รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยพัฒนาด้านการอารักขาพืชในประเทศไทย
2. **โครงการวิจัย** : ระบุชื่อโครงการวิจัยตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

   กิจกรรม : ระบุชื่อกิจกรรมตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : ระบุชื่อกิจกรรมย่อยตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

3. **ชื่อการทดลอง : การใช้ดีเอ็เอบาร์โค้ดเพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Beauveria bassiana***

   ชื่อการทดลอง : DNA barcoding for identification of *Beauveria bassiana*

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นายเมธาสิทธิ์ คนการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

   ผู้ร่วมงาน:

   1.นางเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

   2. นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

   3. นางรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล สำนักวิจัยพัฒนเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ

แยกเชื้อรา *B. bassiana* จากแมลงที่ติดเชื้อราและดินบริเวณแปลงปลูกพืชของเกษตรกร โดยวิธี bating technique จำนวน 15 ไอโซเลท ในปีงบประมาณ 2561 เชื้อราในกลุ่มบิวเวอร์เรียมีโครงสร้างสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคนิเดียเหมือนกันจึงไม่สามารถจัดจำแนกด้วยลักษณะภายนอกได้ ดังนั้นได้นำเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบและจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มดังกล่าวในบริเวณ 3 ยีนคือ ITS, βt และα-1factor โดยใช้ primer ITSF1-ITSF2, Bt2a-Bt2b และ EF1F-ER1R เพื่อเปรียบเทียบหาบริเวณชิ้นส่วนของยีนที่เหมาะสมการจัดจำแนกและตรวจสอบ ในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction ร่วมกับการผลจากการวิเคราะห์ Automatic barcode gap discovery

พบว่าจากแผนภูมิต้นไม้ของ ITS gene สามารถแยก *Beauveria* spp. ออกจากเชื้อราโรคแมลงและเชื้อราอื่นๆได้ ดังนั้นเบื้องต้นสามารถใช้เป็น DNA marker ในการตรวจสอบ และจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มบิวเวอร์เรีย และสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจพิสูจน์พันธุกรรมเชื้อราในกลุ่มนี้เพื่อขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตรได้ สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ beta-tubulin และ elongation factor เนื่องจากในบริเวณยีนดังกล่าวมีปริมาณ G-C content ที่สูง ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อราบางไอโซเลท และ barcode gaps บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์บน ITS และ βt มีเปอร์เซ็นต์ซ้อนทับใกล้เคียงกัน ส่วนบริเวณยีน α-1factor ซึ่งมีค่า distribute overlap ระหว่าง intra- และ interspecific genetic variation ค่อนแตกต่างกันผลที่ได้สอดคล้องกับแผนภูมิต้นไม้พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถแยกกลุ่มย่อยในระดับ *B. bassiana* species complex

Abstract

Isolation of *B. bassiana* from infected insects and soil at agricultural farm by using bating techniques about 15 isolates during 2561. This fungi was similar complexes structures such as characteristic of colonies and conidia that could not be able to distinguishes them by using morphological structure. Therefore, DNA barcoding techniques would be applied for detection and classification by using the data from 3 gene regions on ITS, βt and α-1factor for comparison of nucleotide data which genes has to be potential of dna marker of this fungi by PCR techniques and Automatic barcode gap discovery. The phylogenetic inferences of ITS and βt showed *Beauveria* spp. were be able to be on corrected position on clade with supported by high bootraps and also the rage of distribute overlap was not high as much α-1factor. However, ITS was good for DNA barcode of this fungi which according to easy to amplify and phylogenetic inferences accurated. The βt and α-1factor were perfected but it was difficult to work out on amplification. In α-1factor gene was fit to be DNA marker for classification in *B. bassiana* species complex according to the distribute overlap between intra-and interspecific genetic variation were high gaps which could be seen on phylogenetic tree of *B.bassiana* species complex level.

6. คำนำ

ปัจจุบันการควบคุมแมลงศัตรูพืชในธรรมชาติโดยการใช้ ชีวินทรีย์ (biological control agents) ซึ่งเป็นวิธีการ ที่นำเอาความหลากหลายทางด้านชีวภาพ ประกอบด้วยตัวห้ำ (predator) ตัวเบียน (parasite or paracitoid) และเชื้อโรค (pathogen) ไม่ว่าจะเป็นแมลงศัตรูพืช โรคพืช หรือ วัชพืชทางการเกษตร รวมทั้งที่เป็นแมลงพาหะ (vectors) มาใช้ในการจัดการระบบปลูกพืช โดยเน้นการควบคุมศัตรูพืชแบบธรรมชาติโดยอาศัยหลักของนิเวศวิทยาเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี หรือ การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี (biocontrol) การใช้สารชีวินทรีย์หรือชีวภัณฑ์ต่างๆ ในปัจจุบันยังมีความจำกัดอยู่มากเช่น ไม่สามารถซื้อได้ตามท้องตลาด มีขบวนการที่ยุ่งยากซับซ้อนในการผลิต หรือ ผลิตภัณฑ์ที่วางขายตามท้องตลาดไม่มีคุณภาพ ทำให้เกษตรกรขาดความเชื่อถือในการใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ในปัจจุบันกรมวิชาการเกษตรเริ่มมีการผลักดันให้มีการขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์มากขึ้น เพื่อควบคุมคุณภาพของสารชีวภัณฑ์ และให้ผลิตภัณฑ์ถูกต้องเป็นไปตามข้อกฎหมาย โดยทั้งนี้ให้ขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายทางการเกษตร ซึ่งหน้าที่หลักกรมวิชาการเกษตรได้มอบหมายให้กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชเป็นผู้รับผิดชอบตรวจสอบผลิตภัณฑ์เชื้อราโรคแมลงที่นำมาขึ้นทะเบียนดังกล่าว

