การสำรวจ รวบรวม และแยกเชื้อ *Metarhizium* spp. จากดินและแมลงในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แยกจากตัวอย่างดิน จำนวน 17 จังหวัด โดยการใช้ baiting technique ซึ่งใช้หนอนนก (yellow mealworm; *Tenebrio molitor*) เป็นเหยื่อล่อ ได้เชื้อราจำนวน 82 ไอโซเลต จาก 13 จังหวัด คือ ขอนแก่น 7 ไอโซเลต, ชัยภูมิ 4 ไอโซเลต, นครราชสีมา 15 ไอโซเลต, บุรีรัมย์ 6 ไอโซเลต, มหาสารคาม 1 ไอโซเลต, ยโสธร 2 ไอโซเลต, ร้อยเอ็ด 9 ไอโซเลต, เลย 9 ไอโซเลต, ศรีสะเกษ 5 ไอโซเลต, สุรินทร์ 9 ไอโซเลต, หนองคาย 4 ไอโซเลต, อุบลราชธานี 8 ไอโซเลต และอำนาจเจริญ 3 ไอโซเลต ส่วนการแยกเชื้อจากตัวอย่างแมลง (ด้วงดำ; *Heteronychus* spp.) โดยตรงนั้น รวบรวมได้จากจังหวัดร้อยเอ็ด จำนวน 3 ไอโซเลต รวมแยกหาเชื้อ *Metarhizium* spp. ได้จำนวน 85 ไอโซเลต เมื่อนำเชื้อทุกไอโซเลตมาแบ่งกลุ่มตามขนาดโคนิเดียสามารถจัดได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มโคนิเดียขนาดเล็ก (43 ไอโซเลต) ขนาดกลาง (29 ไอโซเลต) และขนาดใหญ่ (13 ไอโซเลต)

เชื้อ *Metarhizium* spp. ที่แยกได้ทุกไอโซเลตเมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ protease, chitinase และ lipase โดยตรวจสอบแบบกึ่งเชิงปริมาณ ด้วยการใช้อาหารแข็ง พบว่าค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีต่อเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสในการสร้างเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด มีค่าอยู่ระหว่าง 0.267-1.000 (ไม่ตรวจพบวงใส), 0.427-1.000 และ 0.586-0.932 ตามลำดับ โดยไอโซเลต IPKKU 239 สร้างเอนไซม์ protease ได้สูงสุด แต่มีจำนวน 15 ไอโซเลต ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ protease ได้ สำหรับการสร้างเอนไซม์ chitinase ไอโซเลต IPKKU 241 สร้างได้สูงสุด แต่มีเพียง 6 ไอโซเลต ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ได้ อย่างไรก็ตามทุกไอโซเลตของเชื้อรานี้สามารถสร้างเอนไซม์ lipase โดยที่ไอโซเลต IPKKU 224 และ IPKKU 165 สร้างเอนไซม์ lipase ได้สูงสุดและต่ำสุดตามลำดับ เมื่อนำเชื้อตัวแทนไอโซเลตจำนวน 18 ไอโซเลต ซึ่งได้จากการแบ่งกลุ่มตามขนาดโคนิเดีย ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ และสถานที่

เก็บตัวอย่าง มาเปรียบเทียบการผลิตมวลชีวภาพ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด คือ fungus agar (FA), Sabouraud dextrose agar ที่เติม yeast extract (SDAY), Sabouraud dextrose agar (SDA), yeast malt extract (YM) และ potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 28±0.5 องศาเซลเซียส พบว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของทุกไอโซเลตที่อายุ 14 วัน มีค่าเท่ากับ 49.92, 49.34, 47.20, 45.19 และ 45.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งไอโซเลต IPKKU 207, IPKKU 189 และ IPKKU 180 สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าไอโซเลตอื่นๆ ในอาหารทุกชนิด โดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 54.37, 53.64 และ 53.37 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนในเมล็ดธัญพืช (ข้าวฟ่าง) เชื้อ *Metarhizium* spp. สามารถสร้างโคนิเดียได้โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง $4.20x10^{7}$-$5.37x10^{8}$ โคนิเดียต่อกรัม หลังจากบ่มเชื้อนาน 15 วัน โดยไอโซเลต IPKKU 246 สามารถสร้างโคนิเดียได้สูงสุด สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายหนอนนกของเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยวิธีจุ่มหนอนนกลงในสารแขวนลอยโคนิเดียที่ความเข้มข้น $1x10^{8}$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียสนั้น พบว่าทุกไอโซเลตให้เปอร์เซ็นต์การตายอยู่ระหว่าง 36.67-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05) และเชื้อจำนวน 6 ไอโซเลต สามารถทำให้หนอนนกตายได้สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการบ่งชี้ชนิดเชื้อ *Metarhizium* spp. จากตัวแทนไอโซเลตจำนวน 18 ไอโซเลตนี้ โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA และใช้ไพรเมอร์ TW81 และ AB28 พบว่าขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ซึ่งเมื่อนำไปบ่งชี้ชนิดจากฐานข้อมูลของ GenBank แสดงให้เห็นว่า เชื้อที่จำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเชื้อ *Metarhizium* spp. นั้น มีลำดับเบสคล้ายกับเชื้อ *Metarhizium anisopliae* โดยมีค่าความเหมือนอยู่ระหว่าง 88-99 เปอร์เซ็นต์ และเท่าที่มีการค้นพบในปัจจุบัน พบว่า เชื้อ *Metarhizium* sp. IPKKU 247 ที่แยกจากด้วงดำศัตรูชนิดใหม่ของข้าวนั้นบ่งชี้ชนิดได้เป็นเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* จึงจัดเป็นการรายงานครั้งแรกในประเทศไทย ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยนำข้อมูลลำดับเบสมาสร้าง phylogenetic tree จากการวิเคราะห์แบบ Neighbor-joining พบว่าเชื้อ *M. anisopliae* มีการกระจายตัวไปตาม clade ต่างๆ โดย *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* อยู่ในกลุ่มเดียวกัน แยกออกจากเชื้อ *M. flavoviride* var. *flavoviride* และ *M. album* อย่างชัดเจน การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคทางชีวโมเลกุลนั้นให้ความรวดเร็ว แม่นยำ และชัดเจนในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อราสกุล *Metarhizium*

