การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจัดจำแนกเชื้อรา *Beauveria bassiana*

DNA Barcode for Identification of *Beauveria bassiana*

เมธาสิทธิ์ คนการ[1/] เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์[1/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[2/] รุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล[3/]

[1/] กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[3/] กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

รายงานความก้าวหน้า

แยกเชื้อราโรคแมลง *Beauveria bassiana* ที่มีศักยภาพในการควบคุมแมลงและราแมลงในกลุ่ม *Cordycep militaris* ที่นำจะมาทดสอบการทำดีเอ็นเอบาร์โค๊ดจำนวน 15 ไอโซเลท จากบริเวณแปลงปลูกพืชของเกษตรกรในเขตจังหวัดภาคเหนือ จังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง และ ภาคตะวันตก ราชบุรี เพชรบุรี และกาญจนบุรี และภาคใต้ จังหวัด ชุมพร โดยวิธี bating technique โดยใช้ *Tenebrio molitor* พบจำนวน 15 ไอโซเลท แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยวิธี single spore เพื่อสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีชีวโมเลกุล คือ Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ITSF1-ITSF2 ในยีนบริเวณ the internal transcribed spacer (ITS) พบว่าสามารถเพิ่มบริมาณดีเอ็นเอได้ดี และจากการถอดระหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing และ Blast เปรียบเทียบกับข้อมูลพื้นฐานบน Gene Bank ใน NCBI เบื้องต้นได้เชื้อราในกลุ่ม Beauveria จำนวน 9 ไอโซเลท คือ *Beauveria* sp. stain DOA – B4, *Beauveria* sp. stain DOA – B7, *Beauveria* sp. stain DOA – B6 และ *Beauveria* sp. stain DOA – C6 อยู่ในกลุ่มของ *B. bassiana* และนอกจากนั้นยังสามารถระบุชนิดเชื้อราแมลงเบื้องต้น เช่น *Cordyceps militaris strain* DOA-B10, *Isaria fumosorosea* strain DOA-B13, *I.tenuipes* strain DOA-B12, *Cordyceps cicadae* strain DOA-B16, และ *Ophiocordyceps sobolifera* strain DOA-B1 ซึ่งได้จากผลจากการวิเคราะห์จัดลำดับวิวัฒนาการโดยวิธี Maximum likelihood phylogentic tree ต่อไป

คำหลัก : เชื้อราแมลง ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ชีวโมเลกุล

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-08-60

คำนำ

ปัจจุบันการควบคุมแมลงศัตรูพืชในธรรมชาติโดยการใช้ ชีวินทรีย์ (biological control agents) ซึ่งเป็นวิธีการที่นำเอาความหลากหลายทางด้านชีวภาพ ประกอบด้วยตัวห้ำ (predator) ตัวเบียน (parasite or paracitoid) และเชื้อโรค (pathogen) ไม่ว่าจะเป็นแมลงศัตรูพืช โรคพืช หรือวัชพืชทางการเกษตร 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 รวมทั้งยังเป็นประโยชน์มากในการตรวจสอบเชื้อราแมลงสายพันธุ์ใหม่ที่จะค้นพบในอนาคต และเป็นประโยชน์ต่อการสร้างฐานข้อมูลเชื้อราโรคแมลงของกรมวิชาการเกษตรในระบบสากล International code of nomenclature อีกด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ชุดสำหรับสกัดดีเอ็น (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, Na_2SO3, Isomyl alcohol, Isopropanol)
11. พีซีอาร์, เอมไซม์ และเทคโพลีเมอร์เรส PCR & enzyme &Tag polymerase
12. เชื้อรา *B. bassiana*

วิธีการ

1. <u>การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อรา *B. bassiana* จากแมลงที่เป็นโรคตามธรรมชาติ ดิน และสารชีวภัณฑ์</u>

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

<u>2. การตรวจสอบและจัดจำแนกเชื้อ *Beauveria* spp. ในระดับชีวโมเลกุล</u>

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 ปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ความเร็ว

รอบ 12,000 รอบต่อนาที (rpm) ประมาณ 10 นาที เก็บสารแขวนลอยดีเอ็นเอที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอต่อไป วัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ โดยเครื่องวัดคุณภาพดีเอ็นเอ Nano Drop spectrophotometer เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีการ PCR (polymerase chain reaction) คัดเลือก primer และหาอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม 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) และtranslation elongation factor 1α ได้แก่ primer EF1F(5-TGCGGTGGTATCGA CAAGCGT-3 และ EF1R (5-AGCATGTTGTCGCCGTTG AAG-3) (Linnakoski *et al.,* 2010)