เชื้อรา *B. bassiana* เป็นเชื้อราอยู่ในกลุ่มของ entomopathogenic fungi มีความคล้ายคลึงกันทางด้านสัณฐานวิทยา (cryptic species) และอยู่ในกลุ่มที่เรียกว่า species complex คือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อราระดับพันธุ์กรรมได้ โดยวิธีสัณฐานวิทยา (morphological studies) จากปัญหาดังกล่าวจึงทำให้ระบบการตรวจสอบเชื้อราโรคแมลงในสารชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตรไม่มี แม่นยำและถูกต้องตามมาตรฐานสากล

ดังนั้นการประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นระบบมาตรฐานมาช่วยระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตและสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ จึงมีความสำคัญมากเพราะเนื่องจากเทคนิคดังกล่าวมีความถูกต้อง รวดเร็ว และแม่นยำ ตรวจสอบและจำแนกได้ตรงตามลักษณ์ทางพันธุกรรมได้ถูกต้องเป็นที่ยอมรับในระบบสากล ซึ่งผลการตรวจสอบดังกล่าวจะช่วยในการสนับสนุนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวินทรีย์สู่เชิงพาณิชย์ของกรมวิชาการเกษตรนอกจากนั้นเทคนิคดังกล่าวยังช่วยในการปกป้องทรัพย์สินทางปัญญาของกรมวิชาการเกษตรได้ ในกรณีที่มีการนำเชื้อราสายพันธุ์กรมวิชาการเกษตรไปผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์เชิงพาณิชย์โดยไม่ได้รับอนุญาต และป้องกันการเอาเปรียบจากบริษัทผู้ผลิตสารชีวภัณฑ์ที่ผสมเชื้อราสายพันธุ์อื่นที่ไม่ตรงกับฉลากที่ระบุเอาไว้ รวมทั้งยังเป็นประโยชน์มากในการตรวจสอบเชื้อราแมลงสายพันธุใหม่ที่จะค้นพบในอนาคต และเป็นประโยชน์ต่อการสร้างฐานข้อมูลเชื้อราโรคแมลงของกรมวิชาการเกษตรในระบบสากล

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1 ชุดสำสำหรับสกัดดีเอ็น (Pepman Ultra DNA extraction)

2 ค่าสังเคราะห์ไพร์เมอร จำนวน 6 คู่

3 ค่าหลอดไมโครทูป 0.2 ml และ 1.5 ml

4 ค่าทิบ (Tip) ดูดสารเคมี (10 µl, 200 µl,1000µl)

5 เอการ์โรสเจล (agarose gel) 100 กรัม

6 เอ็นเอ มาค์เกอร์ (DNA marker 100 base pair) 75 UG

7 ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพีซีอาร์โปรดัก (High pure PCR product Purification kit) 50 rxns

8 ชุดดีเอ็นเอ ตรวจสอบ Red gel

9 สีย้อมสารพันธุกรรม

10 สารเคมี (น้ำกลั่นสำหรับทำปฏิกิริยา พีซีอาร์, อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, MEA Tris-HCL, EDTA, NaCl, Na2SO3, Isomyl alcohol, Isopropanol)

11 . พีซีอาร์, เอมไซม์ และ เทคโพลีเมอร์เรส PCR & enzyme &Tag polymerase

12. เชื้อรา *B .bassiana*

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อรา *B .bassiana* จากแมลงที่เป็นโรคตามธรรมชาติ ดิน และสารชีวภัณฑ์

เก็บตัวอย่างแมลงที่เป็นโรค ดินจากแปลงปลูกพืชแปลงเกษตรกร ในเขตจังหวัดภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง และอุตรดิตถ์) ภาคอีสาน (เลย หนองคาย และ อุบลราชธานี) ภาคกลาง (เพชรบูรณ์ กำเพชร) ภาคตะวันตก (ราชบุรี เพชรบุรี และกาญจนบุรี) ภาคตะวันออก (ตราด ระยอง และจันทร์บุรี) และภาคใต้ (นครศรีธรรมราช สงขลา และชุมพร) และสารชีวภัณฑ์ มาแยกเชื้อราดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อรา MEA (malt extract agar) ผสมสารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนแบคทีเรีย โดยวิธี แยกจากโครงสร้างของเชื้อราโดยตรง และสำหรับตัวอย่างดินจะทำการแยกเชื้อราโดยวิธี insect – baiting technique บ่มเชื้อราไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาพปลอดแสงประมาณ 2-3 วัน หลังจากนั้นแยกเชื้อราบริสุทธิ์ โดยวิธี hypal trip isolation ลงในอาหาร MEA และตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่นๆ อย่างละเอียด ก่อนเก็บเชื้อราไว้เป็น stock culture และเพื่อจัดจำแนก (identification) ทางด้านสัณฐานวิทยาเบื้องต้น และบันทึกผลการทดลอง

2. การตรวจสอบและจัดจำแนกเชื้อ *Beauveria* spp. ในระดับชีวโมเลกุล

เลี้ยงเชื้อรา *Beauveria* spp. บนอาหาร MEA (Malt extract Agar) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7-10 วัน จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Prep man ultra (Applied Biosystems) โดยวิธีการขูดเส้นใยปริมาณเล็กน้อย ลงใน Eppendorf tube ขนาด 100 µl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการบดเส้นใยแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที (rpm) ประมาณ 10 นาที เก็บสารแขวนลอยดีเอ็นเอที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอต่อไป วัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ โดยเครื่องวัดคุณภาพดีเอ็นเอ Nano Drop spectrophotometer เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีการ PCR (polymerase chain reaction) คัดเลือก primer และหาอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา

ที่เหมาะสม โดยใช้ primer ในส่วนของ rDNA (ITS1, ITS2, และ 5.8 S rRNA Gene) คือ primer ITS F1(5-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3)-ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) (Gardes and Brun 1993, White *et al.,* 1990) และ protein-code gene ได้แก่ partial of β-tubulin ; Bt2a (5-GGTAACCAAATCGGTGCTGCT-3)-Bt2b(5'-ACCCTCAGTGTAGTG ACCCTTGGC-3') (Glass and Donaldson 1995) และ translation elongation factor 1α ได้แก่ primer EF1F(5-TGCGGTGGTATCGA CAAGCGT-3 และEF1R (5- AGCATGTTGTCGCCGTTG AAG-3) (Linnakoski *et al.,* 2010)

ส่วนผสมปฏิกิริยา PCR 25 μl เพิ่มปริมาณดีเอ็น ระกอบไปด้วยสารเคมีต่อไปนี้ (Mytag buffer, Bioline,USA) (Linnakoski *et al.,* 2010)

PCR grade water	16.5 μl
PCR buffer	5 μl
Forward primer	0.5 μl
Reverse primer	0.5 μl
Tag polymerase	0.5 μl
DNA template	2 μl

จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง thermocycle ในสภาวะปฏิกิริยาดังนี้

Primer	hot start	denature	annealing	Extension	final extension
ITSF1-ITSF4	95 °C 4 นาที	95 °C 1 นาที ←	50-52°C 30 วินาที	→ 72 °C 1 นาที 35 รอบ	72 °C 4 นาที
Bt2a-Bt2b	95 °C 4 นาที	95 °C 1 นาที ←	54-57°C 30 วินาที	→ 72 °C 1 นาที 35 รอบ	72 °C 4 นาที
EF1F-ER1R	95 °C 4 นาที	95 °C 1 นาที ←	55-60°C 30 วินาที	→ 72 °C 1 นาที 35 รอบ	72 °C 4 นาที

บันทึกผลการทดลอง

ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอ ภายใต้ UV light บน 1% agarose gel ในสารละลาย 0.5 x TAE buffer (40 mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 8)และย้อมสีดีเอ็นเอด้วย Gelred ™ nucleic acid (Biotium) จากนั้นทำดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป DNA Clean and Concentrator

™—25 Kit, (Zumo Research) ส่งตัวอย่าง PCR product ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

วิเคราะห์ผลการทดลอง

1.1 วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม Bioinformatics เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ Basic local alignment search tool (BLAST) เพื่อให้ทราบสายพันธุ์ของเชื้อราในระบบ Gene bank ของ NCBI (National central for biotechnology information) จัดเตรียมข้อมูล DNA consensus โดยใช้โปรแกรม MEGA 6.5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al.,* 2013) และ MAFFT V7. (a multiple sequences alignment program) (Katoh, 2013) วิเคราะห์จัดลำดับวิวัฒนาการโดยวิธี Maximum likelihood phylogentic tree และลงทะเบียนเชื้อราใน NCBI (national central for biotechnology information) เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงในระบบสากล

1.2 วิเคราะห์หาตำแหน่งดีเอ็นบาร์โค้ดแก็ป (DNA barcoding gap) บนตำแหน่งยีนนั้นๆบริเวณ intra- และ interspecific genetic variation โดยใช้ความแตกต่างระหว่างชิ้นส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือที่เรียกว่า Automatic barcode gap เพื่อดูลักษณะของ Distribute overlap ทั้ง 3 gene คือ ITS βt และ EF (http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/temp/index.html) (Puillandre *at al.,* 2012) โดยใช้โมเดล Jukes-Cantor(JC69) และแสดง phylogenetic tree โดยใช้ maximum likelihood

เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2559 สิ้นสุด เดือนมกราคม 2561

1.ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง, กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

แยกเชื้อราโรคแมลง *B. bassiana* ที่มีศักยภาพในการควบคุมแมลง ในเบื้องต้นพบว่าเชื้อราในดินที่เก็บจากบริเวณแปลงปลูกพืชของเกษตรกรในเขตจังหวัดภาคเหนือ จังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง และภาคตะวันตก ราชบุรี เพชรบุรี และกาญจนบุรี และภาคใต้ จังหวัด ชุมพร โดยวิธี bating technique แยกได้จำนวน 20 ไอโซเลต เก็บไว้ใน (*B. bassiana* สายพันธุ์ DOA) (fig 1) ทำเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยวิธี single spore และ hyphal trip แล้วจัดกลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก (fig2) ในการตรวจสอบโดยวิธีชีวโมเลกุลต่อไป เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นกสกัดดีเอ็นเอ พบว่าได้ปริมาณดีเอ็นเอที่พอเหมาะและง่ายต่อการเพิ่มปริมาณในการทำปฏิกิริยา PCR และไม่ควรทิ้งเชื้อราดังกล่าวให้มีอายุเกิน 10 วัน เนื่องจากผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ปริมาณจะต่ำ โดยสังเกตุจากเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ หรือดูบน gel electrophoresis

ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีนบริเวณ The internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้ primer ITSF1-ITSF2 ในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งมีลำดับเบสความยาวประมาณ 750-800 bp สามารถเพิ่มบริมาณดีเอ็นเอได้ดี 100 % และจากการถอดระหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing และ Blast เปรียบเทียบกับข้อมูลพื้นฐานบน Gene Bank ใน NCBI พบว่า *B. bassiana* สายพันธุ์ DOA และสายพันธุ์ จากบริษัทที่นำมาขึ้นทะเบียน มีลำดับนวิคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (query cover) *B.bassiana* มากกว่า 99.8-100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น *B bassiana* DOA-NP จะอยู่ในกลุ่มของ *Nomuraea rilei* ซึ่งปัจจุบันได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Metarhzium rilei* (Kepler et al., 2014) *B bassiana* DOA-B12, DOA-B16, DOA-B17 คือ *Cordyceps cicadae* , *Isaria tenuipes* และ *Ophiocordyceps sobolifera* ตามลำดับ ผลจากการวิเคราะห์ DNA barcode gap โดยดูจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน intra- และ interspecific genetic (Puillandre *at al.,* 2012) พบว่าจากกราฟยังมีเปอร์เซนต์ซ้อนทับ(Distribute overlap)อยู่ระหว่าง species แต่เปอร์เซนต์ดังกล่าวไม่สูงมาก และเมื่อเปรียบเทียบกับผล phylogenetic tree แล้ว ซึ่งสอดคล้องกับแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ซึ่ง species ดังกล่าวแบ่งกลุ่มกันอย่างชัดเจน และในเบื้องต้นพบว่า ITS gene สามารถใช้เป็น DNA barcode ในการจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่ม Beauveria species complex หรือ *B. bassiana* sensu lato ได้ (Akmal *et al.,* 2013, Seiffert 2009) ในกรณีที่ต้องการพิสูจน์ลักษณะทางพันธุกรรมเชื้อราในกลุ่มนี้ที่นำมาขึ้นทะเบียนกรมวิชาการเกษตร

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ beta-tubulin genes พบว่า primer Bt2a-Bt2b ในปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีลำดับเบสความยาวประมาณ 450-500 bp พบว่า *B.bassiana* สายพันธุ์ DOA-B4 และ DOA-B17 เพิ่มปริมาณได้แต่ ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่สมบูรณ์ และมีข้อมูลเพียงพอที่จะนำมาวิเคราะห์ได้ เนื่องจากในบริเวณยีนดังกล่าวมีปริมาณ G-C content ที่สูง ทำให้ primer ไม่สามารถเริ่มต้นสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ และเมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในเชื้อรากลุ่มดังกล่าวจากผลิตภัณฑ์ ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถพิสูจน์เชื้อราดังกล่าวได้แม่นยำ คือเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งสอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์ DNA barcode gap โดยดูจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน intra- และ interspecific genetic (Puillandre at al., 2012) พบว่าจากกราฟมีเปอร์เซ็นต์ซ้อนทับ (Distribute overlap) ใกล้เคียงกับตำแหน่งยีน ITS อยู่ระหว่าง species แต่เปอร์เซนต์ดังกล่าวไม่สูงมาก (Fig.3)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Elongation Factor 1 (*e*EF1) พบว่า primer EF1F-ER1R ซึ่งมีลำดับเบสความยาวประมาณ 750 bp พบว่า การเพิ่มปริมาณในตำแหน่งยีนดังกล่าว มีปัญหาเรื่อง GC content มากบาง ไอโซเลตไม่สามารถทำได้ เนื่องจาก primer ไม่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ หรือ การสังเคราะห์ไม่สมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตามยีนดังกล่าวก็เหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการพิสูจน์เชื้อราบิวเวอร์เรียในกลุ่ม species complex โดยเฉพาะในกลุ่มย่อย *B. bassiana* sensu stricto ซึ่งสามารถดูได้จากค่า Distribute overlap ระหว่าง intra- และ interspecific genetic variation (Puillandre *at el.,* 2012, Silva et al., 2015) (Fig.5) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ phylogenetic tree ซึ่งพบว่า สามารถแยกกลุ่มย่อยออกมาจาก *B. bassiana* ซึ่งมีความเป็นไปได้เป็นสายพันธุ์เดียวกันสาเหตุที่แยกclade เกิด haplotype gene ที่ต่างกัน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเปรียบเทียบข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 gene คือ The internal transcribed spacer (ITS) beta-tubulin genes และ Elongation Factor 1 (eEF1) พบว่า เครื่องหมายที่เหมาะที่จะนำมาตรวจสอบเชื้อราในกลุ่ม *B.bassiana* ซึ่งมีความซับซ้อนทางพันธุกรรรมนั้น คือ ITS และ BT gene ในกรณีที่ตรวจสอบระดับ species โดยเฉพาะงานการขึ้นทะเบียนของกรมวิชาการเกษตร ซึ่ง ITS gene ซึ่งใช้เป็นเครื่องหมายดังกล่าวควรใช้ primer ITSF1-ITS4 เพราะให้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ละเอียดกว่า ITS1-ITS4 ที่สำคัญเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาในขบวนการ PCR ง่าย ส่วน BT gene มักจะมีปัญหาเรื่อง GC-content สำหรับในกรณีต้องการตรวจสอบระดับกลุ่มย่อยหรือทำงานทางด้าน taxonomy เพื่อตั้งชื่อ หรือ identify เชื้อรากลุ่มนี้ควรใช้เครื่องหมายดังกล่าวเพิ่มเติมในส่วนของ RPB2 (encoding the second largest subunit of RNA polymerase II) เพื่อการจัดจำแนกที่ถูกต้อง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ในการตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อรา *Beauveria* และเชื้อราโรคแมลงทั่วไปได้ถึงระดับสปีชีย์ ในผลิตภัณฑ์เชื้อราแมลงที่นำมาขึ้นทะเบียนของกรมวิชาการเกษตรได้

11.คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางสาวอุทุมพร จันสีทา ตำแหน่งนักวิชาการเกษตร และ นางสาวอาภรณ์รัตน์ ศรีสว่าง ตำแหน่งพนักงานประจำห้องทดลอง ที่ช่วยเก็บข้อมูลและทำให้งานวิจัยครั้งนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

12.เอกสารอ้างอิง

Akmal, M., S., Freed., M.N. Malik and H.T Gul 2013. Efficacy of Beauveria bassiana (Deuteromycotina: Hypomycetes) against different aphid species under laboratory conditions. PakistanJ. Zool., 45: 71-78.

