



รายงานการวิจัย
เรื่อง

ความหลากหลายทางชนิด การแพร่กระจาย ตัวอาศัย และสารซึ่งมีคุณสมบัติ
ทางยาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล Cordyceps (Clavicipitaceae)
ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ (ระยะที่ 2)
Species Diversity, Distribution, Hosts, and Medicinal Substances of
Entomopathogenic Fungi in the Genus Cordyceps (Clavicipitaceae)
in Doi Inthanon National Park, Chiang Mai Province (Phase II)

นายรุ่งเกียรติ แก้วเพชร
ดร.ศมาพร แสงยศ

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
2560
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต



รายงานการวิจัย
เรื่อง

ความหลากหลายทางชนิด การแพร่กระจาย ตัวอาศัย และสารซึ่งมีคุณสมบัติ
ทางยาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล Cordyceps (Clavicipitaceae)
ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ (ระยะที่ 2)
Species Diversity, Distribution, Hosts, and Medicinal Substances of
Entomopathogenic Fungi in the Genus Cordyceps (Clavicipitaceae)
in Doi Inthanon National Park, Chiang Mai Province (Phase II)

นายรุ่งเกียรติ แก้วเพชร
(คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต)
ดร.ศมาพร แสงยศ
(คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้)

มหาวิทยาลัยสวนดุสิต
2560
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสวนดุสิต
(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2559)

หัวข้อวิจัย	ความหลากหลายทางชนิด การแพร่กระจาย ตัวอาศัย และสารซึ่งมีคุณสมบัติทางยาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล <i>Ophiocordyceps</i> (<i>Hypocreales: Ophiocordycipitaceae</i>) ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ (ระยะที่ 2)
ผู้ดำเนินการวิจัย	นายรุ่งเกียรติ แก้วเพชร และ ดร.ศมาพร แสงยศ
ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชา ฉิมพลี
หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปี พ.ศ.	2560

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* (*Hypocreales: Ophiocordycipitaceae*) ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ ในจังหวัดเชียงใหม่ (ระยะที่ 2) โดยการสำรวจและรวบรวมตัวอย่าง ระบุชื่อวิทยาศาสตร์พบว่าส่วนใหญ่เป็น *Ophiocordyceps nutans* รองลงมาคือ *O.myrmecophila* และ *O.sphecocephala* ตามลำดับ ส่วน *O.irangiensis* และที่ไม่สามารถระบุชื่ออีก 3 สปีชีส์ คือ *Ophiocordyceps* sp.1 *Ophiocordyceps* sp.2 และ *Ophiocordyceps* sp.3 นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี single spore isolation และ tissue culture จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในอาหารวุ้นที่มีสูตรอาหาร อุณหภูมิ และ pH ต่าง ๆ เป็นเวลา 15-60 วันในที่มืด พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ทุกสปีชีส์เจริญได้ดีในอาหาร potato dextrose agar ที่อุณหภูมิ 25° C และที่ pH ในช่วง 5-6 และสามารถสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบเทียมได้ แต่ *O.nutans* ไม่พบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบเทียม เมื่อนำเชื้อ *Ophiocordyceps* มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร เชื้อด้วยเทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) ด้วยไพรเมอร์ REP และ ERIC เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ความเหมือนด้วย Dice's coefficient และจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) ที่ค่า similarity 0.80 พบว่าเทคนิค AFLP, Rep-PCR ไพรเมอร์ REP และ ERIC มีค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.95180, 0.95928 และ 0.85325 ตามลำดับ โดยผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP และ rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP ให้ผลสอดคล้องกัน ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระบบนิเวศของพื้นที่มีความหลากหลายแตกต่างกัน

Research Title	Species Diversity, Distribution, Hosts, and Medicinal Substances of Entomopathogenic Fungi, Genus <i>Ophiocordyceps</i> (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) in Doi Inthanon National Park, Chiang Mai Province (Phase II)
Researchers	Mr.Rungkiat Kawpet and Samaporn Saengyot, Ph. D.
Research Consultant	Asst.Prof.Witcha Chimphee, Ph.D.
Organizations	Faculty of Science and Technology Suan Dusit University Faculty of Agricultural Production Mae Jo University
Year	2017

