บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การเลี้ยง และการเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

นำเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Beauveria* spp. และ *Metarhizium* spp. จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) และสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จำนวน 58 รหัส (ตาราง 4) โดยเลี้ยงบนอาหาร malt agar (MA) และ potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก) เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ หลังจากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะแยกเชื้อไปไว้ในอาหารใหม่ (fresh media) โดยบ่มในสภาพอุณหภูมิห้อง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ตาราง 4 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงรหัสต่าง ๆ ในประเทศไทย

ลำดับ	รหัส	ไอโซเลท	ชนิดของเชื้อ	แหล่งอาศัย	แหล่งที่มา
1	Bb1	BCC14532	*Beauveria bassiana*	Coleoptera-ตัวเต็มวัย	ภาคเหนือ
2	Bb2	BCC14841	*B. bassiana*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ภาคเหนือ
3	Bb3	BCC16041	*B. bassiana*	Coleoptera-ตัวเต็มวัย	ภาคเหนือ
4	Bb4	BCC17599	*Beauveria* sp.	Homoptera-จักจั่น	เพชรบุรี
5	Bb5	BCC17778	*B. brongniartii*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
6	Bb6	BCC17906	*B. brongniartii*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
7	Bb7	BCC17981	*B. bassiana*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
8	Bb8	BCC18054	*B. bassiana*	ดิน	ไม่ทราบแหล่งที่มา
9	Bb9	BCC18058	*B. bassiana*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
10	Bb10	BCC18059	*B. bassiana*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
11	Bb11	BCC18616	*Beauveria* sp.	แมลง	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
12	Bb12	BCC18631	*Beauveria* sp.	แมลง	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ตาราง 4 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	ไอโซเลท	ชนิดของเชื้อ	แหล่งอาศัย	แหล่งที่มา
13	Bb13	BCC19012	*B. bassiana*	Coleoptera	ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ
14	Bb14	BCC19058	*B. amorpha*	Coleoptera-ตัวเต็มวัย	ภาคเหนือ
15	Bb15	BCC19337	*B. amorpha*	Araneae-แมงมุม	ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ
16	Bb16	BCC20196	*B. bassiana*	Homoptera-เพลี้ยกระโดด	ประเทศไทย
17	Bb17	BCC22355	*B. bassiana*	Homoptera-เพลี้ยกระโดด	ภาคเหนือ
18	Bb18	BCC25950	*B. bassiana*	แมลงตัวเต็มวัย	ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ
19	Bb19	BCC31676	*Beauveria* sp.	*Gryllotalpa orientalis*	เชียงใหม่
20	Bb20	Bb.2637	*B. bassiana*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
21	Bb21	Bb.4591	*B. bassiana*	Coleoptera-Curculionidae	จันทบุรี
22	Bb22	Bb.5082	*B. bassiana*	Hymenoptera-ผึ้ง	เพชรบูรณ์
23	Bb23	Bb.5335	*B. bassiana*	Hymenoptera-มด	เพชรบุรี
24	Bb24	Bb.5436	*B. bassiana*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
25	Bb25	Bb.6241	*B. bassiana*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
26	Bb26	Bb.6243	*B. bassiana*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
27	Bb27	B.6988	*Beauveria* sp.	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	สุราษฎร์ธานี
28	Bb28	B.7683	*Beauveria* sp.	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ตาก
29	Ma1	BCC1380	*Metarhizium flavoviride*	Homoptera-Delphacidae	ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ
30	Ma2	BCC1399	*M. flavoviride*	Homoptera-เพลี้ยกระโดด	ภาคใต้
31	Ma3	BCC1402	*M. anisopliae*	Homoptera-เพลี้ยกระโดด	ภาคใต้
32	Ma4	BCC1552	*M. anisopliae*	Araneae-แมงมุม	นครนายก
33	Ma5	BCC1555	*M. anisopliae*	Homoptera-เพลี้ยกระโดด	นครนายก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตาราง 4 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	ไอโซเลท	ชนิดของเชื้อ	แหล่งอาศัย	แหล่งที่มา
34	Ma6	BCC1617	*M. anisopliae*	Homoptera-ตัวอ่อนเพลี้ยกระโดด	จันทบุรี
35	Ma7	BCC1701	*M. anisopliae*	Hemiptera-เพลี้ยกระโดด	ภาคใต้
36	Ma8	BCC1705	*M. anisopliae*	Homoptera-เพลี้ยกระโดด	ภาคกลาง
37	Ma9	BCC1707	*M. flavoviride*	Hemiptera-ตัวอ่อน	ภาคกลาง
38	Ma10	BCC1762	*M. cylindrosporae*	Homoptera-ตัวอ่อนจักจั่น	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
39	Ma11	BCC1828	*M. anisopliae*	แมลง	นครราชสีมา
40	Ma12	BCC1858	*M. anisopliae*	Coleopter-หิ่งห้อย	เพชรบุรี
41	Ma13	BCC2074	*M. anisopliae*	Lepidoptera-หนอนไหม	นครปฐม
42	Ma14	BCC2335	*M. flavoviride*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
43	Ma15	BCC2699	*M. anisopliae*	แมลง	ภาคตะวันตก
44	Ma16	BCC4810	*M. anisopliae*	เศษไม้	ประเทศไทย
45	Ma17	BCC4849	*M. anisopliae*	เศษไม้	ประเทศไทย
46	Ma18	BCC4951	*M. anisopliae* var.*anisopliae*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
47	Ma19	BCC5797	*M. anisopliae*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
48	Ma20	BCC7672	*Metarhizium* sp.	Homoptera-เพลี้ยกระโดด	สระบุรี
49	Ma21	BCC12392	*M. anisopliae*	Homoptera-เพลี้ยกระโดด	นครราชสีมา
50	Ma22	BCC12636	*M. anisopliae*	Coleoptera-ด้วงดีด	ไม่ทราบแหล่งที่มา
51	Ma23	BCC16000	*M. anisopliae*	Homoptera-เพลี้ยกระโดด	กาญจนบุรี
52	Ma24	BCC17760	*M. anisopliae*	ฟางข้าว	ไม่ทราบแหล่งที่มา
53	Ma25	BCC17896	*M. anisopliae*	ดิน	ไม่ทราบแหล่งที่มา
54	Ma26	BCC17908	*M. anisopliae*	*Tomaspis saccharina*	ไม่ทราบแหล่งที่มา
55	Ma27	BCC18558	*M. anisopliae*	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	ไม่ทราบแหล่งที่มา
56	Ma28	BCC22353	*M. anisopliae*	Orthoptera-ตั๊กแตน	ภาคกลาง

