

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. เชื้อ *Metarhizium* spp.

1.1 ประวัติการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

การค้นพบเชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีมากกว่า 2,000 ปี โดยพบเชื้อราสกุล (genus) *Cordyceps* ที่ทำให้เกิดโรคกับหนอนผีเสื้อ ตลอดจนเรื่องราวของการนำโครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ (fruiting body) ของเชื้อ *C. sinensis* มาเป็นอาหารหรือยารักษาโรค แม้กระทั่งปัจจุบันก็ยังคงมีการใช้อยู่ และในบรรดาเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงเชื้อ *Cordyceps* ถูกตีพิมพ์เป็นครั้งแรกโดย Reaumur ในปี ค.ศ. 1726 (Boucias and Pendland, 1998) และในช่วงศตวรรษนี้ยังได้มีการพบเชื้อราที่เข้าทำลายแมลงวันได้หลายชนิด (species) ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราในอันดับ (order) Entomophthorales โดยการเกิดโรคในสมัยนั้นเข้าใจว่าแมลงเกิดโรคเองตามทฤษฎี spontaneous generation (Samson et al., 1988) ต่อมามีการค้นพบ germ theory โดย Agostino Bassi ชาวอิตาลี ในปี ค.ศ. 1834 ได้ตีพิมพ์ผลงานชื่อ Del Mal del Segno, Calcinaccio o Moscardino โดยมีตัวอย่างจากการเกิดโรคมัสคาตินสีขาว (white muscardine) ของหนอนไหม ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Beauveria bassiana* และเชื้อชนิดนี้เคยถูกรายงานการค้นพบไว้ประมาณปี ค.ศ. 900 ว่าทำให้เกิดโรคกับหนอนไหมที่ประเทศญี่ปุ่น ต่อมาได้มีการศึกษาพิสูจน์สาเหตุการเกิดโรคขึ้นอย่างเป็นระบบ โดย Koch จนได้ตั้ง Koch's postulate และได้มีการค้นพบเชื้อ *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin โดย Elias Metschnikoff ในปี ค.ศ. 1878 ซึ่งในตอนแรกให้ชื่อว่า *Entomophthora anisopliae* (*Isaria destructor*) หรือโรคมัสคาตินสีเขียว (green muscardine) (Zimmermann, 1992; Boucias and Pendland, 1998) ซึ่งชื่อเดิมของโรคมัสคาติน คือ moscardino มาจากภาษาอิตาเลียน แปลว่าลูกกวาดรสผลไม้ เนื่องจากแมลงที่ตายด้วยเชื้อราจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นมัมมี่ (white mummified) ซึ่งเหมือนกับลูกกวาดรสผลไม้หรือขนมหวานชนิดหนึ่งของชาวอิตาลีที่ชื่อว่า calcino (Krishnaswami et al., 1973) ภายหลังได้เป็นจุดนำไปสู่การศึกษาเพื่อควบคุมแมลงโดยชีววิธี และในช่วงศตวรรษที่ 19-20 ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราที่เข้าทำลายแมลงอีกมากมายทั้งในด้านอนุกรมวิธาน จึงมีการจัดทำคู่มือและภาพประกอบการจัดจำแนกเชื้อราที่ทำลายสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ดังเช่นผลงานของ Cooke ปี 1892, Kobayasi และ Shimizu ปี 1983, Samson และคณะ ปี 1988, Shimizu ปี 1994 และ Sung ปี 1996 (Hywel-Jones, 2001) รวมทั้งยังมีการค้นพบเชื้อราชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด

1.2 เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง

1.2.1 เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของแมลง

โรคของแมลงที่เกิดจากเชื้อรานี้มีมากมายหลายชนิด ซึ่งการจัดกลุ่มเชื้อราที่พบว่าเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกับแมลงในอดีตจัดแบ่งเป็น 4 ชั้น (class) ดังนี้ Phycomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes และ Deuteromycetes (fungi imperfecti หรือ imperfect fungi) ต่อมา มีการจัดกลุ่มเชื้อราใหม่ โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA; rDNA) มาเป็นองค์ประกอบหนึ่งของการจัดกลุ่ม ซึ่งจัดเชื้อราอยู่ใน 3 อาณาจักร (kingdom) คือ Fungi, Straminopila และ Protocista โดยเชื้อราชั้นสูงที่ทำลายแมลงส่วนใหญ่อยู่ในอาณาจักร Fungi (ศิริชัย, 2546) สำหรับเชื้อราสาเหตุโรคแมลงนั้นสามารถจัดกลุ่มได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มเชื้อราและตัวอย่างชื่อสกุลของเชื้อราที่สามารถเข้าทำลายแมลง

อาณาจักร	ไฟลัม	ชั้น	อันดับ	สกุล
Fungi	Chytridiomycota	Chytridiomycetes	Chytridiales	<i>Coelomycidium</i>
				<i>Myiophagus</i>
			Blastocladales	<i>Coelomomyces</i>
			Mucorales	<i>Sporodiniella</i>
	Zygomycota	Zygomycetes	Entomophthorales	<i>Entomophaga</i>
				<i>Entomophthora</i>
				<i>Massospora</i>
	Ascomycota	Saccharomycetes	Saccharomycetales	<i>Metschnikowia</i>
				<i>Saccharomyces</i>
		Plectomycetes	Ascosphaerales	<i>Ascosphaera</i>
		Pyrenomycetes	Hypocreales	<i>Cordyceps</i>
				<i>Hypocrella</i>
		Laboulbeniomycetes	Laboulbeniales	<i>Filarimyces</i>
		Loculoascomycetes	Myriangiales	<i>Myriangium</i>
			Pleosporales	<i>Podonectria</i>
	Deuteromycetes (Asexual ascomycetes)			<i>Akanthomyces</i>
				<i>Aschersonia</i>
				<i>Aspergillus</i>
				<i>Beauveria</i>

ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มเชื้อราและตัวอย่างชื่อสกุลของเชื้อราที่สามารถเข้าทำลายแมลง (ต่อ)

อาณาจักร	ไฟลัม	ชั้น	อันดับ	สกุล
				<i>Fusarium</i>
				<i>Gibellula</i>
				<i>Hirsutella</i>
				<i>Hymenostillbe</i>
				<i>Metarhizium</i>
				<i>Nomuraea</i>
				<i>Paecilomyces</i>
				<i>Verticillium</i>
			Mycelia sterilia	<i>Aegerita</i>
	Basidiomycota	Phragmobasidiomycetes	Septobasidiales	<i>Septobasidium</i>
Straminopila	Oomycota	Oomycetes	Lageniales	<i>Lagenidium</i>
			Saprolegniales	<i>Leptolegnia</i>
				<i>Couchia</i>

ที่มา: คัดแปลงมาจาก ศิวิลัย (2546)

1.2.2 การทำให้เกิดโรคของแมลงจากเชื้อรา

การเข้าทำลายแมลงของเชื้อรานั้นมีขั้นตอนที่คล้ายกันในเชื้อราแต่ละชนิดโดยสรุปได้ดังนี้ คือ เริ่มจากที่สปอร์ สัมผัสที่ผนังลำตัวของแมลง ซึ่งสปอร์ของเชื้อราเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรค การเข้าทำลายของเชื้อราผ่านระบบหายใจและระบบอาหารพบน้อยมาก โดยเชื้อราจะสร้างเส้นใยสั้นๆ (germ tube หรือ injection peg) เมื่อมีความชื้นที่เหมาะสม เพื่อเจริญแทงทะลุผนังลำตัวแมลงเข้าไปภายใน ที่ส่วนปลายนี้มีเอนไซม์ protease, aminopeptidase, lipase, esterase และ chitinase เอนไซม์ protease เป็นเอนไซม์หลักที่ย่อยชั้นผนังลำตัวของแมลง โดยช่วยย่อยสลายส่วนของเนื้อเยื่อ epidermis ทำให้เส้นใยสั้นๆ สามารถแทงทะลุผ่านเข้าไปถึง basement membrane และแทงทะลุต่อผ่านเข้าไปในช่องว่างภายในลำตัวของแมลงได้ เมื่อเชื้อราเข้าไปในตัวแมลงแล้วจะสร้างเส้นใย (mycelium) มากมาย เชื้อราบางชนิดสร้างเส้นใยและจะหักออกเป็นท่อนเล็กๆ เรียกว่า hyphal body แผ่กระจายไปทั่วตัวแมลง เบียดบังทำลายอวัยวะและระบบกลไกต่างๆ ในตัวแมลง ถ้าอุณหภูมิและความชื้นไม่เหมาะสม hyphal body จะเริ่มสร้างผนังหนาล้อมรอบตัวเองเปลี่ยนเป็นสปอร์ที่พักตัว (chlamydospore) ซึ่งสามารถอยู่ในระยะพักตัวนี้ได้เป็น

ระยะเวลานาน ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสม เชื้อราจะเจริญสร้างเส้นใยภายในตัวแมลงจนเต็ม โดยที่เชื้อราบางชนิด อาจสร้างสารพิษ (toxin หรือ secondary metabolite) ทำลายเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ ของแมลงด้วย เช่น *M. anisopliae* สร้างสารพิษชื่อ destruxin A และ B เชื้อ *B. bassiana* สร้างสารพิษ beauvericin เป็นต้น ทำให้แมลงตายอย่างรวดเร็ว เมื่อเชื้อสร้างเส้นใยจนเต็มตัวแมลง แมลงเกิดอาการป่วยและนิ่งอยู่กับที่ ต่อจากนั้นเชื้อราจะเจริญแทงผ่านผนังลำตัวแมลงออกมาภายนอกอีกครั้ง เพื่อสร้างเส้นใยสืบพันธุ์ (conidiophore) ซึ่งอาจเป็นสายเดี่ยวหรือแตกแขนงชูขึ้นมาสู่อากาศ ที่ปลายของเส้นใยสืบพันธุ์จะโป่งออกมีผนังกันและแยกตัวออกมาเป็นสปอร์ไว้เพื่อขยายพันธุ์ต่อไป แมลงที่ตายด้วยเชื่อนั้น ตัวมักจะแห้งแข็ง มีเส้นใยและสปอร์ปกคลุมทั่วตัว เรียกลักษณะนี้ว่ามัมมี สปอร์ที่ปกคลุมบนตัวแมลงนี้ จะเป็นส่วนที่ช่วยแพร่กระจายเชื้อต่อไป (ทิพย์วดี, 2535; สมศักดิ์, 2544; ศิวิลัย, 2546)

1.2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรค

เชื้อราที่พบในแมลงมีมากมายหลายชนิด และมีความสัมพันธ์กับแมลงในลักษณะต่างๆ การที่เชื้อราสามารถทำให้เกิดโรครุนแรงมากน้อยกับแมลงนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยดังต่อไปนี้ (มลิวัลย์, 2534; Goettel et al., 2000; Butt et al., 2001; ศิวิลัย, 2546)

1) เชื้อรา ความสามารถในการเข้าทำลาย และความรุนแรงของการเกิดโรคของแมลงจากเชื่อนั้น พบว่าเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดโรคต้องมีความรุนแรง แต่ความรุนแรงของเชื้อราจะแตกต่างกันในแต่ละชนิดและสายพันธุ์ (strain) นอกจากนั้นยังมีความเฉพาะเจาะจงกับแมลงต่างชนิดกัน เชื้อราบางชนิดสร้างสารพิษที่มีฤทธิ์รุนแรงฆ่าแมลงได้อย่างรวดเร็ว บางชนิดเพียงเข้าไปเจริญแย่งแร่ธาตุอาหารภายในตัวแมลง เพื่อคงชีวิตของเชื้อรา ซึ่งเชื้อราบางชนิดมีชีวิตรอดนานในรูปของสปอร์ที่พักตัว (resting spore) อยู่ได้ทั้งภายในและภายนอกตัวแมลงอาศัย สำหรับปริมาณเชื้อราจำนวนที่แน่นอนในการก่อให้เกิดโรคนั้นไม่เป็นที่ทราบ แต่ต้องมีมากเพียงพอในระดับหนึ่ง

2) แมลงอาศัย โดยปกติแล้ว การระบาดของโรคขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประชากรแมลงชนิดไม่สมบูรณ์ (imperfect density dependence) และแมลงอาศัยมีความอ่อนแอต่อโรคซึ่งแตกต่างกันในด้านพันธุกรรม วัย ลักษณะทางสรีระและสัณฐานวิทยา เป็นต้น รวมทั้งตำแหน่งและวิธีการเข้าสู่ตัวแมลง โดยทั่วไปเชื้อราเข้าสู่ตัวแมลงโดยผ่านเข้าทางผนังลำตัว นอกจากนี้ยังเข้าสู่ตัวแมลงได้ทางท่อหายใจ ซึ่งมักพบในแมลงที่มีรูหายใจข้างลำตัวมีขนาดใหญ่จึงเป็นทางให้เชื้อราเข้าไปได้ดี เช่น ตั๊กแตน หรือแมลงอาศัยที่มีบาดแผลซึ่งอาจเกิดจากการกัดกินกันเอง หรือที่ถูกแตนเบียนวางไข่ก็ได้

