

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria*
ที่ก่อให้เกิดโรคนแมลงด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

DIVERSITY ANALYSIS OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI: *Beauveria* spp.
BY MOLECULAR TECHNIQUES



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-SC-M-020-010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DIVERSITY ANALYSIS OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI: *Beauveria* spp.

BY MOLECULAR TECHNIQUES



SUWICHA HANGTRAKUL

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

2009

KMITL-2009-SC-M-020-010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2009

OFFICE OF ACADEMIC ADMINISTRATION

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงด้วยเทคนิคทางโมเลกุล
Diversity Analysis of Entomopathogenic Fungi: *Beauveria* spp. by Molecular Techniques

นักศึกษา นางสาวสุวิษา อังตระกูล
รหัสประจำตัว 49068306
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนรรักษ์	โพธิ์เยี่ยม	
ผศ.ดร.สุพัตรา	โพธิ์เยี่ยม	
รศ.ดร.เกษม	สร้อยทอง	
รศ.ดร.อรินทิพย์	ธรรมชัยพิเนต	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY / LADKRABANG

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 6 มีนาคม พ.ศ. 2552 เวลา 09.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารณวลัยลักษณ์ 1 ห้อง 424

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัครวัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่....25.....เดือน.....พฤษภาคม.....พ.ศ.2552.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงด้วยเทคนิคทางโมเลกุล
นักศึกษา	นางสาวสุวิษา อั้งตระกูล
รหัสนักศึกษา	49068306
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษา(ร่วม)	รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง

บทคัดย่อ

เชื้อราสกุล *Beauveria* เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงที่นำมาใช้เป็นสารชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช การศึกษาครั้งนี้ได้รวบรวมเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่แยกได้จากแมลงและดินในประเทศไทยจำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต นำมาศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพทั้งจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางโมเลกุล โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาศึกษาจากลักษณะของโคโลนี และจากอัตราส่วนความยาวและความกว้างของสปอร์ ซึ่งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถจำแนกได้อย่างได้แน่นอนว่าเป็นเชื้อรา *Beauveria* สปีชีส์ใด จึงนำเฉพาะไอโซเลต B001-B029 มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ในบริเวณ internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) และบางส่วนของ 18S และ 28S ของ rDNA (ribosomal DNA) โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ PN3/PN16 สามารถเพิ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ชนิดอื่นที่มีขนาด 600 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ และจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *HhaI* (*AspLEI*) สามารถแยกเชื้อรา *Beauveria bassiana* จำนวน 25 ไอโซเลต ออกจากเชื้อรา *Beauveria brongniartii* จำนวน 4 ไอโซเลตได้ และเมื่อจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบด้วยโปรแกรม ClustalX และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโดยใช้ Kimura-two parameter จากจำนวนชุดข้อมูล 1000 ชุด ด้วยโปรแกรม PHYLIP หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree ในบริเวณ ITSs สามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้อย่างชัดเจนเป็น 3 กลุ่ม คือ เชื้อรา *B. bassiana*, *B. brongniartii* และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ซึ่งนำมาใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม

Thesis Title	Diversity Analysis of Entomopathogenic Fungi: <i>Beauveria</i> spp. by Molecular Techniques
Student	Miss Suwicha Hangtrakul
Student ID	49068306
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2009
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Supattar Poaim
Thesis Co Advisor	Assoc. Prof. Dr. Kasem Soithong

ABSTRACT

Beauveria spp. have been known as entomopathogenic fungi that widely used as biological control agent. In this study, we were collected 30 isolates of *Beauveria* spp. from insects and soil in Thailand. Diversity has been investigated by using morphological and molecular techniques. Morphological, based on colony pattern and spore dimensions could not correctly identify according to species. Genetic diversity of *Beauveria* spp. isolate B001-B029 were detected by using polymerase chain reaction (PCR), sequencing and polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of internal transcribed spacer region (ITS1-5.8S-ITS2) and small portion of 18S and 28S rDNA (ribosomal DNA). ITS1/ITS4 and PN3/PN16 primers were detected a unique fragment of approximately 600 and 900 bp, respectively. Based on the RFLP patterns, the isolates were divided into two distinct groups that were observed with *AluI* and *HhaI* (*AspLEI*), PCR-RFLP technique successfully distinguished 25 *Beauveria bassiana* isolates from 4 *Beauveria brongniartii* isolates. The multiple sequences were aligned and determined with ClustalX software. The consensus trees were constructed using Kimura-two parameter in the PHYLIP package by 1000 bootstrap resembling. Phylgenetic relationships among ITSs sequence showed homology between the species and all of them were clustered to three main groups; *B. bassiana*, *B. brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* were clustered to be out-group from all *Beauveria* spp.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา โปธิเอี่ยม ที่ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหา ตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เกษม สร้อยทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางในการศึกษา ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อราบางส่วน และสละเวลาในการตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุรักษ์ โปธิเอี่ยม ประธานสอบวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาสละเวลาในการ ตรวจสอบความถูกต้อง พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววินทรีย์แห่งชาติ และ Dr. Ohnmar Myo Aung ซึ่งให้ความ อนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อราบางส่วน และขอบคุณกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย

ขอขอบคุณพี่พยอม และพี่น้องที่ต นักวิทยาศาสตร์ที่ใจดี คอยอำนวยความสะดวก และให้ความ ช่วยเหลือในส่วนของการทำงาน และขอบคุณนายศรัณย์ สุขวัฒน์ เพื่อนที่คอยหวังดีและให้ความ ช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบอบแด่คุณแม่โสภา ฮังตระกูล แม่ที่ดีและน่ารักที่สุด ขอกราบขอบพระคุณในความรักที่มีให้ลูกเสมอมา

นางสาวสุวิชา ฮังตระกูล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญรูป.....	VIII
สารบัญตาราง.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบข่ายของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....	4
2.1 เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง.....	4
2.1.1 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง.....	4
2.1.2 สารพิษจากเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง.....	5
2.1.3 ประเภทของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง.....	5
2.2 เชื้อราสกุล <i>Beauveria</i>	6
2.2.1 อนุกรมวิธานของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i>	6
2.2.2 ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i>	7
2.2.2.1 เชื้อรา <i>B. bassiana</i>	7
2.2.2.2 เชื้อรา <i>B. brongniartii</i>	8
2.3 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย.....	10
2.3.1 เทคนิคอาร์เอฟแอลพี.....	10
2.3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....	11
2.4 การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต.....	12
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	20
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์.....	20
3.1.1 สารเคมี.....	20
3.1.2 อุปกรณ์.....	21
3.2 วิธีการทดลอง.....	21
3.2.1 แหล่งที่มาและการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> จากธรรมชาติ.....	21
3.2.1.1 การเก็บตัวอย่างดินและแมลง.....	22
3.2.1.2 การแยกเชื้อจากตัวอย่างดิน.....	22
3.2.1.3 การแยกเชื้อจากตัวอย่างแมลง.....	22
3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	23
3.2.2.1 ลักษณะโคโลนีและสีของอาหารของเชื้อรา.....	23
3.2.2.2 ลักษณะเชื้อรารายได้กล้องจุลทรรศน์.....	23
3.2.3 การศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....	23
3.2.3.1 การเตรียมเส้นใยรา.....	23
3.2.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ.....	24
3.2.3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITSs ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	24
3.2.3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์.....	25
3.2.3.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี.....	25
3.2.3.6 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยชีวสารสนเทศด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0.....	26
3.2.3.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....	26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	28
4.1 แหล่งที่มาและการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> จากธรรมชาติ.....	28
4.1.1 แหล่งที่มาของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i>	28
4.1.2 ผลการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i>	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i>	32
4.2.1 ลักษณะโคโลนีและสีของอาหารของเชื้อรา.....	32
4.2.2 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา.....	33
4.3 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....	41
4.3.1 ผลของการสกัดดีเอ็นเอ.....	41
4.3.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITSs ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	41
4.3.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4.....	42
4.3.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16.....	42
4.3.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์.....	45
4.3.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี.....	48
4.3.4.1 ผลการศึกษาในบริเวณ ITSs.....	48
4.3.4.2 ผลการศึกษาในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA.....	52
4.3.5 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยชีวสารสนเทศด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0.....	56
4.3.6 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....	59
4.3.6.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ในบริเวณ ITSs.....	59
4.3.6.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S.....	61
4.3.6.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ในบริเวณ ITSs และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S ร่วมกัน.....	62
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	68

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บรรณานุกรม.....	70
ภาคผนวก ก.....	76
ภาคผนวก ข.....	77
ภาคผนวก ค.....	79
ประวัติผู้เขียน.....	81



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
vii
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	วงจรชีวิตของเชื้อราที่ก่อโรคในแมลง.....5
2.2	ลักษณะของเชื้อรา <i>C. bassiana</i> และ <i>B. bassiana</i>8
2.3	ลักษณะของเชื้อรา <i>C. brongniartii</i> และ <i>B. brongniartii</i>9
2.4	แสดงหลักการของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี.....11
2.5	แผนภาพแสดงการจัดเรียงตัวของบริเวณต่างๆ บน rDNA.....12
2.6	แสดงตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs.....13
4.1	พื้นที่เก็บตัวอย่างดินและแมลงจากธรรมชาติในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย.....29
4.2	แมลงที่พบในธรรมชาติซึ่งถูกเชื้อราเข้าทำลาย ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อรา สกุล <i>Beauveria</i> ที่คัดแยกได้จากแมลงจำนวน 5 ไอโซเลต.....30
4.3	ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 18 ไอโซเลต.....35
4.4	ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ในกลุ่มที่ 2 จำนวน 5 ไอโซเลต.....37
4.5	ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ในกลุ่มที่ 3 จำนวน 3 ไอโซเลต.....38
4.6	ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ในกลุ่มที่ 4 และ 5 จำนวน 4 ไอโซเลต.....38
4.7	คุณภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....41
4.8	ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในบริเวณ ITSs ของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4.....43
4.9	ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16.....44
4.10	แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา <i>B. bassiana</i> และเชื้อรา <i>B. brongniartii</i>46
4.11	ผลการศึกษาด้านเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีบริเวณ ITSs ของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>AluI</i>50
4.12	ผลการศึกษาด้านเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีบริเวณ ITSs ของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HhaI</i> (<i>AspLEI</i>).....51
4.13	ผลการศึกษาด้านเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>AluI</i>54
4.14	ผลการศึกษาด้านเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HhaI</i> (<i>AspLEI</i>).....55

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.15 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ในบริเวณ ITSs จำนวน 12 ไอโซเลต.....	65
4.16 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA จำนวน 17 ไอโซเลต.....	66
4.17 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA จำนวน 29 ไอโซเลต.....	67



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับบนตำแหน่ง rDNA.....	14
3.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ ตำแหน่งจดจำ สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาและหยุดปฏิกิริยา ของเอนไซม์.....	27
4.1 รหัสไอโซเลต แหล่งอาศัย และแหล่งที่มาของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i>	31
4.2 แสดงขนาดความยาวและความกว้างของสปอร์ของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ที่มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์น้อยกว่า 2.0.....	39
4.3 แสดงขนาดความยาวและความกว้างของสปอร์เชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> ที่มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์มากกว่า 2.0.....	40
4.4 แสดงผลการตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITSs และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ของเชื้อรา <i>B. bassiana</i> และ <i>B. brongniartii</i> ด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0.....	58

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

แมลงศัตรูพืชเป็นปัญหาที่สำคัญต่อเกษตรกร ที่ทำให้ผลผลิตทางการเกษตรเสียหายและไม่มีคุณภาพ เกษตรกรส่วนใหญ่มักใช้สารเคมีในการแก้ปัญหาการระบาดของแมลงศัตรูพืช ซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีราคาแพง หากแมลงศัตรูพืชเกิดการดื้อ ทำให้ต้องเพิ่มปริมาณสารเคมีที่ใช้ และการตกค้างสะสมของสารเคมีในผลผลิตและสิ่งแวดล้อม อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภคได้ ดังนั้นการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) หรือการนำเอาสิ่งมีชีวิตมาควบคุมสิ่งมีชีวิตด้วยกันเองเป็นอีกแนวทางที่จะช่วยลดการใช้สารเคมีได้ การนำเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) ตามธรรมชาติ มาใช้ในการควบคุมแมลงเป็นทางเลือกหนึ่ง ซึ่งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงมีมากกว่า 700 ชนิด แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่พบได้บ่อยและมีบทบาทสำคัญทางการเกษตร ได้แก่ สกุล *Beauveria* สกุล *Metarhizium* สกุล *Paecilomyces* สกุล *Aschersonia* สกุล *Verticillium* และสกุล *Entomophthora* เป็นต้น (Samson และคณะ, 1988; Moore-Landecker, 1996; Hywel-Jones, 2002)

การจัดจำแนกเชื้อราจะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เป็นหลัก เช่น ลักษณะของเส้นใยและสปอร์ สีของอาหาร และลักษณะการสืบพันธุ์ เป็นต้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวนั้นมีความหลากหลาย และมักจะเปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ส่งผลให้การจำแนกชนิดของเชื้อราเกิดการผิดพลาดได้ง่าย มีผลทำให้การนำไปใช้กับแมลงศัตรูพืชไม่ได้ผล การตรวจสอบมักใช้ระยะเวลา และต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญและมีประสบการณ์ ดังนั้นการแก้ปัญหานี้คือการนำเทคนิคทางโมเลกุล (molecular techniques) เข้ามาประยุกต์ใช้เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อราที่ถูกต้อง ซึ่งมีความแม่นยำและให้ผลรวดเร็ว เพื่อให้การควบคุมมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเทคนิคที่นำมาใช้อย่างแพร่หลายในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราในปัจจุบันมีอยู่ด้วยกันหลายเทคนิค ได้แก่ เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP; Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) (Neueglise และคณะ, 1994, 1997; Glare และ Inwood 1998; Coates และคณะ, 2002) เทคนิคอาร์เอฟดี (RAPD; Random Amplified Polymorphism DNA) (Bidochka และคณะ, 1994; Maurer และคณะ, 1997) เทคนิคเอสซีเออาร์ (SCAR; Strain Specific Sequencing Characterized Amplified Region) (Castrillo และคณะ, 2003) และเทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism;) (de Muro และคณะ, 2003) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตอย่างมาก แต่ยังมีข้อมูลของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงอยู่น้อย สำหรับการศึกษาเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงในสกุล *Beauveria* ในประเทศไทยมีเพียงข้อมูลด้านประสิทธิภาพของเชื้อในการกำจัดหรือควบคุมแมลงศัตรูพืช (อรณพและสุรไกร, 2528; สมบัติ และคณะ, 2541; เกษมและสันติภาพ, 2545) แต่ยังไม่พบรายงานถึงการรวบรวมตัวอย่าง และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังนั้นจึงควรต้องมีการรวบรวมตัวอย่าง พร้อมทั้งศึกษาความหลากหลายของเชื้อราในสกุล *Beauveria* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางโมเลกุล

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 รวบรวมสายพันธุ์เชื้อราในสกุล *Beauveria* ในประเทศไทย
- 1.2.2 จำแนกสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายของเชื้อราในสกุล *Beauveria* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา
- 1.2.3 จำแนกสายพันธุ์และศึกษาความหลากหลายของเชื้อราในสกุล *Beauveria* ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล
- 1.2.4 วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีสร้าง phylogenetic tree ของเชื้อราในสกุล *Beauveria*

1.3 ขอบข่ายของงานวิจัย

ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราในสกุล *Beauveria* ที่พบได้ในประเทศไทย ทั้งด้านสัณฐานวิทยาและทางโมเลกุล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 มีฐานข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Beauveria* ในประเทศไทย
- 1.4.2 ทราบถึงความใกล้ชิดและความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Beauveria* ในประเทศไทย
- 1.4.3 สามารถนำฐานข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบและยืนยันชนิดของเชื้อราที่จะใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1.4.4 ค้นพบเชื้อราชนิดใหม่ในสกุล *Beauveria* จากแหล่งธรรมชาติ และแปลงเกษตรกรรม
ของประเทศไทย
- 1.4.5 ส่งเสริมการเกษตรที่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตและการรักษาสภาพแวดล้อมโดยหลีกเลี่ยง
การใช้สารเคมี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง

เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) เป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งในการควบคุมประชากรของแมลง ซึ่งโดยปกติเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงมักเกิดขึ้นเองในธรรมชาติ แต่ไม่รุนแรง สำหรับการระบาดของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงอาจเกิดขึ้นได้เป็นครั้งคราว และทำลายประชากรแมลงอย่างกว้างขวาง (มลิวัลย์, 2544) โดยเชื้อราที่ก่อโรคมักมีความเป็นอยู่แบบปรสิต (parasite) อาศัยอยู่ภายในลำตัวของแมลงอาศัย ใช้เนื้อเยื่อภายในร่างกายเพื่อดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงที่พบได้ในประเทศไทยมีหลายสกุล เช่น *Cordyceps*, *Hypocrella*, *Ophiocordyceps*, *Torrubiella*, *Acremonium*, *Aschersonia*, *Beauveria*, *Entomophthora*, *Cladosporium*, *Hymenostilbe*, *Isaria* และ *Paecilomyces* เป็นต้น (Aung, 2008)

2.1.1 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง

โดยส่วนใหญ่สปอร์ราบบแมลงศัตรูพืชจะออกฤทธิ์เมื่อแมลงศัตรูพืชมกินเข้าไป แต่เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงจะสามารถออกฤทธิ์ได้โดยตรงเมื่อสปอร์เกาะติดที่ผิวของแมลง โดยเมื่อสปอร์ของเชื้อราติดไปติดอยู่กับผนังลำตัวของแมลง และเมื่อมีความชื้นเหมาะสม สปอร์จะแทงทะลุผนังลำตัว โดยเฉพาะกับบริเวณผนังลำตัวแมลงที่มีความอ่อนบางจะสามารถแทงทะลุได้ง่าย เช่น รอยต่อระหว่างปล้อง หรือข้อต่อของระยางค์ต่างๆ เข้าสู่เนื้อเยื่อของแมลง โดยอาศัยน้ำย่อยต่างๆ คือ ไลเปส (lipase) โปรทีเนส (protenase) และไคตินเนส (chitinase) หลังจากนั้นเชื้อราจะเจริญเข้าสู่ช่องว่างของตัวแมลง เมื่อสภาพความชื้นในช่องว่างตัวแมลงเหมาะสมก็จะเจริญเติบโตสร้างเส้นใยจำนวนมาก ทำลายชั้นไขมันและแพร่กระจายอยู่ทั่วในช่องว่างภายในลำตัว แมลงจะตายและเส้นใยจะเพิ่มจำนวนจนอัดแน่นอยู่ภายในซากแมลง เมื่อแมลงตายเส้นใยจะพัฒนาต่อไปโดยเจริญผ่านผนังลำตัวแมลงออกสู่นอกตัวแมลง และสร้างสปอร์ขึ้นปกคลุมผนังลำตัวด้านนอกของแมลง สปอร์จะแพร่กระจายไปตามลม ผ่น หรือติดไปกับแมลงอื่น โดยเมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็จะทำลายแมลงต่อไป (กลุ่มงานชีววิถี, 2549) ดังแสดงวงจรชีวิตของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง ในรูปที่

2.1



รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง

ที่มา : กลุ่มงานชีววิถี, 2549

ลักษณะของแมลงที่ถูกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงเข้าทำลาย จะแสดงอาการของการเป็นโรค คือ กินอาหารน้อยลง ไม่เคลื่อนไหว สีผนังลำตัวแมลงมักจะเปลี่ยนไป เส้นใยของเชื้อราจะดูดน้ำและสารอาหารจากแมลงเพื่อการเจริญเติบโต ดังนั้นเมื่อแมลงตายส่วนใหญ่จะมีลักษณะแข็งและแห้ง พบเส้นใยและผงสปอร์ปกคลุมตัวแมลง

2.1.2 สารพิษจากเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง

สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) คือสารพิษธรรมชาติที่สร้างจากเชื้อรา เชื้อราบางสกุลจะสร้างสารเมตาโบไลต์ (toxic metabolite) ที่มีฤทธิ์รุนแรงและใช้ฆ่าแมลงได้ เช่น เดสทรูซินส์ (destruxins) และไซโตซาลาซิน ซี (cytochalasin C) จากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* หรือ บาสเซียนิน (bassianin) บิวเวอริซิน (beauvericin) บาสเซียนโกลด์ (bassianolide) บิวเวอโรไลด์ (beauverolide) และเทเนลลิน (tenellin) จากเชื้อรา *Beauveria bassiana* หรือโอโอสปอรีน (oosporein) จากเชื้อรา *Beauveria brongniartii* บิวเวอริซินและบิวเวอโรไลด์จากเชื้อรา *Paecilomyces fumosoroseus* เป็นต้น (Robert, 1996; Strasser และคณะ, 2000) โดยสารพิษเหล่านี้จะยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลงทำให้แมลงตายได้

2.1.3 ประเภทของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง

เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง 2 ประเภท คือ ออพพอร์ทูนิสติกพาโทเจน (opportunistic pathogens) เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงก่อโรคกับแมลงได้หลายชนิด สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เช่น *B. bassiana*, *M. anisopliae* และ *P. fumosoroseus* เป็นต้น และฟาสติเดียสพาโทเจน (fastidious pathogens) คือเป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงที่มีความจำเพาะกับแมลงบางชนิด ยากต่อการแยกเชื้อและเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Hywel-Jones, 2002) นอกจากนี้ยังอาจจัดแบ่งเป็นพวกออบลิเกตพาโรเจน (obligate pathogens) คือ จำเป็นต้องมีแมลงอาศัย (host) หรือมีชีวิตอยู่ได้เมื่ออยู่ในแมลงอาศัยเท่านั้น และแบบแซโปรโทรฟ (saprotrophs) คือดำรงชีพโดยการดูดซึมสารอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว แต่สามารถเป็นปรสิตในแมลงได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม (Moore-Landecker, 1996)

2.2 เชื้อราสกุล *Beauveria*

2.2.1 อนุกรมวิธานของเชื้อราสกุล *Beauveria*

ในช่วงศตวรรษที่ 16 และ 17 การผลิตผ้าไหมซึ่งเป็นสินค้าสำคัญของประเทศฝรั่งเศสและอิตาลีได้รับความเสียหายจากการตายของตัวอ่อนหนอนไหม จากสิ่งๆที่เรียกกันว่า muscadine มาจากภาษาอิตาเลียน คือ muscadino หมายถึง ผลไม้จากน้ำตาลที่มีกลิ่นคล้ายชะมด หรืออาจมาจากภาษาฝรั่งเศส คือ muscadin หมายถึง ผลไม้จากน้ำตาลและขนนกต่าง ๆ เนื่องจากลำตัวของแมลงที่ตายเปลี่ยนแปลงเป็นซากแข็ง สีขาวคล้ายผลไม้ที่จากน้ำตาล (Hawel-Jones, 2002) ในปี ค.ศ. 1835 Agostino Bassi de Lodi ได้ค้นพบเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง white muscadine ในตัวอ่อนไหม ต่อมา มีการตั้งชื่อเชื้อราชนิดนี้หลายชื่อ ได้แก่ *Botrytis bassiana* (Balsamo, 1835), *Sporotrichum globoliferum* (Spegazzini, 1880), *Isaria vexans* (Pettit, 1895) ต่อมา Beauverie ได้ชี้ให้เห็นว่า เชื้อราชนิดนี้มีลักษณะเฉพาะที่ไม่สามารถจัดให้อยู่ในสกุลใดได้ (Beauverie, 1911) ดังนั้นในปี ค.ศ. 1912 Vuillemin จึงได้ตั้งชื่อสกุลของเชื้อราชนิดนี้ขึ้นใหม่ โดยให้ชื่อสกุลว่า *Beauveria* และตั้งชื่อสปีชีส์ (species) ของเชื้อราสปีชีส์นี้ว่า *bassiana* โดยมีการจัดชั้นอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

ไฟลัม (Phylum) Ascomycota

คลาส (Class) Sordariomycetes

อันดับ (Order) Hypocreales

วงศ์ (Family) Cordycipitaceae

สกุล (Genus) *Beauveria*

ที่มา : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>

เชื้อราสกุล *Beauveria* เป็นเชื้อราที่อยู่ในระยะ anamorph หรือระยะที่มีลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual stage) ซึ่งจะอาศัยสปอร์เพื่อการขยายพันธุ์ แต่ถ้าเชื้อราสกุลนี้อยู่ในระยะ teleomorphs หรือระยะที่มีลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual stage) จะถูกจัดอยู่ในสกุล *Cordyceps* ซึ่งจะมีเพริเทเซีย (perithecia) เกาะติดอยู่บนเส้นใยที่มีรูปร่างคล้ายกระบองหรือสโตรมา เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(stroma) ที่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า เจริญออกจากตัวแมลงอาศัย ทำหน้าที่สร้างสปอร์ที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งการสืบพันธุ์ทั้งสองมีลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด (Shimazu และคณะ, 1988; Li และคณะ, 2001; Sasaki และคณะ, 2007) และเชื้อราบางสปีชีส์เมื่ออยู่ในสภาวะขาดแคลนอาหาร จะมีการสร้างซิงนีมาตา (synnemata) ซึ่งเป็นมัดเส้นใยที่เรียงตัวกันอย่างแน่นหนา ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างสปอร์ที่ทนทานต่อสภาวะดังกล่าว เพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ต่อไป

ปัจจุบันเชื้อราสกุล *Beauveria* มีรายงานไว้ทั้งหมด 7 สปีชีส์ (Glare, 2004; Rehner และ Buckley, 2005; Rehner และคณะ, 2006) โดยเชื้อรา *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata*, *B. amorpha* และ *B. malawiensis* นั้นค้นพบและแยกได้จากแมลง (Samson และ Evans, 1982; de Hoog, 1972; Brady, 1979; Rehner และคณะ, 2006) ในขณะที่เชื้อรา *B. vermiconia* (de Hoog และ Rao, 1975) และ *B. caledonica* (Bisset และ Widden, 1988) นั้นค้นพบและแยกได้จากดิน ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อรา *B. vermiconia* เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคของในแมลง *Hylamorpha elegans* (Coleoptera: Scarabaeidae) ในประเทศชิลี (Glare และคณะ, 1993) แมลงเต่าทองที่อาศัยอยู่ในเปลือกไม้ (bark beetle cadavers) ในป่าของประเทศนิวซีแลนด์ และแมลง *Hylobius abietis* (Curculionidae: Scolytinae) ในประเทศสกอตแลนด์อีกด้วย (Glare และคณะ, 2008) โดยบางสปีชีส์มีระยะ teleomorph ด้วย เช่น *Cordyceps bassiana* คือเชื้อราในระยะ teleomorphs ของเชื้อรา *B. bassiana* (Li และคณะ, 2001; Huang และคณะ, 2002) และ *Cordyceps brongniartii* คือเชื้อราในระยะ teleomorph ของเชื้อรา *B. brongniartii* (Liu และ Liang, 1993; Shimazu และคณะ, 1988; Sasaki และคณะ, 2007) เป็นต้น

2.2.2 ลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อราสกุล *Beauveria*

เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงสกุล *Beauveria* หรือบางครั้งเรียกว่า *C. bassiana* สามารถจำแนกได้จากลักษณะก้านชูสปอร์ ที่มีลักษณะคดเคี้ยวแบบฟันปลา (denticulate zig-zag) ซึ่งยากต่อการมองเห็นเพราะมีขนาดเล็ก และมีกลุ่มช่อของสปอร์ขนาดใหญ่ เชื้อราสกุล *Beauveria* ที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชมี 2 ชนิด คือ *B. bassiana* (Bals.) Vuillemin หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *B. globulifera* (Spegazzini) Picard และเชื้อรา *B. brongniartii* หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *B. tenella* (Delacroix) Siemaszko เนื่องจากเชื้อรา 2 ชนิดนี้สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย และมีฤทธิ์รุนแรงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างได้ผล (Li และคณะ, 2001) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.2.2.1 เชื้อรา *B. bassiana*

เชื้อรา *B. bassiana* ในระยะ teleomorph จะมีสโตรมาสีเหลืองหรือเหลืองอมส้ม ยาว 40-43 มิลลิเมตร กว้าง 2.3-7 มิลลิเมตร เจริญขึ้นมาบนผิวดินและเชื่อมต่อกับตัวแมลงอาศัย (รูปที่ 2.2A) เจริญลักษณะกลมรีคล้ายไข่ (ellipsoidal) สีเหลือง เมื่อเจริญเต็มที่จะมีช่องว่างเปิดออก เพื่อให้สปอร์หลุดออกมาได้ ขนาด 335-535 × 160-295 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.2B) แต่ในกรณีที่เป็นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะ anamorph สปอร์และเส้นใยอยู่รวมกันเป็นกลุ่มช่อขนาดใหญ่ (รูป 2.2C) สปอร์มีลักษณะกลมรีคล้ายไข่ไก่ ขนาด $1.5-4 \times 1.5-3$ ไมโครเมตร เจริญอยู่บนโคนดิโอจีนัสเซลล์ (conidiogenous cell) ที่มีลักษณะคล้ายแจกัน (flask-shaped) หรือทรงกระบอก (subcylindrical) ที่ยื่นยาวออกไป (รูป 2.2D) (Li และคณะ, 2001) โคลินีเรียบเป็นฝุ่นคล้ายแป้งหรือฝุ่นคล้ายชอล์ก ผิวหน้าแตก ผิวสีด้านล่างของอาหารจะแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหาร เช่น ถ้าเป็นอาหาร PDA จะไม่มีสี บนอาหารเจลาตินใสมิซีสซึมฟู เชื้อราชนิดนี้สามารถทำลายแมลงศัตรูพืชได้ถึง 63 ชนิด เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หนอนกระทู้หอม หนอนท่อใบข้าว แมลงหวี่ขาว เพลี้ยไฟ หนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไก่แจ้ส้ม เพลี้ยกระโดด เพลี้ยจักจั่น และไรแดง เป็นต้น (กลุ่มงานชีววิถี, 2549)



