รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชื่อชุดโครงการวิจัย :** วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ**.**
2. **ชื่อโครงการ :** การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาพันธุ์พืช จลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การจำแนกเชื้อราเขียว *Metharhizium* spp. จากยีนไคติเนสด้วยเทคนิคชีวโมกุล

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Identification of *Metharhizium* spp. from chitinase gene by molecular teachnique

4. **หัวหน้าการทดลอง**:

นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน:

นางเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาวจีรภา ปัญญูศิริ สังกัด ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ:

เชื้อราเขียวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีทั้งหมด 14 ตัวอย่าง ซึ่งจากการจำแนกเบื้องต้นพบว่าเป็น *Metarhizium anisopliae* 11 ตัวอย่าง *M. flavoride* 1 ตัวอย่าง และ *Metarhizium spp*. 2 ตัวอย่าง จากการจำแนกเชื้อราเขียวโดยใช้ยีนไคติเนสและส่วนของ ITS พบว่า การทำพีซีอาร์ในส่วนของ ITS โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS 1 และ ITS 4 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง และสามารถจำแนกตัวอย่างได้เป็น *M. majus*, *M. anisopliae* และ *M. flaviride* และในการทำการเพิ่มปริมาณยีนไคติเนส โดยใช้ไพร์เมอร์ Ch4F และ Ch4R พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียง 9 ตัวอย่าง ซึ่งจำแนกได้เป็น M. majus ทั้งหมด

There were 14 samples of green muscadine from this study. The fundamental identification showed that 11 samples were *Metharhizium anisopliae*, one sample was *M. flavoride* and 2 samples were Metarhizium spp. The results of identification from chitinase gene and ITS showed that ITS part of all samples can be amplified by using ITS1 and ITS 4. Samples were *M. majus, M. anisopliae* and *M. flaviride.* Moreover, there were 9 samples can be amplified by using Chi4F and Chi4R. All of them were *M. majus*.

6. คำนำ :

เชื้อ *Metarhizium* spp. หรือเชื้อราเขียว (green muscardine fungus) เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคกับแมลงหลายชนิด (Tangthirasunun *et al*., 2010) อีกทั้งเป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ง่ายและพบทั่วไปในดิน จึงได้รับความนิยมนำไปใช้ในควบคุมแมลงแบบชีววิธี (Biological Control) (Zimmermann, 1993)

ในประเทศไทยเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* เป็นจุลินทรีย์ประเภทหนึ่งที่ได้รับความสนใจจากเกษตรกรผู้ปลูกมะพร้าวและปาล์มน้ำมัน ในเอกสารคำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและศัตรูพืชของกรมวิชาการเกษตร(2553) ได้แนะนำให้เกษตรกรใช้เชื้อราเขียวในการควบคุมด้วงแรดมะพร้าว ซึ่งในปัจจุบันมีการขยายพื้นที่ปลูกมะพร้าวและปาล์มน้ำมันกันมากในเขตภาคใต้ การกองเศษซากพืช ขุยมะพร้าว หรือกากปาล์มน้ำมันทิ้งไว้เป็นเวลานานๆ จะกลายเป็นแหล่งขยายพันธุ์ของด้วงแรดชนิดนี้ การป้องกันกำจัดในปัจจุบันมักใช้วิธีป้องกันกำจัดแบบผสมผสาน เชื้อราเขียวเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจผลิตใช้ทางการค้าในหลายประเทศ เช่น ได้แก่ แอฟริกาใต้ ภายใต้ชื่อการค้า Green Muscle (Thomas *et al*., 2000) ออสเตรเลีย และอเมริกา ภายใต้ชื่อการค้า BioGreen และ Bioblast (Milner, 2000)

เสาวนิตย์และคณะ (2553) ได้ศึกษาและรวบรวมเชื้อราเขียวตั้งแต่ปี 2547 ถึงปัจจุบัน ได้รวบรวมเชื้อราเขียวจากแหล่งต่างๆ จำนวน 10 สายพันธุ์ซึ่งนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนด้วงแรดมะพร้าวแล้ว ส่วนศูนย์พันธุวิศวกรรมและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติได้มีโครงการร่วมกับกรมวิชาการเกษตรที่จะนำเชื้อราเขียวจำนวน 7 สายพันธุ์ไปทำการทดสอบที่ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี แต่ทั้งนี้ยังขาดข้อมูลในการจำแนกสายพันธุ์ว่าสายพันธุ์ที่มีอยู่นั้นเป็นสายพันธุ์เดียวกันหรือต่างกัน

ยีนที่สำคัญในราเขียวคือยีนไคติเนส ซึ่งยีนนี้จะะมีผลต่อขบวนการลอกคราบโดยกลไกการเข้าทำลายแมลงของเอนไซม์ไคติเนสเกิดขึ้นเมื่อแมลงกินชิ้นส่วนของพืชที่มีไคติเนสเข้าไปในทางเดินอาหาร เอนไซม์ทำลายเยื่อบุผนังทางเดินอาหาร เนื่องจากผนังทางเดินอาหารมีไคติเนสเป็นส่วนประกอบ (ทิพย์วดี, 2549)

เชื้อราเขียวที่ทางกลุ่มงานปราบศัตรูทางชีวภาพนำมาศึกษาด้วงแรดมะพร้าว ยังขาดข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีวโมกุล หากมีข้อมูลลายพิมพ์ดีเอนเอและลำดับเบส

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ยีนนี้จะมีความสัมพันธุ์กับประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวการศึกษาความ แตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราเขียวโดยวิเคราะห์ความสัมพันธุ์ของลำดับเบสของยีนไคติเนสอาจจะนำมาใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายในหาตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อราเขียวที่มีประสิทธิภาพได้

7. วิธีดำเนินการ :

-อุปกรณ์

-สารเคมี

-ตู้ควบคุมระดับความเย็นที่ 4, –20 และ -80 องศาเซลเซียส

- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

- เครื่อง electrophoresis

- เครื่อง centrifuge

- vortex mixer

- water bath

- หม้อนึ่งความดัน

- ไมโครปิเปต ขนาด 2 μl, 20 μl, 200 μl และ 1000 μl

- เครื่อง incubate shaker

- ตู้ laminar flow

- เครื่องกวนสาร

-. ตู้ไมโครเวฟ

- เครื่อง spectrophotometer

- เครื่องชั่งชนิดละเอียด

- ตู้อบ

-วิธีการ

1. การรวบรวมตัวอย่างและเพิ่มปริมาณเชื้อราเขียว

1.1 รวบรวมตัวอย่างเชื้อราเขียว *Metarhizium spp*. จาก กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพกับแมลงศัตรูพืชแล้วจำนวน 10 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากศูนย์พันธุกรรมวิศวกรรมแห่งชาติ จำนวน 7 ตัวอย่าง

1.2 นำเชื้อราเขียวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อเพิ่มปริมาณในการสกัดดีเอ็นเอ

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอโดยการใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ® นำดีเอ็นเอมาวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณ โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis และวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer

3. การเพิ่มปริมาณยีนไคติเนสและส่วนของ ITS ด้วยเทคนิค PCR

3.1 ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนไคติเนส จากไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีนไค

ติเนส ของเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยใช้ไพร์เมอร์ Chi-4F (ATCCGGCACGGCTAC) และ Chi-4R (CTTGGATCCGTCCCAGTTG) โดยใช้สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมกับ ไพร์เมอร์

3.2 ทำ PCR เพื่อเพิ่มเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนที่ต้องการบริเวณ ITS ทำการเพิ่มปริมาณยีนในส่วน ITS ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ primer ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) และ ITS 4 (AGGCATCCACTTGGACGCC)

4 การหาลำดับเบสและการวิเคราะห์ยีนไคติเนสและ ITS

ทำ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด kit Wizard ®SV Gel and PCR clean-up System (Promega) แล้วส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับเบสที่บริษัทที่รับวิเคราะห์ลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้จากยีนไคติเนสและ ITS มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของเห็ดชนิดอื่นใน GenBank ทำ alignment

-เวลาและสถานที่ทดลอง

ตุลาคม 2556-กันยายน 2558

สถานที่ทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การรวบรวมตัวอย่างและเพิ่มปริมาณเชื้อราเขียว

1.1 ทำการรวบรวมตัวอย่าง รวบรวมตัวอย่างเชื้อราเขียว *Metarhizium spp.* จากกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพกับแมลงศัตรูพืช (ตารางที่ 1) และตัวอย่างจากศูนย์พันธุกรรมวิศวกรรมแห่งชาติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงเชื้อราเขียวไอโซเลทต่างๆ ที่แยกจากแมลงอาศัยและแหล่งที่มาแตกต่างกันจากสำนักวิจัยอารักขาพืช

ชนิดของเชื้อราเขียว	ไอโซเลทเชื้อราเขียว	แมลงอาศัย	แหล่งที่มา	อัตราการตายของหนอนด้วงแรดมะพร้าว (100%)
M. anisopiae	M0	แมลงในกลุ่ม Coleoptera อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่	ศูนย์พันธุวิศวกรรม (รหัส BCC 2841)	100
M. anisopiae	M1	*Brontispa longissima* Gestro	จ. ประจวบคีรีขันธ์	49.47
M. anisopiae	M2	*Orytes rhinoceros* Linnaeus	กรมส่งเสริมการเกษตร	100

M. anisopiae	M3	*Dorysthenes buqueti* Guerin	ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววินทรีย์แห่งชาติ	91.77
M. anisopiae	M4	*Brontispa longissima* Gestro	จ. สมุทรปราการ	17.11
M. anisopiae	M5	*Orytes rhinoceros* Linnaeus	จ. ปทุมธานี	100
M. anisopiae	M6	*Dorysthenes buqueti* Guerin	จ. นครสวรรค์	100
M. anisopiae	M7	*Orytes rhinoceros* Linnaeus	จ. ราชบุรี	100
M. anisopiae	M8	*Lepidiota stigma* Fabricius	จ. ประจวบคีรีขันธ์	8.33
M. anisopiae	M9	*Lepidiota stigma* Fabricius	จ. ประจวบคีรีขันธ์	31.84

ตารางที่ 2 แสดงเชื้อราเขียวไอโซเลทต่างๆ ที่แยกจากแมลงอาศัยและแหล่งที่มาแตกต่างกันจาก *Metarhizium* ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ชนิดของเชื้อราเขียว	รหัสเชื้อราเขียว	แมลงอาศัย	แหล่งที่มา
M. flavovide	1707	Hemiptera - nymph	อุทยานแห่งชาติคลองลาน (กำแพงเพชร)
M. anisopiae	1858	Coleoptera - Lampyridae	อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน (เพชรบุรี)
Metarhizium spp.	19520	Hemiptera - Pentatomidae bug	เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งใหญ่นเรศวร (ด้านตะวันตก) (กาญจนบุรี)
Metarhizium spp.	25948	Lepidoptera - larva	อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ (นครราชสีมา)