Linnakoski R., ZW., De Beer, J. Ahtiainen, E. Sidorov, P. Niemelä, A. Pappinen, and M.J., Wingfield. 2010. *Ophiostoma* spp. associated with pine– and spruce–infesting bark beetles in Finland and Russia. Persoonia 25**:** 72–93.

Kepler, Humber, Bischoff and S.A. Rehner .2014. Mycologia 106(4): 824

Puillandre N., A. Lambert, S. Brouillet and G. AchazABGD. 2012. Automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. Mol. Ecol. 1864-1877. pp.

Seiffert K. 2009: Progress toward DNA barcoding of fungi. Molecular Ecology Resources., 9 (Suppl 1): 83-89. 10.1111/j.1755-0998.2009.02635.x.

Silva JN, Costa A, Silva JV and C. Almeida. 2015. DNA barcoding and phylogeny in Neotropical species of the genus *Spondias*. Biochem Syst Ecol;61:240–243.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar .2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729

13. ภาคผนวก

Fig 1. The structure of conidia and conidiophore showed on insects body and appeared on the ground (a,b,c)

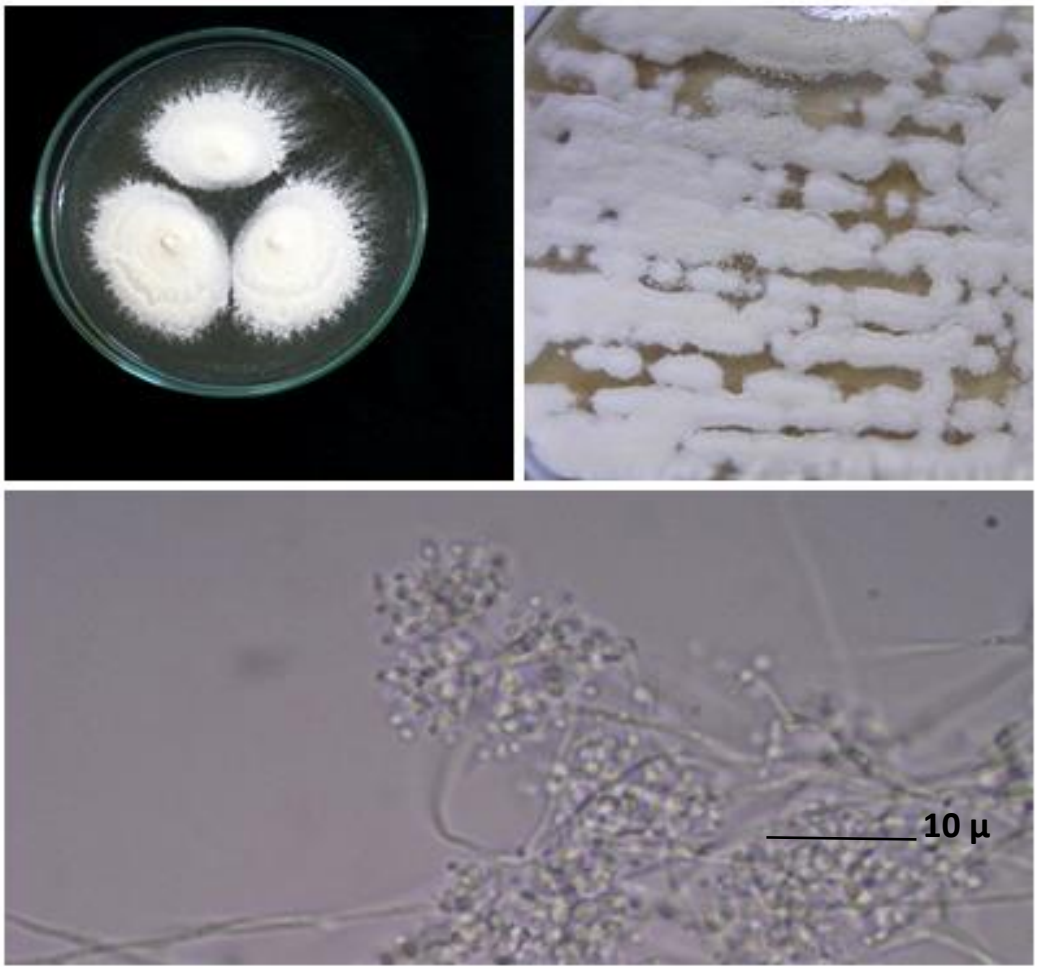
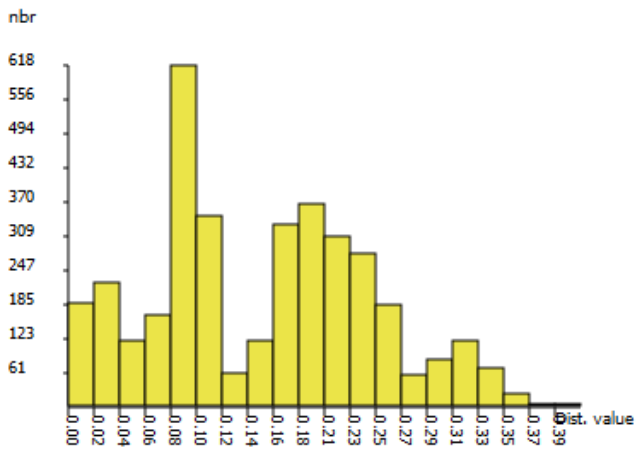
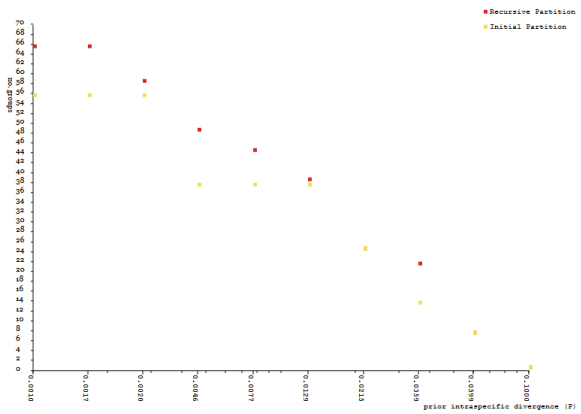