รูปที่ 2.2 ลักษณะของเชื้อรา *C. bassiana* และ *B. bassiana* โดยสปอร์มาที่เจริญบนแมลงอาศัย (A) เพริเทเซีย (B) ของเชื้อรา *C. bassiana* และกลุ่มช่อของสปอร์และเส้นใย (C) และก้านชูสปอร์และโคนดิโอจีนัสเซลล์ (D) ของเชื้อรา *B. bassiana*

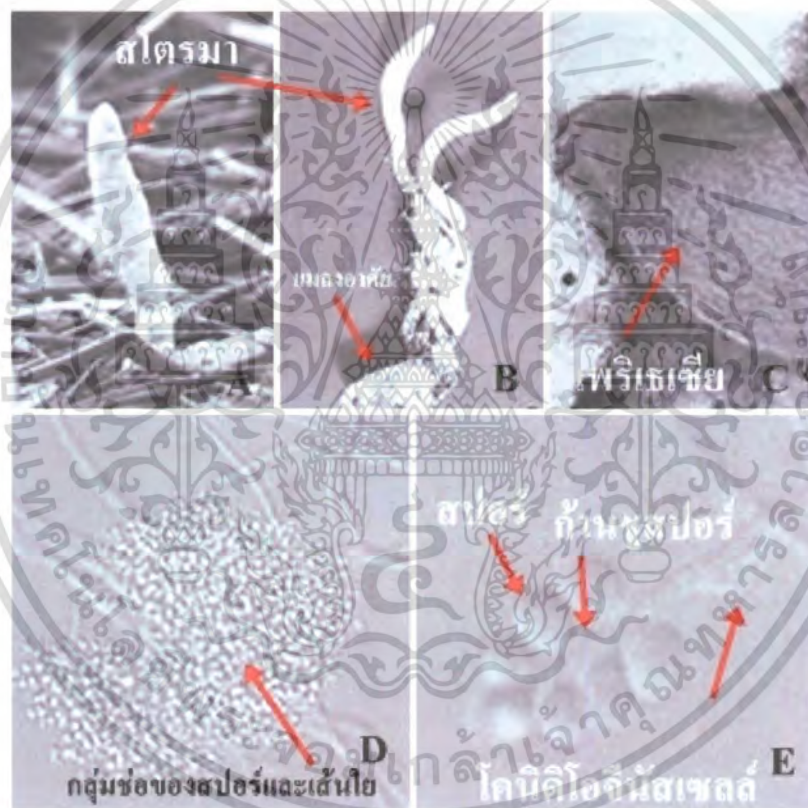
ที่มา : ดัดแปลงจาก Li และคณะ, 2001

2.2.2.2 เชื้อรา *B. brongniartii*

เชื้อรา *B. brongniartii* ในระยะ teleomorph มีสปอร์ยาว 16-42 มิลลิเมตร กว้าง 1.4-

3.7 มิลลิเมตร เจริญขึ้นบนผิวดิน (รูป 2.3A) และเชื่อมต่อกับตัวแมลงอาศัย (รูปที่ 2.3B) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์ การนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพริเซเซีย มีลักษณะกลมรีคล้ายไข่ สีเหลือง เมื่อเจริญเต็มที่จะมีช่องว่างเปิดออกเพื่อให้สปอร์หลุดออกมาได้ มีขนาด $394-580 \times 163-310$ ไมโครเมตร (รูปที่ 2.3C) แต่ในกรณีที่เป็นระยะ anamorph สปอร์และเส้นใยอยู่รวมกันเป็นกลุ่มช่อขนาดใหญ่ (รูป 2.3D) สปอร์เจริญอยู่บนโคนดิโอจีนัสเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายแจกัน หรือทรงกระบอกที่ยื่นยาวออกไป (รูป 2.3E) มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และไม่มีสี สปอร์มีลักษณะเป็นรูปกลมรีคล้ายไข่ไก่ ขนาด $2.3-3.2 \times 0.8-2.2$ ไมโครเมตร หรือทรงกลมรี (oval) ขนาด $2.7-3.8 \times 1.1-1.7$ ไมโครเมตร (Sasaki และคณะ, 2007) โคนดิโอจีนัสเซลล์ เส้นใยฟูอัดตัวกันค่อนข้างแน่น เมื่อเปียกจะราบไปกับผิวของอาหาร ในประเทศไทยเชื้อราชนิดนี้สามารถทำลายแมลงศัตรูพืชได้หลายอันดับ ได้แก่ Diptera, Lepidoptera, Othoptera และ Coleoptara เป็นต้น (Aung, 2008)



รูปที่ 2.3 ลักษณะของเชื้อรา *C. brongniartii* โดยแสดงสโตรมาที่เจริญขึ้นมาบนผิวดิน (A) สโตรมาที่เชื่อมต่อกับตัวแมลงอาศัย (B) และเพริเซเซีย (C) ของเชื้อรา *C. brongniartii* และลักษณะของเชื้อรา *C. brongniartii* และกลุ่มช่อของสปอร์และเส้นใย (D) ลักษณะสปอร์ก้านชูสปอร์ และ โคนดิโอจีนัสเซลล์ (E) ของเชื้อรา *B. brongniartii*

ที่มา : คัดแปลงจาก Sasaki และคณะ (2007)

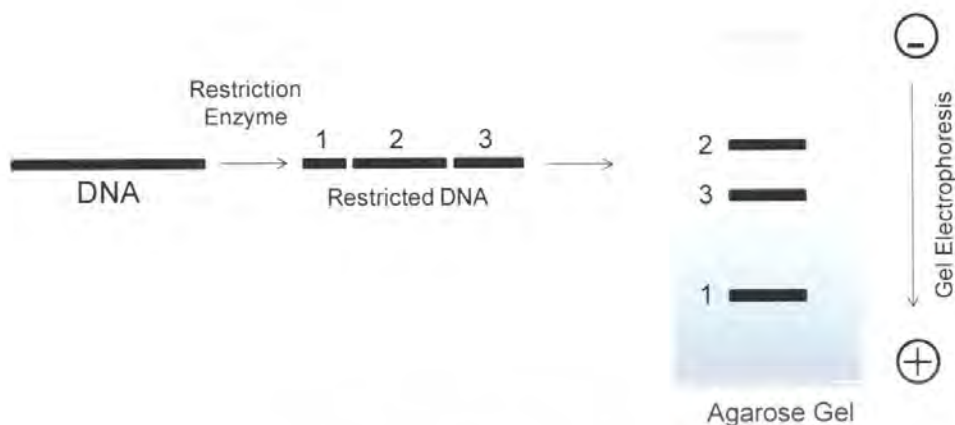
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย

2.3.1 เทคนิคอาร์เอฟแอลพี

อาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) หมายถึงความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเก็บอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลบางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียในรูปของดีเอ็นเอ โมเลกุลของดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนี้มีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เองหรือเหตุอื่น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ได้มีเพียงการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวเท่านั้น อาจมีการเปลี่ยนแปลงถึงระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (duplication) มีการตัดเรียงตัวใหม่ของส่วนของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement หรือ inversion) หรือมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือจากต่างโครโมโซม (transposition) โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต แต่ละชนิดจนสามารถกล่าวได้ว่าไม่มีสิ่งมีชีวิตคู่ใดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเหมือนกัน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) หรือพืชที่เกิดจากการสืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ ความหลากหลายดังกล่าวนี้สามารถตรวจสอบได้โดยหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแล้วนำมาเปรียบเทียบกัน แต่เป็นวิธีทำได้ยากและใช้เวลานาน วิธีที่ง่ายกว่า คือนำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์นั้น

เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย และจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่ต้องมีการเรียงตัวของเบสแบบจำเพาะ เรียกว่า ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมาย โมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากแหล่งต่างกันและมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป หรือมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่ง ดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำมาตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิม เรียกว่าเกิดโพลิมอร์ฟิซึม หรืออาร์เอฟแอลพี (สุรินทร์, 2548) โดยหลักการของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงหลักการของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี

ที่มา : ดัดแปลงจาก Daniel และ Sullivan, 2000

2.3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จะใช้ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) มาช่วยในการวิเคราะห์ซึ่งชีวสารสนเทศเป็นศาสตร์แขนงใหม่ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับค่านำความรู้ด้านเทคโนโลยีสารสนเทศมาใช้ในการศึกษาและใช้เพื่อการจัดการกับข้อมูลจำนวนมากที่ได้จากการวิจัยด้านชีวภาพ (biological Science) เช่น การนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีมาเปรียบเทียบทีละคู่ (pairwise sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ซึ่งทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่นั้นว่าเหมือนหรือต่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล แล้วแสดงออกมาเป็นคะแนนในรูปของ graphic view รวมไปถึงการแสดงข้อมูลทั้งหมดของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล เช่น เลขประจำตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) รายละเอียดต่างๆ เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณใด แหล่งที่มา หรือการใช้โปรแกรม Webcutter 2.0 มาใช้ตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree analysis) มีความสำคัญในการจัดจำแนกกลุ่มและศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในปัจจุบัน โปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมาก ในแง่ของ phylogenetic tree building method โปรแกรมซึ่งเป็นที่นิยมมากคือโปรแกรม PHYLIP ถูกเขียนขึ้นโดย Joe Felsenstein (วสันต์ จันทราทิพย์ และคณะ, 2547) โปรแกรม PHYLIP ประกอบไปด้วย phylogenetic analysis method มากมาย เช่น distance matrix, parsimony และ likelihood method ซึ่งมีความยืดหยุ่นในการปรับค่าการทำงานอีกด้วย ซึ่งในงานวิจัยนี้จะเลือกวิธี วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโดยการใช้ distance matrix method

โดยหลักการสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของ phylogenetic tree คือ จัดเรียงข้อมูลของ

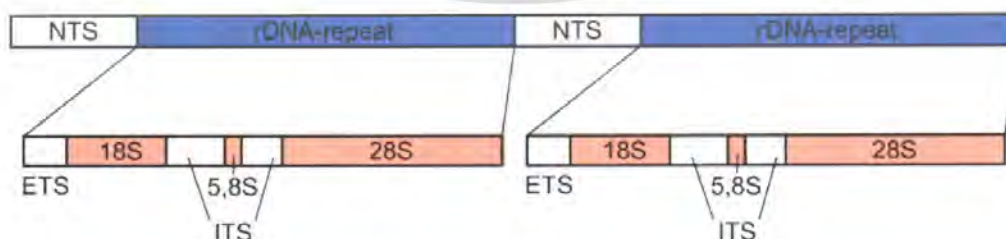
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยโปรแกรม BioEdit เพื่อให้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันอยู่ตรงกัน จากนั้นตรวจเช็คความถูกต้อง และตัดแต่งให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมดที่จะนำมาหาความสัมพันธ์ให้มีความหมายและท้ายเท่ากัน แล้วจึงเปรียบเทียบข้อมูลโดยวิธี alignment ด้วยโปรแกรม เช่น ClustalW, ClustalX เป็นต้น พร้อมใช้ distance matrix method เป็น substitution model แล้วทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (tree construction) โดยอาศัยโปรแกรม PHYLIP ได้แก่ seqboot.exe, dnadist.exe, neighbor.exe และ consense.exe พร้อมปรับแต่งแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม tree viewer หรือ tree editor เช่น TreeView32

2.4 การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต

การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ด้วยเทคนิคทางโมเลกุลประกอบด้วยหลายเทคนิคที่อาศัยหลักการพื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์ ที่น่าสนใจคือเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (Neuvéglise และคณะ, 1994; Wada และคณะ, 2003) โดยความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตศึกษาได้จากหลายบริเวณ เช่น ไรโบโซมัลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA: rDNA) ไมโทคอนเดรีย และยีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต เป็นต้น

สิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต จะมีตำแหน่งที่สังเคราะห์ไปเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิดไรโบโซมัลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA: rRNA) นั่นคือ rDNA ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ (conserved regions) ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จะพบหน่วยซ้ำ (repeat units) ที่เรียงต่อกันบนโครโมโซมในส่วน nucleolar organizing regions (NORs) แต่ละหน่วยซ้ำจะประกอบไปด้วยบริเวณ transcribed ได้แก่ บริเวณ small subunit (SSU) คือส่วน 18S บริเวณ large subunit (LSU) คือส่วน 28S และบริเวณ 5.8S, บริเวณ external transcribed spacers (ETS) ได้แก่ ETS1 และ ETS2, บริเวณ non-transcribed spacer (NTS) และบริเวณ internal transcribed spacers (ITSs) ได้แก่ ITS1, 5.8S และ ITS2 ดังแสดงในรูปที่ 2.5

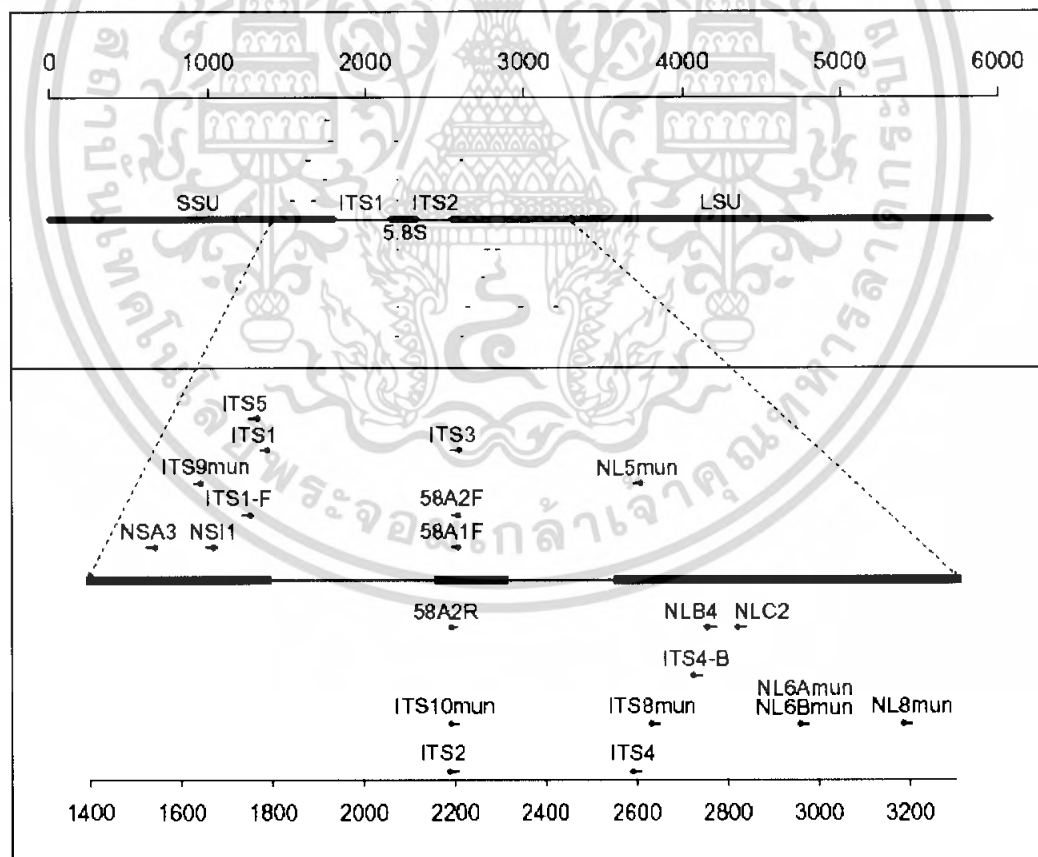


รูปที่ 2.5 แผนภาพแสดงการจัดเรียงตัวของบริเวณต่างๆ บน rDNA

ที่มา : http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Eucaryot_rdna.png

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับบริเวณที่นิยมนำมาศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ บริเวณ 28S rDNA เหมาะสำหรับแยกความแตกต่างในระดับวงศ์ บริเวณ 18S rDNA เหมาะสำหรับแยกความแตกต่างในระดับสกุล เพราะมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง และบริเวณ ITSs บน rDNA มักนิยมนำมาใช้กันโดยทั่วไปเนื่องจากมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่าในบริเวณอื่นบน rDNA ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ได้ (Mitchell และ Zuccaro, 2006) ทำให้บริเวณ ITSs เป็นบริเวณที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการหรือความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITSs ยังนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังนั้นจึงมีการออกแบบไพรเมอร์สากล (universal PCR primer) จากบริเวณอนุรักษ์ ซึ่งง่ายต่อการนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs ที่เป็นบริเวณที่มีจำนวนซ้ำมาก (high copy number) ถึง 30,000 ซ้ำต่อเซลล์ ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จะมีขนาดเล็ก (600-700 คู่เบส) และตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs ต่างกันจะทำให้ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ต่างกันด้วย (รูปที่ 2.6) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาบริเวณ ITSs แสดงดังตารางที่ 2.1



รูปที่ 2.6 แสดงตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs

ที่มา: Martin และ Rygielwicz, 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับบนตำแหน่ง rDNA

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' --> 3')	อ้างอิง
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White และคณะ, 1990
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	White และคณะ, 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	White และคณะ, 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White และคณะ, 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White และคณะ, 1990
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes และ Bruns, 1993
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	Gardes และ Bruns, 1993
PN3	CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC	Wada และคณะ, 2003
PN16	TCCCTTTCAACAATTTACAG	Wada และคณะ, 2003

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

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Mugnai และคณะ (1989); Glare และ Inwood (1998) กล่าวว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Beauveria* จะเปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยแวดล้อม ดังเช่น รูปแบบสปอร์ของเชื้อรา *B. brongniartii* จะมีเฉพาะรูปทรงกลมรีคล้ายไข่หรือทรงกระบอกเท่านั้น แต่สปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* จะเป็นแบบทรงกลมรีเมื่ออยู่บนแมลงอาศัย และเป็นแบบทรงกลม (globose) เมื่อเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์

Neuvéglise และคณะ (1994) ศึกษาความแปรผันของบริเวณ rDNA ของเชื้อรา *B. brongniartii* จำนวน 28 ไอโซเลต และเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 2 ไอโซเลต จากแมลงอาศัยและถิ่นกำเนิดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ PN3 และ PN16 ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs และบางส่วนของบริเวณ 18S และ 28S ที่มีความยาวประมาณ 930 คู่เบส จากนั้นหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด ได้แก่ *HaeIII*, *MspI*, *MboI*, *HhaI*, *AluI*, *EcoRI* และ *SspI* พบความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในเชื้อรา *B. brongniartii* คือแบ่งเชื้อราสายพันธุ์นี้ได้ออกเป็น 7 กลุ่ม โดยมีกลุ่มหนึ่งในนั้นแยกได้จากแมลง *Hoplochelus marginalis* โดยเฉพาะ คือสามารถจำแนกแหล่งที่มาของเชื้อได้ โดยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์นำมาใช้ยืนยันผลการจัดกลุ่มดังกล่าว และทำให้ทราบค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างกลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบริเวณ ITSs ของเชื้อรา *B.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

brongniartii มีความหลากหลาย ถูกอนุรักษ์ไว้เพียง 40 เบอร์เซ็นต์ โดยมีการกลายพันธุ์ในบริเวณ ITS1 และ ITS2 อยู่ในช่วง 0.70-14.67 และ 1.80-16.67 เบอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Hegedus และ Khachatourians (1996) ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific PCR primers) สำหรับตรวจสอบเชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ GK2016 จากประเทศแคนาดา ที่ก่อโรคในตัวเต็มวัยของ *Melanoplus sanguinipes* นั่นคือไพรเมอร์ P1 (5'-AAGCTTCGACATGGTCTG-3') และไพรเมอร์ P3 (5'-GGAGGTGGTGAGGTTCTGTT-3') โดยสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วภายใน 5 วันหลังจากมีการติดเชื้อ

Cravanzola และคณะ (1997) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *B. brongniartii* จำนวน 28 ไอโซเลต ที่แยกจาก *Melolontha melolontha*, *B. brongniartii* จำนวน 22 ไอโซเลต ที่แยกจาก *Melolontha hippocastani*, *B. brongniartii* จำนวน 5 ไอโซเลต จากบริเวณต่างๆ ในแถบยุโรป และ *B. brongniartii* จำนวน 1 ไอโซเลต ที่แยกจาก *Holotrichia serrata* ประเทศอินเดีย โดยประเมินผลความแตกต่างทางพันธุกรรมและจัดจำแนกวิวัฒนาการทางสายพันธุ์ของเชื้อรา *B. brongniartii* ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยไพรเมอร์ OPM01-OPM14, OPM-16 และ OPM-18 พบว่าเชื้อรา *B. brongniartii* แต่ละไอโซเลตมีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ ซึ่งผลที่ได้ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งอาศัยและแหล่งที่มาของเชื้อรา

Glare และ Inwood (1998) จำแนกเชื้อราในสกุล *Beauveria* จากประเทศนิวซีแลนด์ด้วยอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์ พบว่าเชื้อรา *B. bassiana*, *B. vermiconia*, *B. amorpha* และ *B. velata* มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์น้อยกว่า 2 และเชื้อรา *B. brongniartii* และ *B. caledoniaca* มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์มากกว่า 2 ยกเว้นเชื้อรา *B. brongniartii* จากประเทศนิวซีแลนด์ที่อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์เท่ากับ 1.58 นอกจากนี้ยังทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs โดยใช้คู่ไพรเมอร์ TW81/AB28 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs ได้ มีขนาดประมาณ 580 คู่เบส และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีดีด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเอนไซม์ *Bgl*II, *Dra*I และ *Kpn*I ไม่มีจุดตัดบนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และเอนไซม์ *Cla*I และ *Sau*3A สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ แต่ไม่แสดงข้อแตกต่างในแต่ละไอโซเลต และเอนไซม์ *Hae*III, *Mbo*I, *Mse*I, *Tha*I และ *Tsp*509 มีรูปแบบการตัดที่ความหลากหลาย ทำให้สามารถแบ่งเชื้อราออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของเชื้อรา *B. bassiana* จากประเทศนิวซีแลนด์, *B. vermiconia*, *B. amorpha* และ *B. caledonica* และกลุ่มของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* จากแหล่งที่มาอื่นที่ไม่ใช่ประเทศนิวซีแลนด์ ซึ่งผลที่ได้แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อรากับแหล่งอาศัยและแหล่งที่มาได้

Huang และคณะ (2002) ศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *C. bassiana* และเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งแยกได้จากตัวอย่าง *Cordyceps* พบว่าเชื้อราทั้งสองมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ

ITSs เหมือนกัน จึงยืนยันผลได้ว่าเชื้อรา *C. bassiana* คือเชื้อราที่อยู่ระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *B. bassiana*

Coates และคณะ (2002) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs ของเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 9 ไอโซเลต โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS4/ITS5 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs ได้ มีขนาดประมาณ 525 คู่เบส และศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราดังกล่าว พบว่ามีการกลายพันธุ์ภายในสปีชีส์ในบริเวณ ITSs 8.33 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *B. bassiana* พบว่าเอนไซม์ *AluI*, *Hinfl*, *HhaI*, *SinI*, *Tru9AI* และ *ThaI* สามารถตัดและให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism) ภายในสปีชีส์เดียวกัน และบอกความแตกต่างของเชื้อรารายในสปีชีส์เดียวกันได้

Wada และคณะ (2003) ศึกษาเชื้อรา *B. brongniartii* จำนวน 38 ไอโซเลต เชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 5 ไอโซเลต และเชื้อรา *B. amorpha* จำนวน 1 ไอโซเลต จากแหล่งอาศัยและจากถิ่นกำเนิดต่างๆ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs และบางส่วนของบริเวณ 18S และ 28S ได้ มีขนาดประมาณ 950 คู่เบส ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *AluI*, *HaeIII*, *MspI*, *HhaI* และ *AccII* สามารถตัดและให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่าง สปีชีส์ได้ โดยรูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อรา *B. bassiana* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *AluI*, *HaeIII* และ *HhaI* จะให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอต่างจากเชื้อรา *B. brongniartii* และ *B. amorpha* และรูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อรา *B. amorpha* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *MspI* จะให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอต่างจากเชื้อราในสกุล *Beauveria* ทั้งหมด ซึ่งรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *MspI* สามารถบอกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *B. amorpha*, *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ได้

de Muro และคณะ (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่แยกได้จากแมลงและดินจากประเทศเคนยา และจากประเทศต่างๆ จำนวน 27 ไอโซเลต ด้วยเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITSs พบว่าเชื้อรา *B. bassiana* มีความแตกต่างภายในสปีชีส์น้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ คือมีความผันแปรทางพันธุกรรมต่ำ จึงไม่สามารถบอกความแตกต่างของเชื้อรารายในสปีชีส์เดียวกันได้

Castrillo และคณะ (2003) ศึกษาการจำแนกเชื้อรา *B. bassiana* GHA ที่ใช้ในทางการค้าจากเชื้อราชนิดอื่น ได้แก่ เชื้อรา *B. bassiana*, *B. amorpha*, *B. brongniartii* และ *M. anisopliae* ด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี และใช้รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *B. bassiana* GHA ที่แตกต่างจากเชื้อราชนิดอื่น มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ SCAR (sequence-characterized amplified regions) ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง มีความสามารถในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อรา *B. bassiana* GHA ที่มีเข้มข้นเพียง 100 พิโคกรัมได้

Rehner (2005) กล่าวว่าเชื้อราสกุล *Beauveria* มีโคนดิโอจีนัสเซลล์ที่มีลักษณะเป็นรูปทรงกลมสั้น (short-globose) หรือแบบทรงแจกัน (flask-shaped) การจำแนกสปีชีส์ของเชื้อราทำได้ยากเนื่องจากโครงสร้างของเชื้อราเจริญเป็นกลุ่มแบบแตกออกจากกอ (sympodial) และเชื้อราไม่มีลักษณะเฉพาะ ลักษณะสัณฐานวิทยามีการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย จึงใช้ลักษณะสปอร์ที่แตกต่างกันเป็นหลักในการจำแนกชนิดของเชื้อราสกุล *Beauveria* ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มโดยอาศัยรูปร่างสปอร์ได้ 6 กลุ่ม คือ กลุ่ม A สปอร์มีรูปทรงกลม ขนาด 2.3-3.2 ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *B. bassiana*, กลุ่ม B สปอร์มีรูปทรงกลมรีคล้ายไข่ ขนาด $3.3-4.8 \times 2.1-2.5$ ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *B. brongniartii*, กลุ่ม C สปอร์มีรูปทรงกลมแต่ขนาดเล็กกว่ากลุ่ม A ขนาด 2.1-2.9 ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *B. bassiana*, กลุ่ม D สปอร์มีรูปทรงกระบอก ขนาด $3.8-5.2 \times 1.9-2.3$ ไมโครเมตร หรือแบบจุดภาค (comma) ขนาด 1.9-2.5 ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *B. calendonica* และ *B. vermiconia*, กลุ่ม E สปอร์มีรูปทรงกลมรีคล้ายไข่แต่สปอร์ยาวกว่ากลุ่ม B ขนาด $3.0-4.4 \times 2.5-3.2$ ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *Cordyceps* sp. กลุ่ม F สปอร์มีรูปทรงกระบอก ขนาด $4.2-5.2 \times 1.7-2.1$ ไมโครเมตร ได้แก่ เชื้อรา *B. amorpha*

de Muro และคณะ (2005) ศึกษาเชื้อราสกุล *Beauveria* จำนวน 110 ไอโซเลต (เชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 104 ไอโซเลต เชื้อรา *B. brongniartii* จำนวน 1 ไอโซเลต และเชื้อรา *Beauveria* ที่ไม่สามารถบอกรหัสได้จำนวน 5 ไอโซเลต) ที่รวบรวมจาก 7 ประเทศในตะวันออกกลางและเอเชียตะวันตก โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1F/ITS4 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs ได้ มีขนาดประมาณ 560 คู่เบส ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเอนไซม์ที่ไม่ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ได้แก่ *EcoRI* และ *SspI* เอนไซม์ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ แต่ไม่แสดงข้อแตกต่างในแต่ละไอโซเลต ได้แก่ *MboI* และ *HpaII* จากนั้นสุ่มเลือกเชื้อราสกุล *Beauveria* จำนวน 20 ไอโซเลต มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่น พบว่าเอนไซม์ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ แต่ไม่แสดงข้อแตกต่างในแต่ละไอโซเลต คือ *ClaI* และเอนไซม์ที่สามารถตัดและให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอของเชื้อราที่แตกต่างกัน ได้แก่ *AluI*, *HhaI*, *ThaI*, *Tsp509* และ *MseI*

Abdo และคณะ (2006) ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราในสกุล *Beauveria* ที่ได้จากแมลง *Cephalcia tannourinensis* จากป่าในประเทศเลบานอน จากนั้นนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITSs แล้วนำข้อมูลที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าเชื้อรานี้คือเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *B. bassiana* สามารถทำให้เกิดโรคกับแมลง *C. Tannourinensis* ได้ในธรรมชาติ จากนั้นทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลตนี้สามารถทำให้ระยะไข่และระยะหอนตายได้ โดยทำให้ไข่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ในขณะที่หอนจะไม่เคลื่อนไหวและแข็งเกร็งภายใน 5 วัน จากนั้นจะมีการ

งอกของสปอร์ขึ้นมานบนผิวลำตัวของหนอน เมื่อทดสอบประสิทธิภาพโดยใช้สารละลายสปอร์ที่ความเข้มข้น $4.2 \times 10^2 - 5 \times 10^3$ พบว่าจำนวนหนอน 85-100 เปอร์เซ็นต์ จะตายภายใน 7 วัน

