

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
คำอุทิศ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
3. ขอบเขตของการวิจัย	2
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	5
1. เชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	5
1.1 ประวัติการศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคแมลง	5
1.2 เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง	6
1.3 การนำเชื้อราที่ทำลายแมลงไปใช้ประโยชน์	9
1.4 ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	14
1.5 ผลกระทบของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. ต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม	19
2. การบ่งชี้เชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	22
2.1 การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	22
2.2 การใช้วิธีทางชีวโมเลกุล	27
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	41
1. การสำรวจและรวบรวมเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	41
1.1 การสำรวจ และรวบรวมตัวอย่างดินและตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อรา	41
1.2 การแยกหาเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	41
1.3 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์	42
1.4 การเก็บรักษาเชื้อ	42

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	42
2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์	42
2.2 การศึกษาลักษณะและการเจริญเติบโตของเชื้อ	43
3. การศึกษาความสามารถและประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	43
3.1 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์	43
3.2 การเปรียบเทียบการผลิตมวลชีวภาพของเชื้อ	44
3.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายแมลงของเชื้อ	44
4. การบ่งชี้ชนิดและการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	45
โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของไรโบโซมอลดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA	
4.1 การเตรียมเชื้อ	45
4.2 การเตรียมดีเอ็นเอ	46
4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA ด้วยเทคนิค PCR	46
4.4 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์	47
4.5 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ	47
4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส	48
บทที่ 4 ผลการทดลอง	51
1. การสำรวจและรวบรวมเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	51
2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	56
3. ความสามารถและประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	91
3.1 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์	91
3.2 การเปรียบเทียบการผลิตมวลชีวภาพของเชื้อ	95
3.3 ประสิทธิภาพในการทำลายแมลงของเชื้อ	97
4. การบ่งชี้ชนิดและการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	100
โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA	
4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA ด้วยเทคนิค PCR	100
4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสเพื่อบ่งชี้ชนิด	101
4.3 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	121

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	137
1. การสำรวจและรวบรวมเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	137
2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	137
3. การศึกษาความสามารถและประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	138
3.1 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์	138
3.2 การเปรียบเทียบการผลิตมวลชีวภาพของเชื้อ	139
3.3 การศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายแมลงของเชื้อ	140
4. การบ่งชี้ชนิดและการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	140
โดยอาศัยการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA	
4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ 5.8S rDNA ด้วยเทคนิค PCR	140
4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสเพื่อบ่งชี้ชนิด	141
4.3 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	141
บทที่ 6 ข้อเสนอแนะ	143
เอกสารอ้างอิง	145
ภาคผนวก	153
ภาคผนวก ก วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา	155
ภาคผนวก ข สูตรอาหารสำหรับการ แยก เลี้ยงเชื้อรา และศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์	165
ภาคผนวก ค สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีวโมเลกุล	171
ภาคผนวก ง หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกตัวแทนไอโซเลตของเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษา	177
ประวัติผู้เขียน	181

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การจัดกลุ่มเชื้อราและตัวอย่างเชื้อสกุลของเชื้อราที่สามารถเข้าทำลายแมลง	6
ตารางที่ 2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูจากเชื้อราที่ได้รับการจดทะเบียน และที่กำลังอยู่ระหว่างการพัฒนาเป็นการค้า	12
ตารางที่ 3 สาร secondary metabolite บางชนิดที่สำคัญและผลิตโดยเชื้อราที่เข้าทำลายแมลง	14
ตารางที่ 4 แมลงอาศัยของเชื้อ <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
ตารางที่ 5 ความคงทนของเชื้อ <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
ตารางที่ 6 ความสามารถของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. ในการทำให้เกิดโรคต่อ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล	17
ตารางที่ 7 การทดสอบความปลอดภัยของเชื้อ <i>Metarhizium anisopliae</i> ต่อสัตว์	21
ตารางที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>Metarhizium</i> ชนิดต่างๆ	24
ตารางที่ 9 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	28
ตารางที่ 10 เชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ ที่รวบรวมได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	51
ตารางที่ 11 การแบ่งกลุ่มตามขนาดโคนีเดียของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ	57
ตารางที่ 12 การเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ บนอาหาร SDAY	59
ตารางที่ 13 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ	91
ตารางที่ 14 การผลิตมวลชีวภาพของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	96
ตารางที่ 15 การผลิตมวลชีวภาพของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. ด้วยเมล็ดธัญพืช	97
ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. ในการทำลายหนอนนก	99
ตารางที่ 17 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ โดยการเปรียบเทียบ ลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA กับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank	102
ตารางที่ 18 ลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ได้ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA	130