Fig2. The colony of *B. bassiana* strain DOA-B4 on MEA and structure of conidiophore and conidia on microscope which representative of complex species





\

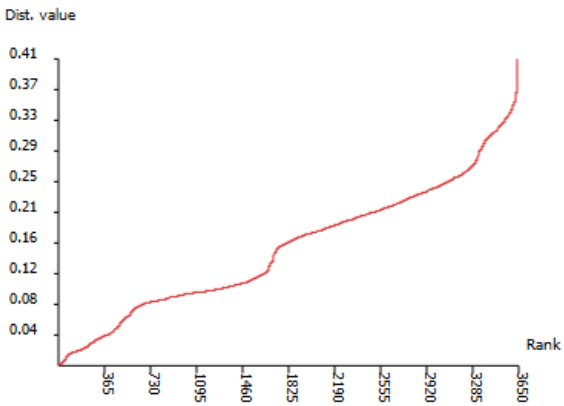


Fig. 3. Distance values show a gap between the intra-specific and the inter-specific distances of ITS gene for detected barcode gaps .

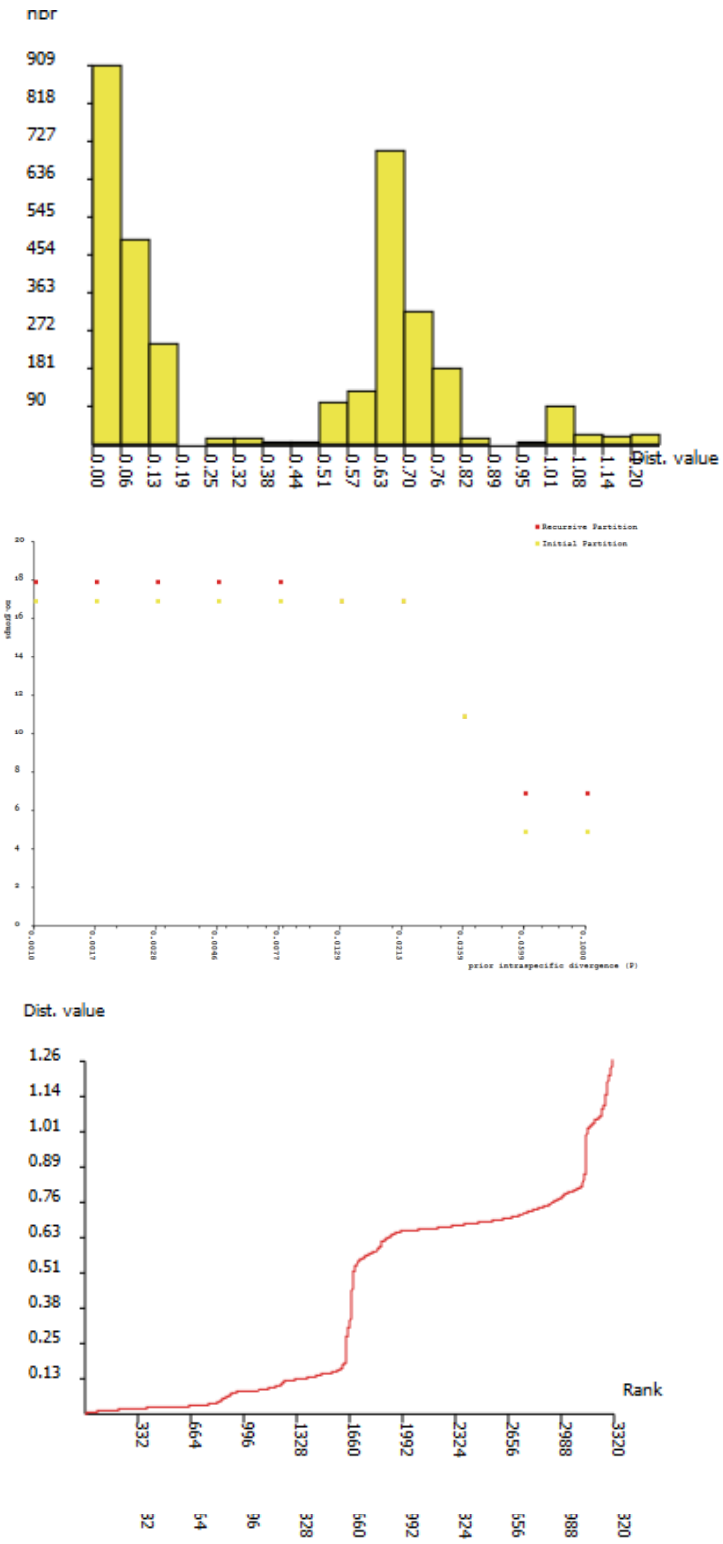


Fig. 4. Distance values show a gap between the intra-specific and the inter-specific distances of EF gene for detected barcode gaps .