ตาราง 4 (ต่อ)

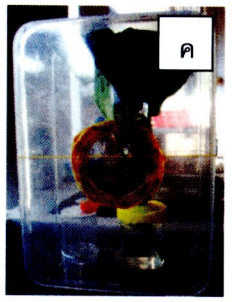
ลำดับ	รหัส	ไอโซเลท	ชนิดของเชื้อ	แหล่งอาศัย	แหล่งที่มา
57	Ma29	M.6079	*Metarhizium* sp.	Homoptera	ระนอง
58	Ma30	M.7965	*Metarhizium* sp.	ไม่ทราบแหล่งอาศัย	นครราชสีมา

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Beauveria* spp. และ *Metarhizium* spp. ในการกำจัดหนอนใยผัก

3.2.1 การเลี้ยง และเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก

หนอนใยผักที่ใช้ในการศึกษาเก็บตัวอย่างจากแปลงเกษตรกรในเขต ต.สันผีเสื้อ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ต.หนองหอยใหม่ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ และ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ ที่ไม่มีการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืช มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการด้วยใบคะน้าที่ปลอดสารพิษ โดยเลี้ยงหนอนใยผักในกล่องพลาสติก จนกระทั่งแมลงเข้าดักแด้ แล้วเก็บใส่กล่องขนาดเล็กไปวางในกล่องพลาสติกใสขนาด 19×30×10 เซนติเมตร เพื่อให้เจริญเป็นตัวเต็มวัยและผสมพันธุ์กัน ซึ่งข้างในกล่องจะใส่ต้นคะน้าที่ปลูกโดยไม่ใช้สารฆ่าแมลงอายุ 2-3 สัปดาห์ เพื่อให้เป็นที่วางไข่ และให้น้ำผึ้งที่มีความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารของตัวเต็มวัย ปล่อยให้ผีเสื้อที่ออกจากดักแด้วางไข่ตามใบคะน้าหลังจากนั้นประมาณ 5-6 วันทำการย้ายต้นคะน้าที่มีกลุ่มไข่ของหนอนใยผักไปไว้อีกกล่องหนึ่งซึ่งเป็นพลาสติกใสขนาด 19×30×10 เซนติเมตร เมื่อไข่ฟักเป็นตัวหนอนแล้วเลี้ยงด้วยใบคะน้าอายุ 2-3 สัปดาห์ ทำการเปลี่ยนคะน้าทุก ๆ 1-2 วัน เลี้ยงจนหนอนเข้าดักแด้อีกรุ่น จึงเก็บดักแด้นั้นไปวางไว้ในกล่องพลาสติกใสขนาด 19×30×10 เซนติเมตรอีก เพื่อให้เป็นตัวเต็มวัย ผสมพันธุ์ และวางไข่ต่อไป (ภาพ 7)