3) **สิ่งแวดล้อม** การระบาดของโรคอันเกิดจากเชื้อราขึ้นขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมมาก ที่สำคัญได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง ซึ่งเชื้อราสามารถทนอุณหภูมิได้ระหว่าง 0-40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ และต่อการทำให้ติดโรค โดยทั่วไปอยู่ที่ประมาณ 20-30 องศาเซลเซียส เช่น เชื้อ *M. anisopliae* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญเติบโตถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส และขณะที่เชื้อราเจริญออกจากผนังลำตัวแมลงเพื่อสร้างสปอร์ หรือเมื่อสปอร์จะงอกนั้นมีความต้องการความชื้นในบรรยากาศสูงมาก (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) สำหรับแสงสว่างนั้นมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อม คือ แสงอัลตราไวโอเลต (UV) มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อรา เพราะแสงอัลตราไวโอเลตมีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ ในทางอ้อมแสงแดดทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นและความชื้นลดต่ำลง สำหรับกระแสน้ำนั้นมีส่วนช่วยในการแพร่กระจายเชื้ออย่างยิ่ง

1.3 การนำเชื้อราที่ทำลายแมลงไปใช้ประโยชน์

1.3.1 ด้านการแพทย์และเภสัช

ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราและแมลงที่ให้ผลผลิตจนเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลาย ในการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และเภสัชนั้น แม้ว่าจะมีเพียงเชื้อราไม่กี่ชนิดที่ได้นำมาใช้เป็นยารักษาโรคหรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพก็ตาม แต่ก็พบว่ามีเชื้อราที่น่าสนใจคือ เชื้อ *Cordyceps* ซึ่งเชื้อนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อเป็นยาบำรุงและมีหลักฐานว่าชาวจีนใช้สมุนไพรจากราชนิดนี้มาเป็นเวลากว่า 2,000 ปีแล้ว (Hywel-Jones, 2001) ชาวจีนเรียกเชื้อ *C. sinensis* ที่เจริญบนหนอนผีเสื้อในท่งหญ้า (sphinx moth; *Hepialus armoricanus*) ที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลมากกว่า 10,000 ฟุต นี้ว่า “dong chong xia cao” ซึ่งมีความหมายว่า “หนอนฤดูหนาว-หญ้าฤดูร้อน” หรือที่เรียกเป็นภาษาจีนแต้จิ๋วว่า “ถั่งเช่า” พบในเขตภูเขาสูงในประเทศจีน ทิเบต เนปาล และภูฐาน โดยเชื้อเจริญสร้างเส้นใยอยู่ในตัวหนอนจนเต็ม และเมื่อหนอนผีเสื้อตาย เชื้อราจะผลิตโครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ ส่วนใหญ่ได้มีการนำเชื้อราชนิดนี้มาใส่ในเป็ด แล้วนำเป็ดไปต้มในน้ำร้อนหรือตุ๋นให้คนป่วยกินน้ำซุป โดยเชื่อกันว่าเชื้อราชนิดนี้เป็นยารักษาโรค ส่วนใหญ่ใช้เป็นยาบำรุงร่างกาย ช่วยเพิ่มความแข็งแรง ลดความเครียด ในการออกฤทธิ์ทางการแพทย์เชื้อ *C. sinensis* จะเสริมสร้างภูมิคุ้มกันในร่างกาย ลดคอเรสเตอรอลในเลือด ช่วยให้การหายใจดีขึ้นคือการทำงานของหัวใจ การไหลเวียนโลหิต ดับ ไข้ ระบบสืบพันธุ์ รวมทั้งต่อต้านมะเร็งด้วย (ศิริชัย, 2546) เชื้อ *C. sinensis* มีสารออกฤทธิ์ทางยา คือ cordycepic acid ($C_7H_{12}O_6$) และยังพบสาร cordycepin ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะและมีพิษต่อแมลง ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสังเคราะห์ อาร์เอ็นเอ (RNA) นอกจากนี้ยังพบสารกลุ่ม adenosine-type (hydroxy ethyl adenosine analog)

ในอเมริกาใช้บำบัดผู้ป่วยโรคเอดส์ และผลิตในรูปการค้าชื่อ “Didanosine®” (Holliday et al., 2003) และยังมีการศึกษาวิจัยเชื้อราในสกุล *Cordyceps* อีกชนิดหนึ่งคือ *C. militaris* ที่มีกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางทั้งที่ อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ ยุโรป และเอเชีย เพื่อนำมาผลิตเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในมนุษย์ เนื่องจากเชื้อ *C. militaris* นั้นสามารถสร้างโครงสร้างส่วนขยายพันธุ์ได้ง่าย จึงได้มีการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราชนิดนี้ และพบว่า *C. militaris* สร้างสารคล้ายกับ *C. sinensis* คือ cordycepin และสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ ซึ่งให้ชื่อว่า “militarin” ทั้งสองสารนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งชนิด leukemia และ prostate carcinoma ในระดับห้องปฏิบัติการ ทั้งสองสารนี้จึงมีศักยภาพที่จะนำมาใช้บำบัดโรคมะเร็ง (ศิริชัย, 2546) สำหรับเชื้อราอื่นๆ นั้น ยอดहतัย และคณะ (2544) ได้รายงาน bahwa เชื้อ *Aschersonia tubulata* สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรคซึ่งเป็นสารในกลุ่ม triterpenoid แต่ออกฤทธิ์ระดับปานกลาง ส่วนเชื้อ *C. unilateralis* ก็ผลิตสารที่ออกฤทธิ์ในระดับปานกลางเช่นกัน แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อมาเลเรียโดยที่สารดังกล่าวเป็นสารพวก naphthoquinone นอกจากนี้ยังรายงาน bahwa เชื้อ *Paecilomyces tenuipes* ผลิตสารพวก cyclodepsipeptide ได้ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อมาเลเรียและวัณโรคได้ในระดับปานกลาง

1.3.2 ด้านการเกษตรและบ้านเรือน

ในสภาพธรรมชาติเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทำหน้าที่ควบคุมปริมาณของแมลงให้อยู่ในสภาพที่สมดุล ดังนั้นจึงมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยเพื่อหาเชื้อราที่สามารถทำให้เกิดโรคกับแมลงที่มีประสิทธิภาพและคุณสมบัติที่เหมาะสมมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอีกทั้งแมลงศัตรูในบ้านเรือนโดยชีววิธี ซึ่งมีมากมายหลายชนิดในเกือบทุกชั้นของเชื้อราดังที่กล่าวมาแล้ว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับแมลงอาศัยว่ามีความเฉพาะเจาะจงและความรุนแรงแตกต่างกันไป โดยพบว่าเชื้อราบางชนิดมีความเฉพาะเจาะจงกับแมลงอาศัย แต่เชื้อราบางชนิดมีแมลงอาศัยในขอบเขตที่กว้างขวางมาก เช่น เชื้อ *M. anisopliae* มีรายงานว่ามีความจำเพาะมากกว่า 200 ชนิด ที่ติดโรคจากเชื้อราชนิดนี้ และเชื้อ *M. anisopliae* ในชนิดเดียวกัน แต่มีเพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถทำให้เกิดโรคแก่ด้วงแรดมะพร้าวได้ เป็นต้น (พิมลพร, 2545)

แมลงอาศัยที่พบเชื้อราเข้าทำลายเป็นประจำ (ภาพที่ 1) เช่น แมลงในอันดับต่างๆ ดังนี้ Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Homoptera, Hymenoptera, Isoptera, Lepidoptera และ Orthoptera ซึ่งเชื้อราที่มีความสำคัญ เช่น (Rombach et al., 1994; Evans, 1999; สมศักดิ์, 2544; Inglis et al., 2001; Wraight et al., 2001; พิมลพร, 2545)

Aschersonia aleyrodis ใช้ในการควบคุมกำจัดเพลี้ยหอย และแมลงหวี่ขาว

Beauveria bassiana ใช้ในการควบคุมกำจัดแมลงศัตรู เช่น European corn borer, colorado potato beetle, coffee-berry, แมลงหีข้าว, เพลี้ยไฟ, เพลี้ยอ่อน, ตั๊กแตน, หนอนใยผัก และ หนอนเจาะสมอฝ้าย เป็นต้น

Entomophaga grylli (*Entomophthora grylli*) ใช้ในการควบคุมกำจัดตั๊กแตน

Entomophthora muscae ใช้ในการควบคุมกำจัดแมลงวันบ้าน

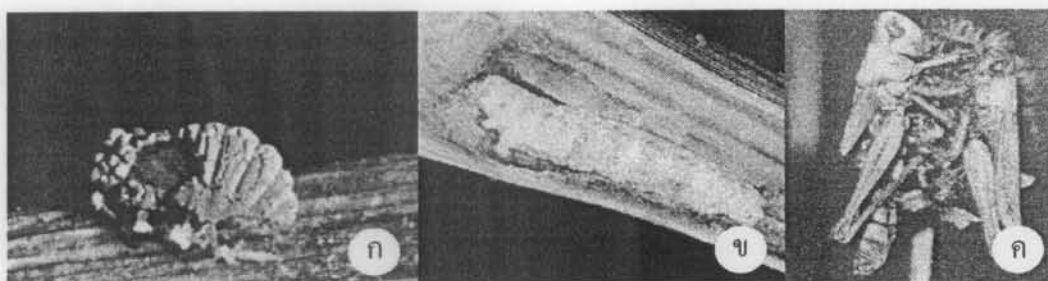
Hirsutella thompsonii ใช้ในการควบคุมกำจัดไรสีม

Lageridium giganteum ใช้ในการควบคุมกำจัดยุง

Metarhizium spp. ใช้ในการควบคุมกำจัดแมลงศัตรู เช่น หนอนด้วงแรดมะพร้าว หนอนด้วงหนวดยาวกินเหง้าอ้อย หนอนใยผัก ตั๊กแตน มวนโกโก้ แมลงเจาะผลกาแฟ แมลงสาบ ปลวก มวนศัตรูอ้อย ด้วงงวง และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เป็นต้น

Paecilomyces fumosoroseus ใช้ในการควบคุมกำจัดแมลงหีข้าว

Verticillium lecanii ใช้ในการควบคุมกำจัดแมลงหีข้าว เพลี้ยไฟ และเพลี้ยอ่อน



ภาพที่ 1 ลักษณะของแมลงที่ตายด้วยเชื้อราชนิดต่างๆ

ก เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ทำลาย

ข หนอน European corn borer ที่เป็นโรคซึ่งเกิดจากเชื้อ *Beauveria bassiana*

ค ตั๊กแตนที่เป็นโรคซึ่งเกิดจากเชื้อ *Entomophaga grylli* (*Entomophthora grylli*)

ที่มา: (ก) Shepard และคณะ (1987); (ข) Witkowski และ Wright (1997);

(ค) Samson และคณะ (1988)

ปัจจุบันงานวิจัยและพัฒนาทางด้าน fungal biopesticide โดยทั่วไปมุ่งเน้นที่การหาสายพันธุ์ที่มีฤทธิ์รุนแรง ใช้กับแมลงศัตรูได้หลายชนิด ออกฤทธิ์ได้รวดเร็ว ใช้เทคโนโลยีการผลิตที่ไม่ยุ่งยากเพื่อการผลิตในเชิงปริมาณ และการทำรูปแบบสูตรผสม (formulation) ที่มีความสะดวกต่อการนำไปใช้ มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมและการเก็บรักษา เชื้อราที่นำมาใช้ประโยชน์หรือผลิต

ออกมาเป็นรูปการค้า ส่วนใหญ่เป็นพวก Hyphomycetes เช่นเชื้อราสกุล *Metarhizium* และ *Beauveria* (ตารางที่ 2) โดยรูปแบบผลิตภัณฑ์อาจอยู่ในรูปผง รูปน้ำ รูปเม็ด หรือผสมกับน้ำมัน ทั้งนี้รูปแบบของการผลิตขึ้นกับชนิดของเชื้อรา การนำไปประยุกต์ใช้ เช่น BioGreen® ที่ผลิตโดย Bio-Care Technology ในออสเตรเลีย มีรูปแบบเป็นเม็ด โดยเคลือบโคนินเดีย ของเชื้อ *M. anisopliae* FI-610 บนเมล็ดข้าวที่หักขนาดเล็ก (Milner, 2000) ในขณะที่ biopesticide ส่วนมากออกฤทธิ์เมื่อแมลงศัตรูกินเข้าไป แต่สำหรับเชื้อรานั้นเป็น “contact biopesticide” คือ ในลักษณะต้องสัมผัสกับตัวแมลงโดยเจริญผ่านผนังลำตัวของแมลงเข้าไปในช่องว่างในลำตัว บางชนิดมีการสร้างสาร secondary metabolite ที่เป็นพิษต่อแมลง และมีแนวโน้มว่าจะสามารถใช้เป็นสารพิษฆ่าแมลงต่อไปในอนาคต จึงเป็นแนวทางที่ดีหากมีการสกัดสารพิษเหล่านี้ออกไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูได้ สำหรับสารพิษที่สำคัญจากเชื้อราที่ทำให้แมลงตายนั้น ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูจากเชื้อราที่ได้รับการจดทะเบียนและที่กำลังอยู่ระหว่างการพัฒนาเป็นการค้า

เชื้อรา	ชื่อการค้า	ผู้ผลิต (บริษัท/รัฐบาล)	สารออกฤทธิ์	รูปแบบ	ศัตรูพืช-สัตว์เป้าหมายหลัก
<i>Beauveria bassiana</i>	Boverin	USSR (former)	Aerial หรือ submerged conidia และ/หรือ blastospore	WP	Colorado potato beetle, coding moth
	Conidia	Hoechst Schering AgrEvo, columbia	Conidia	WDG	Coffee-berry borer
	Mycotrol/BotaniGard	Mycotech, USA	Conidia	WP, ES, OF	Whitefly, aphid, diamondback moth, thrip, grasshopper
	Naturalis	Troy Biosciences, USA	Conidia	ES	Whitefly, aphid, thrip
	Ostrinil	Natural Plant Protection (NPP), France	Conidia	G	European corn-borer