The objectives of this project are to investigate the species diversity, distribution and hosts of the entomopathogenic fungi in the genus *Ophiocordyceps* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) in Doi Inthanon National Park, Chiang Mai Province (Phase II). The investigation was carried out by surveying and field collecting, found that, the majority specimens were identified as *O. nutans*, *O. myrmecophila* and *O. sphecocephala* respectively; a few specimens were identified as *O. irangiensis* and three specimens collected i.e. *Ophiocordyceps* sp.1, *Ophiocordyceps* sp.2 and *Ophiocordyceps* sp.3 could not be identified. All species were isolated as pure cultures by single spore isolation and tissue culture techniques. Each of the *Ophiocordyceps* cultures were tested for growth on various media, temperature and pH levels in the dark for 15-60 days. It was found that all of them except *O. nutans* grew well on potato dextrose agar at 25° C, pH 5-6 and pseudostroma were developed. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and the repetitive sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR) techniques were employed for the genetic diversity assessment among *Ophiocordyceps* isolates. The polymorphic bands were recorded and comparative analyzed. Similarity coefficients were calculated by using Dice's coefficient and the cluster analysis was calculated by using unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA). Based on AFLP analysis, *Ophiocordyceps* were identified by REP primer and ERIC primer analysis. The fitness of dendrograms was determined by cophenetic correlation (r). The matrix revealed high reliable values of these techniques at r-0.95180, 0.95928 and 0.85325 respectively. This results show that populations of *Ophiocordyceps* are highly diverse, geographical diverse conditions may have influence on this fungal variation.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องความหลากหลายทางชนิด การแพร่กระจาย ตัวอาศัย และสารซึ่งมีคุณสมบัติทางยาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) ในอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ (ระยะที่ 2) ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2559

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ประเมินผลและให้สนับสนุนโครงการวิจัยนี้ และขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชา ฉิมพลี คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ปรึกษางานวิจัย ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา ที่ให้ความเอื้อเอื้อในการแนะนำและอำนวยความสะดวก และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความอนุเคราะห์เวลาและสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ สถานที่ รวมทั้งการประสานงาน

ขอขอบพระคุณ ผู้ประสานงานห้องปฏิบัติการการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี (MJU Biological Control Laboratory: MJU-BCL) หลักสูตรอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ที่สนับสนุนการวิจัย

คณะผู้วิจัย

2560

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 สมมติฐานการวิจัย	3
1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 เชื้อราโรคแมลงในสกุล <i>Ophiocordyceps</i>	6
2.2 เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	11
2.3 โปรแกรมจำลองการทดลอง AFLP (<i>In Silico</i> AFLP analysis) ของจีโนมจุลินทรีย์	12
2.4 เทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR)	13
2.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	16
3.1 ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล <i>Ophiocordyceps</i> ที่พบจากแมลงตามพืชต่าง ๆ ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ โดยคัดเลือกอาหารเทียมที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิด	16
3.2 ศึกษาลักษณะพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคแมลงสกุล <i>Ophiocordyceps</i> ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์	18
3.3 เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ	24

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	27
4.1 ผลการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล <i>Ophiocordyceps</i> ที่พบโดยคัดเลือกอาหารเห็ดที่เหมาะสมสำหรับ การเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิด	27
4.2 ศึกษาลักษณะพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโรค แมลงสกุล <i>Ophiocordyceps</i> ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์	29
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	36
5.1 สรุปผลการวิจัย	36
5.2 อภิปรายผล	37
5.3 ข้อเสนอแนะในการนำผลงานวิจัยไปใช้และการทำวิจัยครั้งต่อไป	39
บรรณานุกรม	40
บรรณานุกรมภาษาไทย	40
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	41
ภาคผนวก	45
ประวัติผู้วิจัย	55