ภาพ 7 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก (ก) สภาพแปลงผักตระกูลกะหล่ำของเกษตรกรที่ไม่ฉีดพ่นสารเคมีในเขตจังหวัดเชียงใหม่เป็นแหล่งที่เก็บตัวอย่างหนอนใยผักมาใช้ในการทดสอบ (ข-ค) การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนใยผักในกล่องพลาสติกใส ที่อุณหภูมิห้อง

3.2.2 การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับหนอนใยผัก

การทดสอบกับหนอนใยผักในสภาพห้องปฏิบัติการจะแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 เป็นการทดสอบถึงระยะเวลาที่เชื้อราสาเหตุโรคแมลงใช้ในการกำจัดแมลงเพื่อใช้ในการแบ่งกลุ่มของความรุนแรง โดยมีวิธีการทดสอบดังนี้

1. ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Beauveria* spp. และ *Metarhizium* spp. จำนวน 25 รหัส ซึ่งมีอายุ 15 วันโดยเท Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 3-5 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และขูดเบา ๆ ที่ผิวหน้าของโคโลนีเพื่อเก็บโคนิเดียของเชื้อราแล้วนับจำนวนโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า ด้วย haemacytometer (ภาคผนวก ข) หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยด้วย Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร และนำสารแขวนลอยของเชื้อราปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในขวดสเปรย์ขนาดเล็กไปฉีดพ่นลงบนตัวหนอนใยผักวัย 2 โดยตรงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่มีใบคะน้าขนาด 6×7 เซนติเมตร ซึ่งถูกฆ่าเชื้อที่ผิวใบด้วย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 15 วินาที (ภาพ 8) (Jun, 2000; Anand *et al.*, 2009; Godonou *et al.*, 2009)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีทั้งหมด 26 กรรมวิธี โดยในแต่ละกรรมวิธีมีทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว ส่วนในชุดควบคุม (control) จะใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วผสมกับ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb1
กรรมวิธีที่ 2 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb2
กรรมวิธีที่ 3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb3
กรรมวิธีที่ 4 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb4
กรรมวิธีที่ 5 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb5
กรรมวิธีที่ 6 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb10
กรรมวิธีที่ 7 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb13
กรรมวิธีที่ 8 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb17
กรรมวิธีที่ 9 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb18
กรรมวิธีที่ 10 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb20
กรรมวิธีที่ 11 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb21
กรรมวิธีที่ 12 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb23
กรรมวิธีที่ 13 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb25
กรรมวิธีที่ 14 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb28
กรรมวิธีที่ 15 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma2
กรรมวิธีที่ 16 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma7
กรรมวิธีที่ 17 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma9
กรรมวิธีที่ 18 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma12
กรรมวิธีที่ 19 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma16
กรรมวิธีที่ 20 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma17
กรรมวิธีที่ 21 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma19
กรรมวิธีที่ 22 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma22
กรรมวิธีที่ 23 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma28
กรรมวิธีที่ 24 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma29

กรรมวิธีที่ 25 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma30

กรรมวิธีที่ 26 น้ำกลั่นผสมกับ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (control)

ตรวจนับการตายของหนอนใยผักทุก ๆ วัน เป็นเวลา 7 วันหลังจากฉีดพ่นหากมีการตายเกิดขึ้นในชุดควบคุมอยู่ในช่วง 5-10 เปอร์เซ็นต์ให้ปรับเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott's formula (ภาคผนวก ข) (Abbott, 1925) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่า median lethal time (LT_{50}) ด้วยโปรแกรม LOGIT PC และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการเข้าควบคุมหนอนใยผักของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0

2. การเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) ถูกแสดงโดยทำการตรวจนับจำนวนหนอนใยผักที่ตายแล้ว และมีเส้นใยขึ้นปกคลุมลำตัวในวันที่ 7 หลังจากการฉีดพ่น โดยนำซากหนอนใยผักที่ตายในแต่ละวันมาล้างผิวลำตัวเพื่อให้ปราศจากเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนบริเวณผนังลำตัว ด้วย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 วินาที ตามด้วยการจุ่มลงในแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 วินาที และนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอีก 1 ครั้ง เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นนำซากแมลงที่ผ่านการล้างผิวลำตัวมาวางบนกระดาษกรองที่หยดน้ำให้ชุ่มในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ปิดทับขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยฟิล์มห่ออาหาร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

นับจำนวนซากหนอนใยผักที่มีเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุมลำตัวในวันที่ 7 ภายใต้กล้อง stereo microscope นำค่าที่ได้ไปปรับให้อยู่ในรูปของเปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0

ส่วนที่ 2 เป็นการทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มจากการทดลองในส่วนที่ 1 โดยมีวิธีการทดสอบดังนี้

นำเฉพาะเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุด จำนวน 2 รหัส ได้แก่ Bb23 และ Ma17 ซึ่งทำให้แมลงตายอยู่ในช่วง 26.28-32.29 ชั่วโมง จากกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง (high efficacy) หรือกลุ่ม H และเชื้อราที่มีประสิทธิภาพต่ำสุด จำนวน 2 รหัส ได้แก่ Bb2 และ Ma28 ซึ่งทำให้แมลงตายอยู่ในช่วง 62.46-73.26 ชั่วโมง จากกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำ (low efficacy) หรือกลุ่ม L ของแต่ละสกุล (genus) นำมาทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 ด้วยความเข้มข้นระดับต่าง ๆ อย่างน้อย 5 ความเข้มข้น ซึ่งสามารถทำให้หนอนใยผักมีอัตราการตายอยู่ในช่วงประมาณ 10-90 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีการนำสารแขวนลอยของเชื้อราปริมาตร 1 มิลลิลิตรฉีดพ่นลงบนตัวหนอนใยผักวัย 2 โดยตรงในจาน

อาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่มีใบคะน้าขนาด 6×7 เซนติเมตร ซึ่งถูกฆ่าเชื้อที่ผิวใบด้วย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที และล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 15 วินาที (Jun, 2000; Anand *et al.*, 2009; Godonou *et al.*, 2009)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีทั้งหมด 5 กรรมวิธี ในแต่ละกรรมวิธีมีทั้งหมด 5 ความเข้มข้น และแต่ละความเข้มข้นมีทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว ส่วนในชุดควบคุม (control) จะใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วผสมกับ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* กลุ่ม high efficacy รหัส Bb23 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 และ 10^9 โคนิเดีย/มิลลิลิตร

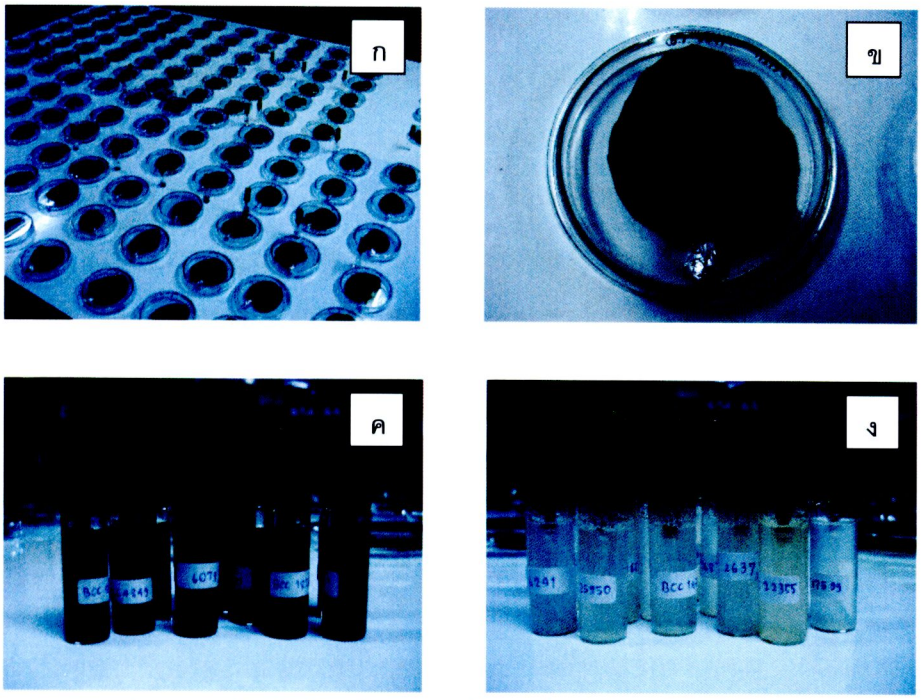
กรรมวิธีที่ 2 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* กลุ่ม low efficacy รหัส Bb2 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 และ 10^9 โคนิเดีย/มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* กลุ่ม high efficacy รหัส Ma17 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 และ 10^9 โคนิเดีย/มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 4 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* กลุ่ม low efficacy รหัส Ma28 ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 และ 10^9 โคนิเดีย/มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 5 น้ำกลั่นผสมกับ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (control)