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

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 ← °C 1 นาที	50-52°C 30 วินาที	72 →	72 °C 4 นาที
		35 รอบ			
Bt2a-Bt2b	95 °C 4 นาที	95 °C 1 นาที ← °C 1 นาที	54-57°C 30 วินาที	72 →	72 °C 4 นาที
		35 รอบ			
EF1F-ER1R	95 °C 4 นาที	95 °C 1 นาที ← °C 1 นาที	55-60°C 30 วินาที	72 →	72 °C 4 นาที
		35 รอบ			

<u>บันทึกผลการทดลอง</u>

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)

<u>วิเคราะห์ผลการทดลอง</u>

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 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

เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2559 สิ้นสุด เดือนมกราคม 2561

1. ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

แยกเชื้อราโรคแมลง *B. bassiana* ที่มีศักยภาพในการควบคุมแมลง ในเบื้องต้นพบว่าเชื้อราในดินที่เก็บจากบริเวณแปลงปลูกพืชของเกษตรกรในเขตจังหวัดภาคเหนือ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง และภาคตะวันตก ราชบุรี เพชรบุรี และกาญจนบุรี และภาคใต้ จังหวัดชุมพร โดยวิธี bating technique แยกได้จำนวน 15 ไอโซเลต ทำเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยวิธี single spore และ hyphal trip เพื่อเตรียมทำการตรวจสอบโดยวิธีชีวโมเลกุลต่อไป ผลจากการทดสอบในเบื้องต้นการสกัดดีเอ็นเอและปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR) พบว่า primer ITSF1-ITSF2 ในยีนบริเวณ the internal transcribed spacer (ITS) สามารถเพิ่มบริมาณดีเอ็นเอได้ดี และจากการถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing และ Blast เปรียบเทียบกับข้อมูลพื้นฐานบน Gene Bank ใน NCBI

15 ไอโซเลต จำนวน 9 ไอโซเลท พบว่าอยู่ในกลุ่มของเชื้อราโรคแมลง คือ *Beauveria* sp. stain DOA – B4, *Beauveria* sp. stain DOA – B7, *Beauveria* sp. stain DOA – B6 และ *Beauveria* sp. stain DOA – C6 อยู่ในกลุ่มของ *B. bassiana* ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้โดยใช้ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS โดยดูจากจากการสร้าง phylogenetic tree ของกลุ่มเชื้อราโรคแมลง พบว่าเบื้องต้นสามารถใช้ ITS เป็นดีเอ็นโอบาร์โค้ทเบื้องต้นได้ ในกรณีที่แยกเชื้อราแมลงจากธรรมชาติ แต่อย่างไรก็ตามต้องอาศัยชิ้นส่วนยีนส์ในส่วนของ code protein มาประกอบเพื่อศึกษาในกลุ่ม *B. bassiana* complex ต่อไป และนอกจากนั้นยังสามารถระบุชนิดเชื้อราแมลงเบื้องต้น เช่น *Cordyceps militaris strain* DOA-B10, *Isaria fumosorosea* strain DOA-B13, *I.tenuipes* strain DOA-B12, *Cordyceps cicadae* strain DOA-B16 และ *Ophiocordyceps sobolifera* strain DOA-B17 การเพิ่มปริมาณยีนส์ในส่วนอื่นๆ เช่น BT และ EF ซึ่งอยู่ในช่วงดำเนินการ (รูปที่2)

เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ เรืองสิทธิชัย. 2555. ดีเอ็นเอบาร์โค๊ดและการประยุกต์ใช้ในงานวิจัยทางกีฏวิทยาการแพทย์. วารสารวิจัยรามคำแหง (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี). 15: 28-34 หน้า.

วุฒิพงศ์ มหาคำ. 2554. DNA barcodes ของพืช : หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้และข้อจำกัด. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย.: 3(1) : 1-30

Bischoff, J.F., S.A. Rehner and R.A. Humber. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia,. 101(4): 512-530.

Bellemain, E. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiology, 10 (1): p. 189.

Glass, N.L. and G.C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied Environmental Microbiology 61: 1323–1330.

Katoh, K.T.H. 2013. Recent developments in the MAFFT V7. multiple sequence alignment program. Briefings in Bioinformatics 9: 286–298.

Kershaw, M.J., E.R. Moorhouse, R.P., Bateman, S.E., Reynolds and A.K. Charnley. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *J. Invertebr. Pathol.* 74, 213–223.