ตารางที่ 2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูจากเชื้อราที่ได้รับการจดทะเบียนและที่กำลังอยู่
ระหว่างการพัฒนาเป็นการค้า (ต่อ)

เชื้อรา	ชื่อการค้า	ผู้ผลิต (บริษัท/รัฐบาล)	สารออกฤทธิ์	รูปแบบ	ศัตรูพืช-สัตว์ เป้าหมายหลัก
<i>Lagenidium giganteum</i>	Laginex	AgraQuest, USA	Mycelium	AS	Mosquito
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Bio-Blast	EcoScience, USA	Conidia	WP	Termite
	BioGreen	Bio-Care Technology, Australia	Conidia	G	Red-headed cockchafer
	Bio-Path	EcoScience, USA	Conidia	WC	Cockroach
	BIO 1020	Bayer AG, Germany	Mycelium	G	Black vine weevil
	Cobican	Probioagro, Venezuela	Conidia	WP	Sugar-cane spittlebug
	Metabiol	PlanTerra-Produtos Biotechnologicos, Brazil	Conidia	WP	Pasture spittlebug
	Metarhizium schweizer	Eric Schweizer Seeds, Switzerland	Conidia	G/WC	White grub
<i>M. anisopliae var. acridum</i>	Green Muscle	Biological Control Products, South Africa	Conidia	WP/OF	Grasshopper, locust
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Bemisin	Probioagro, Venezuela	Conidia	WP	Whitefly
	Pae-Sin	Agrobionsa, Mexico	Conidia	WP	Whitefly
	PreFeRal/ PFR 97	Thermo Trilogy, USA	Blastospore	WDG	Whitefly
<i>Verticillium lecanii</i>	Mycotal	Koppert Biological Systems, the Netherlands	Conidia	WP	Whitefly, thrip
	Vertalec	Koppert, the Netherlands	Blastospore	WP	Aphid

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Wraight และคณะ (2001)

ตารางที่ 3 สาร secondary metabolite บางชนิดที่สำคัญและผลิตโดยเชื้อราที่เข้าทำลายแมลง

เชื้อรา	สาร secondary metabolite
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Destruxin (>27 type), swainsinone, cytochalasin C
<i>Beauveria bassiana</i>	Bassianin, beauvericin, bassianolide, beauverolide, tenellin
<i>B. brongniartii</i>	Oosporein
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Beauvericin, beauverolide, pridine-2,6-dicarboxylic acid
<i>Verticillium lecanii</i>	Dipcolonic acid, hydroxycarboxylic acid, cyclosporin
<i>Tolypocladium</i> spp.	Cyclosporin, efraeptin (5 type)
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Hirsutellin A, hirsutellin B, phomalactone

ที่มา: คัดแปลงมาจาก Vey และคณะ (2001)

1.4 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Metarhizium* spp.

การนำเชื้อ *Metarhizium* spp. มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูโดยชีววิธีนั้น มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและโดยเฉพาะในต่างประเทศ ปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในสภาพไร้อย่างประสบผลสำเร็จ ซึ่งเชื้อ *M. anisopliae* เป็นเชื้อราชนิดที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่งเมื่อเทียบกับเชื้อราและจุลินทรีย์ทั้งหลายที่มีการนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรู เนื่องจากมีแมลงหลายชนิดที่เป็นโรคจากเชื้อนี้ (ตารางที่ 4) สำหรับการนำเชื้อ *Metarhizium* spp. ส่วนใหญ่มักนิยมใช้ในรูปแบบของโคโคนีเดีย สำหรับอัตราและวิธีการใช้นั้นขึ้นอยู่กับ ชนิด รูปแบบสูตรผสม และแมลงที่ต้องการป้องกันกำจัด อย่างไรก็ตามความคงทนและควมมีชีวิต (self life) ของเชื้ออาจแตกต่างกัน (ตารางที่ 5) นอกจากนี้รูปแบบสูตรผสมบางชนิดยังสามารใช้ได้กับเครื่องฉีดพ่นโดยทั่วไปหรือการใช้ร่วมกับส่วนผสมอื่นๆ แต่ไม่ควรผสมกับสารเคมีฆ่าเชื้อรา ทั้งนี้เชื้อ *Metarhizium* spp. คือเชื้อราชนิดหนึ่งเช่นกัน

ตารางที่ 4 แมลงอาศัยของเชื้อ *Metarhizium anisopliae*

อันดับ	แมลงอาศัย	จำนวน (ชนิด)
Orthoptera	(locust, etc.)	11
Dermaptera	(earwig)	1
Hemiptera	(bug)	21
Lepidoptera	(butterfly)	27
Diptera	(fly)	4
Hymenoptera	(bee, wasps, ant)	6
Coleoptera	(beetle)	134

ที่มา: คัดแปลงมาจาก Veen (1968, อ้างโดย Zimmermann, 1992)

ตารางที่ 5 ความคงทนของเชื้อ *Metarhizium anisopliae*

ส่วนของเชื้อ	รูปแบบสูตรผสม (formulation)	ความมีชีวิต (shelf life)
conidia	unformation	63% หลังจาก 24 เดือน ที่ 26°C (97% RH)
conidia	dry wettable powder	มีการอยู่รอดที่ดี หลังจาก 12 เดือน ที่ 37°C (anoxic)
conidia	sunflower oil	95% หลังจาก 2 เดือน ที่ 25°C
mycelium	dry granules	100% หลังจาก 20 สัปดาห์ ที่ 20°C (สภาพสุญญากาศ)

ที่มา: Wraight และ Carruthers (1999)

สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Metarhizium* spp. ต่อแมลงศัตรูนั้น ได้มีการศึกษากันค่อนข้างมากในต่างประเทศ ส่วนในประเทศไทยยังมีการศึกษาด้านนี้น้อย โดยมีการศึกษาทั้งในสภาพไร่และในห้องปฏิบัติการ ซึ่งมีทั้งการนำไปใช้โดยตรงและการประยุกต์ใช้ดังนี้

การใช้เชื้อ *M. anisopliae* ควบคุมด้วงแรดมะพร้าว (*Oryctes rhinoceros*) ในประเทศไทย เริ่มจากการค้นพบโรคราเขียวอันเป็นสาเหตุของโรคในด้วงแรดมะพร้าว (มลิวัลย์ และอัจฉรา, 2521 อ้างโดย มลิวัลย์, 2539) และได้มีการวิจัยและศึกษาต่อมา ซึ่งได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ

M. anisopliae ต่อหนอนด้วงแรดในกองเพาะพันธุ์ด้วงในสภาพธรรมชาติ โดยทำแปลงทดสอบในสวนมะพร้าวจังหวัดชลบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี สุราษฎร์ธานี และนราธิวาส และทดสอบ 4 แปลงย่อย และแปลงเปรียบเทียบซึ่งมี 1 แปลงย่อยต่อซ้ำ จังหวัดละ 1 ซ้ำ ในพื้นที่ 10 ไร่ จัดทำกองปุ๋ยขนาด 2.0x2.0x0.5 เมตร เพื่อล่อด้วงแรดมะพร้าวให้มาขยายพันธุ์และใช้เป็นแปลงทดสอบย่อย วิธีการทำกองปุ๋ยโดยใช้ต้นมะพร้าวที่ตายแล้ว ตัดเป็นท่อน มาทำเป็นขอบ ขุดดินลึกประมาณ 12 นิ้ว แล้วใส่ขี้เลื่อยหรือขุยมะพร้าว และปุ๋ยคอกให้เต็มแปลง ให้ความชื้นพอควร แล้วคลุมแปลงด้วยทางมะพร้าว ตรวจปริมาณด้วงหนอนหลังจาก 2-3 เดือน เมื่อมีปริมาณหนอนมากเพียงพอ ใช้เชื้อราในอัตรา 400 กรัมต่อ 1 แปลง ดูแลให้ความชื้น ตรวจผล 5 ครั้ง หลังจากใช้เชื้อราห่างกันทุก 7-10 วัน พบเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อราคือ จังหวัดชลบุรี 88.68 เปอร์เซ็นต์ สมุทรสาคร 74.37 เปอร์เซ็นต์ สุราษฎร์ธานี 84.33 เปอร์เซ็นต์ และนราธิวาส 95.74 เปอร์เซ็นต์ แต่จังหวัดราชบุรีสำรวจได้เพียง 4 ครั้ง เท่ากับ 59.38 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ยจาก 5 จังหวัด คือ 85.78 เปอร์เซ็นต์ (มลิวัลย์ และคณะ, 2526)

สำหรับ ฉศ (2536) ได้นำเชื้อ *M. anisopliae* ที่ทำให้เกิดโรคกับด้วงแรดมะพร้าวมาทดสอบกับปลวกทำลายไม้ (*Microcerotermes crassus*) แล้วนำเชื้อราจากปลวกที่เกิดโรคมาล้างเพิ่มปริมาณบนอาหาร Latch's media จนเชื้อรามีอายุ 30 และ 45 วัน จึงนำมาทดสอบกับปลวก โดยวิธีให้ปลวกกินและสัมผัสกับเชื้อรา พบว่าเชื้อ *M. anisopliae* ที่มีอายุ 45 วัน มีประสิทธิภาพทำให้ปลวกตายดีกว่าเชื้อที่มีอายุ 30 วัน มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.27×10^7 โคนิเดียต่อตารางเซนติเมตรต่อมิลลิกรัม ส่วนวิธีการให้เชื้อราแก่ปลวก ด้วยวิธีให้กินเชื้อและวิธีสัมผัสเชื้อรา มีผลทำให้ปลวกตายเหมือนกัน สำหรับการทดลองของ Krutmuang (1996) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* อายุ 14 วัน ที่เลี้ยงบนอาหาร Sabouraud dextrose agar ที่เติม yeast extract (SDAY) ต่อปลวก *Coptotermes* sp. จำนวน 20 ตัว 4 ซ้ำ ใช้เชื้อราความเข้มข้น 5×10^5 , 5×10^6 , 5×10^7 และ 5×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร โดยหยดสารแขวนลอยเชื้อแต่ละความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรอง ที่อยู่ในจานทดลอง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ไม่ให้แสงสว่าง ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 92-96 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของปลวกจากเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* เท่ากับ 58.99, 75.81, 92.68 และ 99.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่า *M. anisopliae* var. *majus* ที่มีเปอร์เซ็นต์การตายของปลวกเท่ากับ 19.32, 28.69, 46.98 และ 54.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สำหรับการทดลองของ Sirimungkararat และคณะ (2000) ซึ่งได้ทดสอบประสิทธิภาพในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Metarhizium* spp. จำนวน 5 ไอโซเลต คัดแปลงตามวิธีการของ Samuels (1986) โดยนำเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*) วัย 3 และตัวเต็มวัยที่ได้ผ่านการนำเอา

ไปไว้ในตู้เย็น (0 องศาเซลเซียส) นานประมาณ 5 นาที แล้วนำไปผ่านลงบนโคโลนีของเชื้อ *Metarhizium* spp. อายุประมาณ 7 วัน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) แล้วนำไปวางใน moist chamber บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน หลังจากนั้น นำมาแช่ Clorox® 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ แล้วจึงย้ายไปไว้ใน moist chamber บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ประมาณ 7-12 วัน ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การตายทุกวัน พบว่า ไอโซเลต 4MfSK และ 5MfKK ซึ่งเป็นเชื้อ *M. flavoviride* [ปัจจุบันจากผลการศึกษาโดย อาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุลของ Songpra และคณะ (2004) จัดเป็นเชื้อ *Penicillium oxalicum*] มีประสิทธิภาพในการทำลายแมลงสูงกว่าเชื้อ *M. anisopliae* ทั้ง 3 ไอโซเลต (1MaKK, 2MaUD และ 3MaTIS) และได้ทำการทดลองซ้ำในปีเดียวกันโดยใช้เฉพาะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวเต็มวัย ซึ่ง การทดสอบครั้งที่ 2 ให้ผลสอดคล้องกับครั้งที่ 1 (ตารางที่ 6) โดยเฉพาะเชื้อไอโซเลต 5MfKK (*P. oxalicum*) มีประสิทธิภาพในการทำลายแมลงค่อนข้างสูงทั้ง 2 ครั้งของการทดสอบ คือ 88.00 และ 95.00 เปอร์เซ็นต์ ในการทดสอบครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ และเชื้อ *M. anisopliae* มี ประสิทธิภาพในการทำลายแมลงต่ำกว่าเชื้อ *M. flavoviride* (*P. oxalicum*)

ตารางที่ 6 ความสามารถของเชื้อ *Metarhizium* spp. ในการทำให้เกิดโรคต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ไอโซเลต	การทำให้เกิดโรค (%)		
	การทดสอบครั้งที่ 1 ¹		การทดสอบครั้งที่ 2 ²
	(23 มิ.ย. 43)		(16 ส.ค. 43)
	วัย 3	ตัวเต็มวัย	ตัวเต็มวัย
1 MaKK	40.00	20.00	40.00
2 MaUD	0.00	32.00	75.00
3 MaTIS	0.00	24.00	45.00
4 MfSK ³	32.00	40.00	85.00
5 MfKK ⁴	32.00	88.00	95.00

¹ ใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลวัย 3 จำนวน 25 ตัวต่อไอโซเลต และตัวเต็มวัย 25 ตัวต่อไอโซเลต

² ใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวเต็มวัย 20 ตัวต่อไอโซเลต