ตรวจนับการตายของหนอนใยผักหลังจากฉีดพ่น 4 วัน หากมีการตายเกิดขึ้นในชุดควบคุมอยู่ในช่วง 5-10 เปอร์เซ็นต์ให้ปรับเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott's formula (ภาคผนวก ข) (Abbott, 1925) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่า median lethal concentration (LC_{50}) ด้วยโปรแกรม LOGIT PC



ภาพ 8 การทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 ในสภาพห้องปฏิบัติการ (ก-ข) การทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ค-ง) การเตรียมโคนิเดียของเชื้อราในรูปของสารแขวนลอย เพื่อการฉีดพ่น

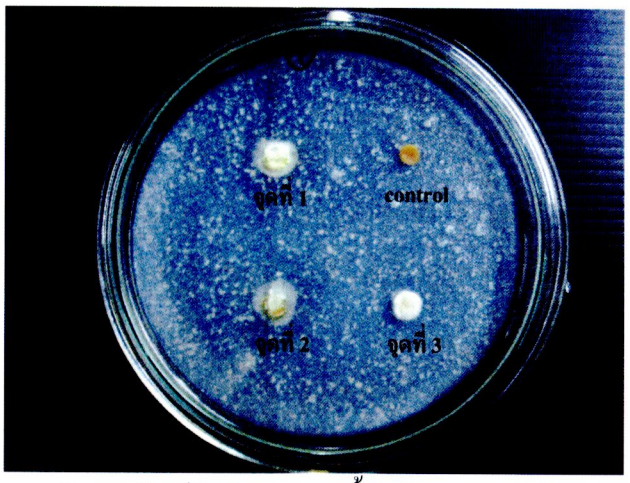
3.3 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง

การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 10 รหัส โดยแยกเป็นกลุ่ม high efficacy จำนวน 5 รหัส ได้แก่ Bb4, Bb20, Bb23, Ma17 และ Ma16 และกลุ่ม low efficacy จำนวน 5 รหัส ได้แก่ Bb2, Ma9, Ma12, Ma22 และ Ma28 ซึ่งมีอายุ 5 วัน โดยการ subculture ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ไปเลี้ยงบน colloidal chitin agar ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งถ้ามีการผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์นี้จะสามารถตัดพันธะ β-(1-4)-glycosidic ของไคตินที่ผสมอยู่ในอาหารให้เป็นหน่วยเล็ก ๆ คือ N-acetylglucosamine (GlcNAc) เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน จึงทำให้เกิด clear zone โดยถ้ามีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณที่แตกต่างกันก็จะปรากฏ clear zone ที่มีขนาดลดหลั่นกันไป

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีทั้งหมด 10 กรรมวิธี โดยในแต่ละกรรมวิธีมีการเปรียบเทียบชุดควบคุมกับกรรมวิธี โดยใน plate จะมีการวางเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 3 จุด และมีชุดควบคุม คือ เชื้อรา *M. anisopliae* รหัส Ma19 เป็น positive control (ภาพ 9) ทำทั้งหมดจำนวน 3 ซ้ำ โดยเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ในการทดสอบมีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb2
กรรมวิธีที่ 2 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb4
กรรมวิธีที่ 3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb20
กรรมวิธีที่ 4 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* รหัส Bb23
กรรมวิธีที่ 5 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma9
กรรมวิธีที่ 6 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma12
กรรมวิธีที่ 7 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma16
กรรมวิธีที่ 8 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma17
กรรมวิธีที่ 9 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma22
กรรมวิธีที่ 10 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* รหัส Ma28