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.

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.

Lim, J., S. Kim, H. Eo, C. Kim, W.K., Paek, W. Kim and J. Bhak. 2009. BioBarcode: a general DNA barcoding database and sever platform for Asian biodiversity resources. BMC Genomics 10 (Supplement 3): S8.

Hafiza, T.G., Shafqat, S., and Z.A.K. Fawad. 2014. Entomopathogenic fungi as effective insect pest management tactic: a review. applied sciences and business economics. Volume 1, Issue 1, 10-18.

Newmaster, S. G. and S. Ragupathy. 2009. Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical Acacia (Mimosoideae, Fabaceae). Mol. Ecol. Resour. 9: 172-180.

Pennisi, E. 2007. Wanted: a barcode for plants. Science. 318: 190-191. Seifert, K. A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. Mol. Ecol. Resour. 9: 83-89.

Rosa, W. D. L., R. Alatorre, J. F. Barrera and C. Toriello. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scolytidae) Under Field Conditions. Journal of Economic Entomology 93(5): p. 1409-1414.

Schoch, C.L, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences. 109 (16): p. 6241-6246.

Samson, R.A., H.C., Evans. and JP. Latge. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, New York, pp. 187.

Seifert, K. A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. Mol. Ecol. Resour. 9: 83-89.

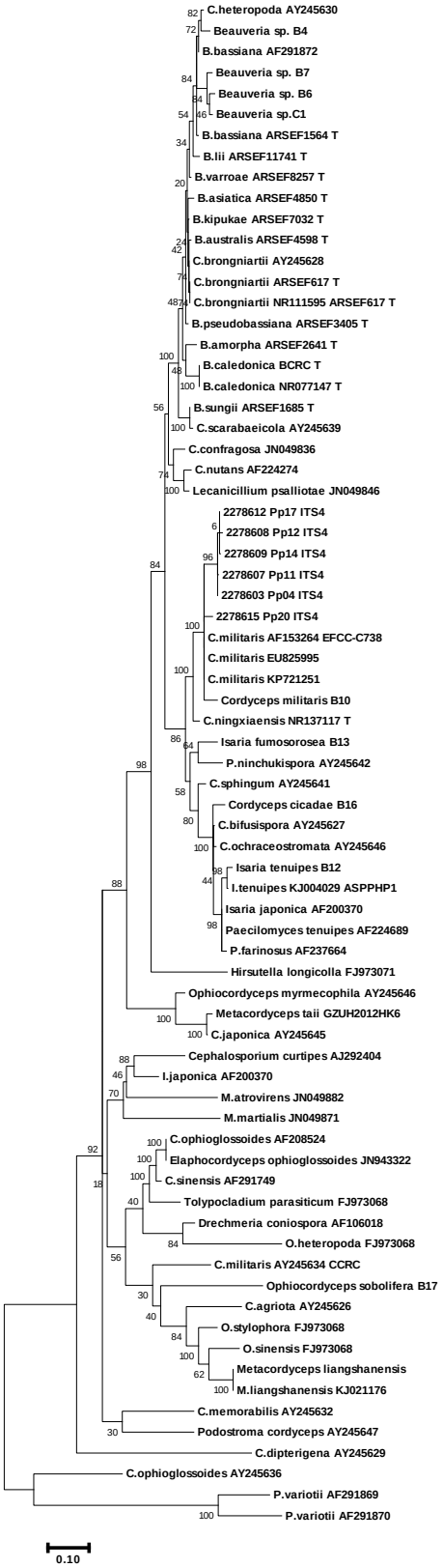
Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729.

White, T.J, T. Bruns, S. Lee. and J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In M. A. Innis, Gelfand D H. , Sninsky JJ, and White TJ. (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., New York, N.Y.

Table และ Figure

Beauveria bassiana clone YT-11 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, com	985	985	99%	0.0	99%
Beauveria bassiana strain CYT5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal trans	976	976	98%	0.0	99%
Beauveria bassiana strain NFCCI 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tr	976	976	98%	0.0	99%
Beauveria bassiana isolate SHU.M.121 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, comple	974	974	99%	0.0	99%
Beauveria bassiana isolate SKC/PR/2012/SILKWORM 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RN	974	974	98%	0.0	99%

รูปที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลพื้นฐานบน Gene Bank ใน NCBI



รูปที่ 2 การสร้าง Maximum likelihood phylogentic tree โดยใช้ข้อมูลพื้นฐานของ the internal transcribed spacer (ITS)