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะของแมลงที่ตายด้วยเชื้อราชนิดต่างๆ	11
ภาพที่ 2 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i>	23
ภาพที่ 3 ลักษณะเชื้อ <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i>	25
ภาพที่ 4 ลักษณะเชื้อ <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	26
ภาพที่ 5 ลักษณะเชื้อ <i>Metarhizium flavoviride</i>	26
ภาพที่ 6 ลักษณะการเรียงตัวของ ribosomal RNA gene	30
ภาพที่ 7 ตำแหน่งของ internal transcribed spacer (ITS) ของ ribosomal RNA gene	31
ภาพที่ 8 โครงสร้างเบสที่พบในโมเลกุลของดีเอ็นเอ	33
ภาพที่ 9 การหาลำดับเบสโดยวิธีทางเอนไซม์	35
ภาพที่ 10 การตรวจจับช่วงคลื่นของการเรืองแสงแบบ real-time ของเครื่องหาลำดับเบส อัตโนมัติระบบต่างๆ	36
ภาพที่ 11 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 165	63
ภาพที่ 12 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 167	64
ภาพที่ 13 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 170	65
ภาพที่ 14 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 189	66
ภาพที่ 15 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 175	67
ภาพที่ 16 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 180	68
ภาพที่ 17 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 181	69
ภาพที่ 18 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 191	70
ภาพที่ 19 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 194	71
ภาพที่ 20 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 197	72
ภาพที่ 21 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 200	73
ภาพที่ 22 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 202	74
ภาพที่ 23 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 207	75
ภาพที่ 24 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 212	76
ภาพที่ 25 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 214	77
ภาพที่ 26 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 216	78
ภาพที่ 27 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 218	79

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 28 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 221	80
ภาพที่ 29 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 222	81
ภาพที่ 30 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 223	82
ภาพที่ 31 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 225	83
ภาพที่ 32 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 227	84
ภาพที่ 33 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 231	85
ภาพที่ 34 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 234	86
ภาพที่ 35 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 239	87
ภาพที่ 36 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 244	88
ภาพที่ 37 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 246	89
ภาพที่ 38 ลักษณะของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 247	90
ภาพที่ 39 ลักษณะของหนอนนกที่ถูกทำลายด้วยเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp.	98
ภาพที่ 40 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. เมื่อเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ TW81 และ AB28 ด้วยเทคนิค PCR	101
ภาพที่ 41 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 175 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (AF136376) จากฐานข้อมูลของ GenBank	103
ภาพที่ 42 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 180 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AY646393) จากฐานข้อมูลของ GenBank	104
ภาพที่ 43 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 181 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (AF516305) จากฐานข้อมูลของ GenBank	105
ภาพที่ 44 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 189 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (AY781698) จากฐานข้อมูลของ GenBank	106

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 45 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 191 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AY646372) จากฐานข้อมูลของ GenBank	107
ภาพที่ 46 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 194 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AY646373) จากฐานข้อมูลของ GenBank	108
ภาพที่ 47 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 200 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AJ608970) จากฐานข้อมูลของ GenBank	109
ภาพที่ 48 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 207 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AJ608970) จากฐานข้อมูลของ GenBank	110
ภาพที่ 49 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 212 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AY237118) จากฐานข้อมูลของ GenBank	111
ภาพที่ 50 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 214 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AY646369) จากฐานข้อมูลของ GenBank	112
ภาพที่ 51 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 218 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AJ608970) จากฐานข้อมูลของ GenBank	113
ภาพที่ 52 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 221 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AJ608970) จากฐานข้อมูลของ GenBank	114
ภาพที่ 53 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 225 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AY635457) จากฐานข้อมูลของ GenBank	115

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 54 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 234 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AJ608970) จากฐานข้อมูลของ GenBank	116
ภาพที่ 55 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 239 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (DQ150249) จากฐานข้อมูลของ GenBank	117
ภาพที่ 56 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 244 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AY237118) จากฐานข้อมูลของ GenBank	118
ภาพที่ 57 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 246 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> (AJ608970) จากฐานข้อมูลของ GenBank	119
ภาพที่ 58 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> sp. IPKKU 247 กับเชื้อ <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> (AF135210) จากฐานข้อมูลของ GenBank	120
ภาพที่ 59 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. ไอโซเลตต่างๆ กับลำดับเบสของเชื้อ <i>Metarhizium</i> spp. และ <i>Beauveria bassiana</i> จากฐานข้อมูลของ GenBank	122
ภาพที่ 60 ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA	129
ภาพที่ 61 Phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 rDNA โดยวิธี Neighbor-joining (majority rule) และค่าทางสถิติ (bootstrap; 100 replicates)	135