Rehner และคณะ (2006) ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของการแพร่กระจายของเชื้อรา *B. bassiana* ที่ก่อให้เกิดโรคใน *Hypothenemus hampei* จากทวีปแอฟริกาและอเมริกา โดยศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อราจาก 2 บริเวณบน rDNA คือบริเวณ *EFutr* และ *Bloc* พบว่าไอโซเลตส่วนใหญ่ทั้งจากทวีปอเมริกาและทวีปแอฟริกาต่างมีจุดกำเนิดหรือแหล่งที่มาเดียวกัน เนื่องจากพบว่ายีนของเชื้อราที่มาจากทั้งสองทวีปนั้นเหมือนกัน และความแตกต่างทางพันธุกรรมที่พบจากรูปแบบดีเอ็นเอบริเวณ *EFutr* และ *Bloc* นั้นมีลักษณะสอดคล้องกัน อาจเกิดจากเชื้อราที่มาจากทวีปอเมริกาสามารถอยู่ในแมลงอาศัยได้หลายชนิด

Estrada และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 11 ไอโซเลต ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Inter-microsatellite (ISSR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำๆ กัน และไพรเมอร์ 873 ISSR ที่มีลำดับเบส (GACA)_n เมื่อนำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มาจากแถบแคริบเบียนทั้งหมด และจากประเทศอื่นๆ โดยทั้ง 2 กลุ่มมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลตจากประเทศคิวบามีความจำเพาะต่อการเกิดโรคในหนอนฝั่เสื่อเจาะลำต้นอ้อยมากกว่าไอโซเลตอื่นๆ

Hadapad และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *B. brongniartii* จากแมลงอาศัยและจากถิ่นกำเนิดต่างๆ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่าเชื้อรา *B. brongniartii* ที่ได้จากแหล่งอาศัยที่ต่างกัน คือแมลงสกุล *Melolontha* และสกุล *Holotrichia* และแหล่งที่มาต่างกัน มีความสามารถในการก่อโรคต่างกัน และมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันด้วย

Sasaki และคณะ (2007) ศึกษาเชื้อรา *C. brongniartii* จาก Coleopteran larvae ที่พบในป่าของประเทศญี่ปุ่น เปรียบเทียบกับเชื้อรา *C. brongniartii* ต้นแบบ (holotype) ในประเทศญี่ปุ่น พบว่าลักษณะสัณฐานวิทยามีความแตกต่างกันเล็กน้อย แต่ต่างจากตัวอย่างเชื้อรา *C. brongniartii* จากป่าของประเทศจีนมาก จากนั้นนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs ของเชื้อรา *C. brongniartii* เทียบกับเชื้อรา *B. brongniartii* พบว่าเชื้อราทั้งสองสปีชีส์มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด

Aung (2008) ศึกษาเชื้อราสกุล *Beauveria* ทั้งด้านสัณฐานวิทยาและในระดับโมเลกุลในเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* จากจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย พบว่าขนาดสปอร์ของเชื้อรา *B. brongniartii* มีขนาด 2.2-6 ไมโครเมตร ซึ่งยาวกว่าตัวอย่างเชื้อราจากประเทศบราซิล ญี่ปุ่น เกาหลี สาธารณรัฐประชาชนจีน และฟิลิปปินส์ ที่มีขนาด 2.3-4.2 ไมโครเมตร ส่วนสปอร์ของเชื้อรา *B.*

bassiana จากจังหวัดเชียงใหม่ มีขนาด $1.2-3 \times 1-3$ ไมโครเมตร ที่มีขนาดเล็กกว่าตัวอย่างเชื้อราจาก

ประเทศบราซิล Commonwealth of Independent States (CIS) ฝรั่งเศส สาธารณรัฐประชาชนจีน โปแลนด์ สหรัฐอเมริกา และเวียดนาม ที่มีขนาด $1.7-3.5 \times 1.5-3.1$ ไมโครเมตร อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์ของเชื้อรา *B. brongniartii* แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ไอโซเลตจากแมลงในกลุ่ม Coleoptera มีอัตราส่วนระหว่าง 2-2.3 ไอโซเลตจากแมลงในกลุ่ม Lepidoptera มีอัตราส่วนระหว่าง 1.8-2 และแมลงในกลุ่ม Diptera, Orthoptera และแมลงที่ไม่สามารถจัดจำแนกกลุ่มได้ มีอัตราส่วนระหว่าง 1.3-1.6 โดยแมลงในกลุ่ม Diptera มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์ของเชื้อรา *B. brongniartii* เท่ากับ 1.3 ซึ่งเป็นขนาดที่เล็กกว่าสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

- 3.1.1.1 อาหาร Dichloran-Glycerol Agar (DG18); Merck
- 3.1.1.2 อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA); Scharlar
- 3.1.1.3 อาหาร Potato Dextrose Broth (PDB); Scharlar
- 3.1.1.4 ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Plant Mini Kit; Qiagen
- 3.1.1.5 เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase; Vivantis
- 3.1.1.6 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 12 ชนิด; Vivantis
- 3.1.1.7 สารละลาย Mix dNTPs; Vivantis
- 3.1.1.8 สารละลายบัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer)
- 3.1.1.9 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 100 คู่เบส; Vivantis
- 3.1.1.10 สีย้อม (loading dye); Vivantis
- 3.1.1.11 สารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)
- 3.1.1.12 อะกาโรสเจล (agarose gel)
- 3.1.1.13 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
- 3.1.1.14 น้ำปราศจากไอออน (deionize H₂O)
- 3.1.1.15 แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
- 3.1.1.16 สารละลาย ethylene diamine tetraacetate (EDTA)
- 3.1.1.17 ไพรมเมอร์ (primer); Invitrogen
 - ไพรมเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')
 - ไพรมเมอร์ ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')
 - ไพรมเมอร์ PN3 (5'-CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC-3')
 - ไพรมเมอร์ PN16 (5'-TCCCTTCAACAATTCACG-3')

3.1.2 อุปกรณ์

- 3.1.2.1 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)
- 3.1.2.2 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator)
- 3.1.2.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- 3.1.2.4 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle)
- 3.1.2.5 เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (vortex mixer)
- 3.1.2.6 หลอดทดลอง (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.2.7 ชุดไมโครปิเปตต์ (micropipette set)
- 3.1.2.8 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- 3.1.2.9 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 3.1.2.10 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow)
- 3.1.2.11 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (balance) ; AG 204, Switzerland
- 3.1.2.12 ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส (refrigerator)
- 3.1.2.13 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 3.1.2.14 สไลด์ (slide) และกระจกปิดสไลด์ (cover glass)
- 3.1.2.15 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 3.1.2.16 เข็มเย็บเชื้อปลายแหลม (needle)
- 3.1.2.17 เครื่องไมโครเวฟ (microwave)
- 3.1.2.18 เครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)
- 3.1.2.19 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 3.1.2.20 โกร่งบดยา (mortar and pestle)
- 3.1.2.21 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)
- 3.1.2.22 เครื่องเจาะ (cock borer)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 แหล่งที่มาและการคัดแยกเชื้อราสกุล *Beauveria* จากธรรมชาติ

รวบรวมเชื้อราสกุล *Beauveria* จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยขอความอนุเคราะห์เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) จากบุคคลและหน่วยงานต่างๆ และที่มีจำหน่ายเพื่อการค้า รวมทั้งทำการเก็บตัวอย่างดินและแมลงที่คาดว่าเป็นโรคตายจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ แปลงเกษตร และอุทยานแห่งชาติในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย เพื่อทำการคัดแยกเชื้อราสกุล *Beauveria* จากธรรมชาติ โดยมีวิธีการ

ดังนี้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.1 การเก็บตัวอย่างดินและแมลง

เก็บตัวอย่างดินในบริเวณที่มีความชื้นสูง เช่น บริเวณใต้ต้นไม้ใหญ่หรือริมแหล่งน้ำ โดยทำการขุดให้ลึกประมาณ 3 นิ้วจากผิวดิน และเก็บใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ ส่วนตัวอย่างแมลงจะสามารถสังเกตได้ตามใบไม้และบริเวณผิวดิน โดยหากแมลงที่ตายด้วยเชื้อรามักจะเกาะอยู่บนผิวใบไม้ ตามกิ่งไม้ หรือเกาะติดอยู่กับลำต้นของต้นไม้ อาจถูกกระแสลมพัดหรือน้ำฝนชะให้ตกลงบนพื้นดิน ซึ่งมักตกอยู่บนกองใบไม้แห้งใกล้กับโคนต้นไม้ ดังนั้นขณะที่เก็บจะต้องสังเกตอย่างละเอียด ทั้งบนกองใบไม้และบนผิวดินบริเวณกองใบไม้แห้ง ตัวแมลงจะมีลักษณะแห้งและแข็ง อาจมีผงสปอร์คล้ายแป้งละเอียดสีขาวเจริญออกมาตามข้อปล้องหรือปกคลุมทั่วตัวแมลง หรือมีการงอกของเชื้อราลักษณะเป็นก้อนสโตมาเจริญขึ้นบนซากแมลง จึงเก็บใส่ภาชนะที่เตรียมไว้เพื่อทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างแมลงต่อไป

3.2.1.2 การแยกเชื้อจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน เพื่อนำมาทำสารละลายดิน โดยการชั่งดิน 10 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร ที่มี Tween-80 ประมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 15 นาที ทำการเจือจาง (dilution) ให้มีความเข้มข้นลดลงทีละ 10 เท่า โดยการดูดสารละลายดิน 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร ที่มี Tween-80 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3} จากนั้นดูดสารละลายดินแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร DG18 (ภาคผนวก ก) แล้วเกลี่ย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเชื้อทุกวัน เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ จะเห็นเชื้อราขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) จึงทำการแยกเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยสีขาว สร้างสปอร์เป็นผงคล้ายแป้งสีขาวหรือขาวอมเหลือง ไปวางบนอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เชื้อราเจริญ และนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป

3.2.1.3 การแยกเชื้อจากตัวอย่างแมลง

วางซากแมลงที่เก็บตัวอย่างมาจากการสำรวจลงในจานเพาะเชื้อ แล้วจึงทำการเขี่ยผงสปอร์ที่ปกคลุมบนซากแมลง มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีครอสสตรีก (cross streak plate) บนอาหาร DG18 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญของเชื้อทุกวัน จะเห็นเชื้อราขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยว จึงทำการแยกเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยสีขาว สร้างสปอร์เป็นผงคล้ายแป้งสีขาวหรือขาวอมเหลือง ไปวางบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เชื้อราเจริญ และนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป

3.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.2.2.1 ลักษณะโคโลนีและสีของอาหารของเชื้อรา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราในสกุล *Beauveria* โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ใช้เครื่องเจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยและย้ายมาวางลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ จึงทำการบันทึกภาพลักษณะของโคโลนี รวมทั้งบันทึกการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร

3.2.2.2 ลักษณะเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราบนสไลด์ (slide culture) โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ใช้กระจกปิดสไลด์เสียบลงบนอาหารเยิงประมาณ 45 องศา บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้เส้นใยราเจริญขึ้นมายังกระจกปิดสไลด์ ซ้อมสีเส้นใยด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue (ภาคผนวก ข) ก่อนนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า และบันทึกภาพพร้อมทั้งวัดขนาดสปอร์ด้วยชุดโปรแกรมถ่ายรูปแบบ Nikon ACT-2U Imaging Software จำนวน 30 สปอร์ต่อไอโซเลต ($n=30$) จากนั้นนำขนาดความยาว (length) และความกว้าง (width) ของแต่ละสปอร์มาหาอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง (length/width ratio; L/W) และนำค่าความยาว ความกว้าง และอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างทั้ง 30 สปอร์ มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean \pm S.D.) ของความยาว ความกว้าง และอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์ในแต่ละไอโซเลตด้วยโปรแกรม SPSS เพื่อจัดกลุ่มของตัวอย่างเชื้อราด้วยอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์

3.2.3 การศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

เนื่องจากปัญหาเรื่องการเก็บรักษาเชื้อราต้นแบบของไอโซเลต B030 ได้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นในเชื้อราต้นแบบในระหว่างการศึกษาดังที่กล่าวมาแล้ว จึงไม่มีตัวอย่างเชื้อราไอโซเลต B030 เพื่อใช้ในการศึกษาด้านเทคนิคทางโมเลกุลของเชื้อราสกุล *Beauveria* ดังนั้นจึงศึกษาเฉพาะ ไอโซเลต B001-B029

3.2.3.1 การเตรียมเส้นใยเชื้อรา

เตรียมตัวอย่างเชื้อราสกุล *Beauveria* เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอโดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-5 วัน ใช้เครื่องเจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เจาะที่ปลายเส้นใย และย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร PDB (ภาคผนวก ก) โดยไม่เขย่า บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญที่ผิวของอาหาร จากนั้นเจียเส้นใยเชื้อราลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างเส้นใยโดยเติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปเขย่า และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ่ายเส้นใยเชื้อราที่ได้ลงในโกร่ง แล้วเติมในโตรเจนเหลวประมาณ 50 มิลลิลิตร พร้อมบดให้เส้นใย เชื้อรากลายเป็นผง ตักผงเส้นใยเชื้อราสำหรับสกัดดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 100 มิลลิกรัม

3.2.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเชื้อราจำนวน 29 ไอโซเลต ได้แก่ B001-B029 มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด สำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit โดยนำผงเส้นใยเชื้อราที่เตรียมไว้มาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP 1 (lysis buffer) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และสารละลาย RNase ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เป็น เนื้อเดียวกันโดยการ vortex จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยทำ การกลับหลอดไปมาเบาๆ ทุก 2-3 นาที เพื่อให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP 2 (precipitate buffer) ปริมาตร 130 ไมโครลิตร และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ดูด สารละลายที่ได้ลงใน Qi Ashredder mini spin column (สีม่วง) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดสารละลายส่วนในสไลด์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AP3/E (binding buffer) ปริมาตร 1.5 เท่าของปริมาตรสารละลายส่วน ในสไลด์ ดูดสารละลายที่ผสมแล้วปริมาตร 650 ไมโครลิตร ลงใน DNeasy mini spin column (สีขาว) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำอีกครั้ง) จากนั้นย้ายคอลัมน์ สีขาว ใส่ลงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตรที่มาพร้อมกับชุดสกัดดีเอ็นเอ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW (wash buffer) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงไปอีกครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AE (elution buffer) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำคอลัมน์ที่สวมอยู่กับหลอดทดลองออก ส่วนสไลด์ที่อยู่ในหลอด คือ สารละลายดีเอ็นเอ นำไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ (ภาคผนวก ก) และเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส

3.2.3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITSs ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้นมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์ (PCR product) บริเวณ ITSs โดยใช้คู่ไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ITS1 (TCCGTAGGTGA ACCTGCGG) / ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White และคณะ, 1990) และ PN3 (CCG TTGGTGAACCAGCGGAGGGATC) / PN16 (TCCCTTCA ACAATTCACG) (Neuvéglise และคณะ, 1994; Wada และคณะ, 2003) โดยเตรียมสารละลายที่เป็นส่วนประกอบในเทคนิคพีซีอาร์ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ (forward และ reverse) ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร (ภาคผนวก ข)

สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 200 นาโนกรัม สารละลาย Mixs dNTPs ความเข้มข้น 1.25 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิโมลาร์ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer) ความเข้มข้น 1 เท่า น้ำปราศจากไอออน (deionized H_2O) และเอนไซม์ *Tag* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต นำสารละลายดังกล่าวผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 25 ไมโครลิตร นำส่วนผสมเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle) โดยใช้ปฏิกิริยาสภาวะเดียวกันทั้งสองคู่ไพรเมอร์ ดังนี้ ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทำปฏิกิริยา จำนวน 30 รอบ ตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปศึกษาต่อในเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทคนิค พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีต่อไป

3.2.3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในงานวิจัย นี้ ในระยะแรกได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITSs โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 แต่เมื่อวิเคราะห์ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แต่ละ ไอโซเลตนั้นแตกต่างกัน อยู่ในช่วง 161-515 คู่เบส ซึ่งบางไอโซเลตนั้นสั้นกว่าความเป็นจริง ทำให้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาเปรียบเทียบกันไม่ได้ ดังนั้นตัวอย่างไอโซเลตที่ยังไม่ได้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 แทน เนื่องจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์นี้อยู่บริเวณเดียวกับบริเวณ ITSs แต่มีความยาวมากกว่า ซึ่งทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITSs ได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้น ตัวอย่างเชื้อราที่หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITSs โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ B002, B004-B006, B008-B011, B013, B015, B016 และ B027 และตัวอย่างเชื้อราที่หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 จำนวน 17 ไอโซเลต ได้แก่ B001, B003, B007, B012, B014, B017-B026, B028 และ B029 จากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่มีอยู่ทั้งหมด

3.2.3.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเชื้อราในสกุล *Beauveria* ไอโซเลต B001-B029 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ PN3/PN16 มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 12 ชนิด ได้แก่ *AccII* (*FbII*), *AhaI*, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Bam*HI, *Bsn*I (*Hae*III), *Hha*I (*Asp*LEI), *Mbo*I (*Bss*MI), *Msp*I (*Hpa*II), *Eco*RI, *Sa*II, *Sfr*274I (*Xho*I), *Sma*I และ *Bgl*II โดยเตรียมสารละลายที่เป็นส่วนประกอบในเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ได้แก่ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะความเข้มข้น 1 หน่วย สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme buffer) ความเข้มข้น 1 เท่า และ น้ำปราศจากไอออน นำสารละลายดังกล่าวผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร นำส่วนผสมไปบ่ม (incubation) ในสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยา และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด (ตารางที่ 3.1) ตรวจสอบผลด้วย เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส

3.2.3.6 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยชีวสารสนเทศด้วยโปรแกรม

Webcutter 2.0

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ B002, B004-B006, B008-B011, B013 B015 B016 และ B027 และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 จำนวน 17 ไอโซเลต ได้แก่ B001 B003 B007 B012 B014, B017-B026, B028 และ B029 มาตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเรา โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาจัดเรียงข้อมูลด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อให้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ตรงกัน และตัดนิวคลีโอไทด์ด้าน 5' และ 3' ออกเพื่อให้เท่ากันทุกตัวอย่าง จากนั้นจึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรวจสอบจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 12 ชนิด ได้แก่ *Hha*I (*Asp*LEI), *Bam*HI, *Bsn*I (*Hae*III), *Eco*RI, *Alu*I, *Msp*I (*Hpa*II), *Acc*II (*Fb*II), *Mbo*I (*Bss*MI), *Sfr*274I (*Xho*I), *Sma*I, *Bgl*II และ *Sa*II ด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0

3.2.3.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* โดยหาความสัมพันธ์ 3 รูปแบบ คือ จากบริเวณ ITSs, บริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA และสุดท้ายคือ จากบริเวณทั้งสองมาเทียบเคียงกัน โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณดังกล่าวมาเตรียมข้อมูลเบื้องต้นด้วยโปรแกรม BioEdit และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalX เวอร์ชัน 1.83 (Thompson และคณะ, 1997) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยชุดโปรแกรม PHYLIP เวอร์ชัน 3.6 (Felsenstein, 2004) วิเคราะห์ข้อมูลค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยใช้ Kimura-2-parameter model จากจำนวนชุดข้อมูล (multiple data sets) 1000 ชุด จัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี Neighbor-joining และใช้โปรแกรม Consense คัดเลือกรูปแบบ phylogenetic tree ที่น่าจะเป็นไปได้และถูกต้องมากที่สุด จากนั้นใช้

โปรแกรม TreeView32 ในการตกแต่งรูปแบบของ phylogenetic tree ในตามที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ ตำแหน่งจดจำ สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาและหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งจดจำ (5'-->3')	สภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยา		สภาวะที่ใช้หยุดปฏิกิริยา	
		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
<i>AccII (FblI)</i>	CG↓CG	55	16	None	None
<i>AluI</i>	AG↓CT	37	16	65	20
<i>BamHI</i>	G↓GATCC	37	16	65	20
<i>BsnI (Hae III)</i>	GG↓CC	37	16	80	20
<i>HhaI (AspLEI)</i>	GCG↓C	37	16	None	None
<i>MboI (BssMI)</i>	↓GATC	37	16	None	None
<i>MspI (HpaII)</i>	C↓CGG	37	16	None	None
<i>EcoRI</i>	G↓AATTC	37	16	65	20
<i>SalI</i>	G↓TCGAC	37	16	65	20
<i>Sfr274I (XhoI)</i>	C↓TCGAG	50	16	65	20
<i>SmaI</i>	CCC↓GGG	25	16	65	20
<i>BglI</i>	GCCNNNN↓NGGC	37	16	65	20

หมายเหตุ None คือ ไม่ต้องหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 แหล่งที่มาและการคัดแยกเชื้อราสกุล *Beauveria* จากธรรมชาติ

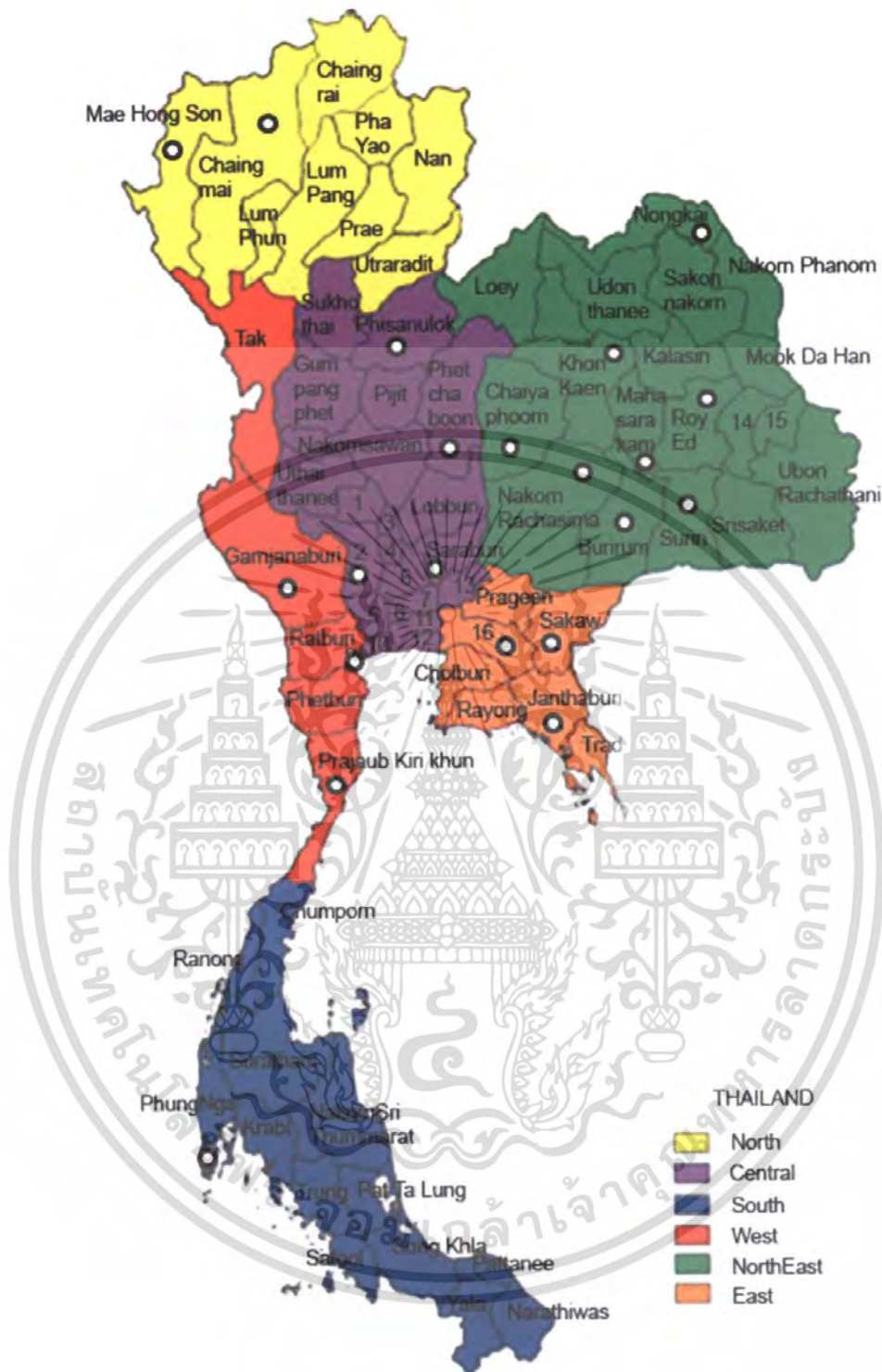
4.1.1 แหล่งที่มาของเชื้อราสกุล *Beauveria*

ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* จากบุคคลและหน่วยงานต่างๆ ได้แก่ รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง (ไอโซเลต B001-B006), ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ (ไอโซเลต B007-B010), Dr. Ohnmar Myo Aung (ไอโซเลต B011-B016, B027 และ B028) รวมทั้งที่มีจำหน่ายเพื่อการค้า (ไอโซเลต B026) นอกจากนี้ยังทำการเก็บตัวอย่างดินและแมลงจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย (ไอโซเลต B017-B025, B029-B030) โดยพื้นที่เก็บตัวอย่างดินและแมลงในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทยแสดงดังรูปที่ 4.1

พื้นที่เก็บตัวอย่างจากธรรมชาติ แบ่งออกเป็นภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน และเชียงใหม่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดหนองคาย นครราชสีมา ขอนแก่น สุรินทร์ มหาสารคาม ขอนแก่น ร้อยเอ็ด บุรีรัมย์ และชัยภูมิ ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดสระบุรี สมุทรสงคราม และสุพรรณบุรี ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา จันทบุรี และสระแก้ว และภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดภูเก็ต ซึ่งจำนวนดินที่เก็บทั้งหมด 100 ตัวอย่าง และจำนวนแมลงทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

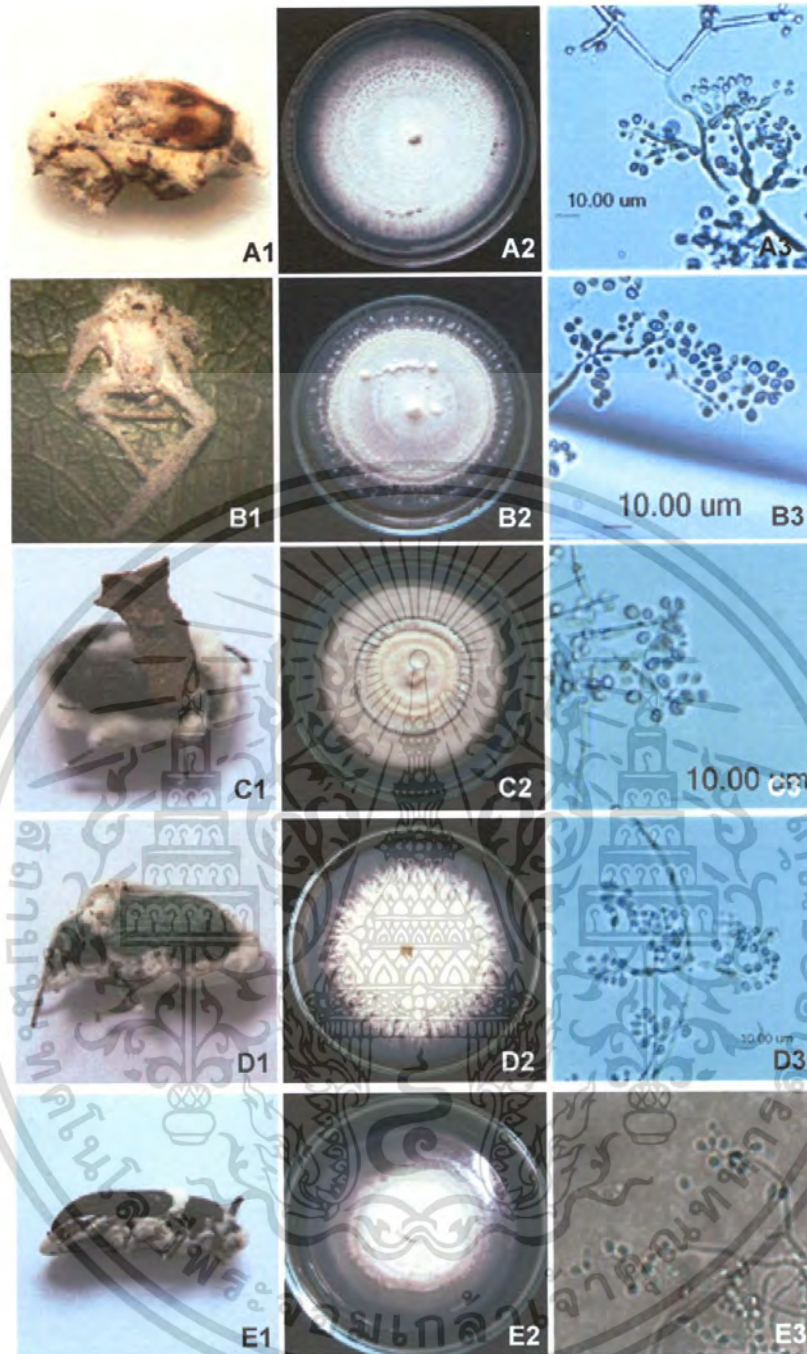
4.1.2 ผลการคัดแยกเชื้อราสกุล *Beauveria*