ทำการวัดขนาดของโคโลนี และขนาดของ clear zone ของเชื้อรา ทุก ๆ วัน เป็นเวลา 7 วัน เพื่อหาอัตราส่วนตามวิธีของ Sridevi and Mallaiah (2008) โดยวัด clear zone ด้วยไม้บรรทัดจากขอบของ clear zone ด้านหนึ่งไปยังขอบของ clear zone ซึ่งอยู่ฝั่งตรงข้าม (X, Y) และให้ทำการวัด 2 ครั้ง แล้วนำค่าทั้ง 2 ครั้ง หารด้วย 2 จะเป็นค่าของเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone ซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิเมตรตั้งฉากกัน และขนาดของโคโลนีทำการวัดขนาดด้วยวิธีเดียวกัน แต่เริ่มวัดจากขอบของเชื้อที่เจริญด้านหนึ่งไปจรดขอบอีกด้านหนึ่ง (X, Y) โดยทำการวัด 2 ครั้ง แล้วนำค่าทั้ง 2 ครั้ง หารด้วย 2 จะเป็นค่าของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิเมตรตั้งฉากกัน ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0 และเปรียบเทียบอัตราส่วนเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey, HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพ 9 การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* รหัส Ma17 บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วย colloidal chitin ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.4 การเตรียม crude enzyme จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

เชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Beauveria* spp. และ *Metarhizium* spp. ในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง (กลุ่ม high efficacy) และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำ (กลุ่ม low efficacy) ที่ใช้ในการควบคุมหนอนใยผัก จำนวน 8 รหัส โดยแยกเป็นกลุ่ม high efficacy จำนวน 4 รหัส ได้แก่ Bb4, Bb23, Ma17 และ Ma16 และกลุ่ม low efficacy จำนวน 4 รหัส ได้แก่ Ma9, Ma12, Ma22 และ Ma28 ที่มีอายุ 7 วัน ถูก subculture ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จำนวน 10 ชิ้น ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว enzyme producing medium (EPM) pH 5.0 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 25 วัน (ภาพ 10)

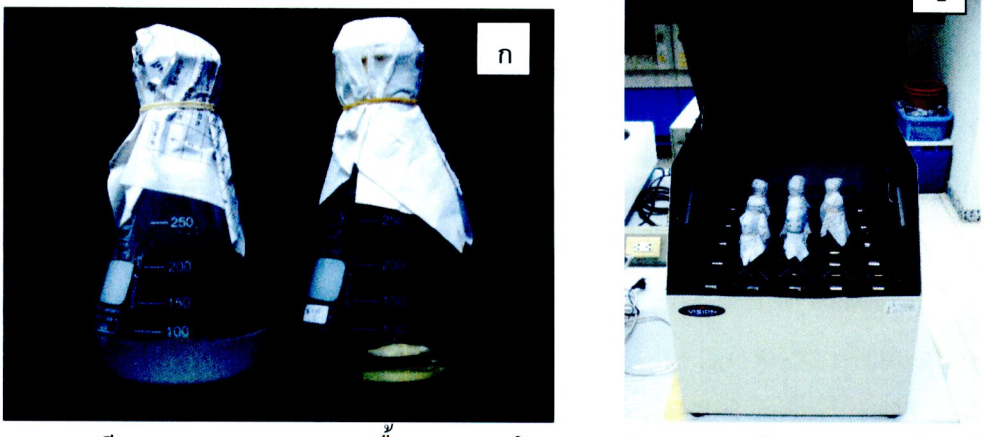
3.4.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (Chitinase activity)

เก็บตัวอย่าง crude enzyme จากขวดรูปชมพู่โดยการดูดสารละลายในอาหารเหลวปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ทุก ๆ 48 ชั่วโมง เป็นเวลา 25 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำส่วนของเหลวใสซึ่งเป็น crude enzyme มาหากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งเป็นการวัดปริมาณน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยไคตินโดยเอนไซม์ไคติเนส (reducing sugar) ด้วยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) ของ Miller (1959) (ภาคผนวก ค) ซึ่งใช้ N-acetylglucosamine (GlcNAc) เป็นตัวมาตรฐาน โดยเอนไซม์ 1 ยูนิต (IU) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคตินไปเป็น N-acetylglucosamine (GlcNAc) 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.4.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Protease activity)