^{3, 4} ปัจจุบันจากผลการจัดจำแนกโดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุลจัดเป็นเชื้อ *Penicillium oxalicum* (Songpra et al., 2004)

ที่มา: Sirimungkarat และคณะ (2000)

ส่วน Lezama-Gutierrez และคณะ (2000) ใช้โคนินเดียของเชื้อ *M. anisopliae* ที่มีความเข้มข้น 1×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 ไอโซเลต ทดสอบกับตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ (mexican fruitfly; *Anastrepha ludens*) วัยที่ 3 ในจานทดลองขนาด 10×15 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และไม่ให้แสงสว่าง ให้ความชื้นโดยใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อหยดลงบนกระดาษกรอง พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้มีค่าเท่ากับ 37.90-98.75 เปอร์เซ็นต์ และมีเชื้อ 13 ไอโซเลต ที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่า 83.70 เปอร์เซ็นต์ และค่า LT_{50} อยู่ระหว่าง 1.8-6.2 วัน ขณะที่ค่า LC_{50} เท่ากับ $3.7-4.8 \times 10^5$ CFU ต่อมิลลิลิตร จากการทดสอบกับเชื้อ *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้สูงสุด

นอกจากนี้ยังมีการทดสอบประสิทธิภาพ โดยนักวิจัยอีกหลายท่าน เช่น Hartwig และ Oehming (1992) ได้ทดสอบเชื้อ *M. anisopliae* ในรูปการค้ำที่มีชื่อว่า BIO 1020® กับหนอนนก (*Tenebrio molitor*) วัย 5 พบว่าอัตรา BIO 1020® 0.1-0.6 กรัมต่อลิตร (ดิน) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนนก 100 เปอร์เซ็นต์ Caudwell และ Gatehouse (1996) ได้ทดสอบรูปแบบเหยื่อล่อของเชื้อ *M. flavoviride* ต่อตัวอ่อนตั๊กแตน (*Schistocerca gregaria*) วัย 5 พบว่าค่า LC_{50} เท่ากับ 1.5×10^8 โคนินเดียต่อมิลลิลิตร สำหรับ Neeting และ Dent (1998) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของรูปการค้ำ Green Muscle® ที่ได้จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่พบในธรรมชาติ คือ *M. anisopliae* var. *acridum* IMI 330189 (ชื่อเดิม *M. flavoviride*) ซึ่งรูปการค้ำนี้ประกอบด้วยโคนินเดียของเชื้อราใน mineral หรือ vegetable oil นิดพื้นโดยใช้เครื่อง ultra low volume (ULV) พบว่าตั๊กแตน (grasshopper) และตั๊กแตน locust มีการตาย 90 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7-21 วัน Milner และคณะ (2003) ได้ศึกษาความคงทนของโคนินเดียในดินแปลงอ้อยของเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* FI-1045 (รูปการค้ำ BioCane®) และ *M. anisopliae* var. *lepidiotum* FI-147 ที่ใช้ในการป้องกันกำจัด canegrub ในแปลงอ้อย 4 รูปแบบสูตรผสม คือ rich granule (BioCane®), wettable powder ได้จากโคนินเดียจาก rich granule, โคนินเดียจาก rich suspended ในน้ำ และโคนินเดียที่เจริญบนอาหารร่วน โดยผสมกับดินแปลงอ้อยแล้วใส่ในวงแหวน PVC และตรวจผลทุก 6 เดือน นาน 3 ปีครึ่ง พบว่าโคนินเดียมีความอยู่รอดจนถึง 3 ปีครึ่ง ทุกรูปแบบสูตรผสม และไอโซเลต FI-147 มีความคงทนมากกว่า FI-1045 โดยที่ไอโซเลต FI-1045 มีความอยู่รอดดีที่สุดในรูปแบบของ BioCane® และสามารถทำให้เกิดโรคแก่แมลงเป้าหมายได้

ในด้านการพัฒนาเชื้อราสาเหตุโรคแมลงให้มีประสิทธิภาพ และศักยภาพในการควบคุม ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูให้สูงขึ้นนั้น ได้มีการศึกษาการผลิตเอนไซม์และสารพิษ และมีความพยายามที่จะตัดต่อยีน รวมทั้งให้มีการแสดงออก (expression) เช่น การใส่ยีนที่สร้างเอนไซม์ protease (Pr1) จาก *M. anisopliae* ลงในจีโนม (genome) ของเชื้อ *M. anisopliae* ARSEF 1080

เพื่อให้เห็น Pr1 สร้างเอนไซม์ protease ที่มากขึ้น พบว่าสามารถลดเวลาในการตายลง 25 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการกินลงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์ธรรมชาติ และมีค่า LC_{50} เท่ากับ 3.14×10^5 , 2.98×10^5 และ 2.75×10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตรต่อกรัม สำหรับเชื้อ *M. anisopliae* สายพันธุ์ธรรมชาติ เชื้อที่ตัดต่อยีน *gdp-Pr1-3* และยีน *gdp-Pr1-4* ตามลำดับ โดยทดสอบในหนอน หงอนยาสูบ (tobacco hornworm; *Manduca sexta*) วัย 5 (St. Leger et al., 1996) และมีการตัดต่อยีน ที่ทนต่อเบนเลท (Benlate®) จากเชื้อ *Aspergillus* เข้าไปยัง *M. anisopliae* นอกจากการปรับปรุง สายพันธุ์โดยการตัดต่อยีนแล้วยังมีการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตทำให้เกิดการกลายพันธุ์ การทำ hybridization และ protoplast fusion และการพัฒนาสูตรผสมทำให้ผลิตภัณฑ์มีความอยู่ตัวมากขึ้น เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำออกฤทธิ์ได้ดีกว่า จึงมีการพัฒนาสูตรที่นอกเหนือจาก oil based เช่น water in oil หรือ oil in water และมีการพบว่าถ้าผสมเชื้อเข้ากับสารเคมีในปริมาณต่ำจะทำให้ออกฤทธิ์มากขึ้น (synergistic) เช่นการใช้เชื้อ *Metarhizium* ผสมกับ imidocloprid ในการควบคุมปลวก ของบริษัทไบเออร์ นอกจากสารเคมีแล้วยังมีการผสมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ผสมกับเชื้อ แบคทีเรียสกุล *Serratia* ในการควบคุม grass grub ในประเทศนิวซีแลนด์ หรือการใช้ร่วมกับ ฟิโรโมนในการดักแมลงสาบ (มรกด, 2538) และการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการ ผลิตและการเก็บรักษา นับว่ามีความสำคัญมาก ผลิตภัณฑ์ต้องปราศจากเชื้อปนเปื้อนมีเปอร์เซ็นต์ การงอกและมีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดโรคสูง

1.5 ผลกระทบของเชื้อ *Metarhizium* spp. ต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

จากการนำเชื้อ *Metarhizium* spp. มาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูกันอย่างกว้างขวางจึงมีการ ตระหนักถึงผลกระทบที่จะเกิดต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมายและสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับ มนุษย์ จึงได้มีการศึกษาผลกระทบที่จะเกิดขึ้น Rosa และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลกระทบของเชื้อ *M. anisopliae* Ma4 ต่อแตนเบียน *Prorops nasuta* (Hymenoptera; Bethyridae) ซึ่งเป็นแตนเบียนที่ เข้าทำลายหนอนเจาะผลกาแฟ โดยการปลูกเชื้อลงบนหนอนเจาะผลกาแฟ ที่ถูกเข้าทำลายโดย แตนเบียน *P. nasuta* พบว่าเชื้อ *M. anisopliae* มีการเข้าทำลายตัวอ่อนของแตนเบียน *P. nasuta* ต่ำ มีค่า LC_{50} เท่ากับ 4.08×10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร โดยผลการทดลองมีความสอดคล้องกับ Neethling และ Dent (1998) สำหรับ Lomer และคณะ (1999) รายงานว่าเชื้อ *M. anisopliae* var. *acridum* IMI 330189 สามารถเข้าทำลายตั๊กแตน แต่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น และมีผลกระทบต่ำต่อ ศัตรูธรรมชาติหรือนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติ ทำให้เกิดการติดเชื้อดำหรือปานกลางต่อแมลงบางชนิดใน อันดับ Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, และ Isoptera และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สำหรับการ ศึกษาถึงผลที่จะเกิดต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นมีขึ้นครั้งแรกในปี 1968 โดย Schserffenberg ซึ่ง

ทดสอบกับหนู (rat) พบว่าไม่ทำให้เกิดโรค ต่อมาได้มีการศึกษาผลกระทบต่อสัตว์ต่างๆ เช่น นก ปลา หนู (mice และ rat) กระต่าย และหนูตะเภา เป็นต้น พบว่าเชื้อ *M. anisopliae* ไม่ทำให้เกิดพิษ หรือโรคต่อสัตว์ดังกล่าว (ตารางที่ 7) และมีการศึกษาเชื้อ *M. anisopliae* ARSEF 1080 ที่ถูกดัดแปร พันธุกรรมโดยการใส่ยีน Pr1 ซึ่งทดสอบในแปลงกะหล่ำ พบว่าการแพร่กระจายเล็กน้อยในแปลง สาธิตแต่ไม่มีหลักฐานการนำโรคโดยแมลงนอกเป้าหมาย และไม่มีผลทำให้เชื้อราที่มีอยู่ในแปลง ทดลองลดลง (Hu and St. Leger, 2002) จากข้อมูลที่ได้เมื่อคำนึงถึงความเป็นจริงเชื้อ *M. anisopliae* จะไม่เป็นผลเสียต่อมนุษย์ สัตว์เลือดอุ่น หรือในพืช นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าจากข้อมูลในการ ทดสอบความเป็นพิษพบว่าไม่มีผลต่อมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น เนื่องมาจากกลไกการออกฤทธิ์หรือ การทำให้เกิดพิษและโรคนั้นเกิดขึ้นในเฉพาะแมลงเท่านั้น และเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้บน ลำตัวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนในด้านผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมไม่คาดว่าจะเกิดเนื่องจากการ ใช้ส่วนใหญ่อยู่ในสภาพโรงเรือนหรือสภาพปิด หรือหากมีการใช้ในสภาพเปิดก็ใช้ในพื้นที่จำกัด และเชื้อ *M. anisopliae* เป็นเชื้อที่มีอยู่ในธรรมชาติอยู่แล้ว นอกจากนั้นเชื้อ *M. anisopliae* ยังมี ลักษณะสำคัญ และข้อได้เปรียบ คือ ไม่สะสมในห่วงโซ่อาหาร ไม่ระเหยเป็นไอ ไม่มีพิษตกค้าง ไม่ มีผลกระทบต่อสัตว์น้ำ ปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์เลือดอุ่น และพืชทุกชนิด (Zimmermann, 1992; Copping, 1998; United States Environmental Protection Agency, 2001)

ตารางที่ 7 การทดสอบความปลอดภัยของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ต่อสัตว์

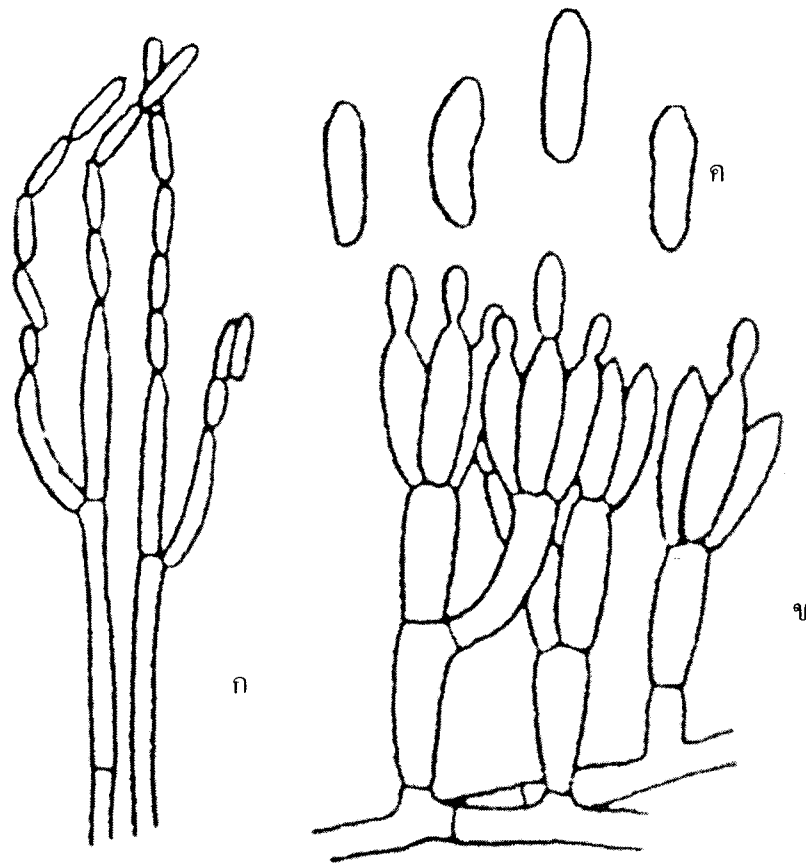
สัตว์	วิธีการ	ผล/อาการ	อ้างอิงจาก
หนู (rat)	ฉีด หายใจ กิน	ไม่ทำให้เกิดโรคและ การระคายเคือง	Schaerffenberg, 1968
หนู (mice) หนูตะเภา	กิน	ไม่มีความแตกต่างกับ กรรมวิธีควบคุม (control)	Latch, 1976
ปลา (<i>Epiplatys bifasciatus</i>)	ผสมสปอร์ในน้ำ	ไม่มีความแตกต่างกับ กรรมวิธีควบคุม	Roberts, 1976
นกกระทา	กิน	ไม่ทำให้เกิดโรคและพิษ	Wasti และคณะ, 1980
หนู (rat) หนู (mice) กระต่าย	ฉีด หายใจ ทาตา	ไม่ทำให้เกิดโรคและพิษ และไม่ระคายเคือง	Shaddock, 1982
หนู (mice) หนูตะเภา	ฉีด หายใจ กิน	ไม่ทำให้เกิดโรคและพิษ	El-kadi และคณะ, 1983
หนู (rat) หนู (mice) หนูตะเภา	ฉีด	สายพันธุ์ Ma83 เป็น สายพันธุ์ที่ปลอดภัย	Fan และคณะ, 1990

ที่มา: Zimmermann (1992)

2. การบ่งชี้เชื้อ *Metarhizium* spp.