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 อะแดปเตอร์และไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	21
4.1 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ <i>Ophiocordyceps</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ ห้อง ($27 \pm 2^{\circ} \text{C}$) เป็นเวลา 15-60 วัน	27
4.2 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ <i>Ophiocordyceps</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextroseagar บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 15-60 วัน	28
4.3 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ <i>Ophiocordyceps</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextroseagar ที่ pH ต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 15-60 วัน	29
4.4 เปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค In Silico AFLP-PCR โดยอาศัยฐานข้อมูลจีโนมเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> กับการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> ที่รวบรวมได้ด้วยเทคนิค AFLP	32
4.5 เปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> จำนวน 31 ไอโซเลต	32
4.6 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> ด้วยไพรเมอร์ REP และ ERIC	34
ก-1 คู่ไพรเมอร์ที่ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอในช่วง 200 แถบ เมื่อทดสอบในโปรแกรม In Silico	48
ก-2 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI และ MseI จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม In Silico AFLP-PCR amplification	49
ก-3 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> ตัดด้วยเอนไซม์ EcoRI และ TaqI จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม In Silico AFLP-PCR amplification	49
ก-4 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> ตัดด้วยเอนไซม์ PstI และ MseI จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม In Silico AFLP-PCR amplification	49
ก-5 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> ตัดด้วยเอนไซม์ PstI และ TaqI จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม In Silico AFLP-PCR amplification	50
ก-6 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ MseI จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม In Silico AFLP-PCR amplification	50
ก-7 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> ตัดด้วยเอนไซม์ HindIII และ TaqI จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม In Silico AFLP-PCR amplification	50
ก-8 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> ตัดด้วยเอนไซม์ ApaI และ MseI จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม In Silico AFLP-PCR amplification	51
ก-9 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ <i>Ophiocordyceps</i> ตัดด้วยเอนไซม์ ApaI และ TaqI จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม In Silico AFLP-PCR amplification	51
ก-10 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากเทคนิค AFLP	51

ตารางที่	หน้า
ก-11 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากเทคนิค REP	52
ก-12 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากเทคนิค ERIC	54

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ลักษณะของหนอนผีเสื้อที่ถูกทำลายจากเชื้อรา <i>Ophiocordyceps sinensis</i> หรือที่เรียกว่า ถั่งเช่า (Dǒng-chóng-xià-cǎo)	9
2.2 แผนภาพการแพร่กระจายของเชื้อรา <i>Ophiocordyceps sinensis</i> ในเขตปกครองตนเองทิเบต ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน	10
2.3 เชื้อรา <i>Ophiocordyceps</i> ชนิดต่างๆ ที่เก็บตัวอย่างได้จากประเทศเนปาล ได้แก่ <i>O. gracilis</i> (a); <i>O. ishikariensis</i> (b); <i>O. liangshanensis</i> (c); <i>O. martialis</i> (d); <i>O. militaris</i> (e); <i>O. nutans</i> (f); <i>O. pruinosa</i> (g); <i>O. sinensis</i> (h); <i>O. sphecocephala</i> (i) และ <i>O. tricornis</i> (j) ตามลำดับ	10
2.4 ลักษณะส่วน stroma (A) สปอร์ (B) และ ascus (C) ของเชื้อรา <i>Ophiocordyceps</i> ที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา)	11
2.5 ขั้นตอนการเข้าทำลายแมลงและวงจรชีวิตของเชื้อรา <i>Ophiocordyceps sinensis</i>	11
3.1 แผนที่จุดที่พบเชื้อรา <i>Ophiocordyceps</i> spp. จากแมลงชนิดต่าง ๆ ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์	16
4.1 ผลการตรวจเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แพลตฟอร์มของสายพันธุ์เชื้อรา <i>Ophiocordyceps</i> จากการเพิ่มปริมาณยีน 16S-23S spacer ขนาด 470 คู่เบส (ลูกศรชี้) ช่องที่ 1-14, M: Middle range DNA marker	30
4.2 การกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค AFLP คำนวณด้วยโปรแกรมย่อย MxComp ของโปรแกรม NTSYS version 2.01d ผลคำนวณได้ค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.95180	33
4.3 การกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มของเทคนิค rep-PCR ด้วยไพรมเมอร์ REP คำนวณด้วยโปรแกรมย่อย MxComp จากโปรแกรม NTSYS version 2.01d ได้ค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.95928	34
4.4 การกระจายข้อมูลแบบ PCA ด้วยเทคนิค rep-PCR จากการใช้ไพรมเมอร์ REP คำนวณด้วยโปรแกรมย่อย Eigen ในโปรแกรม NTSYS version 2.	35