1.2 เมื่อนำเชื้อราเขียวแต่ละชนิดมาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าสามารถขยายเชื้อราเขียวได้ โดยจะได้เส้นใยสีเขียว

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ® เชื้อราเขียวทุกชนิดสามารถให้แถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนในการสกัดด้วยวิธีนี้

3. การเพิ่มปริมาณยีนไคติเนสและส่วนของ ITS ด้วยเทคนิค PCR

3.1 การทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนไคติเนส พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีนไคติเนส โดยใช้ไพร์เมอร์ Chi-4F และ Chi-4R ทุกตัวอย่าง มีเพียงตัวอย่างที่ M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 และ M8 เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณยีนไคติเนสได้

3.2 การทำ PCR เพื่อเพิ่มเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนที่ต้องการบริเวณ ITS โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS 1 และ 4 พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนที่ต้องการได้ทุกตัวอย่าง

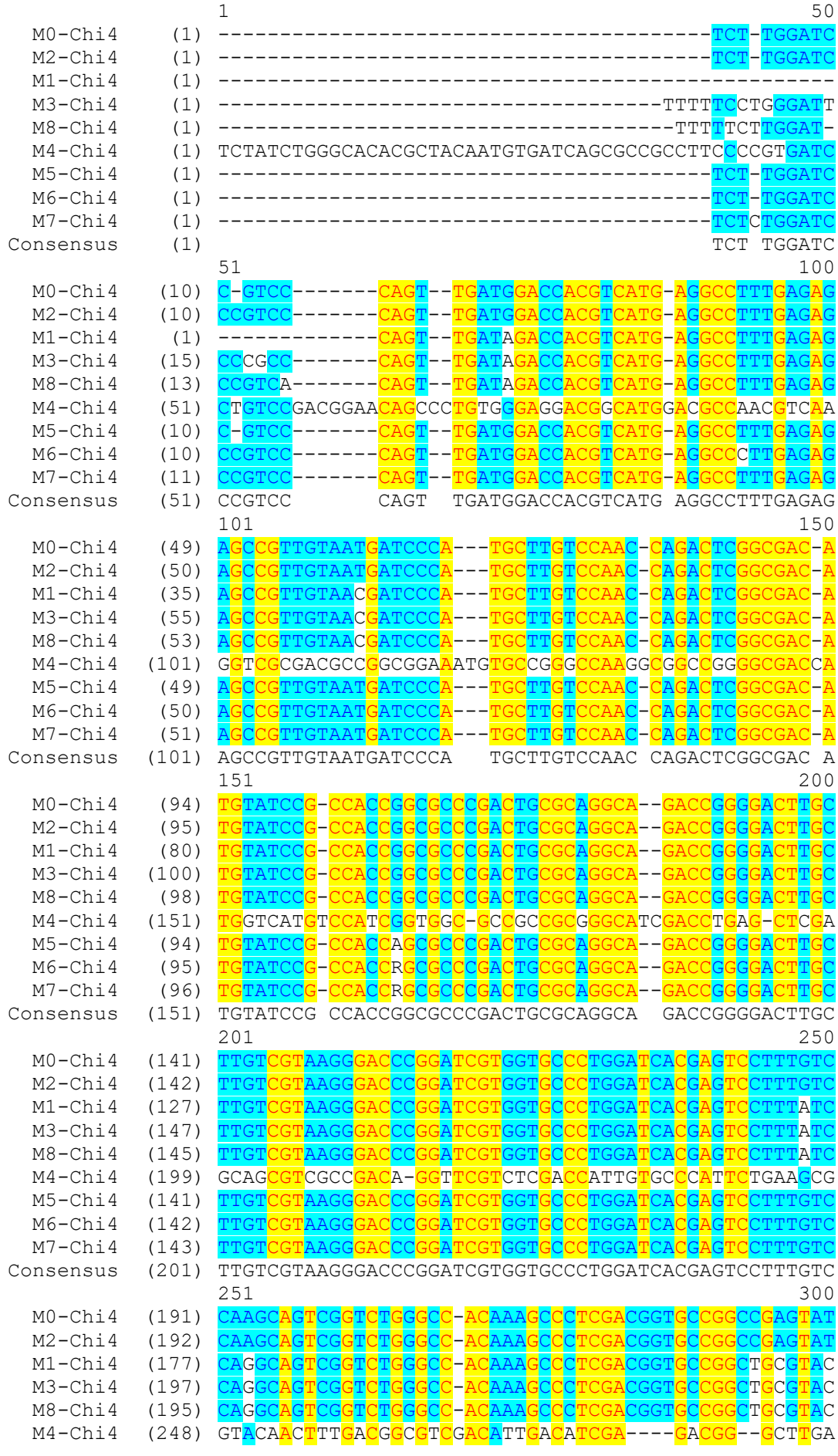
4 การหาลำดับเบสและการวิเคราะห์ยีนไคติเนสและ ITS

เมื่อนำลำดับเบสของยีนไคติเนสไปของเชื้อราเขียวแต่ละตัวอย่างไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank จะได้ข้อมูลตามตารางที่ 3 ซึ่งทุกชนิดที่จำแนกได้จะเป็น M. *majus*

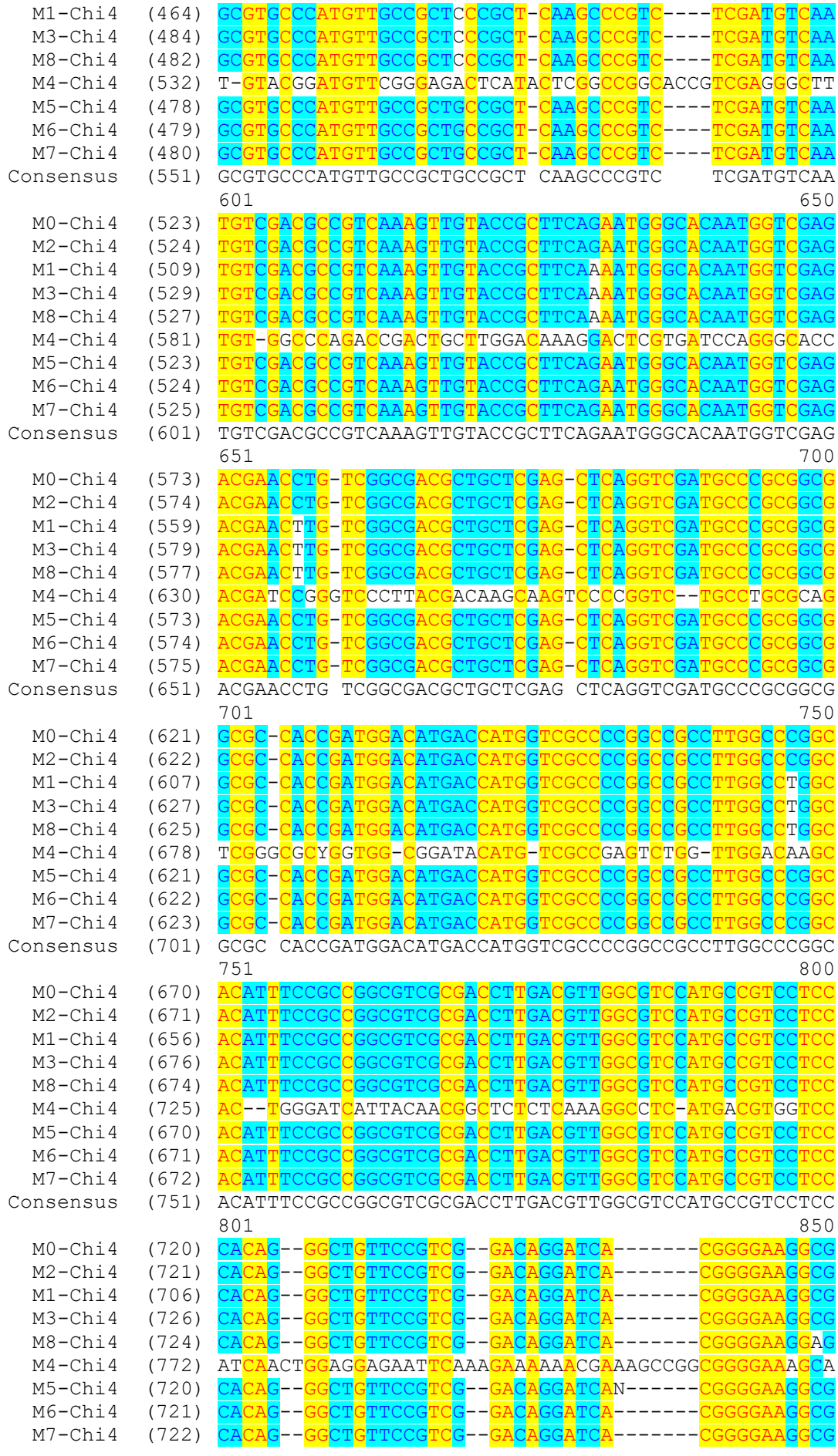
ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลลำดับเบสจากยีนไคติเนสของเชื้อราเขียวเพื่อเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

รหัสเชื้อราเขียว	% identity	ข้อมูลใน GenBank
M0	98	*M. majus*
M1	98	*M. majus*
M2	99	*M. majus*
M3	98	*M. majus*
M4	99	*M. majus*
M5	99	*M. majus*
M6	99	*M. majus*
M7	99	*M. majus*
M8	99	*M. majus*

เมื่อนำลำดับเบสทุกสายพันธุ์มาวิเคราะห์ alignment จะพบว่าทุกสายพันธ์มีลำดับเบสที่เหมือนกันต่างกันไม่กี่เบส ยกเว้นสายพันธุ์ M4 ที่มีความแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 1) ซึ่งเมื่อทำ phylogenic tree จะพบว่า M4 จะแยกสายออกมาและมีความห่างจากเชื้อราเขียวสายพันธุ์อื่นๆ (ภาพที่ 2)