จากการคัดแยกเชื้อราสกุล *Beauveria* จากตัวอย่างดินจำนวน 100 ตัวอย่าง และแมลงจากธรรมชาติจำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อราสกุล *Beauveria* ได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลต แยกได้จากดิน 6 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต B017-B022 และแยกได้จากแมลง 5 ไอโซเลต โดยมีลักษณะโคโลนีและสปอร์อยู่ในสกุล *Beauveria* ได้แก่ ไอโซเลต B023 (รูปที่ 4.2A1-A3), B024 (รูปที่ 4.2B1-B3), B025 (รูปที่ 4.2C1-C3), B029 (รูปที่ 4.2D1-D3) และ B030 (รูปที่ 4.2E1-E3) สรุปรายละเอียดตัวอย่างเชื้อราที่ใช้ในงานวิจัยจำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต โดยรหัสไอโซเลตแหล่งอาศัย แหล่งที่มาของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในงานวิจัยนี้ แสดงดังตาราง 4.1



รูปที่ 4.1 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินและแมลงในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย (แสดงโดยจุดสีขาว)
ที่มา : ดัดแปลงแผนที่จาก <http://www.thailandtripbooking.com/images/thailand-map.gif>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แมลงที่พบในธรรมชาติซึ่งถูกเชื้อราเข้าทำลาย ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่คัดแยกจากแมลงจำนวน 5 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต B023 (A1-A3), ไอโซเลต B024 (B1-B3), ไอโซเลต B025 (C1-C3), ไอโซเลต B029 (D1-D3) และไอโซเลต B030 (E1-E3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 รหัสไอโซเลต แหล่งอาศัย และแหล่งที่มาของเชื้อราสกุล *Beauveria*

ไอโซเลต	แหล่งอาศัย	แหล่งที่มา
B001	NA ¹	NA ²
B002	NA ¹	NA ²
B003	NA ¹	NA ²
B004	NA ¹	NA ²
B005	NA ¹	NA ²
B006	NA ¹	NA ²
B007	Coleoptera	จังหวัดเชียงราย
B008	Coleoptera	จังหวัดเชียงราย
B009	Isoptera	จังหวัดเชียงราย
B010	Coleoptera	จังหวัดเชียงราย
B011	Coleoptera	จังหวัดเชียงใหม่
B012	Coleoptera	จังหวัดเชียงใหม่
B013	Unidentified insect	จังหวัดเชียงใหม่
B014	Coleoptera	จังหวัดเชียงใหม่
B015	Hymcnoptera	จังหวัดเชียงใหม่
B016	Lepidoptera	จังหวัดเชียงใหม่
B017	soil	จังหวัดกาญจนบุรี
B018	soil	จังหวัดราชบุรี
B019	soil	จังหวัดสมุทรสงคราม
B020	soil	จังหวัดสระบุรี
B021	soil	จังหวัดจันทบุรี
B022	soil	จังหวัดสระแก้ว
B023	Coleoptera	จังหวัดนครราชสีมา
B024	Araneae	จังหวัดจันทบุรี
B025	Coleoptera	จังหวัดเชียงใหม่
B026	commercial isolate	จังหวัดนครสวรรค์
B027	Coleoptera	จังหวัดเชียงใหม่
B028	Coleoptera	จังหวัดเชียงใหม่
B029	Coleoptera	จังหวัดเชียงใหม่
B030	Coleoptera	จังหวัดนครราชสีมา

NA¹ = Not available¹ = ไม่ทราบแหล่งอาศัย, NA² = Not available² = ไม่ทราบแหล่งที่มา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Beauveria*

4.2.1 ลักษณะโคโลนีและสีของอาหารของเชื้อรา

เมื่อนำเชื้อราสกุล *Beauveria* จำนวน 30 ไอโซเลต มาศึกษาลักษณะโคโลนี และสีของอาหาร โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ โดยการบันทึกภาพลักษณะของโคโลนี และบันทึกการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร พบว่ารูปแบบของเชื้อราสามารถจัดเป็นกลุ่มๆ ได้ 5 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 เชื้อรามีการเจริญของเส้นใยสีขาวควบคู่ไปกับการสร้างสปอร์ จึงทำให้มองเห็นโคโลนีเป็นวงซ้อนกันหลายวง สปอร์เป็นผงละเอียดสีขาวอมเหลือง ระยะเวลาในการสร้างสปอร์ประมาณ 3-4 วัน ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะแบนราบไปกับผิวหน้าอาหาร ลักษณะพื้นผิวของอาหารเรียบ สีของอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย คือจะมีสีเหลืองนวลตรงกลางโคโลนี และสีอ่อนลงในบริเวณปลายของเส้นใย โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีจำนวน 18 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต B001 (รูปที่ 4.3A1), B002 (รูปที่ 4.3B1), B003 (รูปที่ 4.3C1), B004 (รูปที่ 4.3D1), B005 (รูปที่ 4.3E1), B006 (รูปที่ 4.3F1), B011 (รูปที่ 4.3G1), B016 (รูปที่ 4.3H1), B017 (รูปที่ 4.3I1), B018 (รูปที่ 4.3J1), B019 (รูปที่ 4.3K1), B020 (รูปที่ 4.3L1), B021 (รูปที่ 4.3M1), B023 (รูปที่ 4.3N1), B024 (รูปที่ 4.3O1), B025 (รูปที่ 4.3P1), B026 (รูปที่ 4.3Q1) และ B029 (รูปที่ 4.3R1)

กลุ่มที่ 2 เชื้อราจะมีการเจริญของเส้นใยสีขาวอมเหลือง สร้างสปอร์เป็นผงสีขาวอมเหลืองอยู่บนเส้นใย การเจริญของเส้นใยจะควบคู่ไปกับการสร้างสปอร์ที่หนาแน่น ระยะเวลาในการสร้างสปอร์ประมาณ 3-4 วัน ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะเป็นร่องกระจายทุกทิศทาง ลักษณะพื้นผิวของอาหารเป็นร่อง สีของอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย คือจะมีสีเหลืองนวล โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต B007 (รูปที่ 4.4A1), B008 (รูปที่ 4.4B1), B009 (รูปที่ 4.4C1), B010 (รูปที่ 4.4D1) และ B030 (รูปที่ 4.4E1)

กลุ่มที่ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราไอโซเลตเดียวกัน ณ ช่วงเวลาเดียวกัน และสภาพแวดล้อมเดียวกัน บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อรา มีลักษณะโคโลนีได้ทั้ง 2 แบบ ซึ่งเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต B014, B015 และ B022 โดยลักษณะโคโลนีแบบแรก เชื้อรา มีเส้นใยสีขาวอมเหลือง ลักษณะฟู และไม่แน่น สปอร์เป็นผงละเอียดสีขาวอมเหลืองอยู่บนเส้นใย การเจริญของเส้นใยควบคู่ไปกับการสร้างสปอร์ แต่การสร้างสปอร์ไม่หนาแน่น ทำให้เป็นผิวหน้าโคโลนีแบนราบไปกับผิวหน้าอาหารและมีลักษณะแตก ระยะเวลาในการสร้างสปอร์ประมาณ 3-4 วัน ลักษณะพื้นผิวของอาหารเรียบ สีของอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย คือจะมีสีเหลืองนวลตรงกลางโคโลนีและสีอ่อนลงในบริเวณปลายของเส้นใย ลักษณะดังกล่าวแสดงดังไอโซเลต B014 (รูปที่ 4.5A1), B015 (รูปที่ 4.5B1) และ B022 (รูปที่ 4.5C1) และลักษณะโคโลนีแบบที่สองคือเชื้อราสร้างซินีมาตา โดยเกิดปุ่มนูนสีขาวบนโคโลนี และยาวกลายเป็นมัดเส้นใยที่เรียงตัวกันอย่าง

แน่นหนา มีความยาวแตกต่างกัน กระจายออกทุกทิศทางบนผิวโคโลนี ลักษณะพื้นผิวอาหารเรียบ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะดังกล่าวแสดงดังไอโซเลต B014 (รูปที่ 4.5A2), B015 (รูปที่ 4.5B2) และ B022 (รูปที่ 4.5C2)

กลุ่มที่ 4 เชื้อราไม่มีเส้นใยฟูสีขาวอมเหลือง ผงสปอร์มีสีขาว แต่ไม่เป็นผงละเอียดและอัดตัวกัน ทำให้มองเห็นผงสปอร์อยู่เป็นกระจุกเจริญอยู่บนเส้นใย เมื่อใช้เข็มเขี่ยผงสปอร์แล้วจะติดกันเป็นก้อน และرابไปกับผิวของอาหาร ระยะเวลาในการสร้างสปอร์ประมาณ 4-5 วัน ผิวหน้าโคโลนีไม่ราบเรียบ มีการเจริญของเส้นใยก่อนการสร้างสปอร์ และมีการสร้างเส้นใยมาก ลักษณะพื้นผิวของอาหารเรียบ สีของอาหารจะมีเปลี่ยนแปลง คือตรงบริเวณที่เชื้อราเจริญมีสีเหลืองอมส้มถึงสีน้ำตาล โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีจำนวน 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต B012 (รูปที่ 4.6A1)

กลุ่มที่ 5 เชื้อราไม่มีเส้นใยสีขาวอมเหลืองเจริญแผ่ออกคล้ายกิ่งไม้ที่แตกแขนงราบไปกับผิวของอาหาร ผงสปอร์มีสีเหลืองอ่อน แต่ไม่เป็นผงละเอียดและอัดตัวกัน ทำให้มองเห็นผงสปอร์อยู่เป็นกระจุก ผิวหน้าโคโลนีไม่ราบเรียบ ระยะเวลาในการสร้างสปอร์ประมาณ 4-5 วัน ลักษณะพื้นผิวของอาหารเรียบ สีของอาหารมีเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย คือตรงบริเวณที่เชื้อราเจริญ จะมีสีเหลืองอมส้มถึงเหลืองอมน้ำตาล โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต B013 (รูปที่ 4.6B1), B027 (รูปที่ 4.6C1) และ B028 (รูปที่ 4.6D1)

จะเห็นว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อราแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกัน และสีของอาหารมีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ซึ่งลักษณะที่หลากหลายดังกล่าวสามารถนำมาจำแนกเชื้อราออกเป็นกลุ่มๆ ได้ และเมื่อสังเกตจากลักษณะผงสปอร์ของเชื้อราของแต่ละกลุ่ม พบว่าเชื้อราในกลุ่มที่ 1-3 มีสปอร์เป็นผงละเอียดคล้ายแป้งฝุ่น ส่วนกลุ่มที่ 4 และ 5 มีสปอร์เป็นผงที่ไม่ละเอียด เมื่อเขี่ยจะไม่ฟุ้ง แต่จะราบไปกับผิวอาหาร โดยลักษณะที่หลากหลายดังกล่าวยังไม่สามารถระบุและยืนยันสปีชีส์ของเชื้อราที่ถูกต้องได้อย่างแน่นอน ดังที่ Mugnai และคณะ (1989) รายงานว่าเชื้อราสกุล *Beauveria* มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย ยากต่อการจำแนกสปีชีส์ และ de Muro และคณะ (2005) รายงานว่าผลการจำแนกชนิดของเชื้อราในสกุล *Beauveria* ไอโซเลต SPT 020 และ *B. brongnairtii* ไอโซเลต SPT R021 ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาขัดแย้งกับการจำแนกชนิดด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ซึ่งพบว่าเทคนิคทางโมเลกุลสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราที่ถูกต้องได้

4.2.2 ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา

จากการศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า และบันทึกภาพพร้อมทั้งวัดขนาดสปอร์ด้วยชุดโปรแกรมถ่ายรูป Nikon ACT-2U Imaging Software พบรูปแบบของสปอร์ 2 กลุ่ม ได้แก่

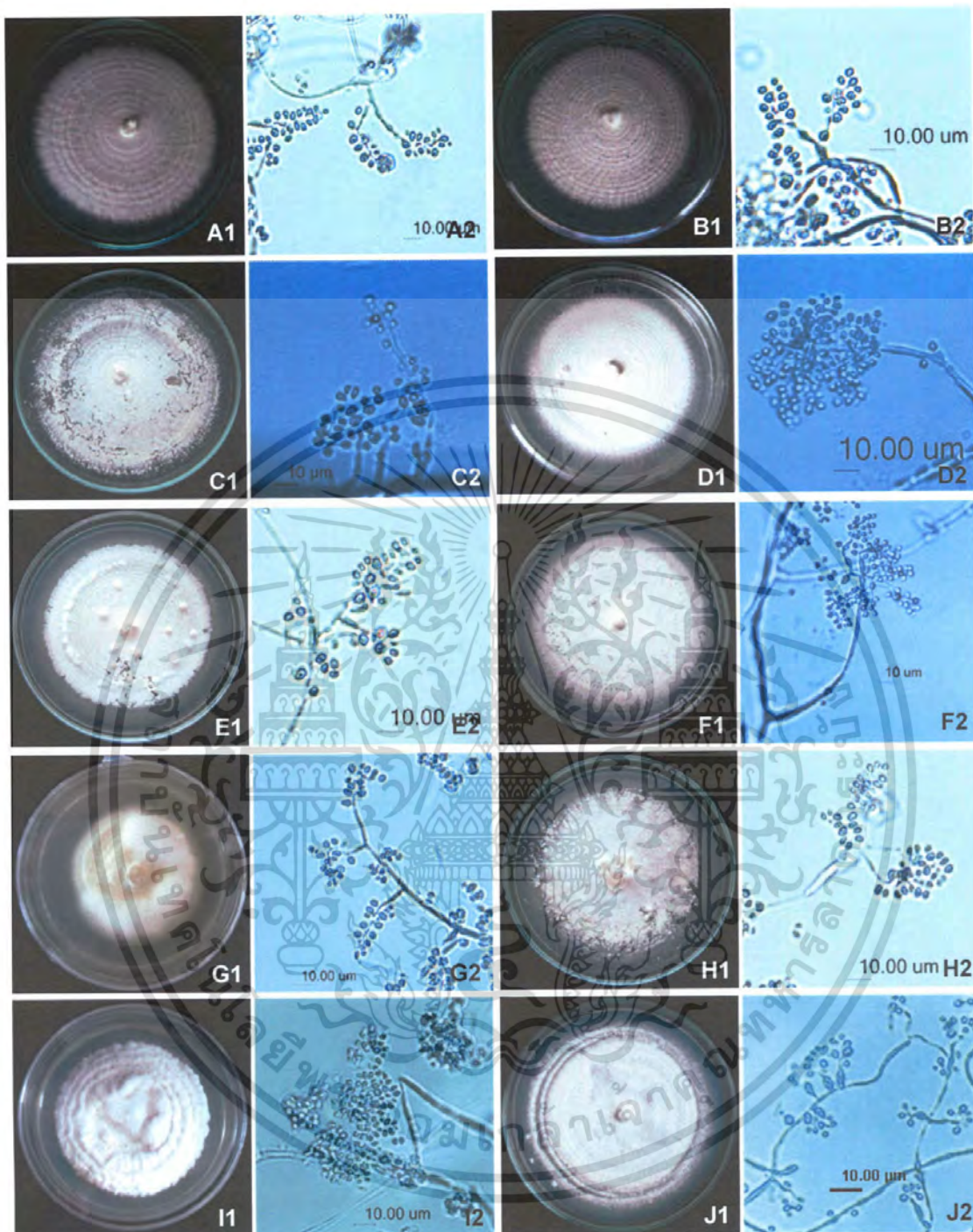
กลุ่มที่ 1 ลักษณะสปอร์มีรูปทรงกลมรี ไม่มีสี สปอร์เจริญอยู่บนก้านชูสปอร์ที่มีลักษณะก้านคดเคี้ยวอยู่รวมกันเป็นกลุ่มซอกคล้ายพวงองุ่น และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มซอกสปอร์ขนาดใหญ่ เมื่อวัดขนาดสปอร์แล้วพบว่ามีความกว้างและความยาวเฉลี่ยประมาณ $2.47-3.34 \times 3.11-3.93$ ไมโครเมตร ดังตารางที่ 4.2 โคนิโคอินัสเซลล์มีรูปทรงกระบอกหรือพองตัวออกจนมีลักษณะคล้ายแจกันทรงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูง เส้นใยทรงกระบอก มีผนังกัน โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในรูปแบบนี้มีจำนวน 26 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต B001 (รูปที่ 4.3A2), B002 (รูปที่ 4.3B2), B003 (รูปที่ 4.3C2), B004 (รูปที่ 4.3D2), B005 (รูปที่ 4.3E2), B006 (รูปที่ 4.3F2), B007 (รูปที่ 4.4A2), B008 (รูปที่ 4.4B2), B009 (รูปที่ 4.4C2), B010 (รูปที่ 4.4D2), B011 (รูปที่ 4.3G2), B014 (รูปที่ 4.5A3), B015 (รูปที่ 4.5B3), B016 (รูปที่ 4.3H2), B017 (รูปที่ 4.3I2), B018 (รูปที่ 4.3J2), B019 (รูปที่ 4.3K2), B020 (รูปที่ 4.3L2), B021 (รูปที่ 4.3M2), B022 (รูปที่ 4.5C3), B023 (รูปที่ 4.3N2), B024 (รูปที่ 4.3O2), B025 (รูปที่ 4.3P2), B026 (รูปที่ 4.3Q2), B029 (รูปที่ 4.3R2) และ B030 (รูปที่ 4.4E2)

กลุ่มที่ 2 ลักษณะสปอร์มีรูปทรงรีและยาว ไม่มีสี สปอร์เจริญอยู่บนก้านชูสปอร์ที่มีลักษณะก้านคดเคี้ยวอยู่รวมกันเป็นกลุ่มช่อสปอร์ขนาดใหญ่ และเมื่อวัดขนาดสปอร์แล้วพบว่ามีความกว้างและความยาวเฉลี่ยประมาณ $1.91-2.22 \times 4.16-4.50$ ไมโครเมตร ดังตารางที่ 4.3 โคนิโคโอจีนัสเซลล์มีรูปทรงกระบอกหรือพองตัวออกจนมีลักษณะคล้ายแจกันทรงสูง เส้นใยทรงกระบอก มีผนังกัน โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในรูปแบบนี้มีจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต B012 (รูปที่ 4.6A2), B013 (รูปที่ 4.6B2), B027 (รูปที่ 4.6C2) และ B028 (รูปที่ 4.6D2)

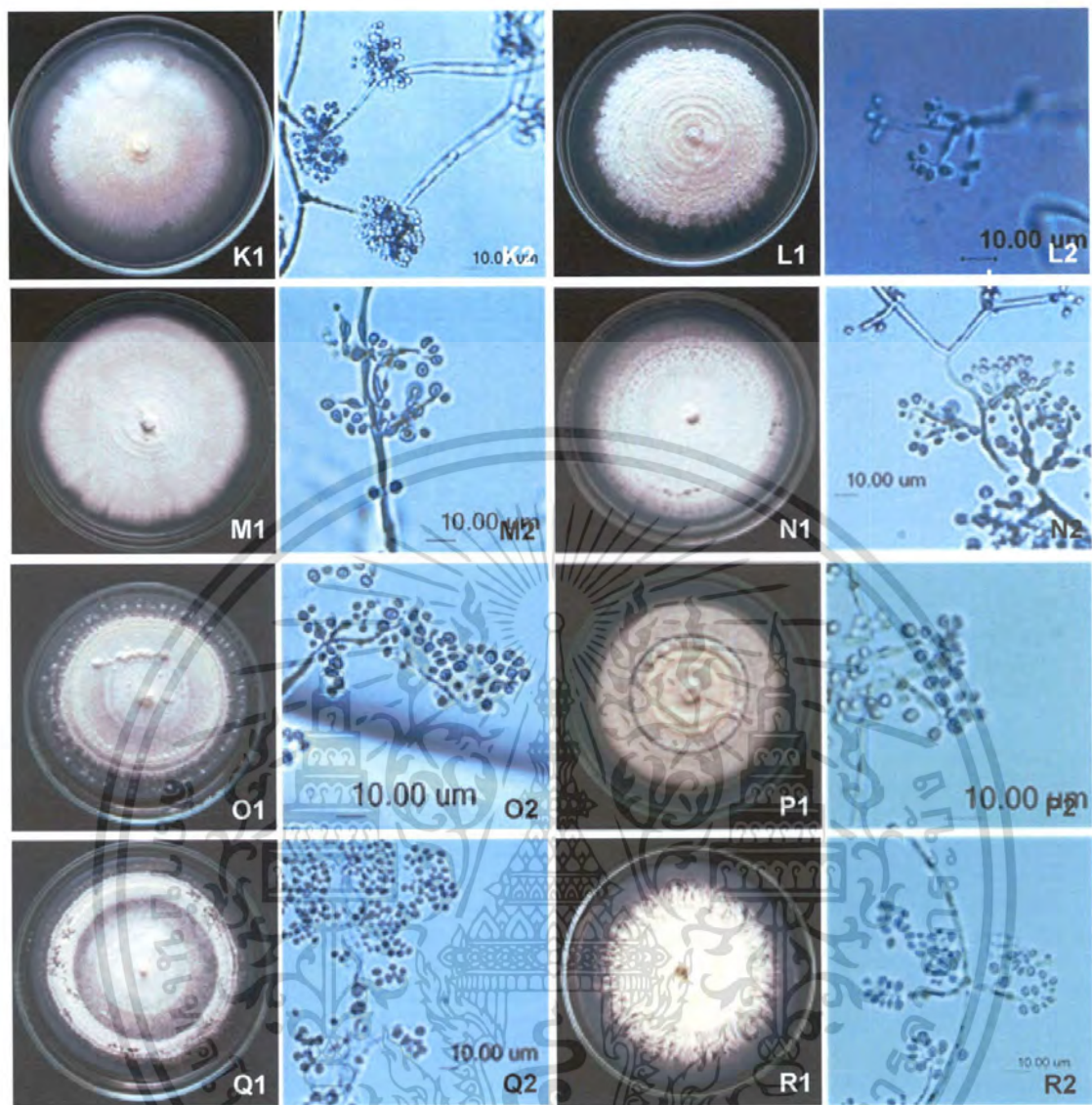
เมื่อทำการวัดขนาดความยาวและความกว้างของสปอร์ จำนวน 30 สปอร์ต่อไอโซเลต ($n=30$) โดยวัดจากส่วนที่ยาวและกว้างที่สุดของสปอร์ จากนั้นนำขนาดความยาวและความกว้างของแต่ละสปอร์มาหาอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง และนำค่าความยาว ความกว้าง และอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างทั้ง 30 สปอร์ มาหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\text{Mean} \pm \text{S.D.}$) ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างสามารถนำมาจัดกลุ่มเชื้อราสกุล *Beauveria* เป็น 2 กลุ่มใหญ่ได้อย่างชัดเจน คือกลุ่มที่สปอร์มีรูปทรงกลมรี มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์น้อยกว่า 2.0 จำนวน 26 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต B001-B011, B014-B026 B029 และ B030 แสดงดังตาราง 4.2 และกลุ่มที่มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์มากกว่า 2.0 ได้แก่ จำนวน 4 ไอโซเลต ไอโซเลต B012, B013, B027 และ B028 แสดงดังตาราง 4.3 และผลการจัดกลุ่มนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ก่อนหน้านี้ คือกลุ่มที่สปอร์รูปทรงกลมรีจะมีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์มากกว่า 2.0 และกลุ่มที่สปอร์มีรูปทรงรีและยาวจะมีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์น้อยกว่า 2.0 แต่ผลการจัดกลุ่มนี้ยังไม่สามารถยืนยันสปีชีส์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลตได้ เนื่องจาก Glare และ Inwood (1998) รายงานว่าเชื้อรา *B. bassiana*, *B. vermiconia*, *B. amorpha* และ *B. velata* มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์น้อยกว่า 2 และเชื้อรา *B. brongnairtii* และ *B. caledoniaca* มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์มากกว่า 2 ยกเว้นเชื้อรา *B. brongnairtii* จากประเทศนิวซีแลนด์ที่มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์เท่ากับ 1.58 ซึ่งมีเชื้อรามากกว่า 1 สปีชีส์ที่ถูกจัดอยู่ในแต่ละกลุ่ม อีกทั้งเชื้อรา *B. brongnairtii* ยังถูกจัดให้อยู่ได้ทั้งสองกลุ่มอีกด้วย ทำให้ต้องมีการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุลต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



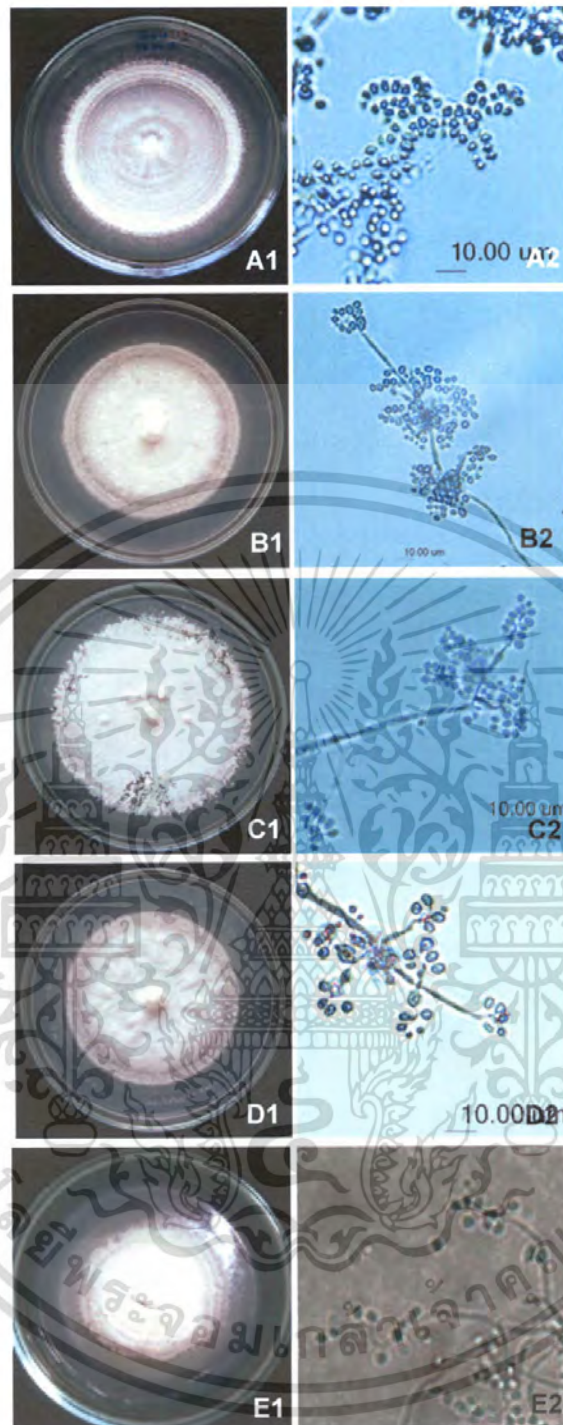
รูปที่ 4.3 ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 18 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต B001 (A1-A2), ไอโซเลต B002 (B1-B2), ไอโซเลต B003 (C1-C2), ไอโซเลต B004 (D1-D2), ไอโซเลต B005 (E1-E2), ไอโซเลต B006 (F1-F2), ไอโซเลต B011 (G1-G2), ไอโซเลต B016 (H1-H2), ไอโซเลต B017 (I1-I2) และ ไอโซเลต B018 (J1-J2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



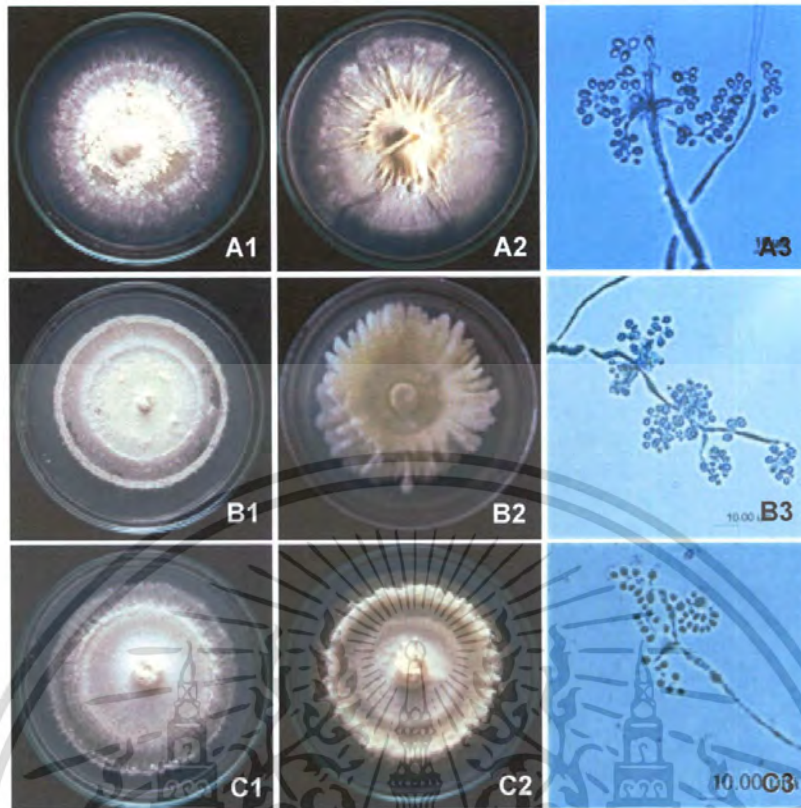
รูปที่ 4.3 (ต่อ) ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 18 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต B019 (K1-K2), ไอโซเลต B020 (L1-L2), ไอโซเลต B021 (M1-M2), ไอโซเลต B023 (N1-N2), ไอโซเลต B024 (O1-O2), ไอโซเลต B025 (P1-P2), ไอโซเลต B026 (Q1-Q2) และ ไอโซเลต B029 (R1-R2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

