

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจและรวบรวมเชื้อ *Metarhizium* spp.

1.1 การสำรวจและรวบรวม ตัวอย่างดินและตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อรา

สำรวจและรวบรวมตัวอย่างดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 17 จังหวัด คือ จังหวัด กาฬสินธุ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ มหาสารคาม มุกดาหาร ยโสธร ร้อยเอ็ด เลย ศรีสะเกษ สกลนคร สุรินทร์ หนองคาย อุดรธานี อุบลราชธานี และอำนาจเจริญ โดยการสุ่มเก็บตัวอย่าง สำหรับการเก็บตัวอย่างดินนั้นประยุกต์ตามวิธีการของ Bidochka และคณะ (1998) โดยกวาดเศษใบไม้ ออก ขุด และเก็บตัวอย่างดินลึกจากผิวหน้าดิน 10 เซนติเมตร ประมาณ 0.5 กิโลกรัม โดยบรรจุใส่ถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลของ สถานที่ วัน เดือน ปี และชนิดของพืชที่ปลูกบริเวณที่เก็บตัวอย่าง นำไปแยกหาเชื้อ *Metarhizium* spp. หากไม่ได้แยกหาเชื้อทันที ให้เก็บตัวอย่างดินไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการแยกหาเชื้อต่อไป ส่วนตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อราให้เก็บใส่กล่องพลาสติกใสขนาด 3x5.5x2 เซนติเมตร เพื่อนำไปแยกหาเชื้อ *Metarhizium* spp. ต่อไป โดยมีการปฏิบัติเพื่อรอการแยกหาเชื้อเช่นเดียวกับตัวอย่างดิน

1.2 การแยกหาเชื้อ *Metarhizium* spp.

1.2.1 ตัวอย่างดิน แยกหาเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยวิธีใช้เหยื่อล่อ (baiting technique) (ดัดแปลงตามวิธีการของ Bidochka et al., 1998; Davet and Rouxel, 2000) ด้วยการนำตัวอย่างดิน 150 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท แล้วปรับความชื้นในดินให้ได้ระหว่าง 75-85 เปอร์เซ็นต์ ตลอดช่วงของการทดลองด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ภาคผนวก ก) นำหนอนนก (yellow mealworm; *Tenebrio molitor*) วัย 3-5 จำนวน 5 ตัว ใส่ลงไปบนดินที่อยู่ในขวดด้วยปากกิบ ปิดฝาขวดให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส ไม่มีแสงสว่าง ตรวจสอบผลหลังจากบ่มทุกวันนาน 21 วัน เมื่อตรวจพบหนอนตายที่คาดว่าเกิดจากเชื้อรา ให้ย้ายหนอนที่ตายไปแช่ลงในสารละลาย sodium hypochlorite 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนาน 3 นาที วางซากหนอนลงใน moist chamber (ภาคผนวก ก) และบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลหลังจากบ่มเชื้อทุกวัน เมื่อเชื้อสร้างเส้นใยและคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ *Metarhizium* spp. ให้ปล่อยไว้จนกระทั่งเชื้อสร้างโคนเดี่ยว จึงนำไปแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

1.2.2 ตัวอย่างแมลง นำตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อรา หรือคาดว่าตายเนื่องจากเชื้อรามาแยกหาเชื้อ หากพบโคนิเดีย ของเชื้อบนตัวอย่างให้นำมาตรวจสอบและวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อหาเชื้อ *Metarhizium* spp. สำหรับตัวอย่างที่พบเฉพาะเส้นใย และคาดว่าจะเป็เชื้อ *Metarhizium* spp. หรือตัวแมลงที่คาดว่าตายด้วยเชื้อราให้นำมาทำ moist chamber และปฏิบัติต่อไปเช่นเดียวกับการแยกเชื้อราจากดินโดยวิธีใช้เหยื่อล่อ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จึงนำไปวินิจฉัยในเบื้องต้นหาเชื้อ *Metarhizium* spp. (ในข้อ 1.2.1 และ 1.2.2) ในทุกกรณีที่พบว่าเป็นเชื้อ *Metarhizium* spp. จะมีการนำไปทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ต่อไป