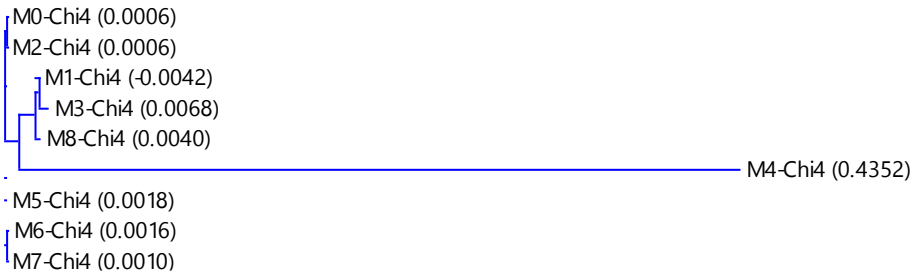

1 50
M0-Chi4 (1) ----------TCT-TGGATC
M2-Chi4 (1) ----------TCT-TGGATC
M1-Chi4 (1) ----------
M3-Chi4 (1) ----------TTTTTCCTGGGATT
M8-Chi4 (1) ----------TTTTTCTTGGAT-
M4-Chi4 (1) TCTATCTGGGCACACGCTACAATGTGATCAGCGCCGCCTTCCCCGTGATC
M5-Chi4 (1) ----------TCT-TGGATC
M6-Chi4 (1) ----------TCT-TGGATC
M7-Chi4 (1) ----------TCTCTGGATC
Consensus (1) TCT TGGATC
51 100
M0-Chi4 (10) C-GTCC-------CAGT--TGATGGACCACGTCATG-AGGCCTTTGAGAG
M2-Chi4 (10) CCGTCC-------CAGT--TGATGGACCACGTCATG-AGGCCTTTGAGAG
M1-Chi4 (1) ----------CAGT--TGATAGACCACGTCATG-AGGCCTTTGAGAG
M3-Chi4 (15) CCCGCC-------CAGT--TGATAGACCACGTCATG-AGGCCTTTGAGAG
M8-Chi4 (13) CCGTCA-------CAGT--TGATAGACCACGTCATG-AGGCCTTTGAGAG
M4-Chi4 (51) CTGTCCGACGGAACAGCCCTGTGGAGGACGGCATGGACGCCAACGTCAA
M5-Chi4 (10) C-GTCC-------CAGT--TGATGGACCACGTCATG-AGGCCTTTGAGAG
M6-Chi4 (10) CCGTCC-------CAGT--TGATGGACCACGTCATG-AGGCCCTTGAGAG
M7-Chi4 (11) CCGTCC-------CAGT--TGATGGACCACGTCATG-AGGCCTTTGAGAG
Consensus (51) CCGTCC CAGT TGATGGACCACGTCATG AGGCCTTTGAGAG
101 150
M0-Chi4 (49) AGCCGTTGTAATGATCCCA---TGCTTGTCCAAC-CAGACTCGGCGAC-A
M2-Chi4 (50) AGCCGTTGTAATGATCCCA---TGCTTGTCCAAC-CAGACTCGGCGAC-A
M1-Chi4 (35) AGCCGTTGTAACGATCCCA---TGCTTGTCCAAC-CAGACTCGGCGAC-A
M3-Chi4 (55) AGCCGTTGTAACGATCCCA---TGCTTGTCCAAC-CAGACTCGGCGAC-A
M8-Chi4 (53) AGCCGTTGTAACGATCCCA---TGCTTGTCCAAC-CAGACTCGGCGAC-A
M4-Chi4 (101) GGTCGCGACGCCGGCGGAAATGTGCCGGGCCAAGGCGGCCGGGGCGACCA
M5-Chi4 (49) AGCCGTTGTAATGATCCCA---TGCTTGTCCAAC-CAGACTCGGCGAC-A
M6-Chi4 (50) AGCCGTTGTAATGATCCCA---TGCTTGTCCAAC-CAGACTCGGCGAC-A
M7-Chi4 (51) AGCCGTTGTAATGATCCCA---TGCTTGTCCAAC-CAGACTCGGCGAC-A
Consensus (101) AGCCGTTGTAATGATCCCA TGCTTGTCCAAC CAGACTCGGCGAC A
151 200
M0-Chi4 (94) TGTATCCG-CCACCGGCGCCCGACTGCGCAGGCA--GACCGGGGACTTGC
M2-Chi4 (95) TGTATCCG-CCACCGGCGCCCGACTGCGCAGGCA--GACCGGGGACTTGC
M1-Chi4 (80) TGTATCCG-CCACCGGCGCCCGACTGCGCAGGCA--GACCGGGGACTTGC
M3-Chi4 (100) TGTATCCG-CCACCGGCGCCCGACTGCGCAGGCA--GACCGGGGACTTGC
M8-Chi4 (98) TGTATCCG-CCACCGGCGCCCGACTGCGCAGGCA--GACCGGGGACTTGC
M4-Chi4 (151) TGGTCATGTCCATCGGTGGC-GCCGCCGCGGGCATCGACCTGAG-CTCGA
M5-Chi4 (94) TGTATCCG-CCACCAGCGCCCGACTGCGCAGGCA--GACCGGGGACTTGC
M6-Chi4 (95) TGTATCCG-CCACCRGCGCCCGACTGCGCAGGCA--GACCGGGGACTTGC
M7-Chi4 (96) TGTATCCG-CCACCRGCGCCCGACTGCGCAGGCA--GACCGGGGACTTGC
Consensus (151) TGTATCCG CCACCGGCGCCCGACTGCGCAGGCA GACCGGGGACTTGC
201 250
M0-Chi4 (141) TTGTCGTAAGGGACCCGGATCGTGGTGCCCTGGATCACGAGTCCTTTGTC
M2-Chi4 (142) TTGTCGTAAGGGACCCGGATCGTGGTGCCCTGGATCACGAGTCCTTTGTC
M1-Chi4 (127) TTGTCGTAAGGGACCCGGATCGTGGTGCCCTGGATCACGAGTCCTTTATC
M3-Chi4 (147) TTGTCGTAAGGGACCCGGATCGTGGTGCCCTGGATCACGAGTCCTTTATC
M8-Chi4 (145) TTGTCGTAAGGGACCCGGATCGTGGTGCCCTGGATCACGAGTCCTTTATC
M4-Chi4 (199) GCAGCGTCGCCGACA-GGTTCGTCTCGACCATTGTGCCCATTCTGAAGCG
M5-Chi4 (141) TTGTCGTAAGGGACCCGGATCGTGGTGCCCTGGATCACGAGTCCTTTGTC
M6-Chi4 (142) TTGTCGTAAGGGACCCGGATCGTGGTGCCCTGGATCACGAGTCCTTTGTC
M7-Chi4 (143) TTGTCGTAAGGGACCCGGATCGTGGTGCCCTGGATCACGAGTCCTTTGTC
Consensus (201) TTGTCGTAAGGGACCCGGATCGTGGTGCCCTGGATCACGAGTCCTTTGTC
251 300
M0-Chi4 (191) CAAGCAGTCGGTCTGGGCC-ACAAAGCCCTCGACGGTGCCGGCCGAGTAT
M2-Chi4 (192) CAAGCAGTCGGTCTGGGCC-ACAAAGCCCTCGACGGTGCCGGCCGAGTAT
M1-Chi4 (177) CAGGCAGTCGGTCTGGGCC-ACAAAGCCCTCGACGGTGCCGGCTGCGTAC
M3-Chi4 (197) CAGGCAGTCGGTCTGGGCC-ACAAAGCCCTCGACGGTGCCGGCTGCGTAC
M8-Chi4 (195) CAGGCAGTCGGTCTGGGCC-ACAAAGCCCTCGACGGTGCCGGCTGCGTAC
M4-Chi4 (248) GTACAACTTTGACGGCGTCGACATTGACATCGA----GACGG--GCTTGA