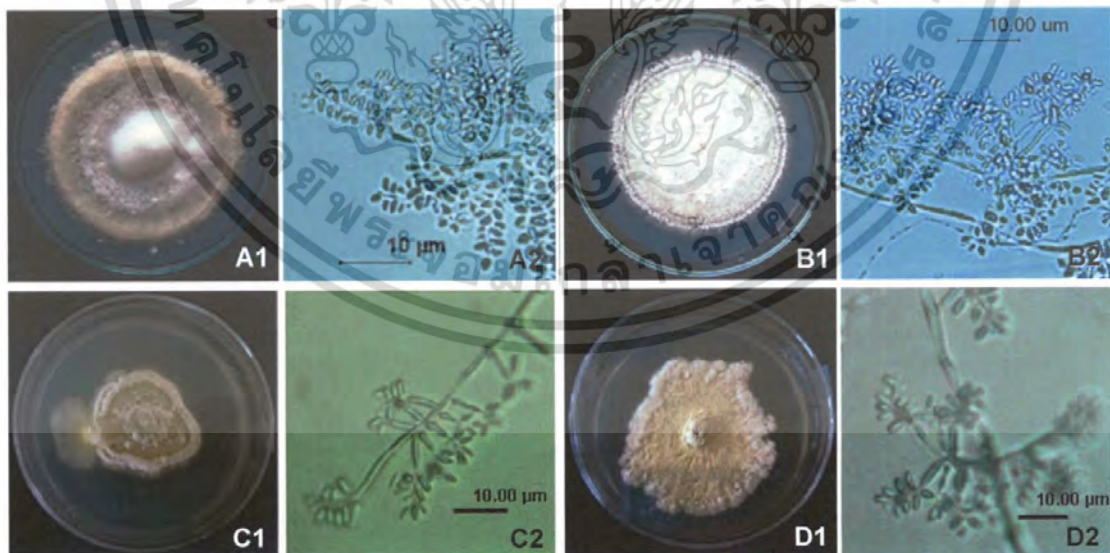


รูปที่ 4.4 ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในกลุ่มที่ 2 จำนวน 5 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต B007 (A1-A2), ไอโซเลต B008 (B1-B2), ไอโซเลต B009 (C1-C2), ไอโซเลต B010 (D1-D2) และไอโซเลต B030 (E1-E2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในกลุ่มที่ 3 จำนวน 3 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต B014 (A1-A3), ไอโซเลต B015 (B1-B3) และ ไอโซเลต B022 (C1-C3)



รูปที่ 4.6 ลักษณะโคโลนี และสปอร์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในกลุ่มที่ 4 และ 5 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต B012 (A1-A2), ไอโซเลต B013 (B1-B2), ไอโซเลต B027 (C1-C2) และ ไอโซเลต B028 (D1-D2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงขนาดความยาวและความกว้างของสปอร์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์น้อยกว่า 2.0

ไอโซเลต	ความยาว (ไมโครเมตร)		ความกว้าง (ไมโครเมตร)		ความยาว/ความกว้าง	
	ค่าเฉลี่ย	ช่วงข้อมูล	ค่าเฉลี่ย	ช่วงข้อมูล	ค่าเฉลี่ย	ช่วงข้อมูล
B001	3.57±0.30	3.03-4.65	3.08±0.25	2.65-3.76	1.15±0.06	1.01-1.30
B002	3.67±0.51	2.87-4.82	2.91±0.36	2.16-3.64	1.27±0.18	0.92-1.57
B003	3.25±0.39	2.11-3.98	2.64±0.42	1.65-3.54	1.25±0.15	0.87-1.55
B004	3.84±0.33	3.11-4.29	2.99±0.29	2.46-3.69	1.29±0.14	1.01-1.64
B005	3.68±0.40	3.11-4.54	3.08±0.32	2.34-3.86	1.20±0.17	0.93-1.78
B006	3.41±0.26	3.00-3.97	2.66±0.30	2.10-2.11	1.28±0.11	1.03-1.55
B007	3.43±0.35	2.32-3.91	2.78±0.34	2.11-3.26	1.23±0.11	1.08-1.53
B008	3.84±0.35	3.70-3.97	3.08±0.38	2.94-3.22	1.35±0.15	1.06-1.61
B009	3.93±0.06	3.84-4.02	3.34±0.22	3.26-3.43	1.25±0.08	1.03-1.42
B010	3.31±0.32	2.55-3.87	2.65±0.30	2.06-3.22	1.25±0.09	1.08-1.45
B011	3.25±0.25	2.78-3.96	2.81±0.23	2.25-3.18	1.15±0.06	1.02-1.33
B014	3.70±0.44	2.72-4.76	2.78±0.32	2.00-3.50	1.34±0.16	1.00-1.81
B015	3.11±0.39	2.50-3.97	2.47±0.29	1.88-3.01	1.26±0.11	1.13-1.56
B016	3.21±0.35	2.33-3.83	2.66±0.29	1.99-3.12	1.20±0.10	1.07-1.45
B017	3.82±0.75	2.78-5.99	3.02±0.39	2.25-4.16	1.25±0.13	1.07-1.61
B018	3.81±0.38	2.84-4.47	3.23±0.34	2.34-4.01	1.18±0.08	1.08-1.53
B019	3.29±0.30	2.47-3.76	2.89±0.32	2.11-3.53	1.14±0.06	1.00-1.27
B020	3.43±0.20	2.88-3.70	2.99±0.26	2.10-3.34	1.15±0.06	1.04-1.37
B021	3.41±0.25	2.87-4.10	2.73±0.26	2.10-3.20	1.25±0.08	1.11-1.43
B022	3.48±0.23	2.98-3.76	2.91±0.25	2.35-3.26	1.20±0.06	1.11-1.39
B023	3.86±0.66	2.76-5.85	3.04±0.42	2.45-4.12	1.25±0.13	1.05-1.66
B024	3.68±0.56	2.88-5.07	2.97±0.47	2.44-4.12	1.24±0.12	1.05-1.47
B025	3.52±0.18	2.99-3.76	2.84±0.22	2.56-3.34	1.24±0.10	1.08-1.46
B026	3.42±0.28	2.59-3.76	2.71±0.23	2.37-3.24	1.26±0.11	1.09-1.50
B029	3.39±0.31	3.28-3.51	2.82±0.31	2.70-2.93	1.20±0.05	1.18-1.23
B030	3.46±0.26	2.68-3.87	2.89±0.25	2.10-3.27	1.19±0.04	1.12-1.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงขนาดความยาวและความกว้างของสปอร์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์มากกว่า 2.0

ไอโซเลต	ความยาว (ไมโครเมตร)		ความกว้าง (ไมโครเมตร)		ความยาว/ความกว้าง	
	ค่าเฉลี่ย	ช่วงข้อมูล	ค่าเฉลี่ย	ช่วงข้อมูล	ค่าเฉลี่ย	ช่วงข้อมูล
B012	4.21±0.45	3.45-4.98	1.91±0.42	1.10-2.65	2.27±0.36	1.80-3.14
B013	4.16±0.47	3.23-5.04	1.94±0.33	1.19-2.75	2.20±0.48	1.52-3.55
B027	4.41±0.33	4.28-4.53	2.14±0.19	2.07-2.21	2.06±0.19	1.99-2.13
B028	4.50±0.37	4.39-4.60	2.22±0.22	1.92-2.75	2.03±0.17	1.97-2.10



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

4.3.1 ผลของการสกัดดีเอ็นเอ

เนื่องจากปัญหาเรื่องการเก็บรักษาเชื้อราต้นแบบของไอโซเลต B030 ได้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นในเชื้อราต้นแบบในระหว่างการศึกษาดังที่กล่าวมาแล้ว จึงได้ศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุลของเชื้อราสกุล *Beauveria* เฉพาะไอโซเลต B001-B029 โดยสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด DNeasy Plant Mini Kit และตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าดีเอ็นเอมีขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส แลบดีเอ็นเอมีความเข้มข้นสูง มีปริมาณดีเอ็นเอมาก มีการแตกหักของดีเอ็นเอเล็กน้อย (รูปที่ 4.7) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อใช้คำนวณหาความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอ พบว่ามีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 1,000-1,250 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม จึงนำไปคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในการทำเทคนิคพีซีอาร์ต่อไป



รูปที่ 4.7 คุณภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างเชื้อราสกุล *Beauveria* ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

4.3.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITSs ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อราสกุล *Beauveria* จำนวน 29 ไอโซเลต ได้แก่ B001-B029 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ PN3/PN16 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดังนี้

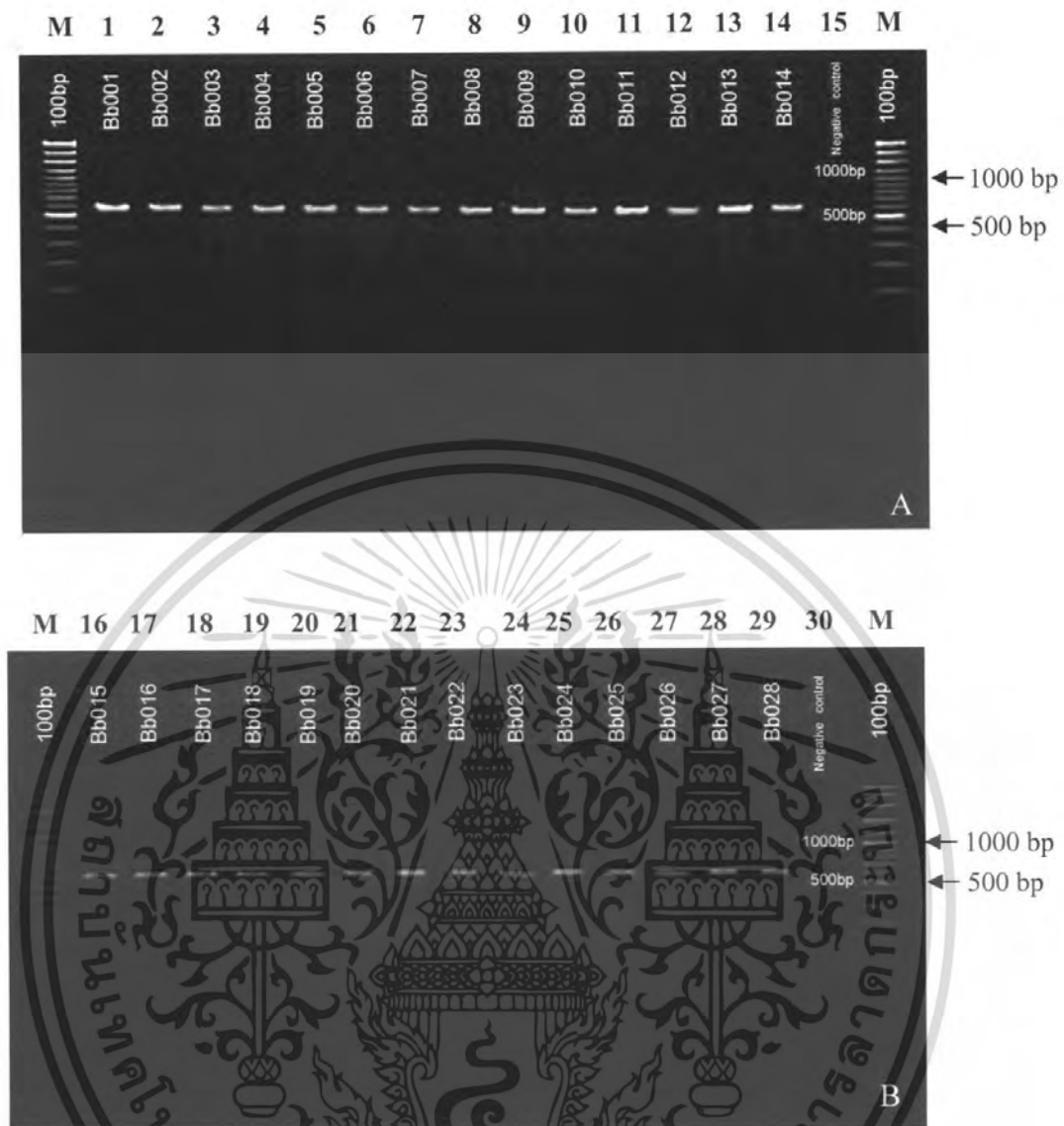
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราสกุล *Beauveria* ไอโซเลต B001-B029 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs ได้ มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ทุกไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 4.8A และ 4.8B ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราแต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ เนื่องจากมีขนาดไม่แตกต่างกัน และยังไม่สามารถนำมาสรุปได้ว่าเชื้อราแต่ละไอโซเลตคือสปีชีส์ใด เนื่องจากยังไม่พบรายงานว่าเชื้อราสกุล *Beauveria* ต่างสปีชีส์กัน มีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในบริเวณ ITSs ต่างกัน จึงนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีต่อไป เพื่อศึกษาความแตกต่างของเชื้อราแต่ละไอโซเลต โดยขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในงานวิจัยนี้เท่ากับรายงานของ Patricia และคณะ (2007) ที่ศึกษาเชื้อรา *B. bassiana* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส และ de Muro และคณะ (2003) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ได้แก่ เชื้อรา *B. brongniartii*, *B. bassiana* และเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 607 คู่เบส

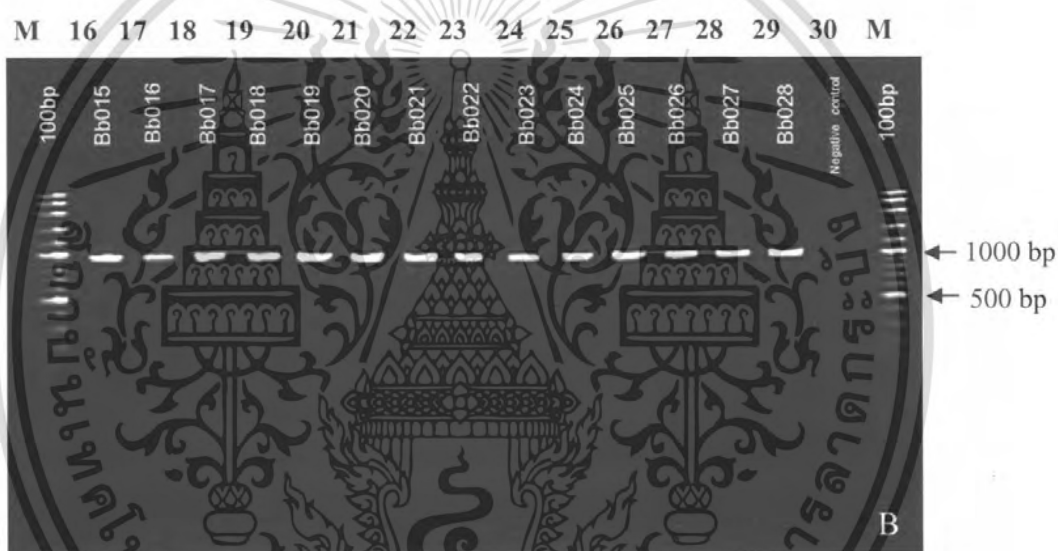
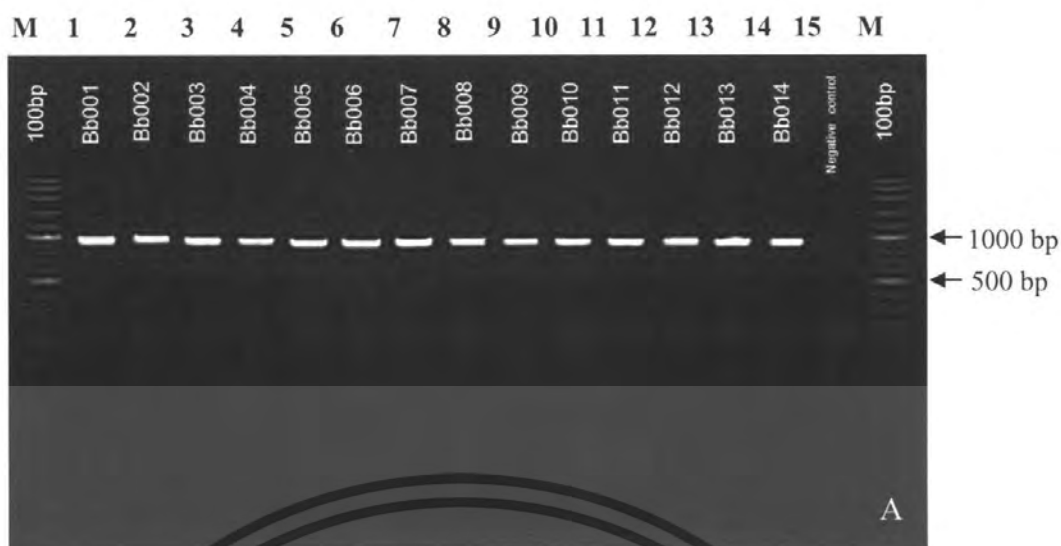
4.3.2.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราสกุล *Beauveria* ไอโซเลต B001-B029 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA มีขนาดความยาวประมาณ 900 คู่เบส ทุกไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 4.9A และ 4.9B ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราแต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ เนื่องจากมีขนาดไม่แตกต่างกัน และยังไม่สามารถนำมาสรุปได้ว่าเชื้อราแต่ละไอโซเลตคือสปีชีส์ใด เนื่องจากยังไม่พบรายงานว่าเชื้อราสกุล *Beauveria* ต่างสปีชีส์กัน มีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ต่างกัน จึงนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีต่อไป เพื่อศึกษาความแตกต่างของตัวอย่างเชื้อราแต่ละไอโซเลต โดยขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในงานวิจัยนี้มีขนาดใกล้เคียงกับรายงานของ Neuvéglise และคณะ (1994) ที่ศึกษาเชื้อรา *B. brongniartii* และเชื้อรา *B. bassiana* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 930 คู่เบส และ Wada และคณะ (2003) ศึกษาเชื้อรา *B. brongniartii* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 950 คู่เบส



รูปที่ 4.8 ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในบริเวณ ITS ของเชื้อราสกุล *Beauveria* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4, Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, Lane 1-14 คือ ไอโซเลต B001-B014 (A), Lane 16-29 คือไอโซเลต B015-B028 (B), Lane 15 และ 30 คือ negative control (ไม่ใช่ดีเอ็นเอต้นแบบ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ของเชื้อราสกุล *Beauveria* โดยใช้คู่มือไพรเมอร์ PN3/PN16. Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, Lane 1-14 คือไอโซเลต B001-B014 (A), Lane 16-29 คือไอโซเลต B015-B028 (B), Lane 15 และ 30 คือ negative control (ไม่ใช่ดีเอ็นเอต้นแบบ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ B002, B004-B006, B008-B011, B013, B015, B016 และ B027 และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 จำนวน 17 ไอโซเลต ได้แก่ B001, B003, B007, B012, B014, B017-B026, B028 และ B029 มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ทำให้ทราบว่าตัวอย่างเชื้อราสกุล *Beauveria* ในงานวิจัยนี้มีเพียง 2 สปีชีส์ นั่นคือ เชื้อรา *B. bassiana* ได้แก่ B001-B011, B014-B026 และ B029 และเชื้อรา *B. brongnairtii* ได้แก่ ไอโซเลต B012, B013, B027 และ B028

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้สอดคล้องกับผลของการจัดกลุ่มด้วยลักษณะสปอร์ของเชื้อรา ทำให้สรุปได้ว่าสปอร์กลุ่มที่มีรูปร่างกลมรีและมีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างน้อยกว่า 2 คือเชื้อรา *B. bassiana* ส่วนกลุ่มที่สปอร์มีรูปร่างรียาวและมีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างมากกว่า 2 คือเชื้อรา *B. brongnairtii* และทำให้สรุปได้อีกว่าเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* มีลักษณะโคโลนีได้หลายรูปแบบ นั่นคือ โคโลนีกลุ่มที่ 1-3 เป็นลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *B. bassiana* และโคโลนีกลุ่มที่ 4-5 เป็นลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *B. brongnairtii*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราไอโซเลต B001-B029 มาเทียบเคียงกันแล้วไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อราภายในสปีชีส์เดียวกัน แต่ระหว่างสปีชีส์ทั้งสองพบความแตกต่างกัน นั่นคือลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* ในการศึกษานี้ต่างกัน 2.64 เฮอร์เซ็นต์ ดังแสดงผลในรูปที่ 4.10 ซึ่งยกตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B003, B007, B014, B022 และ B024 และเชื้อรา *B. brongnairtii* ไอโซเลต B012, B013, B027 และ B028 โดยมีเครื่องหมายดอกจัน (*) แสดงว่านิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งนั้นเหมือนกันทุกไอโซเลต อาจกล่าวได้ว่าตัวอย่างเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* ในงานวิจัยนี้มีความแปรผันทางพันธุกรรมในบริเวณ ITSs ต่ำ สอดคล้องกับรายงานของ Coates และคณะ (2002) ที่ศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อรา *B. bassiana* ในบริเวณ ITSs ของเชื้อรา *B. bassiana* ทั้งหมด 9 ไอโซเลต พบความแตกต่างภายในสปีชีส์ 6.62 เฮอร์เซ็นต์ และมีการกลายพันธุ์ในบริเวณ ITSs ประมาณ 8.39 เฮอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่สามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์ของเชื้อราได้ และ de Muro และคณะ (2003) รายงานว่าเชื้อรา *B. bassiana* ที่แยกได้จากแมลงและดินจากประเทศเคนยา และจากประเทศต่างๆ มีความแตกต่างภายในสปีชีส์น้อยกว่า 2 เฮอร์เซ็นต์ คือมีความผันแปรทางพันธุกรรมในบริเวณ ITSs ต่ำ จึงไม่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์เดียวกันได้ ต่างจาก Neuverglise และคณะ (1994) ที่รายงานว่าเชื้อรา *B. brongnairtii* มีความแปรผันทางพันธุกรรมในบริเวณ ITSs สูง คือมีการกลายพันธุ์ในบริเวณ ITS1 และบริเวณ ITS2 ประมาณ 0.70-14.67 และ 1.80-16.67 เฮอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bb003	ACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACCAGCGGCCGCCGGGGACCTCAAACCTTTGT	60
Bb007	ACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACCAGCGGCCGCCGGGGACCTCAAACCTTTGT	60
Bb014	ACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACCAGCGGCCGCCGGGGACCTCAAACCTTTGT	60
Bb022	ACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACCAGCGGCCGCCGGGGACCTCAAACCTTTGT	60
Bb024	ACTCGCCCCAGCCCGGACGCGGACTGGACCAGCGGCCGCCGGGGACCTCAAACCTTTGT	60
Bb028	ACTCGCCCCAGCC-GGACGCGGACTGGACCAGCGGCCGCCGGGGACCTCAAACCTTTGT	59
Bb012	ACTCGCCCCAGCC-GGACGCGGACTGGACCAGCGGCCGCCGGGGACCTCAAACCTTTGT	59
Bb013	ACTCGCCCCAGCC-GGACGCGGACTGGACCAGCGGCCGCCGGGGACCTCAAACCTTTGT	59
Bb027	ACTCGCCCCAGCC-GGACGCGGACTGGACCAGCGGCCGCCGGGGACCTCAAACCTTTGT	59

Bb003	ATT-CCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAACCTTTCAACAA	119
Bb007	ATT-CCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAACCTTTCAACAA	119
Bb014	ATT-CCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAACCTTTCAACAA	119
Bb022	ATT-CCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAACCTTTCAACAA	119
Bb024	ATT-CCAGCATCTTCTGAATACGCCGCAAGGCAAAACAAATGAATCAAACCTTTCAACAA	119
Bb028	ATTATCAGCATCTTCTGAATCCGCCGCAAGGCAAAACAAATAAATCAAACCTTTCAACAA	119
Bb012	ATTATCAGCATCTTCTGAATCCGCCGCAAGGCAAAACAAATAAATCAAACCTTTCAACAA	119
Bb013	ATTATCAGCATCTTCTGAATCCGCCGCAAGGCAAAACAAATAAATCAAACCTTTCAACAA	119
Bb027	ATTATCAGCATCTTCTGAATCCGCCGCAAGGCAAAACAAATAAATCAAACCTTTCAACAA	119

Bb003	CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAAGCGGATAAGTAATGTGAAT	179
Bb007	CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAAGCGGATAAGTAATGTGAAT	179
Bb014	CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAAGCGGATAAGTAATGTGAAT	179
Bb022	CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAAGCGGATAAGTAATGTGAAT	179
Bb024	CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAAGCGGATAAGTAATGTGAAT	179
Bb028	CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAAGCGGATAAGTAATGTGAAT	179
Bb012	CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAAGCGGATAAGTAATGTGAAT	179
Bb013	CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAAGCGGATAAGTAATGTGAAT	179
Bb027	CGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAAGCGGATAAGTAATGTGAAT	179

Bb003	TGCAGAAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGC	239
Bb007	TGCAGAAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGC	239
Bb014	TGCAGAAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGC	239
Bb022	TGCAGAAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGC	239
Bb024	TGCAGAAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGC	239
Bb028	TGCAGAAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGC	239
Bb012	TGCAGAAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGC	239
Bb013	TGCAGAAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGC	239
Bb027	TGCAGAAATCCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGC	239

Bb003	GGGCATGCCGTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCGACCTCCGCTTGGGAGGTCGGCGTTG	299
Bb007	GGGCATGCCGTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCGACCTCCGCTTGGGAGGTCGGCGTTG	299
Bb014	GGGCATGCCGTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCGACCTCCGCTTGGGAGGTCGGCGTTG	299
Bb022	GGGCATGCCGTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCGACCTCCGCTTGGGAGGTCGGCGTTG	299
Bb024	GGGCATGCCGTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCGACCTCCGCTTGGGAGGTCGGCGTTG	299
Bb028	GGGCATGCCGTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCGACCTCCGCTTGGGAGGTCGGCGTTG	299
Bb012	GGGCATGCCGTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCGACCTCCGCTTGGGAGGTCGGCGTTG	299
Bb013	GGGCATGCCGTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCGACCTCCGCTTGGGAGGTCGGCGTTG	299
Bb027	GGGCATGCCGTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCTCGACCTCCGCTTGGGAGGTCGGCGTTG	299

Bb003	GGGACCGGCAGCACACCGCCGCGCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCT	359
Bb007	GGGACCGGCAGCACACCGCCGCGCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCT	359
Bb014	GGGACCGGCAGCACACCGCCGCGCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCT	359
Bb022	GGGACCGGCAGCACACCGCCGCGCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCT	359
Bb024	GGGACCGGCAGCACACCGCCGCGCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCT	359
Bb028	GGGACCGGCAGCACACCGCCGCGCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCT	359
Bb012	GGGACCGGCAGCACACCGCCGCGCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCT	359
Bb013	GGGACCGGCAGCACACCGCCGCGCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCT	359
Bb027	GGGACCGGCAGCACACCGCCGCGCCTGAAATGGAGTGGCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCT	359

รูปที่ 4.10 แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *B. brongnairtii* โดยเครื่องหมายดอกจัน (*) แสดงว่านิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งนั้นเหมือนกันทุกไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bb003	GCGCAGTAAACAGCTCGCACCGGGACCCCGACGCGGCCACGCCGTAAAAACCCCAACT	419
Bb007	GCGCAGTAAACAGCTCGCACCGGGACCCCGACGCGGCCACGCCGTAAAAACCCCAACT	419
Bb014	GCGCAGTAAACAGCTCGCACCGGGACCCCGACGCGGCCACGCCGTAAAAACCCCAACT	419
Bb022	GCGCAGTAAACAGCTCGCACCGGGACCCCGACGCGGCCACGCCGTAAAAACCCCAACT	419
Bb024	GCGCAGTAAACAGCTCGCACCGGGACCCCGACGCGGCCACGCCGTAAAAACCCCAACT	419
Bb028	GCGTAGTAAATCCAACTCGCACCGGAACCCCGACGTTGGCCACGCCGTAAAAACCCCAACT	419
Bb012	GCGTAGTAAATCCAACTCGCACCGGAACCCCGACGTTGGCCACGCCGTAAAAACCCCAACT	419
Bb013	GCGTAGTAAATCCAACTCGCACCGGAACCCCGACGTTGGCCACGCCGTAAAAACCCCAACT	419
Bb027	GCGTAGTAAATCCAACTCGCACCGGAACCCCGACGTTGGCCACGCCGTAAAAACCCCAACT	419

Bb003	CTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG	479
Bb007	CTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG	479
Bb014	CTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG	479
Bb022	CTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG	479
Bb024	CTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG	479
Bb028	CTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG	479
Bb012	CTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG	479
Bb013	CTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG	479
Bb027	CTGAACGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG	479

Bb003	GAGGAAAAGAAACCAAGAGGATTTGCCCACTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA	539
Bb007	GAGGAAAAGAAACCAAGAGGATTTGCCCACTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA	539
Bb014	GAGGAAAAGAAACCAAGAGGATTTGCCCACTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA	539
Bb022	GAGGAAAAGAAACCAAGAGGATTTGCCCACTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA	539
Bb024	GAGGAAAAGAAACCAAGAGGATTTGCCCACTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA	539
Bb028	GAGGAAAAGAAACCAAGAGGATTTGCCCACTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA	539
Bb012	GAGGAAAAGAAACCAAGAGGATTTGCCCACTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA	539
Bb013	GAGGAAAAGAAACCAAGAGGATTTGCCCACTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA	539
Bb027	GAGGAAAAGAAACCAAGAGGATTTGCCCACTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA	539

Bb003	ATTTGAAATCTGGCTCTCAGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGT	599
Bb007	ATTTGAAATCTGGCTCTCAGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGT	599
Bb014	ATTTGAAATCTGGCTCTCAGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGT	599
Bb022	ATTTGAAATCTGGCTCTCAGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGT	599
Bb024	ATTTGAAATCTGGCTCTCAGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGT	599
Bb028	ATTTGAAATCTGGCTCTCAGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGT	598
Bb012	ATTTGAAATCTGGCTCTCAGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGT	598
Bb013	ATTTGAAATCTGGCTCTCAGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGT	598
Bb027	ATTTGAAATCTGGCTCTCAGGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGT	598