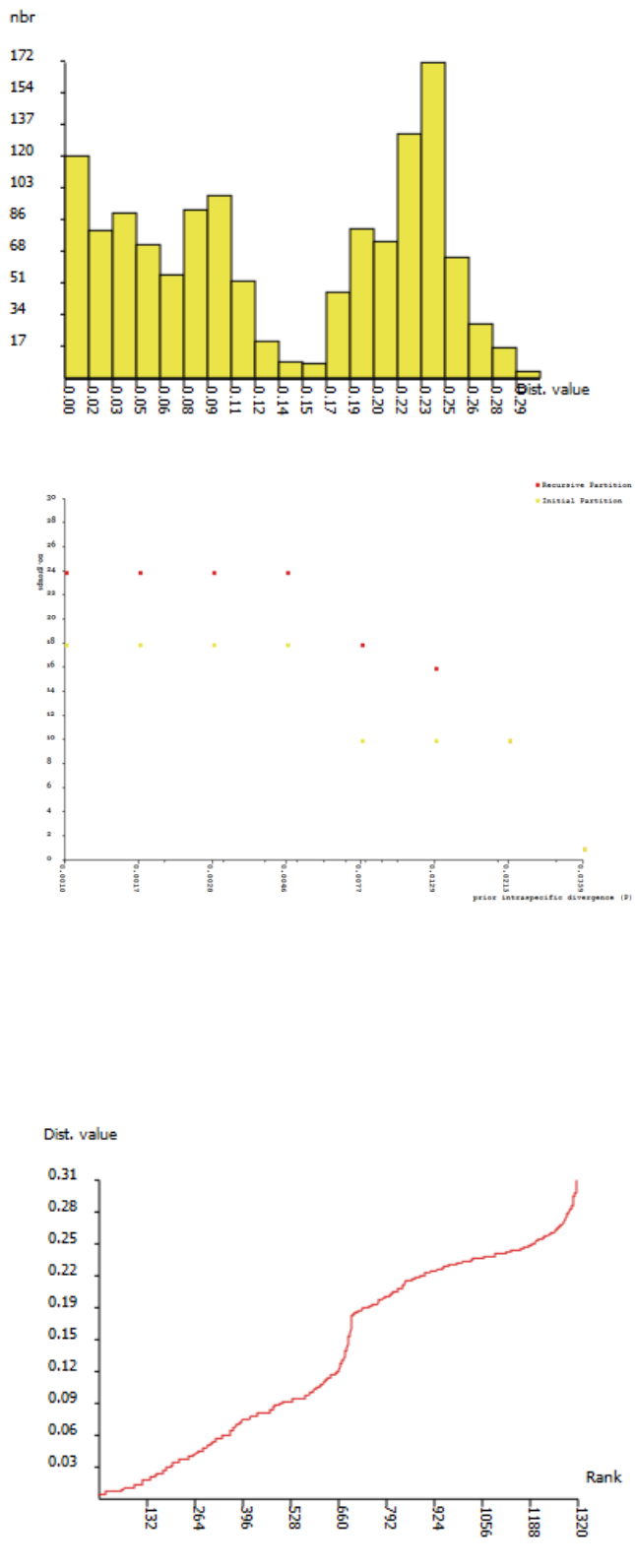


Fig. 5. Distance values show a gap between the intra-specific and the inter-specific distances of BT gene for detected barcode gaps .

Fig 6. Maximum likelihood phylogentic tree of the internal transcribed spacer (ITS) in entomopathogenic fungi group. Bootstrap value (1,000 replication) are indicated above the node.