M5-Chi4 (191) CAAGCAGTCGGTCTGGGCC-ACGAAGCCCTCGACGGTGCCGGCCGAGTAT
M6-Chi4 (192) CAAGCAGTCGGTCTGGGCC-ACRAAGCCCTCGACGGTGCCGGCCGAGTAT
M7-Chi4 (193) CAAGCAGTCGGTCTGGGCC-ACRAAGCCCTCGACGGTGCCGGCCGAGTAT
Consensus (251) CAAGCAGTCGGTCTGGGCC ACAAAGCCCTCGACGGTGCCGGCCGAGTAT
301 350
M0-Chi4 (240) GAGTCTCCCG-AGCATCCGTACA-TGGCGCCGTTGTAGTACTGCATGTTG
M2-Chi4 (241) GAGTCTCCCG-AGCATCCGTACA-TGGCGCCGTTGTAGTACTGCATGTTG
M1-Chi4 (226) GAGTCTCCCG-AACATCCGTACA-TGGCGCCGTTGTAGTACTGCATGTTG
M3-Chi4 (246) GAGTCTCCCG-AACATCCGTACA-TGGCGCCGTTGTAGTACTGCATGTTG
M8-Chi4 (244) GAGTCTCCCG-AACATCCGTACA-TGGCGCCGTTGTAGTACTGCATGTTG
M4-Chi4 (292) GCGGCAGCGGCAACATGGGCACGCTGTCCGCCTCGCAGGCCAACCTGGTG
M5-Chi4 (240) GAGTCTCCCG-AACATCCGTACA-TGGCGCCGTTGTAGTACTGCATGTTG
M6-Chi4 (241) GAGTCTCCCG-AACATCCGTACA-TGGCGCCGTTGTAGTACTGCATGTTG
M7-Chi4 (242) GAGTCTCCCG-AACATCCGTACA-TGGCGCCGTTGTAGTACTGCATGTTG
Consensus (301) GAGTCTCCCG AACATCCGTACA TGGCGCCGTTGTAGTACTGCATGTTG
351 400
M0-Chi4 (288) AGCCACCACAGCCGGCCATTGTCG-GCATACTTCTTG-ATGATGGG---G
M2-Chi4 (289) AGCCACCACAGCCGGCCATTGTCG-GCATACTTCTTG-ATGATGGG---G
M1-Chi4 (274) AGCCACCACAGCCGGCCATTGTCG-GCATACTTCTTG-ATGATGGG---G
M3-Chi4 (294) AGCCACCACAGCCGGCCATTGTCG-GCATACTTCTTG-ATGATGGG---G
M8-Chi4 (292) AGCCACCACAGCCGGCCATTGTCG-GCATACTTCTTG-ATGATGGG---G
M4-Chi4 (342) CGC-ATCATTGACGGC-ATTCTCGCGCAGATGCCGTCCAACTTTGGCCTG
M5-Chi4 (288) AGCCACCACAGCCGGCCATTGTCG-GCATACTTCTTG-ATGATGGG---G
M6-Chi4 (289) AGCCACCACAGCCGGCCATTGTCG-GCATACTTCTTG-ATGATGGG---G
M7-Chi4 (290) AGCCACCACAGCCGGCCATTGTCG-GCATACTTCTTG-ATGATGGG---G
Consensus (351) AGCCACCACAGCCGGCCATTGTCG GCATACTTCTTG ATGATGGG G
401 450
M0-Chi4 (333) AGATAGGCGCCCCAGATGGATCCGTACGTCACGCTGCCCCCCGTCACGTA
M2-Chi4 (334) AGATAGGCGCCCCAGATGGATCCGTACGTCACGCTGCCCCCCGTCACGTA
M1-Chi4 (319) AGATAGGCGCCCCAGATGGATCCGTACGTCACGCTGCCCCCCGTCACGTA
M3-Chi4 (339) AGATAGGCGCCCCAGATGGATCCGTACGTCACGCTGCCCCCCGTCACGTA
M8-Chi4 (337) AGATAGGCGCCCCAGATGGATCCGTACGTCACGCTGCCCCCCGTCACGTA
M4-Chi4 (390) ACCATGGCGCCCGAGACGG---CCTACGTGACGGGGGGCAGCGTGACGTA
M5-Chi4 (333) AGATAGGCGCCCCAGATGGATCCGTACGTCACGCTGCCCCCCGTCACGTA
M6-Chi4 (334) AGATAGGCGCCCCAGATGGATCCGTACGTCACGCTGCCCCCCGTCACGTA
M7-Chi4 (335) AGATAGGCGCCCCAGATGGATCCGTACGTCACGCTGCCCCCCGTCACGTA
Consensus (401) AGATAGGCGCCCCAGATGGATCCGTACGTCACGCTGCCCCCCGTCACGTA
451 500
M0-Chi4 (383) GG---CCGTCTCGGGCGCCATGGTCAGGCCAAAGTTGGACGGCATCTGCG
M2-Chi4 (384) GG---CCGTCTCGGGCGCCATGGTCAGGCCAAAGTTGGACGGCATCTGCG
M1-Chi4 (369) GG---CCGTCTCGGGCGCCATGGTCAGGCCAAAGTTGGACGGCATCTGCG
M3-Chi4 (389) GG---CCGTCTCGGGCGCCATGGTCAGGCCAAAGTTGGACGGCATCTGCG
M8-Chi4 (387) GG---CCGTCTCGGGCGCCATGGTCAGGCCAAAGTTGGACGGCATCTGCG
M4-Chi4 (437) CGGATCCATCTGGGGCGCCTATCTC---CCCATCATCAA-GAAGTATGC-
M5-Chi4 (383) GG---CCGTCTCGGGCGCCATGGTCAGGCCAAAGTTGGACGGCATCTGCG
M6-Chi4 (384) GG---CCGTCTCGGGCGCCATGGTCAGGCCAAAGTTGGACGGCATCTGCG
M7-Chi4 (385) GG---CCGTCTCGGGCGCCATGGTCAGGCCAAAGTTGGACGGCATCTGCG
Consensus (451) GG CCGTCTCGGGCGCCATGGTCAGGCCAAAGTTGGACGGCATCTGCG
501 550
M0-Chi4 (430) CGAGAATG-CCGTCAATGATG-CGCACCAGGTTGGCCTGCGAGGCGGACA
M2-Chi4 (431) CGAGAATG-CCGTCAATGATG-CGCACCAGGTTGGCCTGCGAGGCGGACA
M1-Chi4 (416) CGAGAATG-CCGTCAATGATG-CGCACCAGGTTGGCCTGCGAGGCGGACA
M3-Chi4 (436) CGAGAATG-CCGTCAATGATG-CGCACCAGGTTGGCCTGCGAGGCGGACA
M8-Chi4 (434) CGAGAATG-CCGTCAATGATG-CGCACCAGGTTGGCCTGCGAGGCGGACA
M4-Chi4 (482) CGACAATGGCCGGCTGTGGTGGCTCAACATGCAGTACTACAACGGCGCCA
M5-Chi4 (430) CGAGAATG-CCGTCAATGATG-CGCACCAGGTTGGCCTGCGAGGCGGACA
M6-Chi4 (431) CGAGAATG-CCGTCAATGATG-CGCACCAGGTTGGCCTGCGAGGCGGACA
M7-Chi4 (432) CGAGRATG-CCGTCAATGATG-CGCACCAGGTTGGCCTGCGAGGCGGACA
Consensus (501) CGAGAATG CCGTCAATGATG CGCACCAGGTTGGCCTGCGAGGCGGACA
551 600
M0-Chi4 (478) GCGTGCCCATGTTGCCGCTGCCGCT-CAAGCCCGTC----TCGATGTCAA
M2-Chi4 (479) GCGTGCCCATGTTGCCGCTGCCGCT-CAAGCCCGTC----TCGATGTCAA


M1-Chi4 (464) GCGTGCCCATGTTGCCGCTCCCGCT-CAAGCCCGTC----TCGATGTCAA
M3-Chi4 (484) GCGTGCCCATGTTGCCGCTCCCGCT-CAAGCCCGTC----TCGATGTCAA
M8-Chi4 (482) GCGTGCCCATGTTGCCGCTCCCGCT-CAAGCCCGTC----TCGATGTCAA
M4-Chi4 (532) T-GTACGGATGTTCGGGAGACTCATACTCGGCCGGCACCGTCGAGGGCTT
M5-Chi4 (478) GCGTGCCCATGTTGCCGCTGCCGCT-CAAGCCCGTC----TCGATGTCAA
M6-Chi4 (479) GCGTGCCCATGTTGCCGCTGCCGCT-CAAGCCCGTC----TCGATGTCAA
M7-Chi4 (480) GCGTGCCCATGTTGCCGCTGCCGCT-CAAGCCCGTC----TCGATGTCAA
Consensus (551) GCGTGCCCATGTTGCCGCTGCCGCT CAAGCCCGTC TCGATGTCAA
601 650
M0-Chi4 (523) TGTCGACGCCGTCAAAGTTGTACCGCTTCAGAATGGGCACAATGGTCGAG
M2-Chi4 (524) TGTCGACGCCGTCAAAGTTGTACCGCTTCAGAATGGGCACAATGGTCGAG
M1-Chi4 (509) TGTCGACGCCGTCAAAGTTGTACCGCTTCAAAATGGGCACAATGGTCGAG
M3-Chi4 (529) TGTCGACGCCGTCAAAGTTGTACCGCTTCAAAATGGGCACAATGGTCGAG
M8-Chi4 (527) TGTCGACGCCGTCAAAGTTGTACCGCTTCAAAATGGGCACAATGGTCGAG
M4-Chi4 (581) TGT-GGCCCAGACCGACTGCTTGGACAAAGGACTCGTGATCCAGGGCACC
M5-Chi4 (523) TGTCGACGCCGTCAAAGTTGTACCGCTTCAGAATGGGCACAATGGTCGAG
M6-Chi4 (524) TGTCGACGCCGTCAAAGTTGTACCGCTTCAGAATGGGCACAATGGTCGAG
M7-Chi4 (525) TGTCGACGCCGTCAAAGTTGTACCGCTTCAGAATGGGCACAATGGTCGAG
Consensus (601) TGTCGACGCCGTCAAAGTTGTACCGCTTCAGAATGGGCACAATGGTCGAG
651 700
M0-Chi4 (573) ACGAACCTG-TCGGCGACGCTGCTCGAG-CTCAGGTCGATGCCCGCGGCG
M2-Chi4 (574) ACGAACCTG-TCGGCGACGCTGCTCGAG-CTCAGGTCGATGCCCGCGGCG
M1-Chi4 (559) ACGAACTTG-TCGGCGACGCTGCTCGAG-CTCAGGTCGATGCCCGCGGCG
M3-Chi4 (579) ACGAACTTG-TCGGCGACGCTGCTCGAG-CTCAGGTCGATGCCCGCGGCG
M8-Chi4 (577) ACGAACTTG-TCGGCGACGCTGCTCGAG-CTCAGGTCGATGCCCGCGGCG
M4-Chi4 (630) ACGATCCGGGTCCCTTACGACAAGCAAGTCCCCGGTC--TGCCTGCGCAG
M5-Chi4 (573) ACGAACCTG-TCGGCGACGCTGCTCGAG-CTCAGGTCGATGCCCGCGGCG
M6-Chi4 (574) ACGAACCTG-TCGGCGACGCTGCTCGAG-CTCAGGTCGATGCCCGCGGCG
M7-Chi4 (575) ACGAACCTG-TCGGCGACGCTGCTCGAG-CTCAGGTCGATGCCCGCGGCG
Consensus (651) ACGAACCTG TCGGCGACGCTGCTCGAG CTCAGGTCGATGCCCGCGGCG
701 750
M0-Chi4 (621) GCGC-CACCGATGGACATGACCATGGTCGCCCCGGCCGCCTTGGCCCGGC
M2-Chi4 (622) GCGC-CACCGATGGACATGACCATGGTCGCCCCGGCCGCCTTGGCCCGGC
M1-Chi4 (607) GCGC-CACCGATGGACATGACCATGGTCGCCCCGGCCGCCTTGGCCTGGC
M3-Chi4 (627) GCGC-CACCGATGGACATGACCATGGTCGCCCCGGCCGCCTTGGCCTGGC
M8-Chi4 (625) GCGC-CACCGATGGACATGACCATGGTCGCCCCGGCCGCCTTGGCCTGGC
M4-Chi4 (678) TCGGGCGCYGGTGG-CGGATACATG-TCGCCGAGTCTGG-TTGGACAAGC
M5-Chi4 (621) GCGC-CACCGATGGACATGACCATGGTCGCCCCGGCCGCCTTGGCCCGGC
M6-Chi4 (622) GCGC-CACCGATGGACATGACCATGGTCGCCCCGGCCGCCTTGGCCCGGC
M7-Chi4 (623) GCGC-CACCGATGGACATGACCATGGTCGCCCCGGCCGCCTTGGCCCGGC
Consensus (701) GCGC CACCGATGGACATGACCATGGTCGCCCCGGCCGCCTTGGCCCGGC
751 800
M0-Chi4 (670) ACATTTCCGCCGGCGTCGCGACCTTGACGTTGGCGTCCATGCCGTCCTCC
M2-Chi4 (671) ACATTTCCGCCGGCGTCGCGACCTTGACGTTGGCGTCCATGCCGTCCTCC
M1-Chi4 (656) ACATTTCCGCCGGCGTCGCGACCTTGACGTTGGCGTCCATGCCGTCCTCC
M3-Chi4 (676) ACATTTCCGCCGGCGTCGCGACCTTGACGTTGGCGTCCATGCCGTCCTCC
M8-Chi4 (674) ACATTTCCGCCGGCGTCGCGACCTTGACGTTGGCGTCCATGCCGTCCTCC
M4-Chi4 (725) AC--TGGGATCATTACAACGGCTCTCTCAAAGGCCTC-ATGACGTGGTCC
M5-Chi4 (670) ACATTTCCGCCGGCGTCGCGACCTTGACGTTGGCGTCCATGCCGTCCTCC
M6-Chi4 (671) ACATTTCCGCCGGCGTCGCGACCTTGACGTTGGCGTCCATGCCGTCCTCC
M7-Chi4 (672) ACATTTCCGCCGGCGTCGCGACCTTGACGTTGGCGTCCATGCCGTCCTCC
Consensus (751) ACATTTCCGCCGGCGTCGCGACCTTGACGTTGGCGTCCATGCCGTCCTCC
801 850
M0-Chi4 (720) CACAG--GGCTGTTCCGTCG--GACAGGATCA-------CGGGGAAGGCG
M2-Chi4 (721) CACAG--GGCTGTTCCGTCG--GACAGGATCA-------CGGGGAAGGCG
M1-Chi4 (706) CACAG--GGCTGTTCCGTCG--GACAGGATCA-------CGGGGAAGGCG
M3-Chi4 (726) CACAG--GGCTGTTCCGTCG--GACAGGATCA-------CGGGGAAGGCG
M8-Chi4 (724) CACAG--GGCTGTTCCGTCG--GACAGGATCA-------CGGGGAAGGAG
M4-Chi4 (772) ATCAACTGGAGGAGAATTCAAAGAAAAAACGAAGCCGGCGGGGAAAGCCA
M5-Chi4 (720) CACAG--GGCTGTTCCGTCG--GACAGGATCAN------CGGGGAAGGCG
M6-Chi4 (721) CACAG--GGCTGTTCCGTCG--GACAGGATCA-------CGGGGAAGGCG
M7-Chi4 (722) CACAG--GGCTGTTCCGTCG--GACAGGATCA-------CGGGGAAGGCG

```
Consensus   (801) CACAG  GGCTGTTCCGTCG  GACAGGATCA       CGGGGAAGGCG
                  851                                          900
  M0-Chi4   (759) GCGCTGATCACATTGTAGCCGTTGCCGGAATA----------------
  M2-Chi4   (760) GCGCTGATCACATTGTAGCCGTGGCCGGA-TAGAAA-----------
  M1-Chi4   (745) GCGCTGATCACATTGACG-------------------------------
  M3-Chi4   (765) GCGCTGATCACATTGTAGCGGGTGCCCCAGATAGAAA-----------
  M8-Chi4   (763) GCGCTGATCACATTGTAGCCCGGGCCG---------------------
  M4-Chi4   (822) ACCCCACCAAAATTCACACCACCTCCCCTTTGGTGGCCGCGACCGACAT
  M5-Chi4   (760) GCGCTGATCACATTGTAGCCGTGGCCGGA-TA----------------
  M6-Chi4   (760) GCGCTGATCACATTGTAGCCGTTGCCGGA-TA----------------
  M7-Chi4   (761) GCGCTGATCACATTGTAGCCGT-GCCGGA-TA----------------
Consensus   (851) GCGCTGATCACATTGTAGCCGT GCCGGA TA
                  901
```