Bb003	GCCTTCCGAGTTCCCTGGAAACGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTATGCTCGGACA	659
Bb007	GCCTTCCGAGTTCCCTGGAAACGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTATGCTCGGACA	659
Bb014	GCCTTCCGAGTTCCCTGGAAACGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTATGCTCGGACA	659
Bb022	GCCTTCCGAGTTCCCTGGAAACGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTATGCTCGGACA	659
Bb024	GCCTTCCGAGTTCCCTGGAAACGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTATGCTCGGACA	659
Bb028	GCCTTCCGAGTTCCCTGGAAACGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTATGCTCGGACA	658
Bb012	GCCTTCCGAGTTCCCTGGAAACGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTATGCTCGGACA	658
Bb013	GCCTTCCGAGTTCCCTGGAAACGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTATGCTCGGACA	658
Bb027	GCCTTCCGAGTTCCCTGGAAACGGACGCCACAGAGGGTGAGAGCCCGTATGCTCGGACA	658

Bb003	ACCGAGCCTCTGTAAGGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATG	719
Bb007	ACCGAGCCTCTGTAAGGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATG	719
Bb014	ACCGAGCCTCTGTAAGGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATG	719
Bb022	ACCGAGCCTCTGTAAGGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATG	719
Bb024	ACCGAGCCTCTGTAAGGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATG	719
Bb028	ACCGAGCCTCTGTAAGGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATG	718
Bb012	ACCGAGCCTCTGTAAGGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATG	718
Bb013	ACCGAGCCTCTGTAAGGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATG	718
Bb027	ACCGAGCCTCTGTAAGGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATG	718

รูปที่ 4.10 (ต่อ) แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *B. brongnairtii* โดยเครื่องหมายดอกจัน (*) แสดงว่านิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งนั้นเหมือนกันทุกไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวอนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ของตัวอย่างเชื้อราสกุล *Beauveria* จำนวน 29 ไอโซเลต ได้แก่ B001-B029 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 12 ชนิด ได้แก่ *HhaI* (*AspLEI*), *BamHI*, *BsnI* (*HaeIII*), *EcoRI*, *AluI*, *MspI* (*HpaII*), *AccII* (*FblI*), *MboI* (*BssMI*), *Sfr274I* (*XhoI*), *SmaI*, *BglI* และ *SaI* เพื่อศึกษาความแตกต่างของตัวอย่าง เชื้อราแต่ละไอโซเลต โดยตรวจสอบผลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังนี้

4.3.4.1 ผลการศึกษาในบริเวณ ITSs

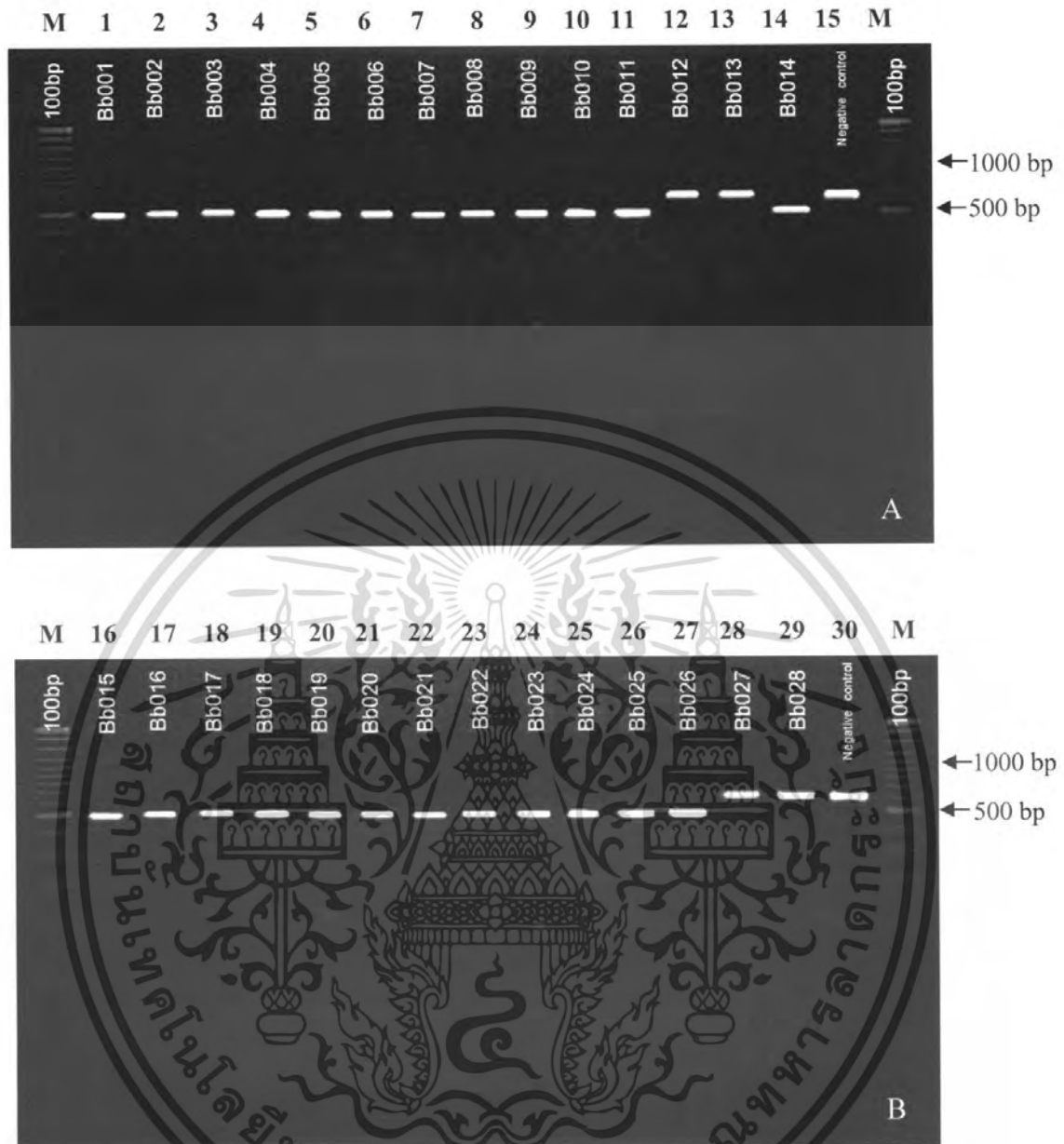
เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs จากคูโพรเมอร์ ITS1/ITS4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 12 ชนิดดังกล่าว เมื่อตรวจสอบผลการตัดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ที่ไม่ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ มี 8 ชนิด ได้แก่ *AccII* (*FblI*), *BamHI*, *MboI* (*BssMI*), *EcoRI*, *SaI*, *Sfr274I* (*XhoI*), *SmaI* และ *BglI* โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดเท่าเดิมคือประมาณ 600 คู่เบส จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* แต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ โดยผลการตัดด้วยเอนไซม์ *MboI* (*BssMI*) ในงานวิจัยนี้ขัดแย้งกับรายงานของ Glare และ Inwood (1998) ที่ใช้เอนไซม์ *MboI* (*BssMI*) ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs ได้แต่มีจุดตัดเหมือนกันทุกไอโซเลต ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* ออกจากเชื้อรา *B. brongniartii* ได้ แต่ de Muro และคณะ (2003) ใช้เอนไซม์ *MboI* (*BssMI*) ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs ได้ และสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* ออกจากเชื้อรา *B. brongniartii* ได้ และผลการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ในงานวิจัยนี้สอดคล้องรายงานของ de Muro และคณะ (2003 และ 2005) ที่รายงานว่าไม่มีจุดตัดบนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเชื้อรา *B. bassiana*, *B. brongniartii* และเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่ไม่ทราบสปีชีส์จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราแต่ละสปีชีส์ได้

เอนไซม์ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ แต่ไม่แสดงข้อแตกต่างในแต่ละไอโซเลต เมื่อตรวจสอบผลการตัดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส มี 2 ชนิด ได้แก่ *BsnI* (*HaeIII*) และ *MspI* (*HpaII*) โดยผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsnI* (*HaeIII*) พบว่าตัดได้ 2 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 200 และ 100 คู่เบส ทุกไอโซเลต โดยผลการตัดสอดคล้องรายงานของ Glare และ Inwood (1998) และ de Muro และคณะ (2003) ที่ใช้เอนไซม์ *BsnI* (*HaeIII*) ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs ได้ และมีจุดตัดเหมือนกันทุกไอโซเลต ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* ออกจากเชื้อรา *B. brongniartii* ได้ และผลการตัดด้วยเอนไซม์ *MspI* (*HpaII*) พบว่าตัดได้ 2 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 150 และ 150 คู่เบส โดยผลการตัดขัดแย้งกับรายงานของ de Muro และคณะ (2005) ที่ใช้เอนไซม์ *MspI* (*HpaII*) ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs และสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* ออกจากเชื้อรา *B. brongniartii* ได้ โดยก่อนหน้านี้นี้ de Muro และคณะ (2003) รายงานว่ารูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *MspI* (*HpaII*) ของเชื้อรา *B. bassiana* มีรูปแบบเดียวกันทุกไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

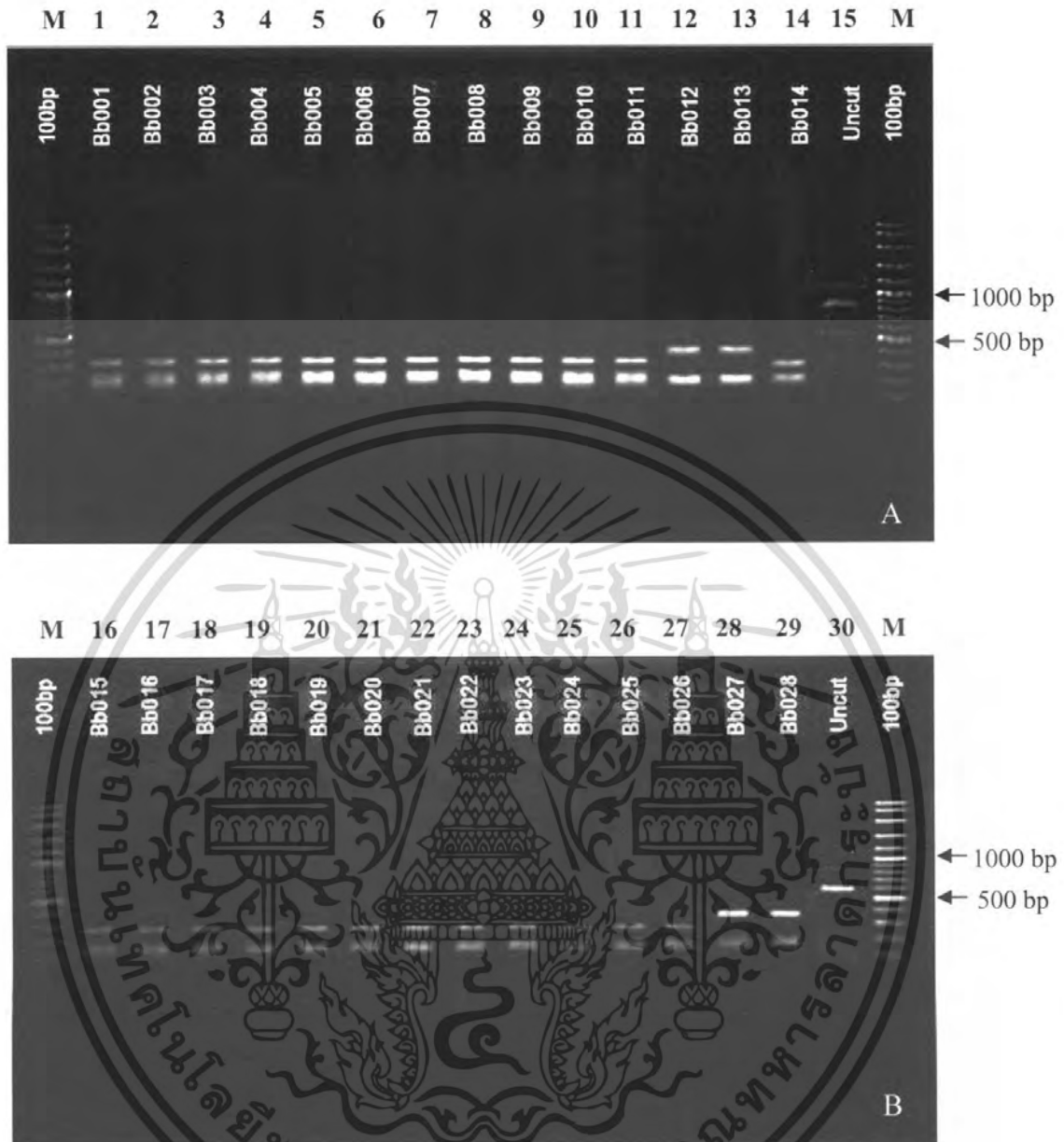
เอนไซม์ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ และให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส มี 2 ชนิด ได้แก่ *AluI* และ *HhaI* (*AspLEI*) โดยผลการตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* สามารถแบ่งเชื้อราสกุล *Beauveria* ตามการตัดได้และไม่ได้ออกเป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มที่ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 และ 150 คู่เบส ได้แก่ ไอโซเลต B001-B011, B014-B026 และ B029 ผลการตัดแสดงดังรูปที่ 4.11A และ 4.11B ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ de Muro และคณะ (2003) ที่ใช้เอนไซม์ *AluI* ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs และสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* ออกจากเชื้อรา *B. brongniartii* ได้ แต่ขัดแย้งกับรายงานของ de Muro และคณะ (2005) ที่พบว่ารูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* ของเชื้อรา *B. bassiana* มีทั้งสองแบบคือมีทั้งตัดได้และไม่ได้ และผลการตัดด้วยเอนไซม์ *HhaI* (*AspLEI*) สามารถแบ่งเชื้อราสกุล *Beauveria* ตามขนาดที่ได้จากการตัดออกเป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มที่ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 และ 150 คู่เบส ได้แก่ ไอโซเลต B001-B011, B014-B026 และ B029 และกลุ่มที่ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 และ 200 คู่เบส ได้แก่ ไอโซเลต B012, B013, Bb027 และ B028 ผลการตัดแสดงดังรูปที่ 4.12A และ 4.12B แต่ผลที่ได้ขัดแย้งกับรายงานของ de Muro และคณะ (2005) ที่ใช้เอนไซม์ *HhaI* (*AspLEI*) ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs ของเชื้อรา *B. bassiana* และพบว่ามียูรูปแบบการตัดที่ความหลากหลาย

จะเห็นว่าผลที่ได้จากการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs ด้วยเอนไซม์ *AluI* และ *HhaI* (*AspLEI*) เป็นไปในรูปแบบเดียวกัน คือแบ่งตัวอย่างเชื้อราออกเป็นสองกลุ่ม และแต่ละกลุ่มประกอบด้วยตัวอย่างไอโซเลตที่ให้รูปแบบการตัดแบบเดียวกัน และสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถยืนยันได้ว่ากลุ่มที่ประกอบด้วยไอโซเลต B001-B011, B014-B026 และ B029 คือรูปแบบการตัดของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B012, B013, Bb027 และ B028 คือรูปแบบการตัดของเชื้อรา *B. brongniartii*



รูปที่ 4.11 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีบริเวณ ITSs ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* โดย Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, Lane 1-14 คือไอโซเลต B001-B014 (A), Lane 16-29 คือไอโซเลต B015-B028 (B), Lane 15 และ 30 คือ uncut (ไม่ใส่เอนไซม์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอสพิบริเวณ ITSs ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* (*Asp*LEI) โดย Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, Lane 1-14 คือไอโซเลต B001-B014 (A), Lane 16-29 คือไอโซเลต B015-B028 (B), Lane 15 และ 30 คือ uncut (ไม่ใส่เอนไซม์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4.2 ผลการศึกษาในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA

เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA จากคู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 12 ชนิดดังกล่าว เมื่อตรวจสอบผลการตัดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ที่ไม่ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ มี 8 ชนิด ได้แก่ *AccII* (*FbII*), *BamHI*, *MboI* (*BssM1*), *EcoRI*, *Sall*, *Sfr274I* (*XhoI*), *SmaI* และ *BglI* โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดเท่าเดิมคือประมาณ 900 คู่เบส จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* แต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ โดยผลการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* สอดคล้องรายงานของ Gaitan และคณะ (2002) ที่พบว่าไม่มีจุดตัดบนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์หรือภายในสปีชีส์เดียวกันได้

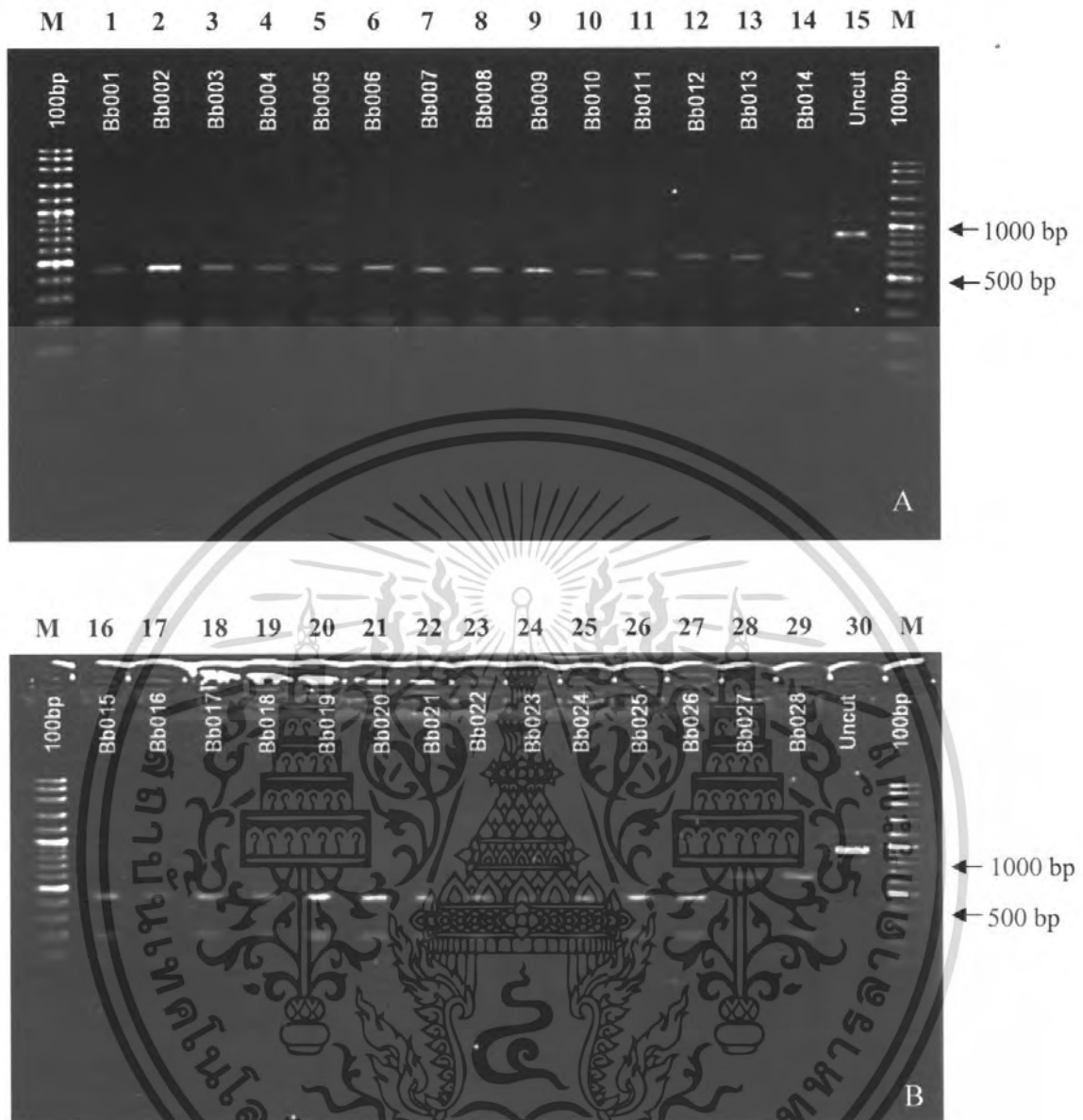
เอนไซม์ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ แต่ไม่แสดงข้อแตกต่างในแต่ละไอโซเลต เมื่อตรวจสอบผลการตัดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส มี 2 ชนิด ได้แก่ *BsnI* (*HaeIII*) และ *MspI* (*HpaII*) โดยผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsnI* (*HaeIII*) พบว่าตัดได้ 2 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 และ 200 คู่เบส 3 ชิ้น โดยผลการตัดสอดคล้องกับรายงานของ Wada และคณะ (2003) ที่ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA จากคู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 ด้วยเอนไซม์ *BsnI* (*HaeIII*) และพบว่าเชื้อรา *B. bassiana*, *B. brongnairtii* และ *B. amorpha* มีรูปแบบการตัดแบบเดียวกัน และผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI* (*HpaII*) พบว่าตัดได้ 2 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 300 และ 100 คู่เบส รูปแบบที่ตัดด้วยเอนไซม์ *MspI* (*HpaII*) สอดคล้องกับรายงานของ Wada และคณะ (2003) ที่พบว่าผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MspI* (*HpaII*) มีรูปแบบการตัดของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* แบบเดียวกัน และรูปแบบการตัดต่างจากเชื้อรา *B. amorpha* ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ ไม่มีตัวอย่างเชื้อรา *B. amorpha* อีกด้วย

เอนไซม์ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ และให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส มี 2 ชนิด ได้แก่ *AluI* และ *HhaI* (*AspLEI*) โดยผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* สามารถแบ่งเชื้อราสกุล *Beauveria* ตามขนาดที่ได้จากการตัดออกเป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มที่ตัดได้ 2 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 คู่เบส 2 ชิ้น ได้แก่ ไอโซเลต B001-B011, B014-B026 และ B029 และกลุ่มที่ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 และ 300 คู่เบส ได้แก่ ไอโซเลต B012, B013, Bb027 และ B028 ผลการตัดแสดงดังรูปที่ 4.13A และ 4.13B และผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* (*AspLEI*) สามารถแบ่งเชื้อราสกุล *Beauveria* ตามขนาดที่ได้จากการตัดออกเป็นสองกลุ่ม คือกลุ่มที่ตัดได้ 2 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 300 และ 150 คู่เบส ได้แก่ ไอโซเลต B001-B011, B014-B026 และ B029 และกลุ่มที่ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 และ 300 คู่เบส ได้แก่ ไอโซเลต B012, B013, Bb027 และ B028 ผลการตัดแสดงดังรูปที่ 4.14A และ 4.14B โดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* และ *HhaI* (*AspLEI*) ต่างจากรายงานของ Wada และคณะ (2003) ที่ใช้เอนไซม์ *AluI* และ *HhaI* (*AspLEI*) ตัดผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์บริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA จากคู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 ของเชื้อรา *B. brongniartii* ที่ได้จากแหล่งกำเนิดและแมลงอาศัยต่างกัน ได้ และพบว่ามีรูปแบบการตัดที่ความหลากหลาย คือสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรารายในสปีชีส์เดียวกันได้ และ Gaitan และคณะ (2002) พบว่าเชื้อรา *B. bassiana* มีรูปแบบการตัดที่ความหลากหลาย สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรารายในสปีชีส์เดียวกันได้เช่นกัน

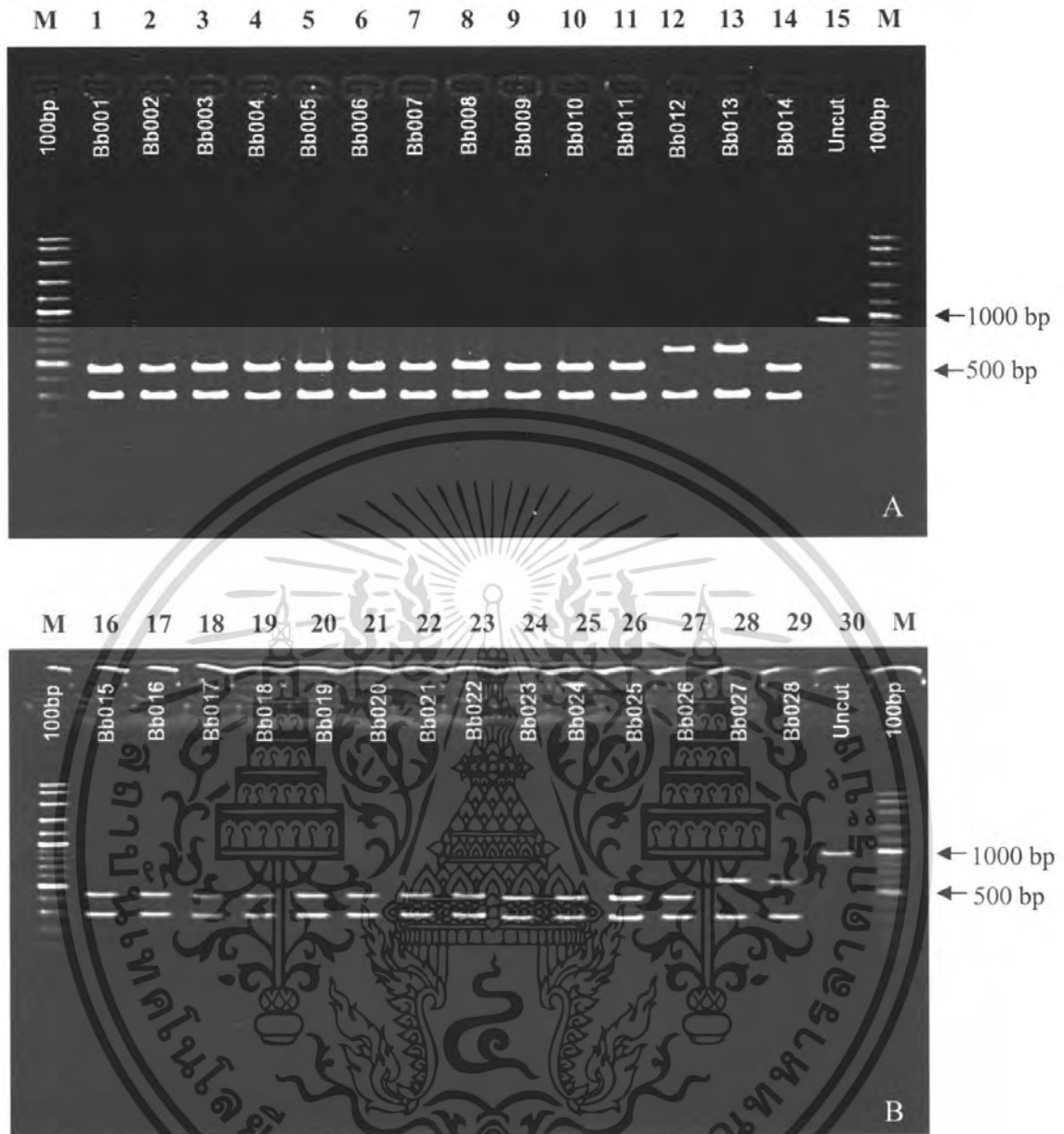
ซึ่งผลที่ได้จากการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ด้วยเอนไซม์ *AluI* และ *HhaI* (*AspLEI*) เป็นไปในรูปแบบเดียวกัน คือแบ่งตัวอย่างเชื้อราออกเป็นสองกลุ่ม และแต่ละกลุ่มประกอบด้วยตัวอย่างไอโซเลตที่ให้รูปแบบการตัดแบบเดียวกัน และสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถยืนยันได้ว่ากลุ่มที่ประกอบด้วยไอโซเลต B001-B011, B014-B026 และ B029 คือรูปแบบการตัดของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B012, B013, Bb027 และ B028 คือรูปแบบการตัดของเชื้อรา *B. brongniartii*

อาจกล่าวได้ว่า ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี บริเวณ ITSs จากคู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA จากคู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 ด้วยเอนไซม์ *AluI* และ *HhaI* (*AspLEI*) ในงานวิจัยนี้เป็นไปในรูปแบบเดียวกัน คือสามารถแยกเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 25 ไอโซเลต ออกจากเชื้อรา *B. brongniartii* จำนวน 4 ไอโซเลตได้อย่างชัดเจน แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรารายในสปีชีส์เดียวกันได้ และไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ของแหล่งกำเนิดและชนิดของแมลงอาศัยในแต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ และพบว่าบริเวณ rDNA ของตัวอย่างเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* มีความแปรผันทางพันธุกรรมต่ำ ซึ่งเป็นบริเวณที่อนุรักษ์ไว้ของแต่ละสปีชีส์ ดังนั้นจึงสามารถนำเทคนิค พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีที่ใช้เอนไซม์ *AluI* และ *HhaI* (*AspLEI*) มาใช้เพื่อแยกความแตกต่างระหว่าง สปีชีส์ทั้งสองได้ในระยะเวลาอันสั้น แต่อย่างไรก็ตาม ควรยืนยันผลการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอนไซม์โดย ชีวสารสนเทศด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 ร่วมด้วย เพื่อยืนยันผลการวิจัยให้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น และเพื่อประหยัดต้นทุนในการคัดแยก อาจใช้เฉพาะเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 4.13 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* โดย Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, Lane 1-14 คือไอโซเลต B001-B014 (A), Lane 16-29 คือไอโซเลต B016-B028 (B), Lane 15 และ 30 คือ Uncut (ไม่ใช่เอนไซม์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอสทีบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HhaI* (*Asp*LEI) โดย Lane M คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, Lane 1-14 คือไอโซเลต B001-B014 (A), Lane 16-29 คือ ไอโซเลต B016-B028 (B), Lane 15 และ 30 คือ Uncut (ไม่ได้ใส่เอนไซม์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.5 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยชีวสารสนเทศด้วยโปรแกรม