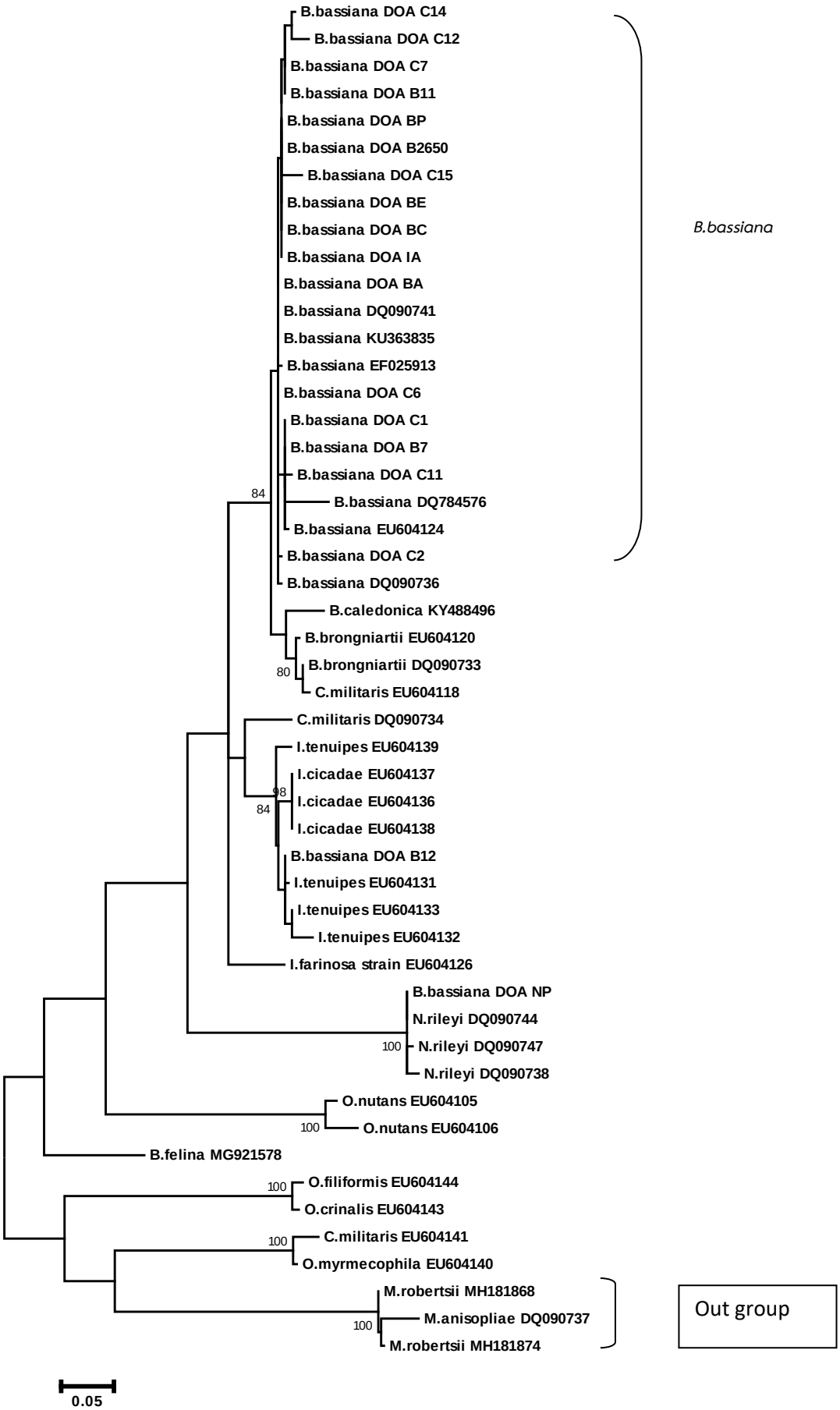


Fig 7. Maximum likelihood phylogentic tree of β t gene in *B. bassiana* complex species

Bootstrap value (1,000 replication) are indicated above the node.

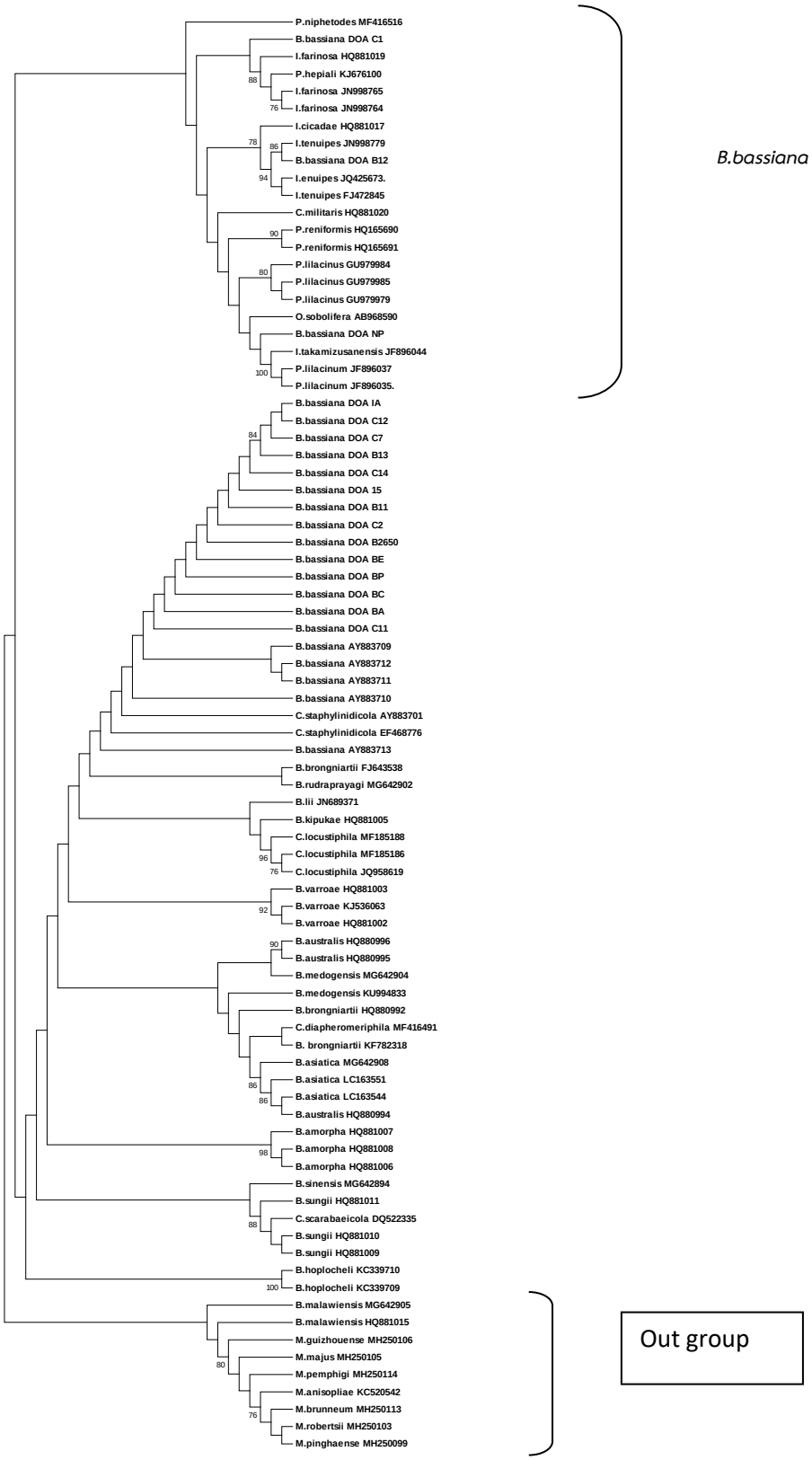


Fig 6. Maximum likelihood phylogentic tree of the Elongation factor in *B. bassiana* complex species. Bootstrap value (1,000 replication) are indicated above the node.