ภาพที่ 1 การทำ alignment ของยีนไคติเนสจากเชื้อราเขียวทั้ง 8 สายพันธุ์ ได้แก่ M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 และ M8



ภาพที่ 2 Phylogenic tree ของเชื้อราเขียวทั้ง 8 สายพันธ์จากยีนไคติเนส ได้แก่ M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 และ M8

เมื่อนำลำดับเบสของยีน ITS ของเชื้อราเขียวแต่ละตัวอย่างไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank จะได้ข้อมูลตามตารางที่ 4 จะพบว่ามี 2 สายพันธุ์ที่เป็น M. *flavoviride* คือ B1707 และ B25948 ส่วนสายพันธุ์ ที่จำแนกเป็น *M. majus* คือ M0, M2, M3, M4, M5, M6, M7 ในขณะที่ สายพันธุ์ M1, M8, M9, B1858, และ B19520 เป็น *M. anisopiae*

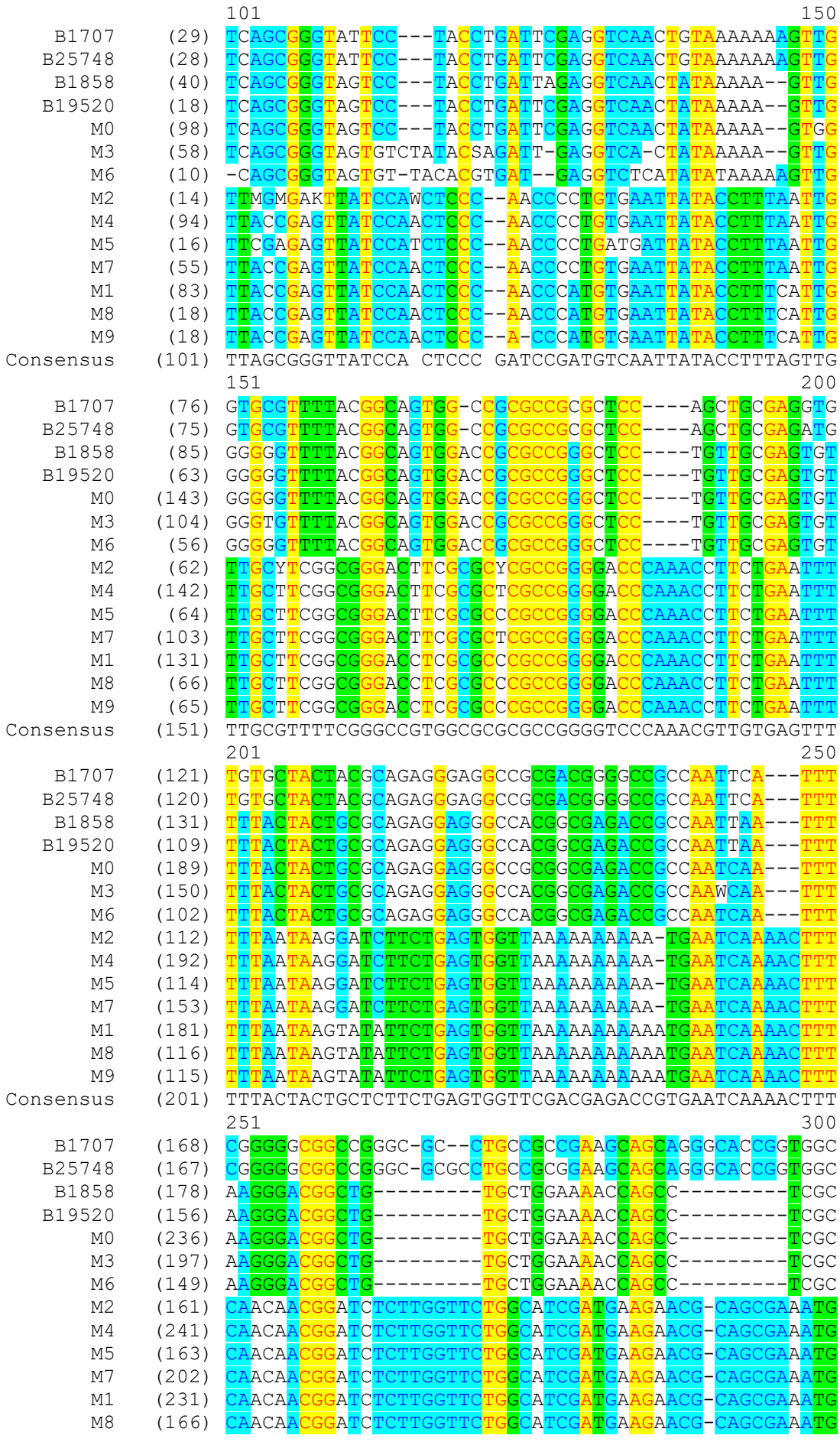
ตารางที่ 4 แสดงข้อมูลลำดับเบสจากยีนไคติเนสของเชื้อราเขียวเพื่อเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

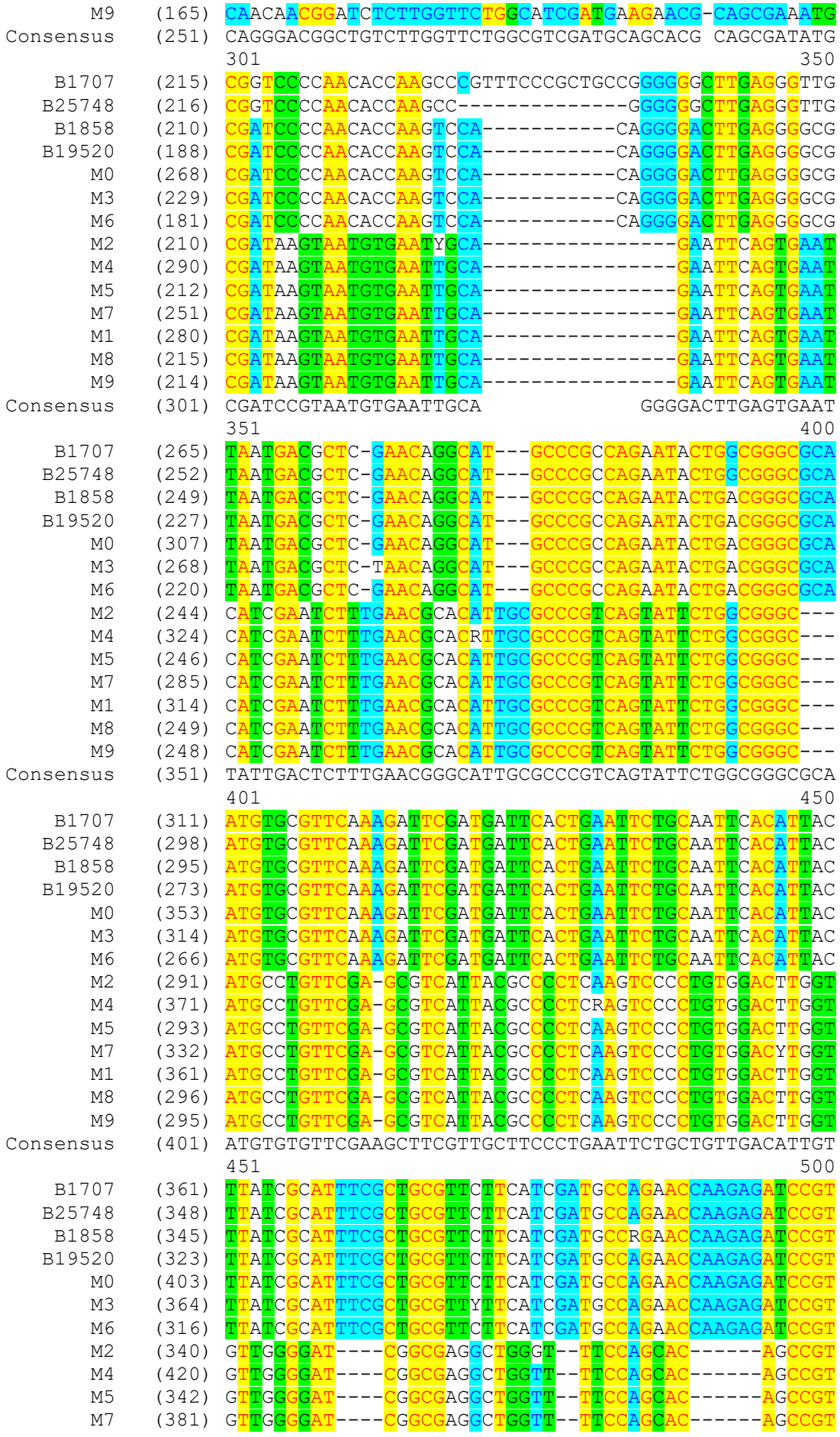
รหัสเชื้อราเขียว	% identity	ข้อมูลใน GenBank
M0	98	*M. majus*
M1	98	*M. anisopliae*
M2	99	*M. majus*
M3	96	*M. majus*
M4	99	*M. majus*