Webcutter 2.0

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ B002, B004-B006, B008-B011, B013 B015 B016 และ B027 และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 จำนวน 17 ไอโซเลต ได้แก่ B001, B003, B007, B012, B014, B017-B026, B028 และ B029 มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้มาตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการตรวจสอบจะต้องนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราทั้งสองสปีชีส์มาจัดเรียงข้อมูลด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อให้ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ตรงกัน และตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* ให้มีความยาวเท่ากัน โดยในบริเวณ ITSs ตัดเหลือ 538 คู่เบส จากความยาวประมาณ 600 คู่เบส และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ตัดเหลือ 853 คู่เบส จากความยาวประมาณ 900 คู่เบส จากนั้นจึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรับแต่งข้อมูลแล้วมาตรวจสอบจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 12 ชนิด ได้แก่ *HhaI* (*AspLEI*), *BamHI*, *BsnI* (*HaeIII*), *EcoRI*, *AluI*, *MspI* (*HpaII*), *AccII* (*FblI*), *MboI* (*BssMI*), *Sfr274I* (*XhoI*), *SmaI*, *BglI* และ *SalI* ด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 ได้ผลการตัดดังนี้

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITSs จากคู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 มาตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 พบว่าเอนไซม์ที่ไม่มีตำแหน่งจุดตัดบนลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITSs มี 6 ชนิด ได้แก่ *BamHI*, *EcoRI*, *SalI*, *Sfr274I* (*XhoI*), *SmaI* และ *BglI* จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* แต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ด้วยเอนไซม์ 6 ชนิดดังกล่าว

เอนไซม์ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ แต่ไม่แสดงข้อแตกต่างในแต่ละไอโซเลต เมื่อตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 มี 4 ชนิด ได้แก่ *AccII* (*FblI*), *MboI* (*BssMI*), *BsnI* (*HaeIII*) และ *MspI* (*HpaII*) โดยเอนไซม์ *AccII* (*FblI*) มีจุดตัด 4 ตำแหน่ง บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *B. bassiana* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 71 143 186 45 และ 92 คู่เบส และมีจุดตัด 3 ตำแหน่ง บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *B. brongnairtii* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 71 144 186 และ 137 คู่เบส เอนไซม์ *MboI* (*BssMI*) มีจุดตัด 1 ตำแหน่ง บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *B. bassiana* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 174 และ 363 คู่เบส และมีจุดตัด 1 ตำแหน่ง บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *B. brongnairtii* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 174 และ 364 คู่เบส เอนไซม์ *BsnI* (*HaeIII*) มีจุดตัด 4 ตำแหน่ง บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *B. bassiana* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 87 286 19 56 และ 89 คู่เบส และมีจุดตัด 4 ตำแหน่ง บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *B. brongnairtii* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 87 285 19 56 และ 89 คู่เบส และเอนไซม์ *MspI* (*HpaII*) มีจุดตัด 5

ตำแหน่ง บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *B. bassiana* ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 65 27 264 14 62

และ 105 คู่เบส และมีจุดตัด 5 ตำแหน่ง บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *B. brongnairtii* ได้ขึ้นดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 65 26 266 14 62 105 คู่เบส

เอนไซม์ที่สามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ และให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต เมื่อตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 มี 2 ชนิด ได้แก่ *AluI* และ *HhaI* (*AspLEI*) โดยเอนไซม์ *AluI* สามารถแบ่งเชื้อราตามการตัดได้และไม่ได้ออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่เอนไซม์ตัดได้ คือ *B. bassiana* มีจุดตัด 1 ตำแหน่ง ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 425 112 คู่เบส และกลุ่มที่เอนไซม์ตัดไม่ได้ คือ *B. brongnairtii* และเอนไซม์ *HhaI* (*AspLEI*) สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราตามขนาดที่ตัดได้ คือ มีจุดตัด 2 ตำแหน่ง บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *B. bassiana* ได้ขึ้นดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 274 140 และ 123 คู่เบส และมีจุดตัด 1 ตำแหน่ง บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *B. brongnairtii* ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 275 และ 263 คู่เบส ซึ่งแสดงผลการตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITSs และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* ด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 สรุปดังตารางที่ 4.4

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยชีวสารสนเทศด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 ต่างจากผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี กล่าวคือ เอนไซม์ที่ไม่ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทั้งบริเวณ ITSs และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี พบว่ามีถึง 8 ชนิด ในขณะที่โปรแกรม Webcutter 2.0 พบว่ามีเพียง 6 ชนิดเท่านั้น โดยเอนไซม์ที่พบว่าสามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้อีก 2 ชนิด คือ *AccII* (*FbII*) และ *MboI* (*BssMI*) โดยสามารถตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ แต่ไม่แสดงข้อแตกต่างในแต่ละไอโซเลตดังที่ได้กล่าวมาแล้ว อาจเนื่องจากเมื่อตัดแล้วได้ขนาดของชิ้นที่ใกล้เคียงกันมาก นอกจากนี้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีและโปรแกรม Webcutter 2.0 ยังแตกต่างกันด้วย ซึ่งผลการตัดของโปรแกรม Webcutter 2.0 จะให้ข้อมูลที่ถูกต้องชัดเจนกว่าผลจากเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี คือสามารถบอกรูปแบบการตัดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* ได้ว่าบริเวณ ITSs และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 12 ชนิดแล้วได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาดเท่าใดในแต่ละสปีชีส์ และขนาดแตกต่างหรือไม่ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเป็นประโยชน์อย่างมากที่จะนำมาใช้เป็นฐานข้อมูลของรูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าว ซึ่งสามารถนำมาใช้เพื่อตรวจสอบสปีชีส์ของเชื้อราได้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี สรุปได้ว่าการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอมาหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ และตรวจสอบผลการตัดของเอนไซม์ด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 จะให้ผลการตัดที่ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็วกว่าการใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี อย่างไรก็ตามก็ยังมีขึ้นอยู่กับปัจจัยในเรื่องทุนวิจัย และศักยภาพของแต่ละห้องปฏิบัติการในการศึกษาเทคนิคทางโมเลกุลด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการตรวจสอบตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะบนลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITSs และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* ด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0

ชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITSs (คู่เบส)		ขนาดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA (คู่เบส)	
	<i>B. bassiana</i>	<i>B. brongnairtii</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>B. brongnairtii</i>
<i>Bam</i> HI	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด
<i>Eco</i> RI	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด
<i>Sal</i> I	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด
<i>Sfr</i> 274I (<i>Xho</i> I)	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด
<i>Sma</i> I	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด
<i>Bgl</i> II	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด	ไม่ตัด
<i>Acc</i> II (<i>Fbl</i> I)	71 143 186 45 92	71 144 186 137	39 143 186 45 440	39 144 186 484
<i>Mbo</i> I (<i>Bss</i> MI)	174 363	174 364	141 657 55	142 658 55
<i>Bsn</i> I (<i>Hae</i> III)	87 286 19 56 89	87 285 19 56 89	55 286 19 56 165 189 83	55 287 19 56 156 197 83
<i>Msp</i> I (<i>Hpa</i> II)	65 27 264 14 62 105	65 26 266 14 62 105	33 27 264 14 62 453	33 26 266 14 62 452
<i>Hha</i> I (<i>Asp</i> LEI)	274 140 123	275 263	242 140 404 67	33 26 266 14 62 452
<i>Alu</i> I	425 112	ไม่ตัด	393 161 141 64 94	555 140 64 94

4.3.6 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

เนื่องจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในงานวิจัยนี้ ได้แบ่งตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITSs จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ B002, B004-B006, B008-B011, B013, B015, B016 และ B027 และลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 จำนวน 17 ไอโซเลต ได้แก่ B001, B003 B007, B012, B014, B017-B026, B028 และ B029 ดังนั้นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจึงทำทั้งสองบริเวณ คือหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในบริเวณ ITSs ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 12 ไอโซเลต และในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างจำนวน 17 ไอโซเลต และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองบริเวณมาเทียบเคียงกัน แล้วจึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอีกครั้ง ซึ่งจะให้ข้อมูลบริเวณ ITSs ได้ทุกไอโซเลต โดยเชื้อราอ้างอิง (reference – sequence) ในสกุล *Beauveria* จากประเทศต่างๆ ที่นำมาจากฐานข้อมูล GenBank ทั้งหมดจำนวน 18 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเชื้อรา *B. bassiana* (EU334677.1 และ EU334679.1) จากประเทศแคนาดา, AB027382.1 จากประเทศเกาหลี, *C. bassiana* (EF026006.1) จากประเทศเกาหลี, *B. brongnairtii* (U18955.1 และ U35283.1) จากประเทศจีน, *C. brongnairtii* (AB100036.1 และ AB100037.1) จากประเทศญี่ปุ่น, *B. velata* (U35289.1 และ Z54134.1) จากประเทศจีน, *B. amorpha* (U18960.1 และ Z54133.1) จากประเทศจีน, *B. calenodica* (DQ350137.1) จากประเทศจีน, AY245625 จากประเทศไต้หวัน และ DQ449653 จากประเทศสเปน และ *B. vermoconia* (U18959.1, Z54109.1 และ U35288) จากประเทศจีน และตัวอย่างนอกกลุ่ม (out group) จำนวน 1 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อรา *M. anisopliae* (AB027383.1) จากประเทศญี่ปุ่น

4.3.6.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในบริเวณ ITSs

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITSs จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 ของเชื้อราสกุล *Beauveria* จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ B002, B004-B006, B008-B011, B013, B015, B016 และ B027 มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมร่วมกับตัวอย่างเชื้อราอ้างอิงในสกุล *Beauveria* ที่นำมาจากฐานข้อมูล GenBank จำนวนทั้งหมด 18 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเชื้อรา *B. bassiana* รหัส EU334677.1, EU334679.1 และ AB027382.1 เชื้อรา *C. bassiana* รหัส EF026006.1 เชื้อรา *B. brongnairtii* รหัส U18955.1 และ U35283.1 เชื้อรา *C. brongnairtii* รหัส AB100036.1 และ AB100037.1 เชื้อรา *B. velata* รหัส U35289.1 และ Z54134.1 เชื้อรา *B. amorpha* รหัส U18960.1 และ Z54133.1 เชื้อรา *B. calenodica* รหัส DQ350137.1, AY245625 และ DQ449653 และเชื้อรา *B. vermoconia* รหัส U18959.1, Z54109.1 และ U35288 และเชื้อรา *M. anisopliae* รหัส AB027383.1 ที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์

ทั้งหมดมาจัดเรียงข้อมูล และตัดนิวคลีโอไทด์ด้าน 5' และ 3' ออกเพื่อให้เท่ากันทุกตัวอย่าง โดยตัดเหลือ 336 คู่เบส แล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree โดยผลการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในบริเวณ ITSs แสดงดังรูปที่ 4.15 ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อราสกุล *Beauveria* และตัวอย่างเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่มออกจากกันได้เป็น 7 clade ได้แก่ clade1 คือ *M. anisopliae* จากประเทศญี่ปุ่น, clade2 คือ *B. velata* จากประเทศจีน, clade3 คือ *B. amorpha* จากประเทศจีน, clade4 คือ *B. brongnairtii* จากประเทศจีน และ *C. brongnairtii* จากประเทศญี่ปุ่น, clade5 คือ *B. calenodica* จากประเทศจีน ใต้หวัน และสเปน clade6 คือ *B. vermoconia* จากประเทศจีน และ clade7 คือ *B. bassiana* จากประเทศแคนาดาและเกาหลี และ *C. bassiana* จากประเทศเกาหลี โดยตัวอย่างเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B002, B004-B006, B008-B011, B015 และ B016 ถูกจัดอยู่ใน clade7 กลุ่มเดียวกับเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *C. bassiana* และตัวอย่างเชื้อรา *B. brongnairtii* ไอโซเลต B013 และ B027 ถูกจัดอยู่ใน clade4 กลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *B. brongnairtii* และเชื้อรา *C. brongnairtii* ซึ่งผลการจัดกลุ่มด้วยการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* จากประเทศไทยใน clade7 ที่มีรูปแบบโคโลนีต่างกัน 3 แบบ ในการใช้ลักษณะรูปแบบของโคโลนีออกจากกันได้ แต่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราที่มีลักษณะสปอร์แตกต่างกันได้ นั่นคือ เชื้อรา *B. bassiana* จากประเทศไทยใน clade7 จัดอยู่ในกลุ่มที่สปอร์มีรูปทรงกลมรี และเชื้อรา *B. brongnairtii* จากประเทศไทยใน clade4 จัดอยู่ในกลุ่มที่สปอร์มีรูปทรงรีและยาว นอกจากนี้ยังสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราที่มาจากแหล่งที่มาเดียวกันได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราที่มาจากแหล่งอาศัยต่างกัน ได้ นั่นคือ เชื้อราไอโซเลต B011, B015 และ B016 เป็นเชื้อราที่ได้แมลงในอันดับ Coleoptera, Lepidoptera และ Hymenoptera ตามลำดับ มีแหล่งที่มาเดียวกัน คือจังหวัดเชียงใหม่ พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *B. bassiana* นอกจากนี้เชื้อราไอโซเลต B002, B004 และ B006 ที่ไม่ทราบแหล่งอาศัยและแหล่งที่มา รวมทั้งเชื้อราไอโซเลต B008 และ B010 จากแมลงในอันดับ Coleoptera และไอโซเลต B009 จากแมลงในอันดับ Isoptera มีแหล่งที่มาเดียวกัน คือจังหวัดเชียงราย มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด และจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *C. bassiana* และผลการจัดกลุ่มเชื้อรา *B. brongnairtii* จากประเทศไทยใน clade4 อาจกล่าวได้ว่า เชื้อราไอโซเลต B013 ที่ไม่ทราบแหล่งอาศัย อาจมาจากแหล่งอาศัยที่เหมือนกันกับไอโซเลต B027 ที่ได้จากแมลงในอันดับ Coleoptera เนื่องจากมีรูปแบบโคโลนีจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และลักษณะสปอร์จัดอยู่ในกลุ่มที่สปอร์มีรูปทรงรีและยาวเหมือนกัน อีกทั้งยังมีแหล่งที่มาเดียวกัน คือจังหวัดเชียงใหม่อีกด้วย

4.3.6.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ บริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 ของเชื้อราสกุล *Beauveria* จำนวน 17 ไอโซเลต ได้แก่ B001, B003, B007, B012, B014, B017-B026, B028 และ B029 มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมร่วมกับตัวอย่างเชื้อราอ้างอิงในสกุล *Beauveria* จากฐานข้อมูล GenBank โดยเชื้อราอ้างอิงบริเวณนี้มีการศึกษาน้อยกว่าในบริเวณ ITSs คือมีเพียง 2 สปีชีส์ คือ *B. bassiana* (*C. bassiana*) และ *C. brongnairtii* มีจำนวนทั้งหมด 6 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเชื้อรา *B. bassiana* รหัส EU334677.1, EU334679.1 และ AB027382.1, *C. bassiana* รหัส EF026006.1 และ *C. brongnairtii* รหัส AB100036.1 และ AB100037.1 และ เชื้อรา *M. anisopliae* รหัส AB027383.1 ที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาจัดเรียงข้อมูล และตัดนิวคลีโอไทด์ด้าน 5' และ 3' ออกเพื่อให้เท่ากันทุกตัวอย่างโดยตัดเหลือ 531 คู่เบส แล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของ phylogenetic tree โดยผลการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในบริเวณ ITSs แสดงดังรูปที่ 4.16 ซึ่งพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อราแต่ละสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* และตัวอย่างนอกกลุ่มออกจากกันได้เป็น 3 clade ได้แก่ clade1 คือ *M. anisopliae* จากประเทศญี่ปุ่น, clade2 คือ *B. bassiana* จากประเทศเคนาดาและเกาหลี และ *C. bassiana* จากประเทศเกาหลี และ clade3 คือ *B. brongnairtii* จากประเทศจีน และ *C. brongnairtii* จากประเทศญี่ปุ่น โดยตัวอย่างเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B001, B003, B007, B014, B017-B026 และ B029 ถูกจัดอยู่ใน clade2 กลุ่มเดียวกับเชื้อรา *B. bassiana* และ *C. bassiana* และตัวอย่างเชื้อรา *B. brongnairtii* ไอโซเลต B012 และ B028 กลุ่มเดียวกันกับเชื้อรา *C. brongnairtii*

ซึ่งผลการจัดกลุ่มด้วยการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนี้ ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* จากประเทศไทยใน clade3 ที่มีรูปแบบโคโลนีแตกต่างกัน 3 แบบออกจากกันได้ และไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. brongnairtii* จากประเทศไทยใน clade2 ที่มีรูปแบบโคโลนีแตกต่างกัน 2 แบบออกจากกันได้ แต่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราที่มีลักษณะสปอร์แตกต่างกันได้ นั่นคือ เชื้อรา *B. bassiana* จากประเทศไทยใน clade3 จัดอยู่ในกลุ่มที่สปอร์มีรูปทรงกลมรี และเชื้อรา *B. brongnairtii* จากประเทศไทยใน clade4 จัดอยู่ในกลุ่มที่สปอร์มีรูปทรงรีและยาว

จากผลการวิเคราะห์แหล่งอาศัยและแหล่งที่มาของเชื้อรา พบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* ที่มาจากแหล่งอาศัยและแหล่งที่มาต่างกันออกจากกันได้ ยกตัวอย่างเช่น เชื้อราไอโซเลต B014 และ B025 ที่แยกได้จากแหล่งอาศัยและแหล่งที่มาเดียวกัน คือ จากแมลงในอันดับ Coleoptera ในจังหวัดเชียงใหม่ ถูกจัดให้อยู่ห่างกันมากกว่าเชื้อราที่แยกได้จากแหล่ง

อาศัยและแหล่งที่มาต่างกัน คือเชื้อราไอโซเลต B022 ที่แยกได้จากดินในจังหวัดสระแก้ว กลับมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับเชื้อราไอโซเลต B024 ที่แยกได้จากแมลงในอันดับ Araneae ในจังหวัดจันทบุรี หรือเชื้อราไอโซเลต B021 ที่แยกได้จากดินในจังหวัดจันทบุรี มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับเชื้อราไอโซเลต B029 ที่แยกได้จากแมลงในอันดับ Coleoptera ในจังหวัดนครราชสีมา เป็นต้น ซึ่งอาจเป็นเพราะจำนวนตัวอย่างเชื้อราอ้างอิงในสกุล *Beauveria* มีน้อย จึงยากต่อการนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อราภายในสปีชีส์เดียวกันออกจากกันได้

4.3.6.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในบริเวณ ITSs และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S ร่วมกัน

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITSs จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ B002, B004-B006, B008-B011, B013, B015, B016 และ B027 และลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 จำนวน 17 ไอโซเลต ได้แก่ B001, B003, B007, B012, B014, B017-B026, B028 และ B029 มาเทียบเคียงกัน และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมร่วมกับตัวอย่างเชื้อราอ้างอิงในสกุล *Beauveria* จากฐานข้อมูล GenBank จำนวนทั้งหมด 18 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นเชื้อรา *B. bassiana* รหัส EU334677.1, EU334679.1 และ AB027382.1, เชื้อรา *C. bassiana* รหัส EF026006.1, เชื้อรา *B. brongnairtii* รหัส U18955.1 และ U35283.1, เชื้อรา *C. brongnairtii* รหัส AB100036.1 และ AB100037.1, เชื้อรา *B. velata* รหัส U35289.1 และ Z54134.1, เชื้อรา *B. amorpha* รหัส U18960.1 และ Z54133.1, เชื้อรา *B. calenodica* รหัส DQ350137.1, AY245625 และ DQ449653 และเชื้อรา *B. vermoconia* รหัส U18959.1, Z54109.1 และ U35288 และเชื้อรา *M. anisopliae* รหัส AB027383.1 ที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาจัดเรียงข้อมูล และตัดนิวคลีโอไทด์ด้าน 5' และ 3' ออกเพื่อให้เท่ากันทุกตัวอย่างโดยตัดเหลือ 336 คู่เบส แล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของ phylogenetic tree โดยผลการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* แสดงดังรูปที่ 4.17 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อราแต่ละสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* และตัวอย่างนอกกลุ่มออกจากกันได้ แบ่งออกเป็น 7 clade ได้แก่ clade1 คือ *M. anisopliae* จากประเทศญี่ปุ่น clade2 คือ *B. velata* จากประเทศจีน clade3 คือ *B. amorpha* จากประเทศจีน clade4 คือ *B. brongnairtii* จากประเทศจีน และ *C. brongnairtii* จากประเทศญี่ปุ่น clade5 คือ *B. vermoconia* จากประเทศญี่ปุ่น clade6 คือ *B. calenodica* จากประเทศจีน ไต้หวัน และสเปน และ clade7 คือ *B. bassiana* จากประเทศแคนาดาและเกาหลี และ *C. bassiana* จากประเทศเกาหลี โดยตัวอย่างเชื้อราไอโซเลต B001-B011, B014-B026 และ B028 ถูกจัดอยู่ใน clade7 และ *C. bassiana* และเชื้อรา *B. brongnairtii* ไอโซเลต B012, B013, B027 และ B028 ถูกจัดอยู่ใน clade4 กลุ่มเดียวกับเชื้อรา *B. brongnairtii* และเชื้อรา *C. brongnairtii* ซึ่งผลการจัดกลุ่มด้วยการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนี้

ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* จากประเทศไทยใน clade7 ที่มีรูปแบบโคโลนี เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างกัน 3 แบบออกจากกันได้ และไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อรา *B. brongnairtii* จากประเทศไทยใน clade4 ที่มีรูปแบบโคโลนีแตกต่างกัน 2 แบบออกจากกันได้ แต่ผลการจัดกลุ่มสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราที่มีลักษณะสปอร์แตกต่างกันได้ นั่นคือ เชื้อรา *B. bassiana* จากประเทศไทยใน clade7 จัดอยู่ในกลุ่มที่สปอร์มีรูปทรงกลมรี และเชื้อรา *B. brongnairtii* จากประเทศไทยใน clade4 จัดอยู่ในกลุ่มที่สปอร์มีรูปทรงรีและยาว

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *B. bassiana* จากประเทศไทยใน clade7 แล้วไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราที่มาจากแหล่งอาศัยและแหล่งที่มาต่างกันได้ คือเชื้อราที่มาจากแหล่งอาศัยต่างกัน และมีแหล่งที่มาเดียวกัน ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่นเชื้อราไอโซเลต B011, B015, B016 และ B025 เป็นเชื้อราที่มาจากแหล่งอาศัยต่างกัน คือแมลงในอันดับ Coleoptera, Lepidoptera และ Hymenoptera แต่มีแหล่งที่มาเดียวกันคือจังหวัดเชียงใหม่ พบว่ามีความสัมพันธ์กันใกล้ชิดกว่าไอโซเลตอื่น และมีบางไอโซเลตที่มาจากจังหวัดเชียงใหม่เช่นกัน นั่นคือไอโซเลต B014 และ B029 ที่ถูกจัดแยกกลุ่มออกไป นอกจากนี้เชื้อราที่มาจากแหล่งอาศัยเดียวกัน และมีแหล่งที่มาต่างกัน ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น เชื้อราที่ได้จากแมลงในอันดับ Coleoptera เหมือนกัน แต่มาจากแหล่งที่มาต่างกัน คือไอโซเลต B007 จากจังหวัดเชียงราย และ B023 จากจังหวัดนครราชสีมา ถูกจัดว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด นอกจากนี้เชื้อราที่มาจากแหล่งอาศัยและแหล่งที่มาต่างกัน ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันด้วย เช่น เชื้อราไอโซเลต B019 แยกได้จากดินในจังหวัดสมุทรสงคราม และ B029 แยกได้จากแมลงในอันดับ Coleoptera ในจังหวัดเชียงใหม่ ถูกจัดว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด เป็นต้น และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อรา *B. brongnairtii* จากประเทศไทยใน clade4 แล้ว พบว่า เชื้อราไอโซเลต B012, B027 และ B028 ซึ่งมีแหล่งอาศัยและแหล่งที่มาเดียวกัน คือ มาจากแมลงในอันดับ Coleoptera จากจังหวัดเชียงใหม่ มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดมากกว่าไอโซเลต B013 ที่มาจากแหล่งที่มาเดียวกัน แต่ไม่ทราบชนิดของแมลงอาศัย และการจัดกลุ่มเชื้อรา *B. brongnairtii* นี้ไม่สัมพันธ์กับรูปแบบโคโลนีของเชื้อราอีกด้วย คือ เชื้อราไอโซเลต B012 มีลักษณะโคโลนีต่างจากเชื้อรา *B. brongnairtii* ไอโซเลตอื่นๆ นอกจากนี้ไอโซเลต B013 ยังมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อรา *C. brongnairtii* มาก และเชื้อรา *B. vermoconia* และ *B. calenodica* มีความใกล้ชิดกับเชื้อรา *C. brongnairtii* น้อยที่สุด แต่สามารถจัดกลุ่มสปอร์ได้

และจากแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* อาจกล่าวได้ว่าเชื้อรา *B. brongnairtii* มีความใกล้ชิดกับเชื้อรา *B. amorpha* เชื้อรา *B. Vermiconia* และ *B. Calendonica* มากกว่า *B. bassiana* ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการหาเทคนิคแยกเชื้อรา *B. brongnairtii* ออกจากเชื้อราอื่นๆ ด้วย

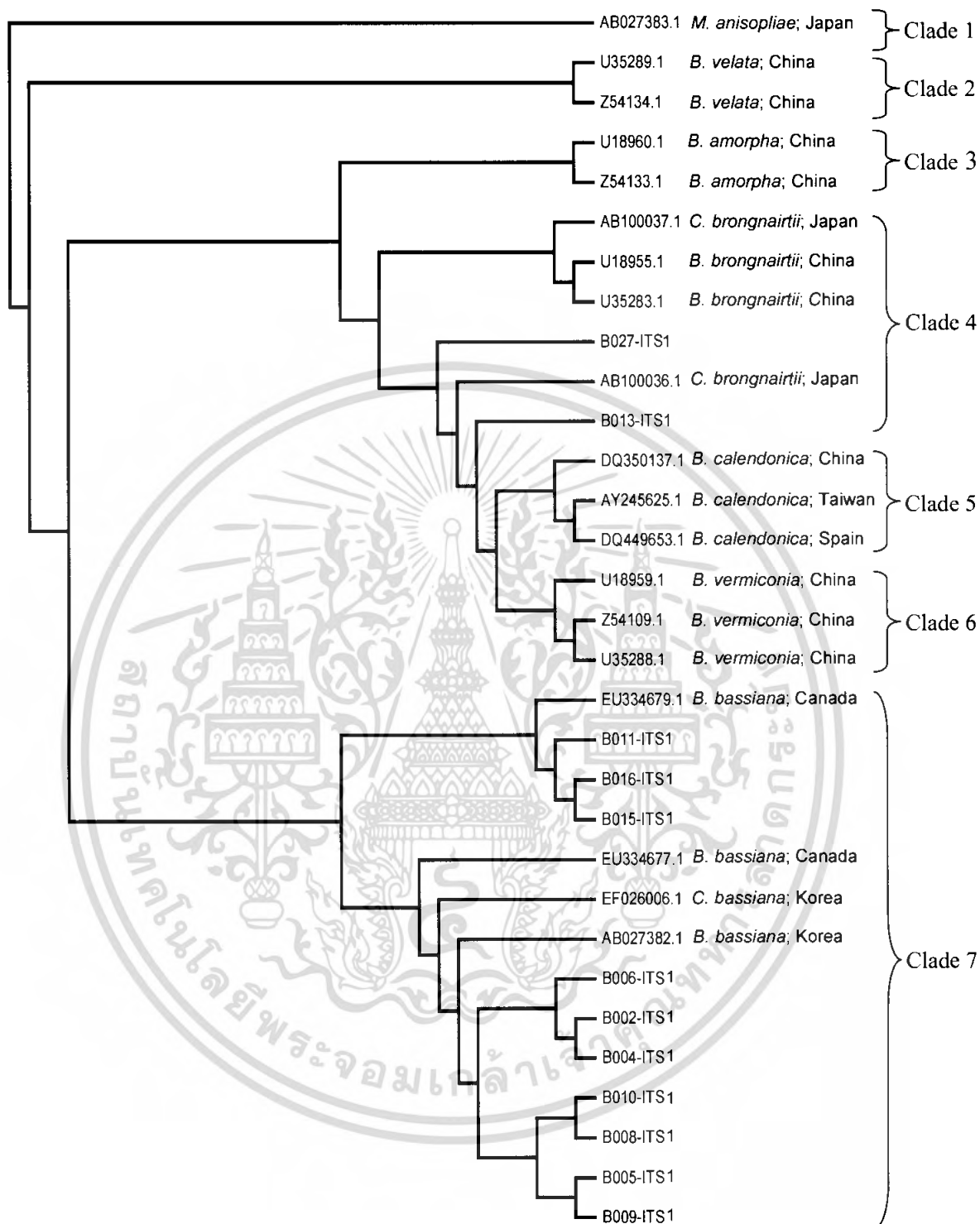
จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของ phylogenetic tree ทั้ง 3 รูปแบบนี้ จะเห็นได้ว่าตัวอย่างเชื้อราสปอร์เดียวกันจะถูกจัดให้อยู่ใน clade เดียวกัน ซึ่งไม่สามารถแยกความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างของเชื้อราที่มาจากแหล่งอาศัยและแหล่งที่มาต่างกันได้ อาจเนื่องจากบริเวณ ITSs ของตัวอย่างเชื้อราในสกุล *Beauveria* จากประเทศไทยในงานวิจัยนี้ได้แก่ เชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* มีความแปรผันทางพันธุกรรมต่ำ และไม่มีความแตกต่างจากเชื้อราในสกุล *Beauveria* จากประเทศอื่นๆ โดยผลจากการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Bidochka และคณะ (1994), Berretta และคณะ (1998), Castrillo และ Brooks (1998) และ Gaitan และคณะ (2002) ที่ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสกุล *Beauveria* จากแหล่งอาศัยและแหล่งที่มาต่างกัน พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันของเชื้อรากับแหล่งอาศัยและแหล่งที่มา ต่างจากรายงานของ St Leger และคณะ (1992), Glare และ Inwood (1998) และ Bidochka และคณะ (2002) ที่พบว่าเชื้อราที่มาจากแหล่งที่มาเดียวกัน มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสูง (high genetic similarity) และจากรายงานของ Maurer และคณะ (1997), Neuvéglise (1997), Urtz และ Rice (1997) และ Wada และคณะ (2003) ที่พบว่าเชื้อราที่มาจากแหล่งอาศัยชนิดเดียวกัน มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสูง