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

วินันท์ดา หิมะมาน และคณะ (2554, น.13) รายงานว่ามีเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง หรือ เชื้อราโรคแมลง (entomopathogenic fungi) มากกว่า 400 ชนิดในประเทศไทย ซึ่งรวมถึงเชื้อราในสกุล *Cordyceps* และ *Ophiocordyceps* ด้วย และ Sung *et al.* (2007, pp. 5-59) ได้ทำการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุล ทำการแยกวงศ์ Clavicipitaceae เสนอวงศ์ใหม่คือวงศ์ Ophiocordycipitaceae ทำการปรับชื่อวิทยาศาสตร์บางสกุล เช่น *Cordyceps* ให้เป็น *Ophiocordyceps* และเสนอสกุลใหม่ของเชื้อราในสกุล *Cordyceps* จากกลุ่มต่าง ๆ และรายงานว่าตั้งแต่ดั้งเดิมเชื้อราในสกุล *Cordyceps* ทั้งหมด ถูกจัดไว้ในวงศ์ Clavicipitaceae แต่จากการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลและความสัมพันธ์ทางการวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic relationships) ของกลุ่มอนุกรมวิธาน 162 กลุ่ม Sung *et al.* (2007, pp. 5-59) พบว่าวงศ์ Clavicipitaceae ประกอบด้วย 3 แขนงย่อยทางอนุกรมวิธาน (clades) จึงแก้ไขและแยกออกเป็น 3 วงศ์ คือ Clavicipitaceae, Cordycipitaceae พร้อมกับเสนอตั้งวงศ์ใหม่ขึ้นมาคือวงศ์ Ophiocordycipitaceae ซึ่งใช้เชื้อราโรคแมลงสาบ *Ophiocordyceps blattae* (Petch) Petch (1931) เป็นรูปแบบชนิด (type species) พร้อมปรับเชื้อราในสกุล *Cordyceps* หลายชนิด ให้ยังคงอยู่ในสกุล *Cordyceps* ในวงศ์ Cordycipitaceae แต่อีกหลายชนิด ย้ายไปอยู่ในสกุล *Ophiocordyceps* กับสกุลที่เสนอขึ้นมาใหม่ คือ *Elaphocordyceps* และให้อยู่ในวงศ์ Ophiocordycipitaceae กับเสนอ *Metacordyceps* ให้เป็นสกุลใหม่อีกสกุลหนึ่งอยู่ในวงศ์ Clavicipitaceae โดยทำให้ชื่อวิทยาศาสตร์ของเชื้อรา “ถั่งเช่า” ที่เคยมีการใช้คือ *Cordyceps sinensis* เปลี่ยนไปเป็น *Ophiocordyceps sinensis* กับทั้งได้จัดทำบัญชีรายชื่อที่เป็นที่ยอมรับ (accepted names) ของเชื้อราชนิดต่าง ๆ ในสกุล *Cordyceps*, *Elaphocordyceps*, *Metacordyceps* และ *Ophiocordyceps* พร้อมกันไปด้วยในรายงานดังกล่าว

ประเทศไทยเป็นแหล่งซึ่งมีความหลากหลายทางชนิดของเชื้อราโรคแมลงสูงแหล่งหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราโรคแมลงในวงศ์ Cordycipitaceae, Clavicipitaceae และ Ophiocordycipitaceae ใน Division (Phylum) Ascomycota และ อันดับ Hypocreales โดยในประเทศไทยมีรายงานเชื้อราโรคแมลงสกุล *Cordyceps* ในวงศ์ Cordycipitaceae และสกุล *Ophiocordyceps* ในวงศ์ Ophiocordycipitaceae เป็นสกุลที่พบมากที่สุด (สุชาติดา มงคลสัมฤทธิ์ และคณะ, 2553, น.163) กับมีรายงานการพบเชื้อรา *Cordyceps* spp. สามชนิด ลงทำลายหอนจักจั่น (cicada larvae) [ซึ่งที่ถูกต้องควรเป็นตัวอ่อนจักจั่น (cicada nymphs)] เป็นครั้งแรกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยพบที่อำเภอภูผินารายณ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ หนึ่งชนิด และอำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคามสองชนิด แต่มิได้ตั้งชื่อใหม่หรือแยกชนิดออกมา (Srivilai *et al.*, 2013, pp.587-595) ซึ่งอาจจะเป็น *Cordyceps cicadae* ที่พบในประเทศไทย (Hsu *et al.* 2015, p.432) หรือเป็นเชื้อราที่เรียกว่า cicada flower (*Cordyceps sobolifera*) ในอดีต หรือ *Ophiocordyceps sobolifera* (Zhu *et al.*, 2016, pp.619-627) ในปัจจุบันก็ได้