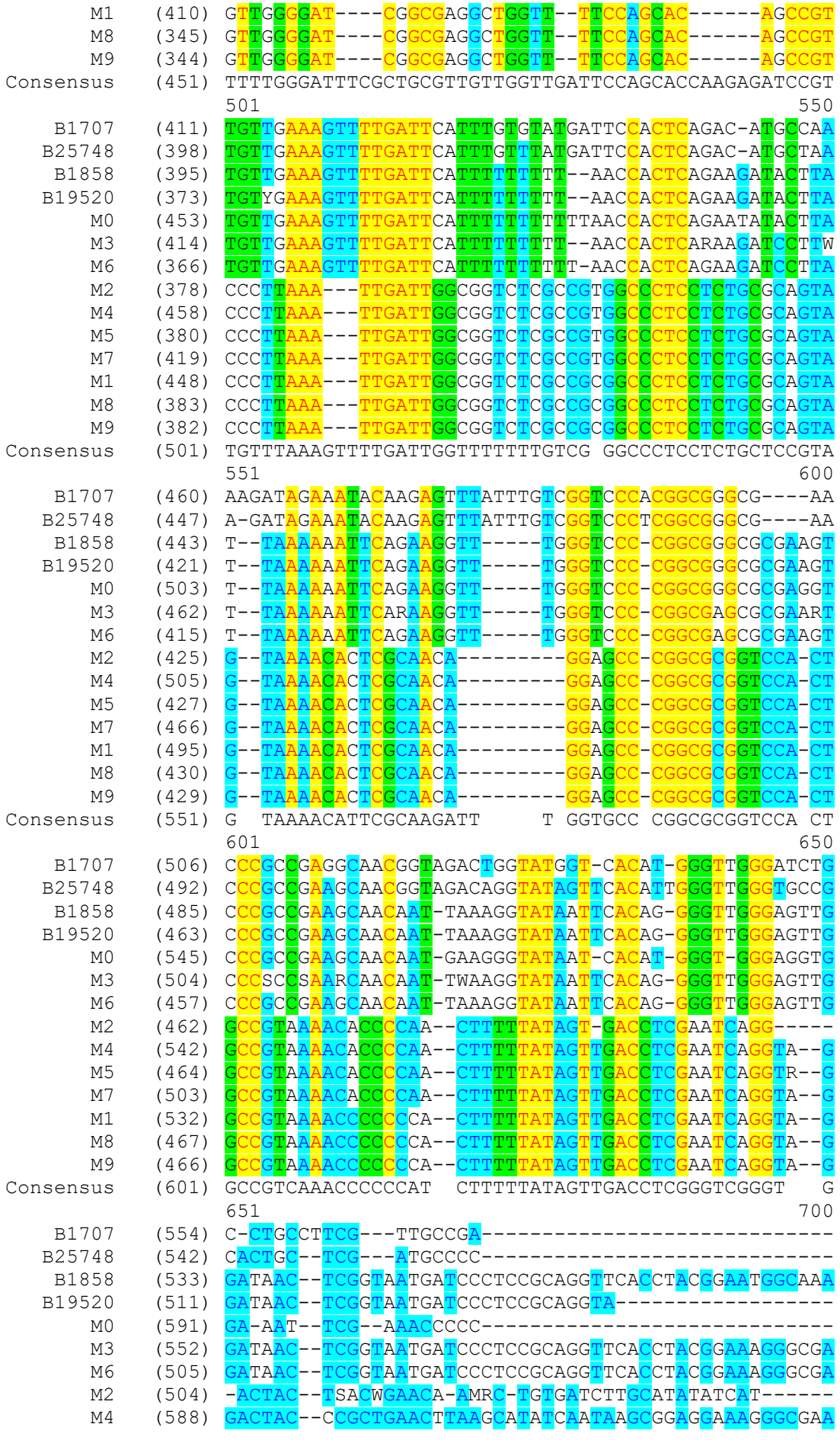
M5	98	*M. majus*
M6	98	*M. majus*
M7	99	*M. majus*
M8	99	*M. anisopliae*
M9	98	*M. anisopliae*
B1707	99	*M. flavoviride*
B1858	96	*M. anisopliae*
B19520	99	*M. anisopliae*
B25948	99	*M. flavoviride*

เมื่อนำข้อมูลของเชื้อราเขียวทั้ง 14 สายพันธุ์มาเทียบเคียงกันจะพบว่า M2, M4, M5, M7, M1, M8 และ M9 มีลำดับเบสที่เหมือนกันมาก และพบว่าทั้ง 14 สายพันธุ์มีความเหมือนกันทุกเบสเฉพาะในบางช่วงเท่านั้น (ภาพที่ 3) เมื่อนำมาทำ phylogenic tree พบว่า สามารถแบ่งเชื้อราเขียวทั้ง 14 สายพันธุ์ได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรกได้แก่ B1707 และ B25748 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ B1858, B19520, M0, M3 และ M6 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ M2, M4, M5, M7, M1, M8 และ M9 (ภาพที่ 4)

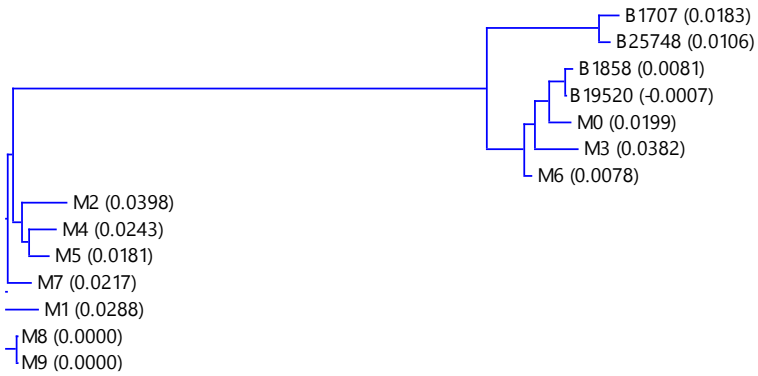
```
                  1                                                  50
    B1707      (1) --------------------------------------------------
   B25748      (1) --------------------------------------------------
    B1858      (1) --------------------------------------------------
   B19520      (1) --------------------------------------------------
       M0      (1) CAACAAATTGATGAGCAATTATTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAGAA
       M3      (1) ----------------------------------------CAAAAAAG
       M6      (1) --------------------------------------------------
       M2      (1) --------------------------------------------------
       M4      (1) ----CAAATTGATGAGCAATTCTTGTTGAGGAATGCAACTTTGTACAAAA
       M5      (1) --------------------------------------------------
       M7      (1) ----------------------------------------CTAGAAAGA
       M1      (1) ---------------CAAAAAACTTTGTTCTACAGCTAGGACTTCCATGA
       M8      (1) --------------------------------------------------
       M9      (1) --------------------------------------------------
Consensus      (1)
                  51                                                 100
    B1707      (1) --------------------TTCCTCCGGCTTATTGATAT--GCTTAAGT
   B25748      (1) --------------------TCTTCCGGGTTATTGATAT--GCTTAAGT
    B1858      (1) --------TTCCTACCTGATTTCCTCCG-ATTATTGATAT--GCTTAAGT
   B19520      (1) -------------------------------TATTGATAT--GCTTAAGT
       M0     (51) AGCTGGGTCGAATTCGCCCTTTCCTCCG-CTTATTGATAT--GCTTAAGT
       M3      (9) CAGATTTTAGAAATCGCCCTTTCTTCCG-ATTATTGATATACGCTTWWAGT
       M6      (1) ----------------------------------------GCGCTAAAG-
       M2      (1) ----------------------------------TGSGGRGRRMTCA---
       M4     (47) AAGCAGCATCCTAATTTGCCCTTGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCA---
       M5      (1) --------------------------------CGTGGGGGGGGATCA---
       M7     (10) -TTTTATGA-ATTTACCCTTTCCGTAGTTGAACGTTAGGAGGGATCA---
       M1     (36) ATTCTATTACATTGGACCATTTGATAAATTTACCTGCGGAGGGATCA---
       M8      (1) --------------------------------TGCCTGCGGAGGGATCA---
       M9      (1) --------------------------------TGCCTGCGGAGGGATCA---
Consensus     (51)                       T  T     T   TGAGG G GCTCAAG
```