Survey, collection and isolation of the entomopathogenic fungus; *Metarhizium* spp. from soil and insect host of 17 provinces in the northeast were carried out. Entomopathogenic fungi were isolated by baiting technique using yellow mealworm larvae, *Tenebrio molitor*, as bait. There were 82 isolates of *Metarhizium* spp. found from 13 provinces; Khon Kaen 7 isolates, Chaiyaphum 4 isolates, Nakhon Ratchasima 15 isolates, Buri Ram 6 isolates, Maha Sarakham 1 isolate, Yasothon 2 isolates, Roi Et 9 isolates, Loei 9 isolates, Si Sa Ket 5 isolates, Surin 9 isolates, Nongkhai 4 isolates, Ubon Ratchathani 8 isolates and Amnat Charoen 3 isolates. There were 3 isolates found from Roi Et province, which infecting insect (black beetle; *Heteronychus* spp.). These isolates were isolated from infected beetle. Including with these isolates, there were 85 isolates in total for this study. By using conidia size as a criterion, *Metarhizium* spp. were divided into three groups; small conidia group (43 isolates), medium conidia group (29 isolates) and large conidia group (13 isolates).

All isolates of *Metarhizium* spp. were evaluated qualitatively on the extracellular enzyme production using solid media. The activity of three enzymes were expressed as the ratio of colony diameter per halo diameter. Extracellular protease, chitinase and lipase activities varied between 0.267-1.000 (no detectable halo), 0.427-1.000 and 0.586-0.932, respectively. The isolate IPKKU 239 had the highest proteolytic activity but 15 isolates had no detectable protease. For chitinolytic activity, isolate IPKKU 241 had the highest activity only 6 isolates could not be detected. However, all isolates of these fungi produced lipase, the highest and the lowest activity were gained from isolates IPKKU 224 and IPKKU 165, respectively. Studies on mass production of 18 representative isolates were undertaken, each isolate was selected for growth evaluation based on

conidia size, extracellular enzyme production and geographical origins on synthetic media, fungus agar (FA), Sabouraud dextrose agar with yeast extract (SDAY), Sabouraud dextrose agar (SDA), yeast malt extract (YM) and potato dextrose agar (PDA) at 14 days. Showed the diameter of colony were 49.92, 49.34, 47.20, 45.19 and 45.04 millimeter, respectively. The isolate IPKKU 207, IPKKU 189 and IPKKU 180, the mycelia grew very well on all media tested, the diameters of colony were 54.37, 53.64 and 53.37 millimeter, respectively. Mass production of conidia on sterilized sorghum grains showed the sporulation after 15 days of inoculation varied between $4.20x10^7$ and $5.37x10^8$ conidia per gram. Bioassay infection ability on yellow mealworm larvae, was also undertaken by immersion the mealworm in a *Metarhizium* conidia suspension at a concentration of $1x10^8$ conidia per milliliter under laboratory conditions. Larvae cumulative mortality rates ranged from 36.67 up to 100 percentage which were significantly different (P=0.05), compared with the control treatment.

Identification of 18 representative isolates of *Metarhizium* spp., based on analysis of ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence data was performed using primers TW81 and AB28. The PCR amplification of these regions yielded a unique fragment of approximately 600 base pairs for each isolates. Comparison the sequence (ITS1-5.8S-ITS2 rDNA regions) of each isolates with GenBank database revealed that *Metarhizium* spp. (based on morphological identification) were mostly similar to *Metarhizium anisopliae* with 88 to 99 percentage identity. From these results, the isolate *Metarhizium* sp. IPKKU 247 of this study was identified as *M. anisopliae* var. *anisopliae*. To the recent knowledge, this is the first report in Thailand on the occurence of *M. anisopliae* var. *anisopliae* on black beetle, *Heteronychus* sp., an insect pest of rice. The ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence data of 24 unique sequences were analyzed by Neighbor-joining method. The data support the majority of the *Metarhizium* group. Three species were recognized; *M. anisopliae*, *M. flavoviride* and *M. album*. The *M. anisopliae* and *M. flavoviride* / *M. album* represent two separate lines within *Metarhizium*. Two correspond with *M. anisopliae* var. *anisopliae* and *M. anisopliae* var. *majus*. The results of this study suggests that the molecular technique allows rapid and precise identification of *Metarhizium*.