1.3 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์

หลังจากแยกเชื้อราจากตัวอย่างดังกล่าวข้างต้นแล้ว (ในข้อ 1.2.1 และ 1.2.2) เมื่อเชื้อเจริญจนสร้างเส้นใยหรือโคนิเดียบนตัวหนอนนกหรือตัวอย่างแมลง ให้ใช้เข็มเย็บย้ายเส้นใยเชื้อราหรือใช้ลูป (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะสปอร์ว่างลงหรือ streak บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ข) ที่มี streptomycin จำนวน 0.5 กรัมต่อลิตร เพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากโคนิเดียเดี่ยวๆ โดยการทำ single spore isolation (ภาคผนวก ก) แล้วจึงเพิ่มปริมาณเชื้อ เพื่อใช้ในการบ่งชี้และทดลองต่อไป

1.4 การเก็บรักษาเชื้อ

เก็บรักษาโดยวิธีย้ายเชื้อที่คาดว่าจะเป็เชื้อ *Metarhizium* spp. ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วลงในหลอดอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) (ภาคผนวก ข) จึงเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 14 และ 28 องศาเซลเซียส เพื่อความสะดวกในการนำออกมาศึกษาลักษณะต่างๆ ทางสัณฐานวิทยาและทางชีวโมเลกุล เพื่อการบ่งชี้สกุล (genus) และชนิด (species) ของเชื้อที่ถูกต้อง และเพื่อการนำไปศึกษาทดลองต่อไป

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตของเชื้อ *Metarhizium* spp.

เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้ว จึงนำเชื้อที่ได้มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร Sabouraud dextrose agar ที่เติม yeast extract (SDAY) (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 7-14 วัน ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

โดยการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ทั้งจาก ขนาดรูปร่าง และลักษณะ รวมทั้งสีของโคนิเดีย ด้วยการทำ wet mount หรือ direct mounting technique โดยใช้ PVLG mountant (ภาคผนวก ค) เป็ mounting media ตรวจดูที่กำลังขยาย 400 เท่า บันทึก

รายละเอียดต่างๆ ของเชื้อ *Metarhizium* spp. และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ สำหรับการแบ่งกลุ่มขนาดโคโคนั้นได้แสดงไว้ในภาคผนวก ง

2.2 การศึกษาลักษณะและการเจริญเติบโตของเชื้อ

ศึกษาลักษณะโคโคนีของเชื้อทั้งจาก ขนาด สี ลักษณะของโคโคนี และเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Metarhizium* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDAY โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดบริเวณที่เชื้อเจริญเติบโตในระดับเส้นรอบวงเดียวกันมาวางลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ไอโซเลต (isolate) ละ 3 ขั้ว แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างตลอดระยะเวลาของการทดลอง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโคนีทุก 7, 14 และ 21 วัน หลังจากการบ่มเชื้อ บันทึกรายละเอียดต่างๆ และถ่ายภาพ

3. การศึกษาความสามารถและประสิทธิภาพของเชื้อ *Metarhizium* spp.

3.1 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์

นำเชื้อบริสุทธิ์จากข้อ 1.3 มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร SDAY บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดบริเวณที่เชื้อเจริญเติบโตในระดับเส้นรอบวงเดียวกันมาวางลงบนอาหารทดสอบแต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการทดสอบ โดยทำไอโซเลตละ 3 ขั้ว และเปรียบเทียบการสร้างเอนไซม์ของเชื้อโดยคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) จากอัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโคนีต่อเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (clear degradation zone) ที่เกิดจากการย่อยสลายซับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์ (Rosato et al., 1981 cited after Samuels et al., 1989) ของการทดสอบเอนไซม์ทุกชนิด โดยอาหารทดสอบดัดแปลงตามวิธีการของ Hankin และ Anagnostakis (1975) และ Saksirirat และ Hoppe (1991) ซึ่งการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แต่ละชนิดนั้น มีดังนี้

3.1.1 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ protease บนอาหาร SDA ที่มี gelatine 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน และตรวจสอบการทำให้เกิดวงใสโดยเทสารละลายอิมัว ammonium sulphate ให้ท่วมผิวหน้าอาหารทดสอบ นาน 60 นาที แล้วจึงเทสารละลายออก

3.1.2 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ lipase ทดสอบบนอาหารวุ้นที่ประกอบด้วย glycerol tributyrat 1 เปอร์เซ็นต์, NaCl 1 เปอร์เซ็นต์, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จะเกิดวงใสเมื่อเอนไซม์สามารถย่อยสลายไขมันได้

3.1.3 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase เลี้ยงเชื้อบนอาหาร sabouraud dextrose broth (SDB) (ภาคผนวก ข) ที่มี colloidal chitin 2.4 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นกรองเส้นใยด้วยกระดาษกรอง (Whatman® เบอร์ 1) แล้วดูส่วน