2.1 การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เนื่องจากเชื้อราที่ทำลายแมลงมีความหลากหลายทางชีวภาพมาก การจัดจำแนกจึงเป็นสิ่งจำเป็น และลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นลักษณะหนึ่งที่น่านำมาใช้ จึงได้มีการจัดจำแนกเชื้อราที่เข้าทำลายแมลงโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งได้แก่ ลักษณะของสปอร์ ก้านชูสปอร์ เส้นใย โครงสร้างที่เกี่ยวข้องอื่นๆ รวมทั้งชนิดของแมลงที่เชื้อราเข้าทำลาย ซึ่งเชื้อราที่ทำลายแมลงมีทั้งที่เป็นระยะที่สร้างสปอร์แบบใช้เพศ (sexual spore) เช่น ascospore, basidiospore, oospore และ zygosporangium เป็นต้น ซึ่งในทางเห็ดราวิทยาเรียกระยะนี้ว่าระยะ teleomorph ส่วนระยะที่สร้างสปอร์แบบไม่ใช้เพศ (asexual spore) เช่น โคนิเดีย จะเรียกระยะนี้ว่าระยะ anamorph การบ่งชี้เชื้อราที่ทำลายแมลงนั้นต้องการเครื่องมือหลักคือ กล้องจุลทรรศน์เพื่อใช้ตรวจดูลักษณะของเส้นใย สปอร์ หรือโครงสร้างที่เกี่ยวข้องอื่นๆ นอกจากนี้ต้องอาศัยคู่มือในการบ่งชี้ ซึ่งมีรายละเอียดของกุญแจอนุกรมวิธาน (identification key) ที่สามารถบ่งชี้ได้ถึงระดับสกุลและชนิดได้ ส่วนข้อมูลสำหรับใช้บ่งชี้ยังสามารถสืบค้นได้จากวารสารหรือเว็บไซต์ที่เกี่ยวข้องทางด้านเห็ดราวิทยา และคู่มือที่นิยมใช้ในการบ่งชี้เชื้อราที่ทำลายแมลง ตัวอย่างเช่น Kobayasi และ Shimizu (1983), Samson และคณะ (1988), Lacey (1997) และ Humber (1998) ฯลฯ เป็นต้น ซึ่งเชื้อ *Metarhizium* spp. จัดได้ว่าเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตพวุกยูคาริโอต (eukaryote) เมื่อจัดตามหลักอนุกรมวิธานแล้วจัดอยู่ในอาณาจักร Fungi, ชั้น Deuteromycetes, อันดับ Moniliales, วงศ์ (family) Moniliaceae (Guarro, et al., 1999; นิวัศ, 2543; Ulloa and Hanlin, 2000) โดยลักษณะของเชื้อ *Metarhizium* นี้เส้นใยมีผนังกันและมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเท่านั้น คือการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งเรียกว่า โคนิเดีย ยังไม่พบวงจรชีวิตของการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ จึงจัดเป็นกลุ่ม imperfect fungi เส้นใยของเชื้อราสกุลนี้สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเส้นใยเจริญเติบโตเต็มที่สร้างโคนิเดียจากก้านชูสปอร์ ซึ่งก้านชูสปอร์อยู่กันก่อนข้างแน่นคล้ายกับ synnema (เส้นใยที่รวมตัวกันแน่นและตั้งตรง) มีโครงสร้างที่ใช้ในการสร้างสปอร์ (phialide) อยู่เป็นกลุ่มเรียงตัวคล้ายกับเชิงเทียนโดยมีรูปทรงกระบอก โคนิเดียมีเซลล์เดียว ผิวเรียบ ใสไม่มีสีจนถึงสีเข้มและเรียงกันเป็นลูกโซ่ (Samson et al., 1988) ดังแสดงในภาพที่ 2 เชื้อราในสกุลนี้มี 3 ชนิด ซึ่งลักษณะส่วนใหญ่ที่มีความแตกต่างกันคือ โคนิเดีย สีของโคนิเดีย และโครงสร้างที่ใช้ในการสร้างสปอร์ เป็นต้น และ Humber (1998) ได้สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Metarhizium* ชนิดต่างๆ ดังปรากฏในตารางที่ 8



ภาพที่ 2 ลักษณะของเชื้อ *Metarhizium*
 ก, ข ก้านชูสปอร์
 ค โคนิเดีย

ที่มา: Barnett และ Hunter (1972)

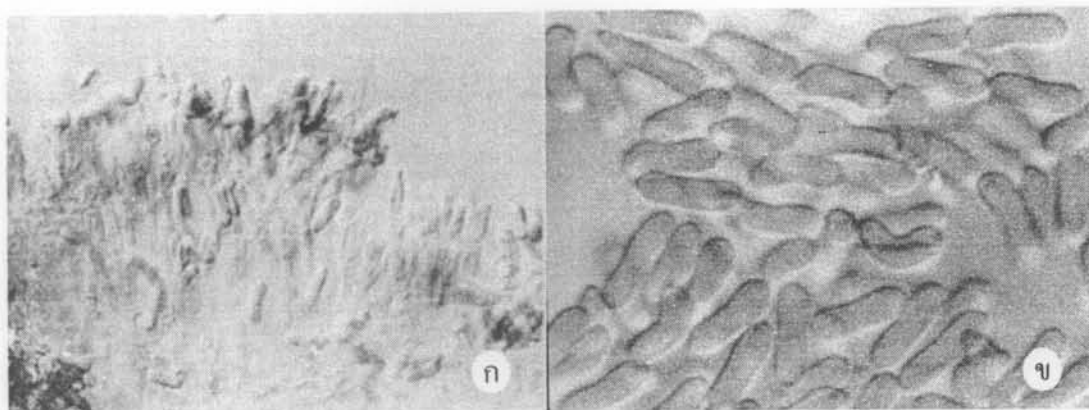
ตารางที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Metarhizium* ชนิดต่างๆ

โคนิเดีย	โครงสร้างที่ใช้ ในการสร้าง สปอร์	สีของโคนิเดีย	ลักษณะอื่นๆ	ชนิด/สายพันธุ์ (variety)
ยาว $\leq 9 \mu\text{m}$, ทรงกระบอก, มักคอดตรง กลาง	ทรงกระบอก	เขียว, เหลือง- เขียว, น้ำตาล ปนเขียวจนถึง เหลือง	พบทั่วไป มีแมลงอาศัย กว้าง เข้าทำลายแมลง ในดินมากกว่าแมลง บนดิน	<i>anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>
ยาว $\geq 11 \mu\text{m}$, รูปร่างคล้าย <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	ทรงกระบอก	เขียว, เหลือง- เขียว, น้ำตาล ปนเขียวจนถึง เหลือง	กระจายตัวกว้างขวาง เป็น diploid form (ระยะที่มีจำนวน โครโมโซมเป็น 2n) ของ <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	<i>anisopliae</i> var. <i>majus</i>
ยาว 7-9 μm รูป ไข่ (ovoid)	ทรงกระบอก ตรงปลายกว้าง	เขียวปนเหลือง หรือเขียวเทา	เจริญช้า สร้างสปอร์ใน อาหารเลี้ยงเชื้อช้ากว่า <i>M. anisopliae</i> พบทั่วไป	<i>flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>
ยาว $\leq 7 \mu\text{m}$, รูปไข่	ทรงกระบอก ตรงปลายกว้าง	เขียวปนเหลือง หรือเขียวเทา		<i>flavoviride</i> var. <i>minus</i>
ขนาด 4-6 $\times 1.5-2.5 \mu\text{m}$, รูปไข่	รูปกระบอกตรง ปลายคอด	ขาวถึงน้ำตาล อ่อน	กลุ่มโคนิเดียคล้ายกลุ่ม ผงแป้งมากกว่า การ รวมกันแน่นเป็น คอตัมน์	<i>album</i>

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Humber (1998)



เชื้อ *Metarhizium anisopliae* ลักษณะของเชื้อ *M. anisopliae* นี้ มักพบ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ var. *majus* และ var. *anisopliae* ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์นี้จะมีลักษณะของก้านชูสปอร์ และ โครงสร้างที่ใช้ในการสร้างสปอร์ที่คล้ายกัน แต่จะต่างกันเล็กน้อยที่ขนาดและลักษณะของโคนิเดีย โดย var. *majus* จะสร้างโคนิเดียรูปทรงกระบอกที่มีขนาดใหญ่กว่าและส่วนใหญ่มักจะคอดตรงกลาง (ภาพที่ 3 ก และ ข) ส่วน var. *anisopliae* จะสร้างโคนิเดียรูปทรงกระบอกเช่นกัน แต่จะมีขนาดเล็กกว่า (ภาพที่ 4 ก และ ข)



ภาพที่ 3 ลักษณะเชื้อ *Metarhizium anisopliae* var. *majus*

ก ก้านชูสปอร์ และ โครงสร้างที่ใช้ในการสร้างสปอร์

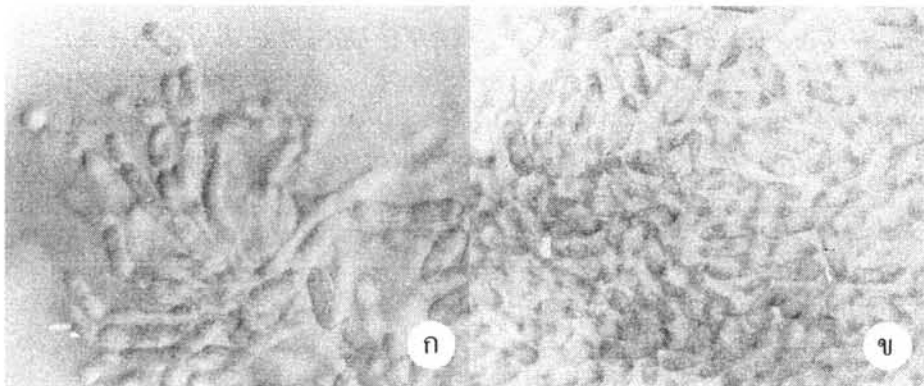
ข โคนิเดีย

ที่มา: Samson และคณะ (1988)

7W

SB

0422



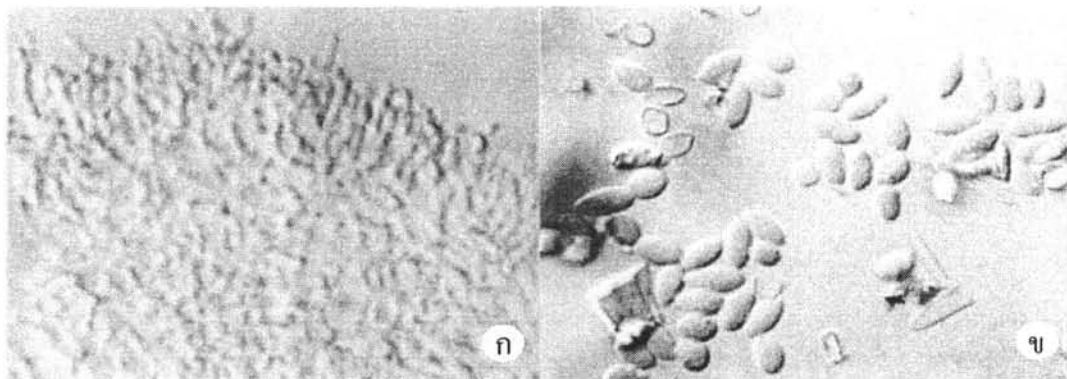
ภาพที่ 4 ลักษณะเชื้อ *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*

ก โครงสร้างที่ใช้ในการสร้างสปอร์

ข โคนิเดีย

ที่มา: Samson และคณะ (1988)

เชื้อ *Metarhizium flavoviride* เชื้อ *M. flavoviride* จะแตกต่างกันอย่างชัดเจนกับเชื้อ *M. anisopliae* โดยมีโครงสร้างที่ใช้ในการสร้างสปอร์ รูปทรงกระบอกตรงปลายกว้าง และสร้างโคนิเดียรูปไข่ (ภาพที่ 5 ก และ ข)



ภาพที่ 5 ลักษณะเชื้อ *Metarhizium flavoviride*

ก โครงสร้างที่ใช้ในการสร้างสปอร์

ข โคนิเดีย

ที่มา: Samson และคณะ (1988)

2.2 การใช้วิธีทางชีวโมเลกุล

ปัจจุบันวิธีทางชีวโมเลกุลถูกนำมาใช้ในการบ่งชี้และจัดจำแนกเชื้อรา รวมถึงสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อย่างแพร่หลาย หลังจากช่วงของการค้นพบและพัฒนาความรู้ในระดับโมเลกุล เริ่มจากการทดลองเพื่อหาสารเคมีที่ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมโดย Griffith ในปี ค.ศ. 1928 แต่ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ จนกระทั่งปี ค.ศ. 1944 Avery, MacLeod และ McCarty จึงได้แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรม ในปี ค.ศ. 1953 Watson และ Crick ได้เสนอโครงสร้างของดีเอ็นเอ และสามารถแยกเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme หรือ restriction endonuclease) ชนิดแรกได้ในปี ค.ศ. 1970 โดย Nathans และ Smith (สุรินทร์, 2543) ต่อมาการศึกษาในระดับโมเลกุลมากขึ้น ทำให้เทคนิคทางชีวโมเลกุลพัฒนาก้าวหน้าขึ้นมาก เช่น เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR), การโคลนยีน (gene cloning), เทคนิคการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger print), การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing), การพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อการวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวโมเลกุล และด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatic) เป็นต้น

สำหรับการใช้วิธีทางชีวโมเลกุล การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของบริเวณที่ต้องการศึกษาคด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสนั้น การออกแบบและการเลือกใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่ถูกต้องเหมาะสมเป็นขั้นตอนสำคัญอย่างหนึ่ง ซึ่งตัวอย่างไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของเชื้อ *Metarhizium* spp. เพื่อนำมาจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดโดยอาศัยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส (DNA sequence analysis) ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ
ของเชื้อ *Metarhizium* spp.