ตัวอย่างของเหลวใสซึ่งเป็น crude enzyme ที่เหลือจากการทดลองที่ 3.4.1 ถูกนำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสโดยการวัดปริมาณโปรตีนที่เกิดจากการย่อยเคซีน (casein) โดยเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีการของ Sundararajan *et al.* (2010) (ภาคผนวก ง) ด้วยวิธี Folin-Lowry ของ Lowry *et al.* (1951) ซึ่งใช้ไทโรซีน (tyrosine) เป็นตัวมาตรฐาน โดยเอนไซม์ 1 ยูนิต (IU) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยเคซีนไปเป็นไทโรซีน 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



ภาพ 10 การเตรียม crude enzyme จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 8 รหัส (ก) ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว enzyme producing medium (EPM) pH 5.0 ปริมาตร 75 มิลลิลิตร (ข) การเขย่าสารละลายด้วยเครื่อง low temperature shaking incubator ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์

เป็นการศึกษาค่าความสัมพันธ์ (r) ของประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์โปรติเอส ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง (high efficacy) และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำ (low efficacy) ดังนี้

1. การเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) กับค่า LT_{50}
2. การเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) กับกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์โปรติเอส
3. การเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) กับกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์โปรติเอส

4. ค่า LT_{50} กับอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนี
5. ค่า LT_{50} กับกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์โปรติเอส

ค่าความสัมพันธ์ (r) จะถูกวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (linear regression) ด้วยโปรแกรม SPSS 16.0

3.6 การศึกษายีนไคติเนส

พิจารณาจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 2 สกุล คือ *Beauveria* spp. และ *Metarhizium* spp. (กลุ่ม high efficacy และกลุ่ม low efficacy) เพื่อคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุลที่ปรากฏความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระยะเวลาที่ทำให้หนอนใยผักตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ (ค่า LT_{50}) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุลที่ปรากฏความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้โปรแกรม SPSS 16.0

การศึกษายีนไคติเนส *chit42* (*chit1*) ซึ่งเป็น endochitinase ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium* spp. จำนวน 6 รหัส โดยแยกเป็นกลุ่ม high efficacy จำนวน 3 รหัส ได้แก่ Ma2, Ma16 และ Ma17 และกลุ่ม low efficacy จำนวน 3 รหัส ได้แก่ Ma9, Ma22 และ Ma28 เพื่อศึกษาความผันแปรของยีนด้วยเทคนิค PCR-SSCP

3.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงบางส่วนจาก Nishiguchi *et al.*, 2002)

1. ขูดตัวอย่างจากผิวหน้าของโคโลนีประมาณ 3-5 กรัม ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปบดให้แตกละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว
2. เติม TE buffer ปริมาตร 570 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง และผสมให้เข้ากัน
3. เติม SDS (sodium dodecyl sulfate) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม proteinase K (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
4. นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. เติม 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน
6. เติม CTAB/NaCl ปริมาตร 80 ไมโครลิตร
7. นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และตรวจสอบลักษณะของแถบดีเอ็นเอบน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วย้อมชิ้นดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide และนำไปส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลต

3.6.3 การออกแบบไพรเมอร์

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *chit42* (*chit1*) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *M. anisopliae* ทั้ง genomic DNA (accession number AF027498) มีความยาว 2,174 คู่เบส และ complementary DNA (accession number AF027497) มีความยาว 1,826 คู่เบส จากฐานข้อมูล GenBank ถูกนำมา blast ด้วยโปรแกรม DNAMAN 4.0 โดยจะแสดงส่วนที่เป็น exon (coding) และ intron (non-coding) แล้วนำข้อมูลดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer Premier 5.0 เพื่อใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการของยีน *chit42* (*chit1*) ให้มีขนาด 200-350 คู่เบส โดยให้ครอบคลุมส่วนที่เป็น exon ทั้งหมด ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตาราง 5

ตาราง 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการในยีน *chit42* (*chit1*)