น้ำใสจำนวน 0.1 มิลลิลิตร หยดลงในหลุมที่เจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร บนอาหาร SDA ที่มี colloidal chitin 2.4 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ตรวจสอบการเกิดวงใสโดยเทสารละลาย congo red 0.1 เปอร์เซ็นต์ ใน ethanol 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ให้ท่วมผิวหน้าอาหารทดสอบ นาน 60 นาที แล้วเทสารละลาย congo red ออก

3.2 การเปรียบเทียบการผลิตมวลชีวภาพของเชื้อ

นำเชื้อ *Metarhizium* spp. จำนวน 18 ไอโซเลต จากข้อ 1.3 ซึ่งเป็นตัวแทนไอโซเลตที่สุ่มเลือกได้ (ภาคผนวก ง) มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร SDAY บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จึงนำไปทดสอบเพื่อผลิตมวลชีวภาพของเชื้อด้วยอาหารต่างกันคือ

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดบริเวณที่เชื้อเจริญเติบโตในระดับเส้นรอบวงเดียวกันมาวางลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด คือ PDA, SDA, SDAY, fungus agar (FA) และ yeast malt extract (YM) (ภาคผนวก ข) ไอโซเลตละ 3 ขั้ว บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีที่มีอายุ 14 วัน

3.2.2 เมล็ดธัญพืช (ดัดแปลงตามวิธีการของ ศิวาลัย และคณะ, 2545) โดยนำเมล็ดข้าวฟ่างจำนวน 75 กรัม ผสมกับน้ำประปาที่ดั่งทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ chlorine ระเหยออกไป ปริมาตร 75 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดบริเวณที่เชื้อเจริญเติบโตในระดับเส้นรอบวงเดียวกัน จำนวน 1 ชิ้น มาวางลงบนข้าวฟ่าง ไอโซเลตละ 3 ขั้ว แล้วเขย่าขวดทันที บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส นานประมาณ 15 วัน จนกว่าจะพบมีการสร้างโคนิเดียทุกไอโซเลต จึงนำไปตรวจนับโคนิเดียโดยใช้ haemocytometer (ภาคผนวก ก)

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายแมลงของเชื้อ

สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพในการทำให้เกิดโรคของเชื้อนั้นดัดแปลงตามวิธีการของ Hartwig และ Oehmig (1992) และ Lezama-Gutierrez และคณะ (2000) ซึ่งมีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการทดลองดังนี้

3.3.1 เชื้อรา นำเชื้อ *Metarhizium* spp. จำนวน 18 ไอโซเลต ซึ่งเป็นตัวแทนไอโซเลตที่สุ่มเลือกได้ (ภาคผนวก ง) มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร SDAY บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน จากนั้นนำมาทำสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อแต่ละไอโซเลต โดยเทสารละลาย Tween 80®

0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร ขูดเอาโคนิเดียออกจากจานอาหารด้วยสไลด์แก้วที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขูดผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเบาๆ เพื่อให้โคนิเดียของเชื้อหลุดออกมาในสารละลาย กรองสารแขวนลอยโคนิเดียใส่ในขวดแก้วผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทั้งนี้ทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราที่ได้แต่ละไอโซเลตนี้ไปตรวจนับหาปริมาณความเข้มข้นของโคนิเดียด้วยการใช้ haemocytometer และปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแขวนลอยโคนิเดียที่นำมาทดสอบเท่ากับ 1×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก)

3.3.2 แมลงทดสอบ ใช้หนอนนกเป็นแมลงทดสอบ โดยเฉพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนนกด้วยอาหารเลี้ยงไก่ไข่ในกล่องพลาสติกที่มีฝาเป็นตาข่าย ขนาด 15x20x9 เซนติเมตร ที่ห้องเลี้ยงแมลง ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส)