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	อ้างอิงจาก
TW81	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC	Curran และคณะ, 1994
AB28	ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	Curran และคณะ, 1994
Vda14	GCAGCAGGTCTCCAAGGT	Pramateftaki และคณะ, 2000
Vda12	GCGACGTCGCTATGAACG	Pramateftaki และคณะ, 2000
Vda13	CGTCGTGAGACAGGTTAG	Pramateftaki และคณะ, 2000
Vda17	GAGCCATTTCGAGTTTCG	Pramateftaki และคณะ, 2000
18SF	GCGAAACTGCGAATGGCT	Pantou และคณะ, 2003
18SR	GTAATGATCCCTCCGCTG	Pantou และคณะ, 2003
Ma-ITS2	GGTCCACTGCCGTAAAACCCC	Pantou และคณะ, 2003
Ma-28S	GCCGACTTCCCTTATCTAC	Pantou และคณะ, 2003
Ma-18S1	GTTGATTCTGCCAGTAGTC	Pantou และคณะ, 2003
Ma-5.8S	CCAGAACCAAGAGATCCG	Pantou และคณะ, 2003
Ma-28S3	GAATCAGCGGTTCTCTCG	Pantou และคณะ, 2003
Ma-28S4	CCTTGTTGTTACGATCTGCTGAGGG	Pantou และคณะ, 2003
Ma-18S4	TAATGAGCCATTCGCAGTTTCGCTG	Pantou และคณะ, 2003
Ma-IGS1	CGTCACTTGTATTGGCAC	Pantou และคณะ, 2003
Ma-IGSspF	CTACC(C/T)GGGAGCCCAGGCAAG	Pantou และคณะ, 2003
Ma-IGSspR	AAGCAGCCTACCCTAAAGC	Pantou และคณะ, 2003
D3A	GACCCGTCTTGAAACACACGGA	Choi และคณะ, 2003
D3B	TCCGGAAGGAACCAGCTACTA	Choi และคณะ, 2003
ITSMet	TCTGAATTTTTTATAAGTAT	Destefano และคณะ, 2004
ITSMet14	GAAACCGGGACTAGGCGC	Destefano และคณะ, 2004

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Choi และคณะ (2003); Pantou และคณะ (2003);
Destefano และคณะ (2004)

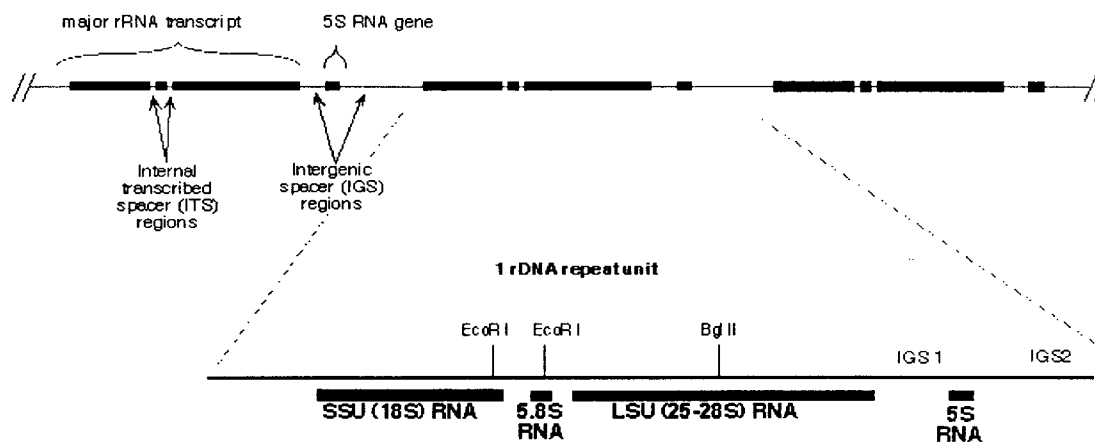
2.2.1 การใช้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

โดยอาศัยหลักการพื้นฐานของเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) คือ การแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ตามขนาดและรูปร่าง บนเจลอะกาโรส (agarose) หรือเจลโพลีอะครีลาไมด์ (polyacrylamide) และใช้เทคนิคทางโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker technique) มาช่วยตรวจหาจุดหรือตำแหน่ง (locus) ที่มีความผันแปรเปรียบเทียบกันเพื่อบอกความแตกต่าง ตัวอย่าง เช่น เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) เทคนิคเหล่านี้ทำให้เกิดความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แต่เทคนิค AFLP และ ARDRA มีการนำเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเข้าร่วมด้วย นอกจากนี้ยังมีเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) หรือวิธีการที่ได้รูปแบบต่างๆ ของแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณบางส่วนของจีโนมโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีสายสั้นๆ เพียง 10 นิวคลีโอไทด์ (10-mer primer) จำนวนมากที่เรียกว่า arbitrary primer ที่เลือกมาแบบสุ่มไม่เฉพาะเจาะจงกับตำแหน่งที่อยู่บนจีโนม เป็นเทคนิคเดียวกับ arbitrary primed PCR (AP-PCR) ซึ่งบางครั้งไพรเมอร์ไม่สามารถทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ แต่มีบางไพรเมอร์ที่เลือกมาสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้หลายขนาด โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดอาจมีรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเฉพาะตัว เทคนิคและวิธีการเหล่านี้จึงสามารถนำมาช่วยในการจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของเชื้อราได้ (Cobb and Clarkson, 1993; Guarro et al., 1999)

2.2.2 การใช้ข้อมูลลำดับเบสของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

ไรโบโซม (ribosome) เป็นโครงสร้างอย่างหนึ่งที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งประกอบด้วยไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA; rRNA) และไรโบโซมอลโปรตีน (ribosomal protein) ไรโบโซมในสิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอต (prokaryote) มีไรโบโซมขนาด 70S ประกอบด้วยหน่วยย่อย large subunit และ small subunit ซึ่งมีขนาด 50S และ 30S ตามลำดับ โดย large subunit ประกอบด้วย 5S rRNA และ 23S rRNA รวมอยู่กับโปรตีนประมาณ 34 ชนิด สำหรับ small subunit ประกอบด้วย 16S rRNA รวมอยู่กับโปรตีน 21 ชนิด ส่วนสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตมีไรโบโซมขนาด 80S ประกอบด้วย large subunit และ small subunit ซึ่งมีขนาด 60S และ 40S ตามลำดับ ซึ่ง large subunit ประกอบด้วย 5S rRNA, 5.8S rRNA และ 28S rRNA รวมอยู่กับโปรตีน 49 ชนิด สำหรับ small subunit ประกอบด้วย 18S rRNA รวมอยู่กับโปรตีนประมาณ 33 ชนิด (Watson et al., 2004) โดย ribosomal RNA gene (rDNA) มีการเรียงตัวซ้ำๆ กัน (repeated copy) แบบต่อเนื่องในลักษณะ tandem แต่ละซ้ำ (repeat unit) มีความยาวระหว่าง 7.7 ถึง 24 กิโลเบส (kb) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นรหัสสำหรับการสร้างโปรตีน (coding region) ซึ่งเป็นส่วน

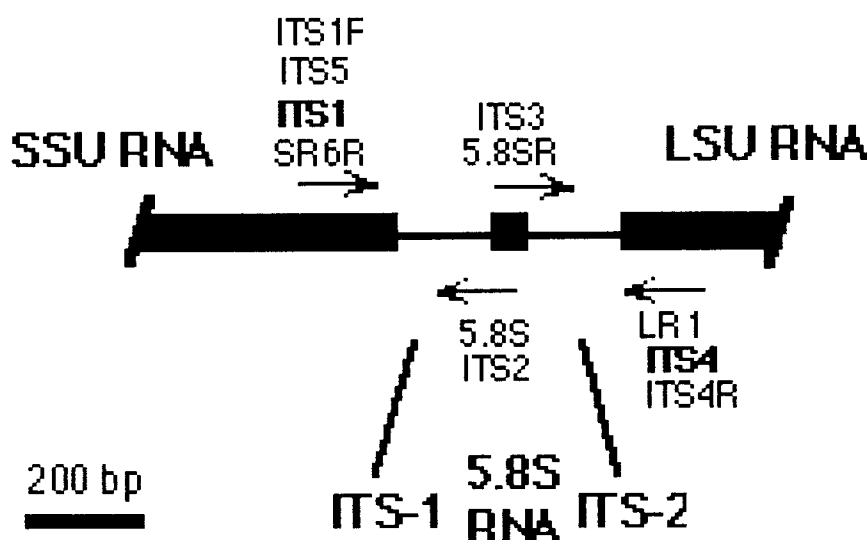
35S และ 5S โดยส่วน 35S จะถอดรหัสไปเป็น 18S rRNA, 5.8S rRNA และ 28S rRNA และบริเวณที่มีลำดับเบสแต่ไม่สามารถแปลรหัสสำหรับการสังเคราะห์โปรตีน (non-coding region) ซึ่งเป็นบริเวณที่เรียกว่า nontranscribed spacer (NTS) หรือ intergenic spacer (IGS) (Guarro et al., 1999) ดังแสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ลักษณะการเรียงตัวของ ribosomal RNA gene

ที่มา: Vilgalys Lab, (ม.ป.ป.)

โดยข้อมูลลำดับเบสในส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอถูกนำมาใช้ในการบ่งชี้และจัดจำแนกเนื่องจากพบปริมาณมากในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด และค่อนข้างเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) เนื่องจากเป็นบริเวณที่ยีนมีรหัสสำหรับสังเคราะห์ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอชนิดต่างๆ นอกจากนี้บริเวณที่เป็น spacer ต่างๆ ซึ่งได้แก่ บริเวณ internal และ external transcribed spacers (ITS และ ETS) เป็นบริเวณที่ไม่ใช่ยีนหรือไม่มีรหัสสำหรับยีนใด โดย ITS มีตำแหน่งอยู่บริเวณ upstream และ downstream ของยีน 5.8S rDNA ซึ่งเรียกว่า ITS1 และ ITS2 ตามลำดับ (ภาพที่ 7) เป็นส่วนที่มีความผันแปรสูง (variable region) บริเวณนี้จึงสามารถนำมาใช้แยกสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปใช้สำหรับแยกความแตกต่างระดับชนิด (Guarro et al., 1999) และประสบความสำเร็จในการจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* (Curran et al., 1994; Driver et al., 2000; Pantou et al., 2003)

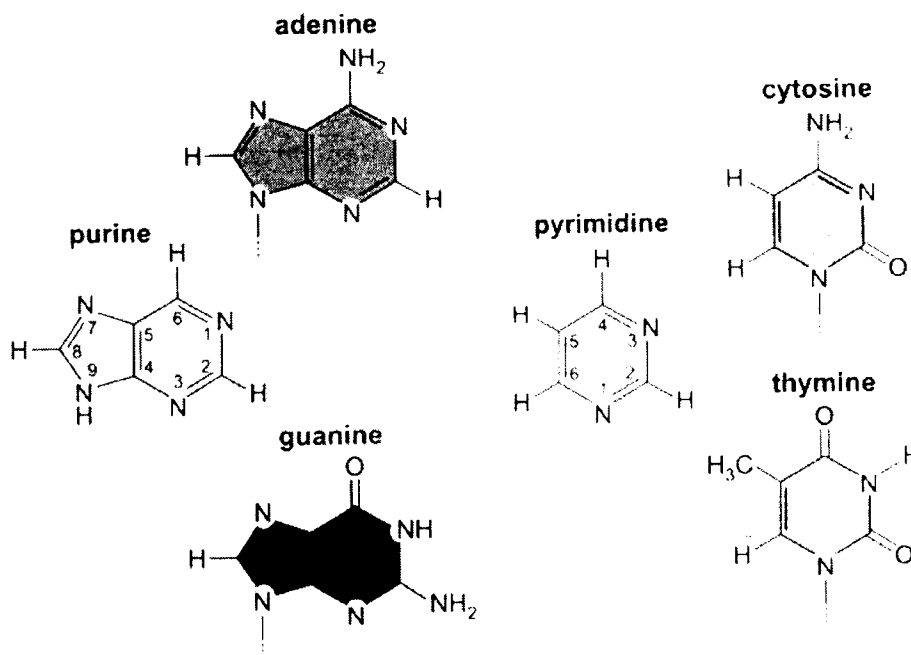


ภาพที่ 7 ตำแหน่งของ internal transcribed spacer (ITS) ของ ribosomal RNA gene

ที่มา: Vilgalys Lab, (ม.ป.ป.)

ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรม (genetic information) ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ โดยลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) แบบต่างๆ ในสายดีเอ็นเอ ข้อมูลเหล่านี้มีการแสดงออกมาเป็นลักษณะต่างๆ โดยผ่านทางอาร์เอ็นเอ ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการผลิตสารโปรตีน

จำเพาะ ลักษณะที่ปรากฏในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดเป็นผลรวมของการกระทำร่วมกันของโปรตีนหลายชนิด ซึ่งมาจากดีเอ็นเอ การถ่ายทอดทางพันธุกรรมเกิดจากระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) กระบวนการนี้จะดำเนินไปด้วยความแม่นยำ นอกจากนี้ข้อมูลทางพันธุกรรมต้องมีการแสดงออกเพื่อให้เกิดเป็นฟีโนไทป์ (phenotype) โดยอาศัยกระบวนการถอดรหัสจากดีเอ็นเอมาเป็นอาร์เอ็นเอ (transcription) แล้วจึงแปลรหัสจากอาร์เอ็นเอเป็นโปรตีน (translation) นอกจากการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอแล้ว ยังมีกระบวนการซ่อมแซม (DNA repair) และการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrangement) ซึ่งมีความสำคัญในการคงอยู่และสร้างความหลากหลายให้กับสิ่งมีชีวิต โดยหน่วยย่อยของดีเอ็นเอคือนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีส่วนประกอบ 3 ส่วน คือ สารประกอบพวกเบส น้ำตาล และหมู่ฟอสเฟต ซึ่งเบสมี 2 ประเภท คือ พิวรีน (purine) ได้แก่ adenine (A), guanine (G) และไพริมิดีน (pyrimidine) ได้แก่ cytosine (C), thymine (T) (ภาพที่ 8) เบสนี้จะต่ออยู่กับน้ำตาลดีออกซีไรโบส (2'-deoxyribose) แล้วมีหมู่ฟอสเฟตเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างตำแหน่ง 5' ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่งกับตำแหน่ง 3' ของน้ำตาลอีกโมเลกุลหนึ่ง ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester) (Darbre, 1999; สุรินทร์, 2543) ทำให้สายโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) ที่เกิดขึ้นมีทิศทางปลายหนึ่งเป็นปลาย 5' และอีกปลายหนึ่งเป็นปลาย 3' จากการศึกษาทางเคมี การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการวิเคราะห์โดยใช้เอ็กซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction) พบว่าโครงสร้างของดีเอ็นเอเป็นเส้นยาวสม่ำเสมอไม่ขึ้นกับองค์ประกอบและลำดับของเบส มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (double helix) เกิดจากสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สาย เรียงตัวขนานและกลับทิศทางกัน (antiparallel) มีน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตอยู่รอบนอกของโมเลกุล เบสซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) A จับคู่กับ T มี 2 พันธะ และ G คู่กับ C มี 3 พันธะ อยู่ในแนวระนาบเกือบตั้งฉากกับแกนของเกลียว ซึ่งเกลียวจะหมุนครบรอบยาว 3.4 นาโนเมตร (nm) หรือเท่ากับ 34 องศา (A°) ทุก 10.5 คู่เบส (base pair) ทำให้เบสแต่ละคู่อยู่ห่างกัน 0.34 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของเกลียวคู่เท่ากับ 2 นาโนเมตร การพันเกลียวทำให้เกิดร่อง 2 ขนาดเรียกว่า major groove และ minor groove (สุรินทร์, 2543; Watson et al., 2004)

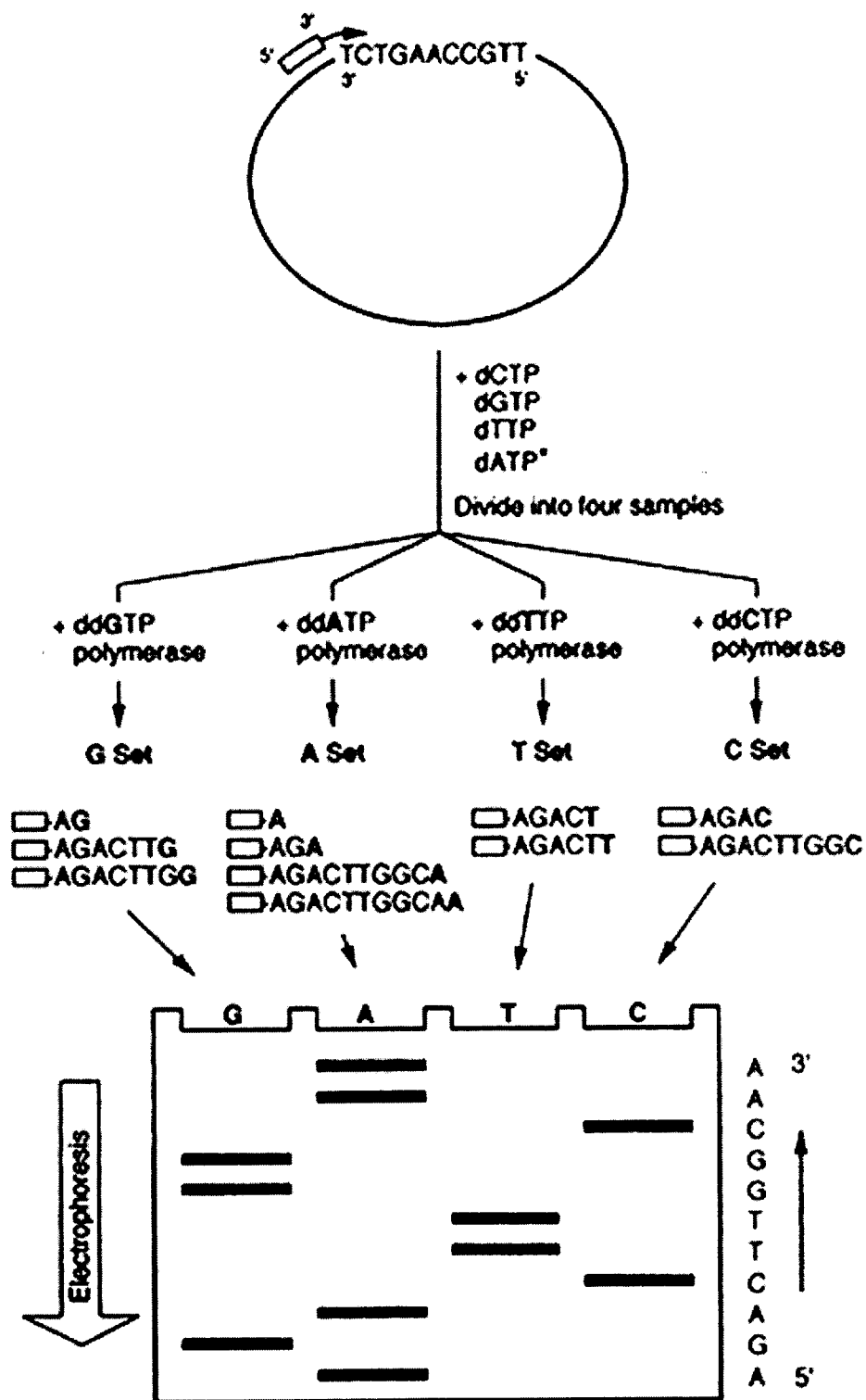


ภาพที่ 8 โครงสร้างเบสที่พบในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

ที่มา: Watson และคณะ (2004)

1) การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ กระทำได้ 2 วิธี คือวิธีของ Sanger และคณะ ปี 1977 โดยวิธีทางเอนไซม์หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า chain-termination method และวิธีทางเคมี (chemical degradation method) ของ Maxam และ Gilbert ปี 1977 (Wilson and Mardis, 1997) ซึ่งอาศัยหลักการอย่างเดียวกัน คือ การแยกดีเอ็นเอที่ต้องการหาลำดับเบสออกเป็นสายเดี่ยว ตัดหรือทำลายดีเอ็นเอให้ขาดตรงเบสหนึ่งเบสใดในสี่เบสอย่างจำเพาะ นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลโพลีอะครีลาไมด์ และอ่านผลจากการติดฉลากสายดีเอ็นเอด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (radioactive labeling) หรือสารเรืองแสง (fluorescent tagging) แต่วิธีการที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายนั้นคือวิธีของ Sanger โดยกระบวนการหาลำดับเบสประกอบด้วย 4 ปฏิกิริยาซึ่งแยกกันทำใน 4 หลอดทดลอง (A, T, C และ G) ทุกหลอดมีองค์ประกอบที่เหมือนกันคือ ดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว (single-stranded DNA template), ไพรมอร์, เอนไซม์ DNA polymerase และไดออกซินิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate) ทั้งสี่ชนิด คือ dATP, dTTP, dCP และ dGTP โดยมีชนิดใดชนิดหนึ่งติดด้วยสารกัมมันตภาพรังสี และแต่ละปฏิกิริยามีไม่เหมือนกันคือ ไดออกซินิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต [dideoxynucleotide triphosphate; ddATP (หลอด A), ddTTP (หลอด T), ddCTP (หลอด C), ddGTP (หลอด G)] (Micklos and Freyer, 2003)

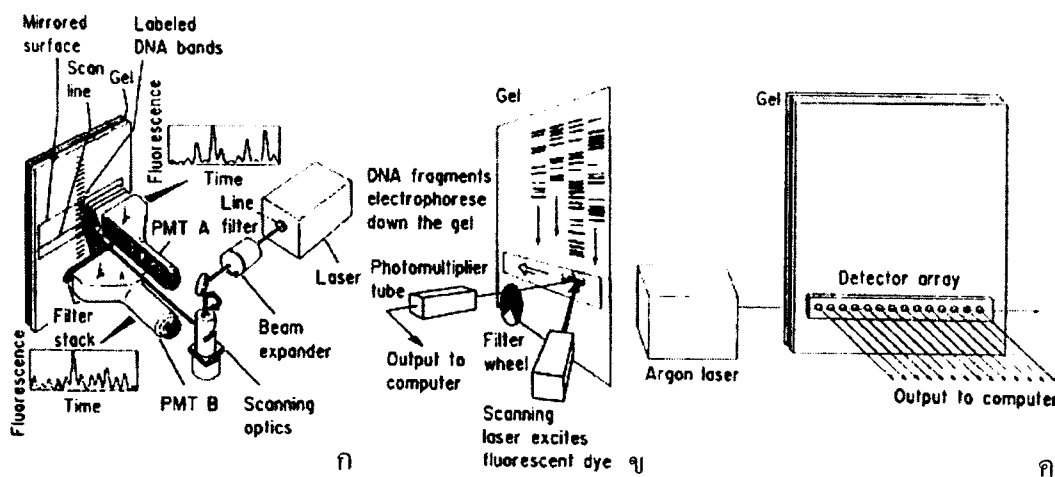
เมื่อเริ่มปฏิกิริยา กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จะเกิดขึ้นโดยการเติมนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้าทางด้าน 3' ของไพรเมอร์ จนกระทั่งถึงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่จะถูกนำเข้าไปเป็นได้ทั้งไดออกซินิวคลีโอไทด์หรือไดไดออกซินิวคลีโอไทด์ หากเอนไซม์ใช้ไดออกซินิวคลีโอไทด์ กระบวนการสังเคราะห์ก็สามารถเกิดต่อไปได้ แต่ถ้าไดไดออกซินิวคลีโอไทด์ถูกใช้ในตำแหน่งนี้ การสังเคราะห์จะไม่สามารถเกิดต่อไปได้ เนื่องจากตำแหน่ง 3' ของไดไดออกซินิวคลีโอไทด์ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-HO) หลังจากครบกำหนดการทำปฏิกิริยา ในแต่ละหลอดจะมีดีเอ็นเอสายใหม่จำนวนมากที่มีความยาวแตกต่างกัน เมื่อนำมาแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสและทำออโตเรดิโอกราฟี (autoradiography) แล้ว จะได้แถบสีดำปรากฏบนฟิล์มเอกซเรย์ ซึ่งสามารถอ่านลำดับเบสโดยเริ่มจากด้านล่างของแผ่น (ปลาย 5') เรียงขึ้นไปเรื่อยๆ (ปลาย 3') ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 การหาลำดับเบสโดยวิธีทางเอนไซม์

ที่มา: Volckaert และคณะ (1993)

เนื่องจากความสนใจในการศึกษาลำดับเบสของดีเอ็นเอถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายจึงได้มีการพัฒนาเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automated DNA sequencer) เพื่อความสะดวก รวดเร็ว และเพิ่มความสามารถในการหาลำดับเบส โดยอาศัยหลักการหาลำดับเบสแบบวิธีเอนไซม์ซึ่งใช้สารเรืองแสงติดฉลากไว้ที่ไดค็อกซินิวคลีโอไทด์ แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี โดยตรวจจับและวิเคราะห์ช่วงคลื่นของการเรืองแสงเมื่อขึ้นดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงเคลื่อนตัวผ่านลำแสงเลเซอร์ (ภาพที่ 10) และสามารถวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วย โดยเบส A มีสีเขียว, เบส T มีสีแดง, เบส C มีสีน้ำเงิน และ เบส G มีสีเหลือง (Micklos and Freyer, 2003) ทำให้มีการแสดงลำดับเบสในรูปกราฟแบบ real-time



ภาพที่ 10 การตรวจจับช่วงคลื่นของการเรืองแสงแบบ real-time ของเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติระบบต่างๆ

ก Genesis2000, Dupont de Nemours and Company, Inc.