101 150
B1707 (29) TCAGCGGGTATTCC---TACCTGATTCGAGGTCAACTGTAAAAAAGTTG
B25748 (28) TCAGCGGGTATTCC---TACCTGATTCGAGGTCAACTGTAAAAAAGTTG
B1858 (40) TCAGCGGGTAGTCC---TACCTGATTAGAGGTCAACTATAAAAA--GTTG
B19520 (18) TCAGCGGGTAGTCC---TACCTGATTCGAGGTCAACTATAAAAA--GTTG
M0 (98) TCAGCGGGTAGTCC---TACCTGATTCGAGGTCAACTATAAAAA--GTGG
M3 (58) TCAGCGGGTAGTGTCTATACSAGATT-GAGGTCA-CTATAAAAA--GTTG
M6 (10) -CAGCGGGTAGTGT-TACACGTGAT--GAGGTCTCATATATAAAAAGTTG
M2 (14) TTMGMGAKTTATCCAWCTCCC--AACCCCTGTGAATTATACCTTTAATTG
M4 (94) TTACCGAGTTATCCAACTCCC--AACCCCTGTGAATTATACCTTTAATTG
M5 (16) TTCGAGAGTTATCCATCTCCC--AACCCCTGATGATTATACCTTTAATTG
M7 (55) TTACCGAGTTATCCAACTCCC--AACCCCTGTGAATTATACCTTTAATTG
M1 (83) TTACCGAGTTATCCAACTCCC--AACCCATGTGAATTATACCTTTCATTG
M8 (18) TTACCGAGTTATCCAACTCCC--AACCCATGTGAATTATACCTTTCATTG
M9 (18) TTACCGAGTTATCCAACTCCC--A-CCCATGTGAATTATACCTTTCATTG
Consensus (101) TTAGCGGGTTATCCA CTCCC GATCCGATGTCAATTATACCTTTAGTTG
151 200
B1707 (76) GTGCGTTTTACGGCAGTGG-CCGCGCCGCGCTCC----AGCTGCGAGGTG
B25748 (75) GTGCGTTTTACGGCAGTGG-CCGCGCCGCGCTCC----AGCTGCGAGATG
B1858 (85) GGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTCC----TGTTGCGAGTGT
B19520 (63) GGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTCC----TGTTGCGAGTGT
M0 (143) GGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTCC----TGTTGCGAGTGT
M3 (104) GGGTGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTCC----TGTTGCGAGTGT
M6 (56) GGGGGTTTTACGGCAGTGGACCGCGCCGGGCTCC----TGTTGCGAGTGT
M2 (62) TTGCYTCGGCGGGACTTCGCGCYCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTT
M4 (142) TTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCTCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTT
M5 (64) TTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTT
M7 (103) TTGCTTCGGCGGGACTTCGCGCTCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTT
M1 (131) TTGCTTCGGCGGGACCTCGCGCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTT
M8 (66) TTGCTTCGGCGGGACCTCGCGCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTT
M9 (65) TTGCTTCGGCGGGACCTCGCGCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCTGAATTT
Consensus (151) TTGCGTTTTCGGGCCGTGGCGCGCGCCGGGGTCCCAAACGTTGTGAGTTT
201 250
B1707 (121) TGTGCTACTACGCAGAGGGAGGCCGCGACGGGGCCGCCAATTCA---TTT
B25748 (120) TGTGCTACTACGCAGAGGGAGGCCGCGACGGGGCCGCCAATTCA---TTT
B1858 (131) TTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAA---TTT
B19520 (109) TTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATTAA---TTT
M0 (189) TTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCGCGGCGAGACCGCCAATCAA---TTT
M3 (150) TTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAAWCAA---TTT
M6 (102) TTTACTACTGCGCAGAGGAGGGCCACGGCGAGACCGCCAATCAA---TTT
M2 (112) TTTAATAAGGATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAAAA-TGAATCAAAACTTT
M4 (192) TTTAATAAGGATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAAAA-TGAATCAAAACTTT
M5 (114) TTTAATAAGGATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAAAA-TGAATCAAAACTTT
M7 (153) TTTAATAAGGATCTTCTGAGTGGTTAAAAAAAAAA-TGAATCAAAACTTT
M1 (181) TTTAATAAGTATATTCTGAGTGGTTAAAAAAAAAAATGAATCAAAACTTT
M8 (116) TTTAATAAGTATATTCTGAGTGGTTAAAAAAAAAAATGAATCAAAACTTT
M9 (115) TTTAATAAGTATATTCTGAGTGGTTAAAAAAAAAAATGAATCAAAACTTT
Consensus (201) TTTACTACTGCTCTTCTGAGTGGTTCGACGAGACCGTGAATCAAAACTTT
251 300
B1707 (168) CGGGGGCGGCCGGGC-GC--CTGCCGCCGAAGCAGCAGGGCACCGGTGGC
B25748 (167) CGGGGGCGGCCGGGC-GCGCCTGCCGCGGAAGCAGCAGGGCACCGGTGGC
B1858 (178) AAGGGACGGCTG---------TGCTGGAAAACCAGCC---------TCGC
B19520 (156) AAGGGACGGCTG---------TGCTGGAAAACCAGCC---------TCGC
M0 (236) AAGGGACGGCTG---------TGCTGGAAAACCAGCC---------TCGC
M3 (197) AAGGGACGGCTG---------TGCTGGAAAACCAGCC---------TCGC
M6 (149) AAGGGACGGCTG---------TGCTGGAAAACCAGCC---------TCGC
M2 (161) CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG-CAGCGAAATG
M4 (241) CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG-CAGCGAAATG
M5 (163) CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG-CAGCGAAATG
M7 (202) CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG-CAGCGAAATG
M1 (231) CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG-CAGCGAAATG
M8 (166) CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG-CAGCGAAATG


M9 (165) CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG-CAGCGAAATG
Consensus (251) CAGGGACGGCTGTCTTGGTTCTGGCGTCGATGCAGCACG CAGCGATATG
301 350
B1707 (215) CGGTCCCCAACACCAAGCCCGTTTCCCGCTGCCGGGGGGCTTGAGGGTTG
B25748 (216) CGGTCCCCAACACCAAGCC----------GGGGGGCTTGAGGGTTG
B1858 (210) CGATCCCCAACACCAAGTCCA----------CAGGGGACTTGAGGGGCG
B19520 (188) CGATCCCCAACACCAAGTCCA----------CAGGGGACTTGAGGGGCG
M0 (268) CGATCCCCAACACCAAGTCCA----------CAGGGGACTTGAGGGGCG
M3 (229) CGATCCCCAACACCAAGTCCA----------CAGGGGACTTGAGGGGCG
M6 (181) CGATCCCCAACACCAAGTCCA----------CAGGGGACTTGAGGGGCG
M2 (210) CGATAAGTAATGTGAATYGCA----------GAATTCAGTGAAT
M4 (290) CGATAAGTAATGTGAATTGCA----------GAATTCAGTGAAT
M5 (212) CGATAAGTAATGTGAATTGCA----------GAATTCAGTGAAT
M7 (251) CGATAAGTAATGTGAATTGCA----------GAATTCAGTGAAT
M1 (280) CGATAAGTAATGTGAATTGCA----------GAATTCAGTGAAT
M8 (215) CGATAAGTAATGTGAATTGCA----------GAATTCAGTGAAT
M9 (214) CGATAAGTAATGTGAATTGCA----------GAATTCAGTGAAT
Consensus (301) CGATCCGTAATGTGAATTGCA GGGGACTTGAGTGAAT
351 400
B1707 (265) TAATGACGCTC-GAACAGGCAT---GCCCGCCAGAATACTGGCGGGGCGCA
B25748 (252) TAATGACGCTC-GAACAGGCAT---GCCCGCCAGAATACTGGCGGGGCGCA
B1858 (249) TAATGACGCTC-GAACAGGCAT---GCCCGCCAGAATACTGACGGGGCGCA
B19520 (227) TAATGACGCTC-GAACAGGCAT---GCCCGCCAGAATACTGACGGGGCGCA
M0 (307) TAATGACGCTC-GAACAGGCAT---GCCCGCCAGAATACTGACGGGGCGCA
M3 (268) TAATGACGCTC-TAACAGGCAT---GCCCGCCAGAATACTGACGGGGCGCA
M6 (220) TAATGACGCTC-GAACAGGCAT---GCCCGCCAGAATACTGACGGGGCGCA
M2 (244) CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGGC---
M4 (324) CATCGAATCTTTGAACGCACRTTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGGC---
M5 (246) CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGGC---
M7 (285) CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGGC---
M1 (314) CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGGC---
M8 (249) CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGGC---
M9 (248) CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGGC---
Consensus (351) TATTGACTCTTTGAACGGGCATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCGCA
401 450
B1707 (311) ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC
B25748 (298) ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC
B1858 (295) ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC
B19520 (273) ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC
M0 (353) ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC
M3 (314) ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC
M6 (266) ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC
M2 (291) ATGCCTGTTCGA-GCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGT
M4 (371) ATGCCTGTTCGA-GCGTCATTACGCCCTCRAGTCCCCTGTGGACTTGGT
M5 (293) ATGCCTGTTCGA-GCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGT
M7 (332) ATGCCTGTTCGA-GCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACYTGGT
M1 (361) ATGCCTGTTCGA-GCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGT
M8 (296) ATGCCTGTTCGA-GCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGT
M9 (295) ATGCCTGTTCGA-GCGTCATTACGCCCTCAAGTCCCCTGTGGACTTGGT
Consensus (401) ATGTGTGTTCGAAGCTTCGTTGCTTCCCTGAATTCTGCTGTTGACATTGT
451 500
B1707 (361) TTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGT
B25748 (348) TTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGT
B1858 (345) TTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCRGAACCAAGAGATCCGT
B19520 (323) TTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGT
M0 (403) TTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGT
M3 (364) TTATCGCATTTCGCTGCGTTYTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGT
M6 (316) TTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGT
M2 (340) GTTGGGGAT----CGGCGAGGCTGGGT--TTCCAGCAC------AGCCGT
M4 (420) GTTGGGGAT----CGGCGAGGCTGGTT--TTCCAGCAC------AGCCGT
M5 (342) GTTGGGGAT----CGGCGAGGCTGGTT--TTCCAGCAC------AGCCGT
M7 (381) GTTGGGGAT----CGGCGAGGCTGGTT--TTCCAGCAC------AGCCGT