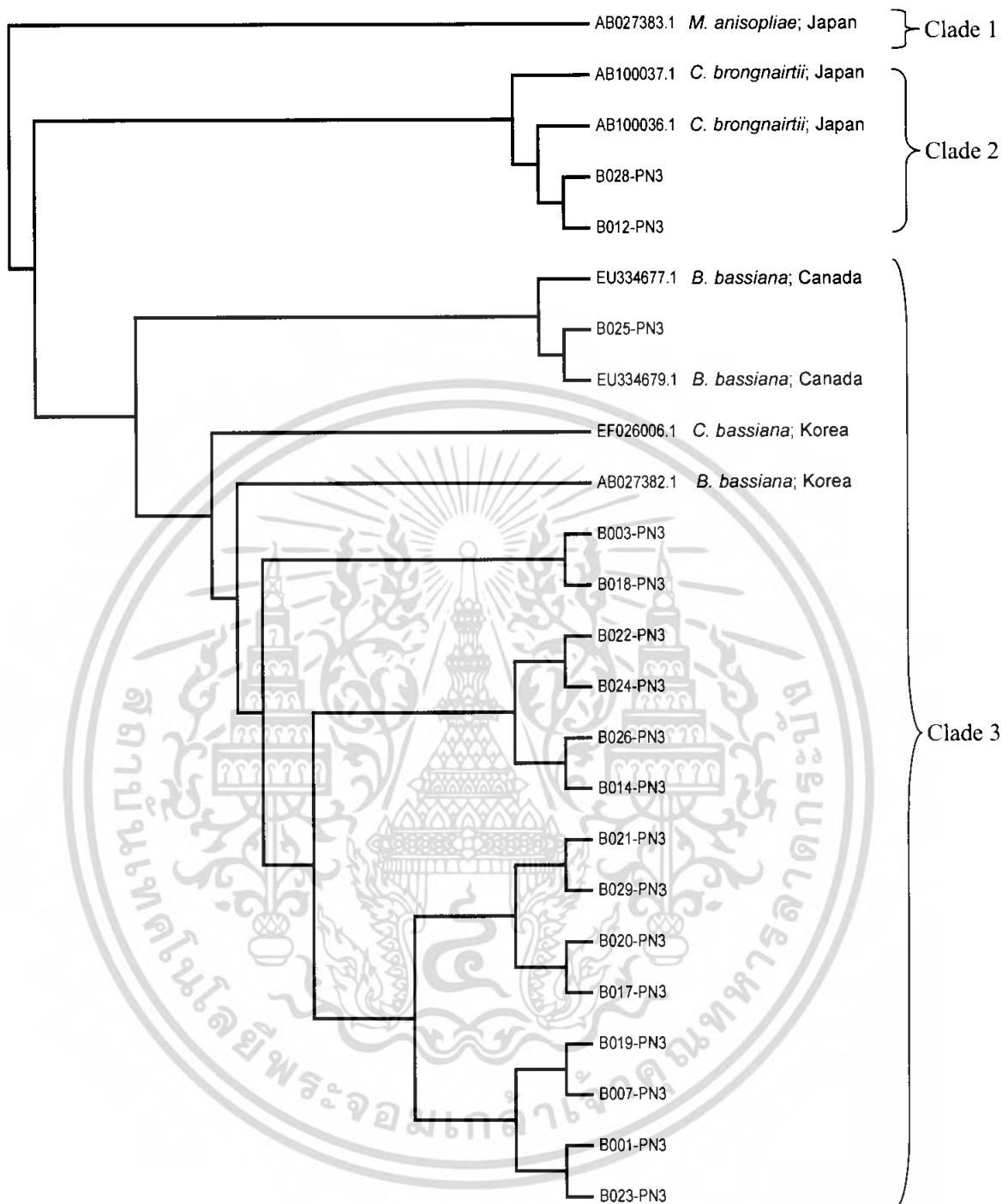
นอกจากนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของ phylogenetic tree ทั้ง 3 รูปแบบสามารถยืนยันได้ว่าการสืบพันธุ์ระยะ teleomorph และ anamorph มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด เนื่องจาก *B. bassiana* และ *C. bassiana* ถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกัน อีกทั้งเชื้อรา *B. brongnairtii* และ *C. brongnairtii* ก็ถูกจัดอยู่ใน clade เดียวกันเช่นกัน สอดคล้องกับงานรายงานของ Huang และคณะ (2002), Liu และคณะ (2002) และ Sasaki และคณะ (2007) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของการสืบพันธุ์ระยะ teleomorph และ anamorph จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA และยืนยันว่าระยะทั้งสองมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด และจากแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ทำให้ทราบว่าบริเวณ ITSs ของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *B. brongnairtii* ที่พบในประเทศไทย ไม่มีความแตกต่างกับบริเวณ ITSs ของเชื้อรา *C. bassiana* และ *C. brongnairtii* จากประเทศอื่นๆ ด้วย

อาจกล่าวได้ว่าการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถนำมาใช้จำแนกสปีชีส์ของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* ในงานวิจัยนี้ได้ ซึ่งผลการจัดกลุ่มดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของสปอร์ที่มีความแตกต่างออกไปอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังสัมพันธ์กับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ และผลการตัดของเอนไซม์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ที่สามารถจำแนกเชื้อรา *B. bassiana* ออกจากเชื้อรา *B. brongnairtii* ได้อย่างชัดเจน ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้เหล่านี้มาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบสปีชีส์ของเชื้อรา โดยเทียบกับฐานข้อมูลดังกล่าว ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและแม่นยำในระยะเวลาอันสั้นได้



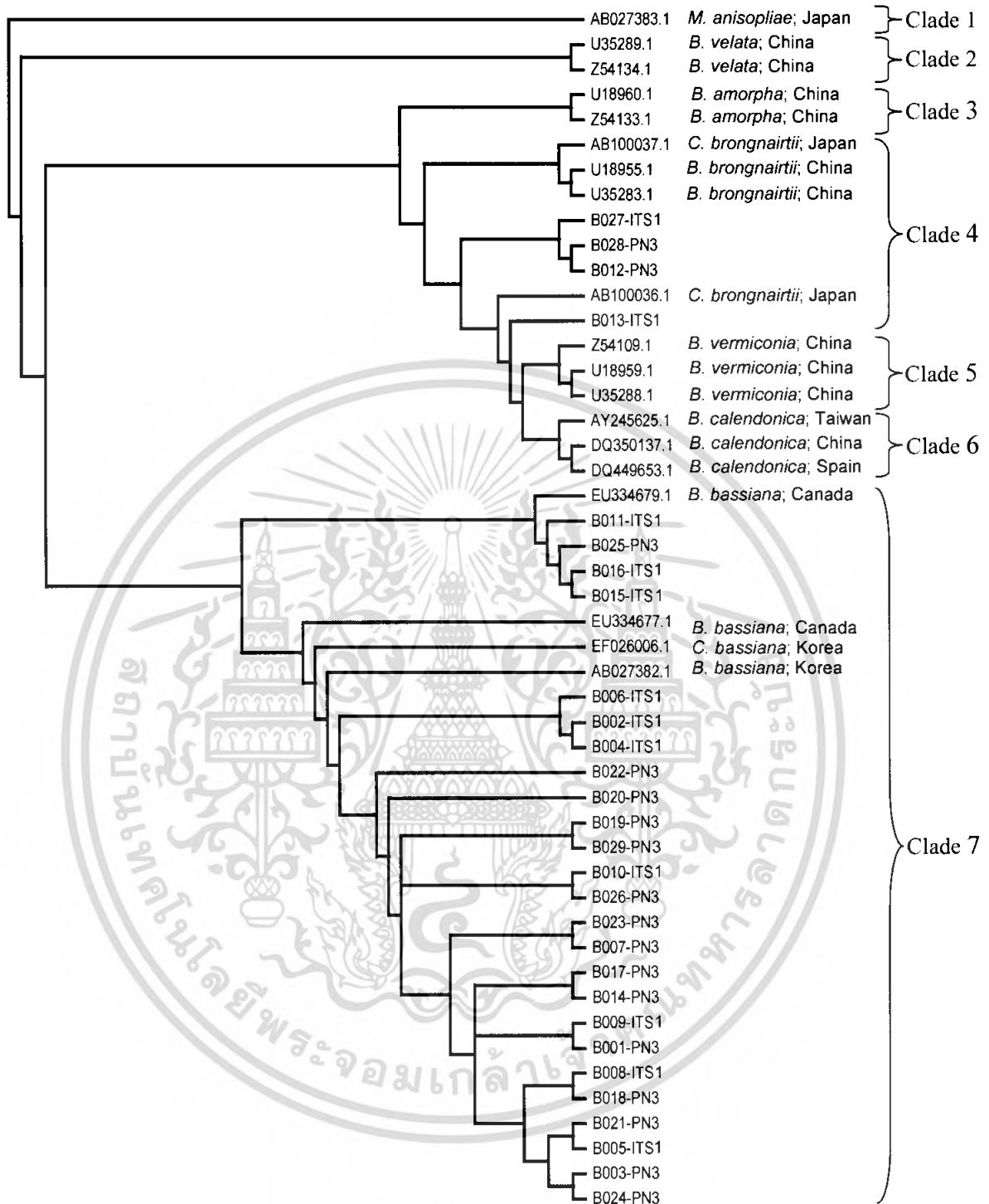
รูปที่ 4.15 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในบริเวณ ITSs จำนวน 12 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA จำนวน 17 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ในบริเวณ ITSs และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S ร่วมกัน จำนวน 29 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่แยกได้จากแมลงและดินในประเทศไทยจำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต โดยศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาทั้งจากลักษณะโคโลนีและสีของอาหารรูปร่างและขนาดของสปอร์ พบว่าลักษณะของตัวอย่างเชื้อราที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีความหลากหลาย จึงทำให้ไม่สามารถสรุปสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่ถูกต้องได้ จึงอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลเข้ามาช่วยในการจำแนก ซึ่งศึกษาเฉพาะตัวอย่างไอโซเลต B001-B029 โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S ของ rDNA โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ PN3/PN16 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกไอโซเลต มีขนาดประมาณ 600 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราแต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ จึงนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 จำนวน 12 ไอโซเลต ได้แก่ B002, B004-B006, B008-B011, B013, B015, B016 และ B027 และบริเวณ ITSs และบางส่วนของ 18S และ 28S rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16 จำนวน 17 ไอโซเลต ได้แก่ B002, B004-B006, B008-B011, B013, B015, B016 และ B027 มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำข้อมูลที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ทำให้ทราบว่าตัวอย่างเชื้อราสกุล *Beauveria* ในงานวิจัยนี้มีเพียง 2 สปีชีส์ คือ เชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *B. brongniartii* จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างเชื้อราไอโซเลต B001-B029 มาเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อราภายในสปีชีส์เดียวกัน ไม่พบความแตกต่างกัน แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างสปีชีส์ทั้งสองพบความแตกต่างกันเพียง 2.64 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าเชื้อราสกุล *Beauveria* มีความแปรผันทางพันธุกรรมในบริเวณ ITSs ต่ำ นอกจากนี้ยังนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีและชีวสารสนเทศด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *AluI* และ *AspLEI (HhaI)* สามารถแยกเชื้อรา *B. bassiana* ออกจากเชื้อรา *B. brongniartii* ได้ โดยการตรวจสอบผลการตัดด้วยชีวสารสนเทศด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 จะให้ข้อมูลที่ชัดเจนกว่าผลที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี และเมื่อนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา พบว่าสามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้อย่างชัดเจนเป็น 3 กลุ่ม คือ เชื้อรา *B. bassiana*, *B. brongniartii* และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ซึ่งนำมาใช้เป็น out-group โดยไม่สามารถบอกความสัมพันธ์กันของเชื้อรากับแหล่งกำเนิดหรือแมลงอาศัยได้อย่างไรก็ตามจำนวนไอโซเลตของ เชื้อราที่ใช้ในการศึกษานี้ อาจไม่เพียงพอที่จะใช้บ่งชี้ได้อย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชัดเจนว่าไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongnairtii* ในประเทศไทย รวมทั้งตำแหน่งที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลาย ซึ่งควรมีการใช้ทั้งจำนวนตัวอย่างมากขึ้นและใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งอื่นๆ มาใช้ในการศึกษาต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กลุ่มงานชีววิธี. สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร. กรมส่งเสริมการเกษตร. 2549. **เชื้อราบีวเวเรียควบคุมศัตรูพืช**. กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

เกษม สร้อยทอง และ สันติภาพ นวลจรัส. 2545. การทดสอบประสิทธิภาพของ *Beauveria bassiana* (Balsano) Vuillemin ในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) และหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มลิวัดย์ ปันยารชุน. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อรา. เอกสารวิชาการการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. หน้า 279-288.

วสันต์ จันทราทิตย์ วีระพงศ์ ลุติตานนท์ นายพุทธภูมิ ลำเจียกเทศ สมหญิง พรหมโส วงศกร พูนพิริยะ เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์ และ สยาม คุณเศษ. 2547. **เรียนรู้โปรแกรมชีวสารสนเทศด้วยตนเอง**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. **พันธูวิศวกรรมเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมบัติ รุจาคม ภมร ปัดดาวะตั้ง นลินี เจียงวรรณะ และ เพชรหทัย ปฎิรูปานุสร. 2541. การควบคุมแมลงสิ่ง โดยเชื้อราขาว *Beauveria bassiana* และเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae*. ในการสัมมนาทางวิชาการ เรื่องการพัฒนาข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ครั้งที่ 9. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรรณพ องศ์สกุล และ สุรไกร เพิ่มคำ. 2528. การทดสอบความสามารถของเชื้อราขาว (*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.) ในการทำให้เกิดโรครากับแมลงศัตรูพืชบางชนิดในห้องปฏิบัติการ. **ในวารสารสงขลานครินทร์**. ปีที่ 8. ฉบับที่ 1. กันยายน 2528. หน้า 1-6.

Abdo, C.N., Nemer, N., Jawdah, G., Atamian, Y.A. and Kwar, N.S. 2006. Isolation of *Beauveria* species from Lebanon and evaluation of its efficacy against the cedar web-spinning sawfly, *Cephalcia tannourinensis*. **BioControl**. 53: 341-352.

Aung, O.M. 2008. Biodiversity and molecular phylogeny of entomopathogenic fungi in Chiangmai province, Thailand. Ph.D.Thesis of Philosophy in Biotechnology in Plant Pathology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Balsamo, C.G. 1835. Osservazione sopra una nuova specie di Mucedinea del genere *Botrytis*, etc. **Italian Bible**. 79: 125.
- Beauverie, J. 1911. Notes sur les Muscardiness, Sur une Muscardine du Ver à Soie, non produite par le *Botrytis bassiana*. Étude du *Botrytis effusa* sp. nov. *Rapp. Comm. Administrative du lab. d'études de la soie*. **Lyon**. 14: 5.
- 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 polymorphism DNA (RAPD). **Current Genetics**. 25: 107-113.
- Bidochka, M.J., Menzies F.V. and Kamp, A.M. 2002. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. **Archives of Microbiology**. 178: 531-537.
- Bisset, J. and Widden, P. 1988. A new species of *Beauveria* isolated from Scottish moorland soil. **Canadian Journal of Botany**. 66: 361-362.
- Brady, B.L.K. 1979. *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute. Kew. England.
- Castrillo, L.A., Vandenberg, J.D. and Wraight, S.P. 2003. Strain-specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. **Journal of Invertebrate Pathology**. 82: 75-83.
- Coates, B.S., Hellmich, R.L. and Lewis, L.C. 2002. *Beauveria bassiana* haplotype determination based on nuclear rDNA internal transcribed spacer PCR-RFLP. **Mycological Research**. 106: 40-50.
- Cravanzola, F., Piatti, P., Bridge, P.D. and Ozino, O.I. 1997. Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* isolated from the european cockchafer (*Melolontha* spp.). **Letters in Applied Microbiology**. 25: 289-294.
- Daniel, J. and Sullivan, O. 2000. Methods for Analysis of the Intestinal Microflora. **Current Issues in Intestinal Microbiology**. 1: 39-50.
- de Hoog, G.S. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium*. **Studies in Mycology**. 1: 1-41.
- de Hoog, G.S. and Rao, V. 1975. Some new Hyphomycetes. **Persoonia**. 8: 207-212.

- de Muro, M.A., Mehta, S. and Moore, D. 2003. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. **FEMS Microbiology Letters**. 229: 249-257.
- de Muro, M.A., Elliott, S., Moore, D., Parkwe, B.L., Skinner, M., Reaid, W. and Bouhssini M.E. 2005. Molecular characterisation of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of Sunn Pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). **Mycological Research**. 109 (3): 294-306.
- Estrada, M.E., Camacho, M.V. and Benito, C. 2006. The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using Inter-microsatellites (ISSRs). **Cellular and Molecular Biology Letters**. 12: 240-248.
- Felsenstein, J. 2004. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author**. Department of Genome Sciences, University of Washington. Seattle.
- Gaitan, A., Valderrama, A.M., Saldarriaga, G., Velez, P. and Bustillo, A. 2002. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* and other insects. **Mycological Research**. 106: 1307-1314.
- Glare, T.R., Jackson, T.A. and Ernesto-Cisternas, A. 1993. *Beauveria vermiconia* (Deuteromycete) is an entomogenous fungus. **Mycological Research**. 97: 336-338.
- Glare, T.R. and Inwood, A.J. 1998. Morphological and genetic characterisation of *Beauveria* spp. from New Zealand. **Mycological Research**. 102: 250-256.
- Glare, T.R. 2004. Molecular characterisation in the entomopathogenic fungal genus *Beauveria*. **Laimburg Journal**. 1: 286-298.
- Glare, T.R., Reay, S.D., Nelson, T.L. and Moore, R. 2008. *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. **Mycological Research**. 112: 352-360.
- Hadapad, A., Reineke, A. and Zebitz, C.P.W. 2006. Genetic variability among *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch isolates from various geographical and host origins based on AFLP analysis. **Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie**. 10: 415-418.

- Hegedus, D.D. and Khachatourians, G.G. 1996. Identification and Differentiation of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Using Polymerase Chain Reaction and Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. **Journal of Invertebrate Pathology**. 67: 289-299.
- Huang, B., Chun-ru, L., Zhen-gang, L., Mei-zhen, F. and Zeng-zhi, L. 2002. Molecular identification of the teleomorph of *Beauveria bassiana*. **Mycotaxon**. 81: 229-236.
- Hywel-Jones, N.L. 2002. Whole ascospores and part-spores in the mcgagenus *Cordyceps*. **Mycological Research**. 105: 3-4.
- Li, Z., Li, C., Huang, B. and Meizhen, F. 2001. Discovery and demonstration of the teleomorph of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. **Chinese Science Bulletin**. 46: 751-753.
- Liu, A.Y. and Liang, Z.Q. 1993. A new record of the genus *Cordyceps* in China (in Chinese). **Acta mycologica Sinica**. 12: 248-250.
- Martin, K.J. and Rygiewicz, P.T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. **BMC Microbiology**. 5: 28
- Moore-Landecker, E. 1996. **Fundamentals of the fungi**. 4th ed. Rowan College of New Jersey. 574 p.
- Mugnai, L., Bridge, P.D. and Evans, H.C. 1989. A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. **Mycological Research**. 92: 199-209.
- Maurer, P. Couteaudier, Y. Girard, P.A. Bridge, P.D. and Riba, G. 1997. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. **Mycological Research**. 101: 159-164
- Neuvéglise, C.Y., Brygoo, Y. and Riba, G. 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. **Mycological Research**. 98: 322-328.
- Neuvéglise, C., Brygoo, Y. and Riba, G. 1997. 28S rDNA group-I introns: a powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii*. **Molecular Ecology**. 6: 373-381.
- Pettit, R.H. 1895. Studies in artificial cultures of entomogenous fungi. **Botany Entomology Diversity Bulletin**. 97: 339.

- Rehner, S.A. and Buckley, E.P. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**. 97: 84-98.
- Rehner, S.A., Posada, F., Buckley, E.P., Infante, F., Castillo, A. and Vega, F.E. 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana* s.l. pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 93: 11-21.
- Roberts, D.W. 1996. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. Symptoms and detection in moribund hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**. 8: 222-227.
- Samson, R.A. and Evans, H.C. 1982. Two new *Beauveria* spp. from South America. **Journal of Invertebrate Pathology**. 39: 93-97.
- Sasaki, F., Miyamoto, T., Tamai, Y. and Yajima, T. 2007. Note on *Cordyceps brongniartii* Shimazu collected from the wild in Japan. **Mycoscience**. 48: 312-315.
- Shimazu, M., Mitsuhashi, W. and Hashimoto, H. 1988. *Cordyceps brongniartii* sp. nov. the teleomorph of *Beauveria brongniartii*. **Mycological Society of Japan**. 29: 323-330.
- Spegazzini, C. 1880. *Sporotrichum globuliferum*, Fungi Argentini. **An Soc Cient Argentina**. 10: 278.
- St Leger, R.J., Allee, L.L., May, B., Staples, R.C. and Roberts, D.W. 1992. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. **Mycological Research**. 96: 1007-1015.
- Strasser, H., Vey, A. and Butt, T.M. 2000. Are there any risk in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolytlocadium* and *Beauveria* species?. **Biocontrol Science and Technology**. 10: 717-735.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acid Research**. 25: 4876-4882.
- Urtz, B.E. and Rice, W.C. 1997. RAPD-PCR characterization of *Beauveria bassiana* isolates from the rice water weevil *Lissorhoptrus oryzophilus*. **Letter in Applied Microbiology**. 25: 405-409.

Vuillemin, P. 1912. *Beauveria*, nouveau genre de Verticillacées. **Bulletin de la Société**

Botanique de France. 59: 34.

Wada, S. and Horita, M. 2003. Discrimination of Japanese isolates of *Beauveria brongniartii* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) by RFLP of the rDNA-ITS regions. **Applied Entomology and Zoology.** 38 (4): 551-557.

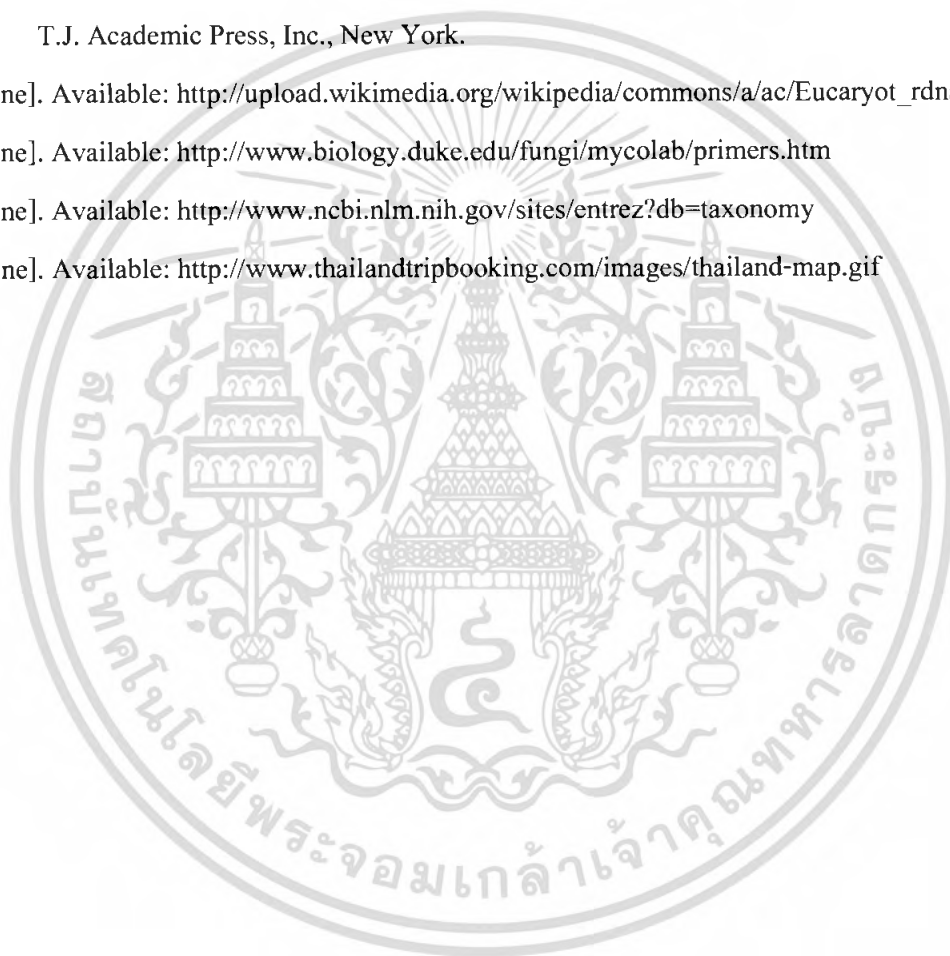
White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322 p. In: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.** eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. Academic Press, Inc., New York.

[Online]. Available: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Eucaryot_rdna.png

[Online]. Available: <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

[Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>

[Online]. Available: <http://www.thailandtripbooking.com/images/thailand-map.gif>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อราสกุล *Beauveria*

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Dichloran-Glycerol (DG18) Agar สำเร็จรูป; Merck

ส่วนประกอบ

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

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

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) สำเร็จรูป; Scharlar

ส่วนประกอบ

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

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

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato Dextrose Broth (PDB) สำเร็จรูป; Scharlar

Potato peptone	4.0	กรัมต่อลิตร
D (+) glucose	20.0	กรัมต่อลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

สารละลาย EDTA (ethylene diamine tetraacetate) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ส่วนประกอบ

1M EDTA	372.24	กรัมต่อลิตร
0.5M EDTA	186.12	กรัมต่อลิตร

ชั่ง EDTA 186.12 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นประมาณ 600 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ magnetic bar สามารถให้ความร้อนได้เล็กน้อย จากนั้นปรับพีเอชเป็น 8.0 โดยใช้สารละลายกรด-ด่าง และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10X TBE buffer

ส่วนประกอบ

Tris base	108.0	กรัมต่อลิตร
Boric acid	55.0	กรัมต่อลิตร
0.5M EDTA (pH 8.0)	40.0	มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 108 กรัม และ boric acid 55 กรัม ใส่ลงใน 0.5M EDTA (pH 8.0) 40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์

ดูดสารละลายเอทธิเดียม โบรไมด์ (ethidium Bromide) จาก stock 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 1X TBE buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในถาดย้อมเจล และผสมให้เข้ากัน

การเตรียมไพรมอร์

สารละลายไพรมอร์เริ่มต้นมีความเข้มข้น A นาโนโมลต่อไมโครลิตร (หรือ A พิโคโมลต่อไมโครลิตร) ต้องการเตรียมไพรมอร์ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร คำนวณจากสูตร

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

ดังนั้น ต้องดูดสารละลายไพรมอร์เริ่มต้นเริ่มต้นมา $(20)(50)/A$ ไมโครลิตร และเติมน้ำปราศจากไอออน $50 - [(20)(50) / A]$ ไมโครลิตร

การเตรียมสีย้อม lactophenol cotton blue

ส่วนประกอบ

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

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายเข้าด้วยกัน และกรองด้วยกระดาษกรอง และเก็บไว้ในขวดสีชา

ภาคผนวก ก

การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

เทคนิคเจลอเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในสารละลาย 1X TBE buffer วางลงบนเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า เทสารละลาย 1X TBE buffer ให้ท่วมผิวหน้าอะกาโรสเจล แล้วจึงดูดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อมปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากไอออน 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงหยอดลงในหลุมอะกาโรสเจล เปรียบเทียบ กับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ปลดยกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปบวก โดยใช้ความต่างศักย์ (voltage) คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นสีย้อมเคลื่อนที่ไปประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของความยาวของเจล นำอะกาโรสเจลไปแช่ในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นล้างสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ออกโดยการนำอะกาโรสเจลโดยแช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 20-30 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต และบันทึกผลเป็นภาพถ่าย

การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; OD)

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

จากค่ามาตรฐาน ถ้าวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1 แสดงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นคือ

ค่า OD เท่ากับ 1 มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

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

ในการวัดค่า OD นี้ ได้นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเจือจาง 100 เท่า ดังนั้น ค่า dilution factor เท่ากับ 100 ต้องเข้าไปคูณกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่คำนวณได้ (1) เพื่อให้ได้ค่า ปริมาณดีเอ็นเอจริงทั้งหมด นั่นคือ

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

เมื่อ $A =$ ค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร

$B =$ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เมื่อทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดแล้ว จึงนำมาคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ ในเทคนิค PCR ในหน่วยไมโครลิตร โดยต้องการปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครกรัม (1000 นาโนกรัม) มีวิธีการคำนวณดังนี้

ปริมาณดีเอ็นเอ B ไมโครกรัม ต้องคูณสารละลายดีเอ็นเอ = 1 มิลลิลิตร

ปริมาณดีเอ็นเอ B ไมโครกรัม ต้องคูณสารละลายดีเอ็นเอ = 1000 ไมโครลิตร

ปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ต้องคูณสารละลายดีเอ็นเอ = $1000/B$ ไมโครลิตร

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

ดังนั้น หากต้องการปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครกรัม เพื่อใช้ในการทำเทคนิค PCR โดยถ้า วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ได้เท่ากับ A และคำนวณความเข้มข้นของ สารละลายดีเอ็นเอได้เท่ากับ B ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องคูณสารละลายดีเอ็นเอเท่ากับ C ไมโครลิตร