ข ABI373A, Applied Biosystems Inc.

ค A.L.F., Pharmacia-LKB AB

ที่มา: Volckaert และคณะ (1993)

2) การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ เป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งสำหรับงานวิจัยทางชีวโมเลกุล โดยเฉพาะกับดีเอ็นเอสายใหม่ที่เพิ่งทราบลำดับเบส การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอทำให้ทราบถึงบริเวณที่มีรหัสสำหรับการสร้างโปรตีน บริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีน นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสโดยเปรียบเทียบ (alignment) ลำดับเบส

บนดีเอ็นเอสายใหม่กับลำดับเบสของสายดีเอ็นเออื่น ทำให้ทราบถึงบริเวณที่เป็น homologous sequence ซึ่งเป็นลำดับเบสที่มีความคล้ายคลึงกัน สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกและบ่งชี้ชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ วิธีการที่ใช้ในการหาความคล้ายคลึงกันระหว่างดีเอ็นเอสองสายมีหลายวิธี เช่น วิธี dot matrix, dynamic programming และ hidden markov model เป็นต้น (ซิเน และประสิทธิ์, 2544) การเปรียบเทียบลำดับเบสที่สนใจกับลำดับเบสของดีเอ็นเออื่นทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database) นั้นมีการพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อการวิเคราะห์ โปรแกรมที่เป็นที่รู้จัก โปรแกรมหนึ่งคือ blastn เป็นโปรแกรมที่อยู่ในกลุ่มของโปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) สามารถใช้งานผ่านทางอินเทอร์เน็ต โดยใช้อินเทอร์เน็ตเบราว์เซอร์เชื่อมต่อไปยังเว็บไซต์ที่ให้บริการคือ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> ซึ่งพัฒนาโดย National Center for Biotechnology Information (NCBI) ประเทศสหรัฐอเมริกา จากการที่มีข้อมูลลำดับเบสเพิ่มมากขึ้นในฐานข้อมูลทำให้มีความต้องการที่จะเปรียบเทียบลำดับเบสหลายสายในคราวเดียวกัน (multiple sequence alignment) โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์มีหลายโปรแกรมโดยโปรแกรมชุดหนึ่งซึ่งเป็นที่รู้จักคือ CLUSTAL ซึ่งคิดค้นและพัฒนาโดยนักวิจัยจาก European Molecular Biology Laboratory (EMBL) ประเทศเยอรมนี สามารถใช้งาน ClustalW ผ่านทางอินเทอร์เน็ตเชื่อมต่อไปยังเว็บไซต์ the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) โดยสามารถวิเคราะห์ (align) ได้สูงสุด 100 sequence ซึ่งข้อมูลทางชีวสารสนเทศถูกเก็บรวบรวมอย่างเป็นระบบโดย 3 องค์กรหลัก คือ GenBank (NCBI), EMBL สหภาพยุโรป และ DNA Database of Japan (DDBJ) ประเทศญี่ปุ่น

2.2.3 การศึกษาการจัดจำแนกเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

Cobb และ Clarkson (1993) ได้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *M. anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลต และ *M. flavoviride* จำนวน 2 ไอโซเลต ด้วยวิธีการ RAPD-PCR ซึ่งเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ (10-mer PCR primer) แบบ arbitrary 8 ชนิด คือ OPA01, OPA04, OPA05, OPA08, OPA09, OPA10, OPA16 และ OPA19 จากการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิดสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ *Metarhizium* spp. ทั้ง 12 ไอโซเลตได้ และมีขนาดระหว่าง 0.3-2.7 กิโลเบส โดยมีขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต และจากการวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถจัดกลุ่มและความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งแยกเชื้อ *M. anisopliae* จำนวน 9 ไอโซเลต จาก 10 ไอโซเลต ออกจาก 2 ไอโซเลต ของเชื้อ *M. flavoviride* ได้ แต่เชื้อ *M. anisopliae* อีก 1 ไอโซเลต มีความคล้ายคลึงสูงกับกลุ่มของ *M. flavoviride*

นอกจากวิธีการ RAPD แล้ว วิธีการทางชีวโมเลกุลที่นิยมอีกวิธีการหนึ่งในการจัดจำแนก บ่งชี้ และศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการทางพันธุกรรมได้นั้นคือ การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ ตัวอย่างเช่นในการศึกษาของ Curran และคณะ (1994) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ *Metarhizium* โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของไรโบโซมอลดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ซึ่งเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ TW81 และ AB28 พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (PCR product) ที่ได้มีขนาดประมาณ 601 คู่เบส และเมื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสสามารถจัดจำแนกเชื้อราสกุลนี้ได้เป็น 3 ชนิด คือ *M. anisopliae*, *M. flavoviride* และ *M. album* และมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแยกออกเป็นสองสายคือ *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* / *M. album* ซึ่งภายในวิวัฒนาการของเชื้อ *M. anisopliae* แยกได้ออกเป็นสองกลุ่ม นอกจากนี้เชื้อ *M. anisopliae* จากประเทศนิวซีแลนด์ (ไอโซเลต FI698, FI699 และ FI702) จัดไปอยู่ในกลุ่มของ *M. flavoviride* และ *M. album*

Driver และคณะ (2000) ได้ศึกษาการจัดจำแนกเชื้อ *Metarhizium* โดยอาศัยการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้อมูลลำดับเบสของไรโบโซมอลดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 (ตามวิธีการของ Curran et al., 1994) และบริเวณ domain three (D3) ของ 28S rDNA ซึ่งเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ D3A และ D3B ร่วมกับรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ RAPD-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มชุด H (OP-H01 และ OP-H02) และชุด F (OP-F06, OP-F07, OP-F08 และ OP-F09) จากเชื้อ *Metarhizium* จำนวน 123 ไอโซเลต ผลการศึกษาพบว่าเชื้อดังกล่าวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ซึ่งเหมาะสมที่สุดต่อการแยกระดับชนิดและสายพันธุ์ โดยข้อมูลลำดับเบส และรูปแบบ RAPD มีความสัมพันธ์กับข้อมูลลำดับเบสและแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายที่สูงมากมีประโยชน์สำหรับการทำให้แตกต่างในระดับสายพันธุ์ จึงได้มีการปรับปรุงการจัดจำแนกเชื้อ *Metarhizium* ขึ้นมาใหม่ จากการทำ cladogram โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสแสดงให้เห็น 10 clades ซึ่งเชื้อ *M. anisopliae* มี 4 clades คือ *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* และอีก 2 varieties ใหม่ คือ *M. anisopliae* var. *lepidiotum* และ *M. anisopliae* var. *acridum* vars nov., เชื้อ *M. album* มี 1 clade, ส่วนเชื้อ *M. flavoviride* มี 5 clades คือ *M. flavoviride* var. *flavoviride* และ *M. flavoviride* var. *minus* สำหรับอีก 3 clades พบ 2 varieties ใหม่ คือ *M. flavoviride* var. *novazealandicum* และ *M. flavoviride* var. *pemphigum* vars nov. และอีก 1 clade คือ *M. flavoviride* Type E มี 2 ไอโซเลต ซึ่งยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Choi และคณะ (2003) ได้ศึกษาถึงการบ่งชี้เชื้อ *Metarhizium* sp. KMA-1 ที่เข้าทำลายตัวอ่อนคั่ว *Protaetia brevitarsis seulensis* ในประเทศเกาหลี โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสในส่วน ของ 28S rDNA บริเวณ D3 โดยใช้ไพรเมอร์ D3A และ D3B และบริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1

และ ITS4 เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซโฟลิมเมอร์ส ผ่านกระบวนการโคลน ยีนโดยใช้พลาสมิด (plasmid) pGEM-T easy vector system แล้วนำไปหาลำดับเบสในบริเวณ ดังกล่าวของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบความเหมือน (identity) จากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม blastn พบว่าเชื้อราที่นำมาศึกษานี้บ่งชี้ชนิดได้เป็นเชื้อ *M. anisopliae* โดยข้อมูลลำดับเบสบริเวณ D3 ของ 28S rDNA ของเชื้อ *Metarhizium* sp. KMA-1 (GenBank accession number; AY237118) มีค่าความเหมือนกับเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* (accession number; AF218207) เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ และข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS ของเชื้อ *Metarhizium* sp. KMA-1 (accession number; AY237119) มีค่าความเหมือนกับเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* (accession number; AF135216) เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์

สำหรับ Destefano และคณะ (2004) ได้ศึกษาถึงการออกแบบไพรเมอร์ที่ เฉพาะเจาะจง (specific primer) เพื่อการวินิจฉัยและบ่งชี้เชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ที่ทำลาย หนอนเจาะลำต้นอ้อย (*Diatraea saccharalis*) โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ *M. anisopliae*, *M. album* และ *M. flavoviride* และใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยปฏิกิริยาถูกลูโซโฟลิมเมอร์ส ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 540 คู่เบส ใน ไอโซเลต E_g, B/Vi และ C ของเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* จากประเทศบราซิล, 600 คู่เบส ใน *M. anisopliae* var. *anisopliae* 14 จากประเทศออสเตรเลีย, 650 คู่เบส ใน *M. album* 201 [Agricultural Research Service of Entomopathogenic Fungi (ARSEF) 2082] และ 600 คู่เบส ใน *M. flavoviride* 204 (ARSEF 2024) และ 209 (ARSEF 2133) แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Afa* I, *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hpa* II และ *Sau* 3A พบว่ารูปแบบ PCR-RFLP ที่ได้มีความแตกต่างกัน ระหว่างชนิดอย่างชัดเจน รวมทั้งเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของไรโบโซมอลดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 (ขนาดประมาณ 540 คู่เบส) ของเชื้อราไอโซเลตต่างๆ ดังกล่าว และเชื้อ *B. bassiana* ARSEF 959, ARSEF 2253 และ ARSEF 2629 ร่วมกับข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank คือ *M. anisopliae* var. *anisopliae* (accession numbers AF516295 และ AF134150), *M. album* (AF137067), *M. flavoviride* (AF138269) และ *B. bassiana* (BBA345090) ด้วยโปรแกรม ClustalW และนำมาทำ phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-joining ซึ่งสามารถยืนยันการจัดจำแนก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานได้และสอดคล้องกับข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank และจาก ข้อมูลลำดับเบสที่ได้นำมาออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* คือ ไพรเมอร์ (20 mer primer) ITSMet สำหรับไอโซเลต E_g, B/Vi และ C และไพรเมอร์ (18 mer primer) ITSMet14 สำหรับไอโซเลต 14 ซึ่งตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงโดยเปรียบเทียบกับข้อมูล ลำดับเบสใน GenBank, EMBL และ DDBJ เมื่อนำไพรเมอร์ ITSMet และ ITSMet14 มาเพิ่ม

ปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ *Metarhizium* spp. และ *B. bassiana* ไอโซเลตต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS4 เป็นไพรเมอร์ reverse พบว่า ไพรเมอร์ ITSMet/ITS4 ซึ่งออกแบบสำหรับไอโซเลต E_g, B/Vi และ C สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ได้ทุกไอโซเลต รวมทั้งไอโซเลต 14 แต่ไอโซเลตนี้มีความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอต่ำ และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 440 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ ITSMet14/ITS4 นั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะไอโซเลต 14 และมีขนาด 490 คู่เบส ซึ่งไพรเมอร์ทั้งสองชุดไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ *M. album*, *M. flavoviride* และ *B. bassiana* แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมานั้นมีความเฉพาะเจาะจงต่อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* และสามารถตรวจสอบเชื้อชนิดนี้ที่เข้าทำลายหนอนเจาะลำต้นอ้อยได้ภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งวิธีการทางชีวโมเลกุลสามารถนำมาวินิจฉัยและบ่งชี้เชื้อ *M. anisopliae* ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ME1 มีข้อมูลลำดับเบสของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ยาวประมาณ 8,118 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยบริเวณ 18S, 5.8S และ 28S รวมทั้งบริเวณ ITS และ IGS (Pantou et al., 2003) และจากการศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อ *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* ต่อความสัมพันธ์กับแมลงอาศัยและแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA แบบ parsimony พบว่าแบ่งออกเป็น 2 clade หลัก คือ *M. anisopliae* clade และ *M. flavoviride* clade และชี้ให้เห็นว่า *M. flavoviride* clade มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงอาศัยมากกว่า *M. anisopliae* ซึ่งแมลงอาศัยและแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์นั้นส่งเสริมวิวัฒนาการของเชื้อราสกุล *Metarhizium* อย่างไรก็ตาม แหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์มีอิทธิพลมากกว่าแมลงอาศัย (Kwong et al., 2004) สำหรับ Songpra และคณะ (2004) ได้ศึกษาการจัดจำแนกเชื้อ *P. oxalicum* ที่ทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับเชื้อ *M. flavoviride* ด้วยเทคนิค ARDRA โดยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ TW81 และ AB28 แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Hae* III, *Mse* I, *Msp* I และ *Tag* I พบว่ารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถแยกเชื้อ *P. oxalicum* ออกจากเชื้อ *M. flavoviride* อย่างชัดเจน แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างไอโซเลตของเชื้อที่อยู่ในแต่ละสกุลได้ และเมื่อนำข้อมูลลำดับเบสไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล EMBL พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ *P. oxalicum* (accession number AY213676) เท่ากับ 94.14 เปอร์เซ็นต์