ชื่อไพรเมอร์	ขนาด (bp)	ลำดับเบส	อุณหภูมิ*
chit42-1	324	Forward: 5'-CCA CAT TCC TTC GAG GTA GT -3'	60
		Reverse: 5'-ACA AGA TGG ACC GGG AAG AA-3'	60
chit42-2	239	Forward: 5'-GAT ACT AAC CAG TAG ACA GG -3'	58
		Reverse: 5'-TAC AGT CAT TTG GGT AGT GC -3'	58
chit42-3	219	Forward: 5'-CTT GGA ATG ATG TCG GTA CA -3'	58
		Reverse: 5'-AAT CGA CGT CAA TGC CAT CA -3'	58
chit42-4	309	Forward: 5'-TCG AAG CAA CTT TGC GAA GT -3'	58
		Reverse: 5'-CTG GAG TTG CTC CAT GAA C -3'	58
chit42-5	274	Forward: 5'-GTT TGC TCA GGG ATA CCA TT -3'	58
		Reverse: 5'-TGG CAA TGC CAA GAC GAT C -3'	58
chit42-6	242	Forward: 5'-CAA CAC GGA TCA TGC TGT C -3'	58
		Reverse: 5'-CAG AGG GAT CGT AGC TGT A -3'	58
chit42-7	277	Forward: 5'-ACG GTG ACA AAG GGT ACT AC -3'	60
		Reverse: 5'-GCT GGC TAG AAC TAA GCC AT -3'	60

*T_m ในการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอ (annealing) หน่วยเป็น องศาเซลเซียส

8. เติม chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายในหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน
9. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที
10. ดูดเฉพาะส่วนใสมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ และเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (24: 24: 1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายในหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน
11. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที
12. ดูดเฉพาะส่วนใสมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ และทำซ้ำข้อ 8 อีกรอบหนึ่ง โดยการเติม chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายในหลอด แล้วเขย่าให้เข้ากัน
13. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที
14. ดูดเฉพาะส่วนใสมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรอันใหม่ และเติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของสารละลายในหลอด แล้วเขย่าเบา ๆ
15. นำตัวอย่างไปไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที
16. เท isopropanol ทิ้ง และเติมเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที
17. เทเอทานอลทิ้ง และตากให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง
18. ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วด้วย TE buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6.2 การตรวจสอบคุณภาพ และวัดปริมาณของดีเอ็นอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยวัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) เพื่อประเมินคุณภาพจากอัตราส่วนระหว่าง A_{260} และ A_{280} โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์จะมีค่าประมาณ 1.8-2.0 สำหรับปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอจะถูกวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยวัดค่า

3.6.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium* spp. จำนวน 6 รหัส โดยแยกเป็นกลุ่ม high efficacy จำนวน 3 รหัส ได้แก่ Ma2, Ma16 และ Ma17 และกลุ่ม low efficacy จำนวน 3 รหัส ได้แก่ Ma9, Ma22 และ Ma28 ถูกใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *chit42* (*chit1*) ในบริเวณที่ต้องการ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ตามตาราง 5 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

Template DNA (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	1.00	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2.00	ไมโครลิตร
chit42-forward primer (10 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.40	ไมโครลิตร
chit42-reverse primer (10 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.40	ไมโครลิตร
dNTP (2.5 มิลลิโมล)	0.50	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25 มิลลิโมล)	1.20	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	0.10	ไมโครลิตร
dH_2O	14.40	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด	20.00	ไมโครลิตร

โปรแกรมที่ใช้ในการควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงของปฏิกิริยา PCR มีดังต่อไปนี้

รอบที่ 1	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	4 นาที	
รอบที่ 2	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	35 รอบ
	Annealing	56-60.6 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
	Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
รอบที่ 3	Final extention	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

นำผลิตผลของ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis เพื่อใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอบน polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดความยาวที่แน่นอน (DNA marker) แล้วย้อมด้วยวิธี silver staining (ภาคผนวก ข)

3.6.5 การตรวจสอบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *chit42* (*chit1*) ด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP)

ผลผลิต PCR ของยีน *chit42* (*chit1*) ทั้ง 7 คู่ไพรเมอร์ จากการทดลองที่ 3.6.3 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ SSCP loading buffer ปริมาตร 8 ไมโครลิตร และนำไป denature ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อรักษาสภาพการเป็นสายเดี่ยว (single-stranded) ของดีเอ็นเอ จากนั้นนำส่วนผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบการ

เคลื่อนที่ของดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis เพื่อใช้กระแสไฟฟ้าแยกดีเอ็นเอบน non-denaturing gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ 200 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วย้อมสีด้วยวิธี silver staining (ภาคผนวก ข)