3.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ โดยจุ่มหนอนนกวัย 5 จำนวน 10 ตัวต่อซ้ำ ในสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อแต่ละไอโซเลตที่เป็นตัวแทน ตามข้อ 3.3.1 นาน 5 วินาที หลังจากปลูกลูกเชื้อ ย้ายหนอนลงในจานทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่มีกระดาษกรอง ให้ความชื้นที่กระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทุกไอโซเลตทำ 3 ซ้ำ ส่วนกรรมวิธีควบคุม (control) จุ่มหนอนนกในสารละลาย Tween 80® 0.05 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ไม่ให้แสงสว่าง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่กระดาษกรองเพื่อเพิ่มความชื้นและตรวจการตายของหนอนทุกวัน หนอนนกที่ตายนำไปทำการฆ่าเชื้อที่ผิว แล้วนำมาวางลงใน moist chamber บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปรากฏเส้นใยที่คาดว่าเป็นเส้นใยของเชื้อ *Metarhizium* spp. นำไปทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ตามข้อ 1.3 แล้วตรวจวินิจฉัยเชื้อโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นชนิดเดียวกับที่ปลูกลูกเชื้อให้หรือไม่ เพื่อนำไปหาเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงจากเชื้อราที่ปลูกลูกให้

4. การบ่งชี้ชนิดและการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA

4.1 การเตรียมเชื้อ นำเชื้อ *Metarhizium* spp. จำนวน 18 ไอโซเลต ซึ่งเป็นตัวแทนไอโซเลตที่สุ่มเลือกได้ (ภาคผนวก ง) มาเลี้ยงบน slant อาหาร SDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน คุดอาหาร SDB จำนวน 1,000 ไมโครลิตร (μ l) เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้เข็มเย็บที่ทนไฟฆ่าเชื้อแล้วขูดเพื่อให้ได้สารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อ คุดสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อที่ได้จำนวน 300 ไมโครลิตร ไป spread บนอาหาร PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ใช้แผ่นสไลด์แก้วที่ทนไฟฆ่าเชื้อแล้วขูดเอาเส้นใยของเชื้อที่เจริญขึ้นมาเก็บใส่หลอดไมโคร

เซนตริฟิวจ์ (micro centrifuge tube; ขนาด 1.5 มิลลิลิตร) แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

4.2 การเตรียมดีเอ็นเอ นำเส้นใยของเชื้อแต่ละไอโซเลตที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 มาสกัดดีเอ็นเอ โดยนำไปบดให้ละเอียดในโกร่งที่เติม nitrogen เหลว แล้วเติม extraction buffer (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้ส่วนผสมเข้ากัน ดูปใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ โดยการกลับขึ้นลง นาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใส (supernatant) ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 0.7 เท่า ของส่วนน้ำใส โดยค่อยๆ ผสมด้วยการกลับหลอดขึ้นลง นาน 5 นาที จะพบดีเอ็นเอเป็นสายสีขาว ชุ่ม เก็บตะกอนดีเอ็นเอโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อให้การล้างตะกอนดีเอ็นเอดีขึ้น นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง (ล้างตะกอนด้วยวิธีเดียวกันนี้จำนวน 3 ครั้ง) แล้วเปิดฝาหลอดไว้ ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จึงนำไปละลายด้วย TE buffer (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร จากนั้นหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ โดยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (ภาคผนวก ก) แล้วจึงวิเคราะห์คุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) (ภาคผนวก ก) เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA ด้วยเทคนิค PCR นำดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่ได้จากข้อ 4.2 เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA; rDNA) บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ 5.8S ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) โดยการใช้ไพรเมอร์ (primer) TW81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') และ AB28 (5'-ATATGCTTAAGTT CAGCGGGT-3') (Curran et al., 1994) ซึ่งในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 40 นาโนกรัม (ng) ต่อไมโครลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร, ดิออกซินิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate; dNTP) (dNTP mix; Bioline USA Inc.) 100 มิลลิโมลาร์ (mM) จำนวน 2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ DNA polymerase (IMMOLASE™ DNA Polymerase; Bioline USA Inc.) 5 ยูนิต (unit) ต่อไมโครลิตร จำนวน 0.1 ไมโครลิตร, 10X ImmoBuffer จำนวน 2.5 ไมโครลิตร, MgCl₂ 50 มิลลิโมลาร์ จำนวน 0.75 ไมโครลิตร และ

ไพรมเมอร์ TW81 และ AB28 10 ไมโครโมลาร์ (μM) อย่างละ 1 ไมโครลิตร ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ด้วย deionized H_2O แล้วนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems Inc.) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1: 95 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที, จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่ 2: 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที; 55 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที; 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที, จำนวน 30 รอบ

ขั้นที่ 3: 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที, จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่ 4: 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษา (hold) หากจำเป็น จนกว่าจะเอาผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ออก

ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

4.4 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 4.3 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เดิม stock solution A (3 โมลาร์ sodium acetate จำนวน 4 ไมโครลิตร และ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 100 ไมโครลิตร) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 104 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex mixer นาน 10 วินาที นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ระหว่างนี้นำมาผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนที่ได้ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย deionized H_2O ปริมาตร 6 ไมโครลิตร แล้วนำมาตรวจผลด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

4.5 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

4.5.1 การทำ cycle sequencing ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.5x Terminator Ready Reaction Premix (BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing RR-100; Applied Biosystems Inc.) จำนวน 4 ไมโครลิตร, 5x Sequencing buffer (BigDye Terminator v1.1, v.3.1) จำนวน 2 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ TW81 หรือ AB28 3.2 พิโคโมลาร์ (pmol), ดีเอ็นเอต้นแบบ (ผลิตภัณฑ์ PCR จากข้อ 4.4) ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ด้วย deionized H_2O จากนั้นผสมให้เข้ากันและหมุนเหวี่ยง (spin down) จึงนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler ตั้งค่าปริมาตรเท่ากับ 20 ไมโครลิตร และตั้งโปรแกรมดังนี้ 96 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (preheat) และ 96 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที,

50 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที, 60 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จำนวน 25 รอบ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

4.5.2 การทำผลิตภัณฑ์ extension ให้บริสุทธิ์ โดยนำผลิตภัณฑ์ extension ที่ได้จากข้อ 4.5.1 มาใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม stock solution B (125 มิลลิโมลาร์ EDTA จำนวน 2 ไมโครลิตร และ 3 โมลาร์ sodium acetate จำนวน 2 ไมโครลิตร) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เติม absolute ethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ระหว่างนี้นำมาผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง แล้วล้างตะกอนที่ได้ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใส่ทิ้ง ปลอ่ยให้ตะกอนผลิตภัณฑ์แห้งในที่มืด

4.5.3 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ นำตะกอน extension ที่ได้จากข้อ 4.5.2 มาละลายด้วยส่วนผสมของ deionized formamide : 2 มิลลิโมลาร์ EDTA ที่มี blue dextran (50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อัตราส่วน 5:1 ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที หลังจากนั้นแช่ลงในน้ำแข็งเตรียมไว้สำหรับนำเข้าเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ (automated DNA sequencer) (ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer; Applied Biosystems Inc.) โดยตรวจผลการอ่านลำดับเบสได้จากซอฟต์แวร์ (software) สำหรับ sequencing (data collection software, sequencing analysis software, sequence navigator และ autoassembler) จากเครื่องอ่านลำดับเบสอัตโนมัติ

4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส เพื่อบ่งชี้ชนิดของเชื้อรา โดยการนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากข้อ 4.5.3 มาเปรียบเทียบกับความเหมือน (identity) หรือความคล้ายคลึง (similarity) กับลำดับเบสของเชื้อราชนิดต่างๆ ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database) ของ GenBank ด้วยโปรแกรม blastn ซึ่งใช้งานผ่านทางอินเทอร์เน็ต โดยใช้อินเทอร์เน็ตเบราว์เซอร์เชื่อมต่อไปยังเว็บไซต์ที่ให้บริการคือ National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic relationship) ของเชื้อ *Metarhizium* spp. เริ่มจากการแก้ไขและเปลี่ยนรูปแบบของลำดับเบสให้อยู่ในรูปของ FASTA format โดยใช้โปรแกรม Chromas LITE (version 2.0) จากนั้นทำการเปรียบเทียบ (alignment) ลำดับเบสของเชื้อตัวแทนไอโซเลตกับลำดับเบสจากฐานข้อมูลของ GenBank ได้แก่ เชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* (accession number AF516295 และ AF134150), *M. anisopliae* var. *majus* (AF137060), *M. flavoviride* var. *flavoviride* (AF138269), *M. album* (AF137067) และ

Beauveria bassiana (AJ345090) ด้วยโปรแกรม ClustalX (version 1.83) และทำการแก้ไข alignment sequence โดยการใช้โปรแกรม BioEdit (version 5.0.6) แล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรมต่างๆ ใน PHYLIP package โดยใช้ Kimura-2-parameter model ในโปรแกรม dnadist เพื่อสร้าง distance matrix โดยภายใน distance matrix จะมีค่า distance ระหว่างลำดับเบสของแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบ สำหรับ distance matrix นี้สามารถนำมาสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-joining ด้วยโปรแกรม neighbor สำหรับค่าทางสถิติ (bootstrap) ได้จากการคำนวณ consensus tree จาก bootstrap tree data (resembling 100 ครั้ง) โดยโปรแกรม consensus