M1 (410) GTTGGGGAT----CGGCGAGGCTGGTT--TTCCAGCAC------AGCCGT
M8 (345) GTTGGGGAT----CGGCGAGGCTGGTT--TTCCAGCAC------AGCCGT
M9 (344) GTTGGGGAT----CGGCGAGGCTGGTT--TTCCAGCAC------AGCCGT
Consensus (451) TTTTGGGATTTCGCTGCGTTGTTGGTTGATTCCAGCACCAAGAGATCCGT
501 550
B1707 (411) TGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTGTATGATTCCACTCAGAC-ATGCCAA
B25748 (398) TGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTATGATTCCACTCAGAC-ATGCTAA
B1858 (395) TGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTTT--AACCACTCAGAAGATACTTA
B19520 (373) TGTYGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTTT--AACCACTCAGAAGATACTTA
M0 (453) TGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTTTTAACCACTCAGAATATACTTA
M3 (414) TGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTTT--AACCACTCARAAGATCCTTW
M6 (366) TGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTTTTT-AACCACTCAGAAGATCCTTA
M2 (378) CCCTTAAA---TTGATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTA
M4 (458) CCCTTAAA---TTGATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTA
M5 (380) CCCTTAAA---TTGATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTA
M7 (419) CCCTTAAA---TTGATTGGCGGTCTCGCCGTGGCCCTCCTCTGCGCAGTA
M1 (448) CCCTTAAA---TTGATTGGCGGTCTCGCCGCGGCCCTCCTCTGCGCAGTA
M8 (383) CCCTTAAA---TTGATTGGCGGTCTCGCCGCGGCCCTCCTCTGCGCAGTA
M9 (382) CCCTTAAA---TTGATTGGCGGTCTCGCCGCGGCCCTCCTCTGCGCAGTA
Consensus (501) TGTTTAAAGTTTTGATTGGTTTTTTTGTCG GGCCCTCCTCTGCTCCGTA
551 600
B1707 (460) AAGATAGAAATACAAGAGTTTATTTGTCGGTCCCACGGCGGGCG----AA
B25748 (447) A-GATAGAAATACAAGAGTTTATTTGTCGGTCCCTCGGCGGGCG----AA
B1858 (443) T--TAAAAAATTCAGAAGGTT-----TGGGTCCC-CGGCGGGCGCGAAGT
B19520 (421) T--TAAAAAATTCAGAAGGTT-----TGGGTCCC-CGGCGGGCGCGAAGT
M0 (503) T--TAAAAAATTCAGAAGGTT-----TGGGTCCC-CGGCGGGCGCGAGGT
M3 (462) T--TAAAAAATTCARAAGGTT-----TGGGTCCC-CGGCGAGCGCGAART
M6 (415) T--TAAAAAATTCAGAAGGTT-----TGGGTCCC-CGGCGAGCGCGAAGT
M2 (425) G--TAAAACACTCGCAACA---------GGAGCC-CGGCGCGGTCCA-CT
M4 (505) G--TAAAACACTCGCAACA---------GGAGCC-CGGCGCGGTCCA-CT
M5 (427) G--TAAAACACTCGCAACA---------GGAGCC-CGGCGCGGTCCA-CT
M7 (466) G--TAAAACACTCGCAACA---------GGAGCC-CGGCGCGGTCCA-CT
M1 (495) G--TAAAACACTCGCAACA---------GGAGCC-CGGCGCGGTCCA-CT
M8 (430) G--TAAAACACTCGCAACA---------GGAGCC-CGGCGCGGTCCA-CT
M9 (429) G--TAAAACACTCGCAACA---------GGAGCC-CGGCGCGGTCCA-CT
Consensus (551) G TAAAACATTCGCAAGATT T GGTGCC CGGCGCGGTCCA CT
601 650
B1707 (506) CCGGCCGAGGCAACGGTAGACTGGTATGGT-CACAT-GGGTTGGGATCTG
B25748 (492) CCGGCCGAAGCAACGGTAGACAGGTATAGTTCACATTGGGTTGGGTGCCG
B1858 (485) CCGGCCGAAGCAACAAT-TAAAGGTATAATTCACAG-GGGTTGGGAGTTG
B19520 (463) CCGGCCGAAGCAACAAT-TAAAGGTATAATTCACAG-GGGTTGGGAGTTG
M0 (545) CCGGCCGAAGCAACAAT-GAAGGGTATAAT-CACAT-GGGT-GGGAGGTG
M3 (504) CCSCCSAARCAACAAT-TWAAGGTATAATTCACAG-GGGTTGGGAGTTG
M6 (457) CCGGCCGAAGCAACAAT-TAAAGGTATAATTCACAG-GGGTTGGGAGTTG
M2 (462) GCCGTAAAACACCCCAA--CTTTTTATAGT-GACCTCGAATCAGG-----
M4 (542) GCCGTAAAACACCCCAA--CTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTA--G
M5 (464) GCCGTAAAACACCCCAA--CTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTR--G
M7 (503) GCCGTAAAACACCCCAA--CTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTA--G
M1 (532) GCCGTAAAACCCCCCCA--CTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTA--G
M8 (467) GCCGTAAAACCCCCCCA--CTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTA--G
M9 (466) GCCGTAAAACCCCCCCA--CTTTTTATAGTTGACCTCGAATCAGGTA--G
Consensus (601) GCCGTCAAACCCCCCAT CTTTTTATAGTTGACCTCGGGTCGGGT G
651 700
B1707 (554) C-CTGCCTTCG---TTGCCGA----------
B25748 (542) CACTGC--TCG---ATGCCCC----------
B1858 (533) GATAAC--TCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTTCACCTACGGAATGGCAAA
B19520 (511) GATAAC--TCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTA----------
M0 (591) GA-AAT--TCG--AAACCCCC----------
M3 (552) GATAAC--TCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTTCACCTACGGAAAGGGCGA
M6 (505) GATAAC--TCGGTAATGATCCCTCCGCAGGTTCACCTACGGAAAGGGCGA
M2 (504) -ACTAC--TSACWGAACA-AMRC-TGTGATCTTGCATATATCAT------
M4 (588) GACTAC--CCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAGGGCGAA

ภาพที่ 3 การทำ alignment จากยีน ITS ของเชื้อราเขียวทั้ง 14 สายพันธุ์ ได้แก่ M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, B1707, B1858, B19520 และ B25748



ภาพที่ 4 Phylogenic tree จากยีน ITS ของเชื้อราเขียวทั้ง 14 สายพันธุ์ ได้แก่ M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, B1707, B1858, B19520 และ B25748

การศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราเขียวได้เป็น 3 ชนิดด้วยกันคือ *M. majus* *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* ซึ่งมี 2 ตัวอย่างที่ไม่สามารถจำแนก specie ได้ก่อนหน้านี้คือ B19520 และ B25748 แต่หลังจากการจำแนกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราเขียวทั้งสองตัวอย่างได้ โดย B19520 คือ *M. anisopliae* และ B25748 คือ *M. flavoviride* นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกเชื้อราเขียวได้ถึงระดับ variety ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ยีนไคติเนสจำแนกสามารถแยกเชื้อราเขียว *M. majus* ซึ่งเป็นชื่อที่เรียกใหม่ในกลุ่มเชื้อราที่ใช้กำจัดด้วง ซึ่งราชนิดนี้จะมีขนาด spore ที่ใหญ่ ชื่ออื่นๆของเชื้อชนิดนี้คือ *M. anisopliae f. major, M. anisopliae f. oryctophagum, M. anisopliae var. majus* (Bischoff et al., 2009) ผลครั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของเสาวนิตย์และคณะ (2553) ที่ทำการทดสอบเชื้อราเขียวทั้ง 10 ชนิดกับด้วงแรดมะพร้าว ในขณะที่การจำแนกด้วยส่วนของ ITS จะแยกได้เป็น *M. majus* บางตัวเท่านั้น การศึกษาเชื้อราเขียวชนิดต่างๆ โดยการหาลำดับเบสในส่วน ITS มีการศึกษาโดยนฤมลและคณะ (2552) ได้ศึกษากับเชื้อราเขียวที่เก็บรวบรวมได้ในไทยที่จังหวัดต่างๆ 14 สายพันธุ์ Velasquez et al. (2007) ได้ศึกษาความแตกต่างของของเชื้อราเขียวในประเทศชิลี 39 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค ITS RAPD และSSR Destifano et al. (2004) ได้ศึกษาเชื้อราเขียว 6 สายพันธุ์จากประเทศบราซิล ออสเตรเลีย ฝรั่งเศส และอินโดนีเซีย ด้วยเทคนิค PCR-RFLP และหาลำดับเบสในส่วน ITS

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การจำแนกเชื้อราเขียว Metarhizium ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล โดยใช้ยีนไคติเนส สามารถจำแนกเชื้อราเขียว 9 ตัวอย่างเป็นชนิด *M. majus* ทั้งหมด ในขณะที่การจำแนกด้วยส่วนของ ITS จะสามารถจำแนกเชื้อได้ทั้ง 14 ตัวอย่าง แยกได้เป็น *M. anisopliae, M. majus* และ *M. flavoviride* แต่มีบางตัวอย่างที่ผลของยีนไคติเนสและ ITS ไม่ชัดเจน ดังนั้นในการจำแนกเชื้อราเขียวควรจะใช้หลายๆยีนเข้าจำแนกเพื่อให้ผลการจำแนกชัดเจนยิ่งขึ้น

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

-สามารถจำแนกเชื้อราของกรมวิชาการเกษตรและศูนย์พันธุวิศวกรรมที่เก็บรวบรวมไว้

-เผยแพร่ในเอกสารวิชาการ

11. คำขอบคุณ

12. เอกสารอ้างอิง

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลง:นิวคลีโอโดลิฮีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นฤมล ตั้งธีระสุนันท์, สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, เกษม สร้อยทอง, พิมพ์พรรณ สมมาตย์ และเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์. 2552. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS. หน้า 396-403 ในเรื่องเต็มการประชุมของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์, เกรียงไกร จำเริญมา และสาทิพย์ มาลี. 2553 . การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae*. หน้า 842-853. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่ม 2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. เอกสารวิชาการ ลำดับที่ 1/2554 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อัญชลี นาทองคำ, ศิวิลัย สิริมังครารัตน์, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, หทัยรัตน์ อุไรรงค์และเบญจมาศ แก้วรัตน์. ประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว *Metarhizium spp*. ไอโซเลตภาคตะวันออกเฉียงเหนือในการควบคุมแมลงศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจ. วารสารวิจัย มข. 15(10): 930-940.

Bischoff, J.F., S.T. Rehner, R.A. Humber. 2000. A multilucus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* linegage. Mycology. 101(4):512-530.

Bridge P.D., M.A.J. Williams, C. Prior and R.R.M. Paterson. 1993. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. J of General Micrology. 139: 1163-1169.

Destefano R., S. Destefano and C. Messiae. 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var *Anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidopera, Pyralidae) using specific primers. Genetic and Molecular Biology. 27: 245-252.

Enkerli J., V. Ghormade, C. Oulevey and F. Widmer. 2009. PCR-RFLP analysis of chitinase genes enables efficient genotyping of *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*. J. of invertebrate Pathol. 102: 185-188.

Milner R.J. 2000. Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. Biocontrol News and Information. 21(2) 47-50.

Muzzarelli R. A. A. 1977. Human enzymeatic activities related to therapeutic administration of chitin derivatives. Cell Mol. Life Sci. 53: 131-140.

Tangthirasunun N., S. Poeaim, K. Soytong, P. Sommartya and S. Popoonsak. 2010. Variation in morphology and ribosomal DNA among Isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. J of Agricultural Technology. 6(2):317-329.

Thomas M.B., J. Klass and S. Blanford. 2000. The year of the locust. Pesticide Outlook. 11:192-195.

Velasquez V.B., M.P. Carcamo, C.R. Merino, A.F. Iglesias and J. F. Duran. 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. Genetic and Molecular Biology. 30:89-99.

Zimmermann G. 1993. The entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and its potential as abiocontrol agent. J. of Pesticide Science. 37: 375-379.

13. ภาคผนวก ไม่มี