อนึ่งเชื้อราโรคแมลง *Ophiocordyceps* spp. หลายชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการเกษตร การแพทย์และเภสัชกรรม เช่นการใช้เป็นยาเชื้อ (microbial insecticides) ทั้งในรูปแบบสำเร็จ (formulations) และโดยการผลิตด้วยเทคโนโลยีพื้นบ้านอย่างง่าย สำหรับการควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่นเดียวกับเชื้อราขาว *Beauveria bassiana* เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* และ *Paecilomyces* spp. เป็นต้น (Copping, 2001, p.702) ส่วนด้านการแพทย์และเภสัชกรรม มีรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติทางยาของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Ophiocordyceps sinensis* (= *Cordyceps sinensis*) หรือเชื้อราที่รู้จักกันดีในชื่อ “ถั่งเช่า” (Dǒng-chóng-xià-cǎo หรือสั้นๆ คือ Chóng cǎo) บนตัวหนอนผีเสื้อกลางคืนในสกุล *Thitarodes* (Lepidoptera: Hepialidae) ที่เรียกว่า “ghost moth” ซึ่งมีรายงานว่ามีการนำเชื้อรานี้ได้มาใช้เป็นสมุนไพรจีนมาตั้งแต่ยุคจีนโบราณ (Jones, 1993) ในด้านข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ มีรายงานพบว่าเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* บางชนิด สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่มีฤทธิ์ทางยาและเภสัชกรรม ได้แก่ สาร cordycepin, ophiocordin, galactomannan และ polysaccharide ซึ่งเป็นสารชีวภาพที่สามารถตรวจพบได้จากส่วนก้านชูสปอร์ (fruiting body) ของเชื้อรา โดยหลังจากการทดสอบพบว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อการก่อเซลล์เนื้องอก (antitumor) ต่อด้านแบคทีเรีย (antibacterial) และต่อต้านเชื้อรา (antifungal) เป็นต้น (Jin et al., 1999, pp. 891-898) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *O. sinensis* ซึ่งเป็นชนิดที่พบทำลายหนอนผีเสื้อในสกุล *Thitarodes* ในพื้นที่สูงในแถบเขตปกครองตนเองทิเบต ประเทศจีน ที่มีรายงานอ้างถึงมูลค่าทางการตลาดซึ่งสูงมาก (Evans and Samson, 1982, pp.431-453) นอกจากนี้ยังมีรายงานอ้างว่ามีการตรวจพบกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acids) วิตามิน K วิตามิน B1 วิตามิน B2 และ วิตามิน B12 ในเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ด้วย (Holliday and Cleaver, 2008, pp.219-234) ดังนั้นเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* จึงนับว่าเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ทำให้ประโยชน์แก่มนุษย์ โดยเฉพาะด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

มีรายงานกล่าวอ้างเกี่ยวกับจำนวนชนิดและความหลากหลายของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* บางส่วนแล้วทั้งในและต่างประเทศ (สุชาติ มงคลสัมฤทธิ์ และคณะ, 2553, น.163; Evans and Samson, 1982, pp.431-453; Hywel-Jones, 1994, pp.939-942) แต่แม้กระนั้นก็ตามจากการที่ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งซึ่งมีความหลากหลายทางชนิดของจุลินทรีย์สูง อีกทั้งการมีแหล่งข้อมูลเกี่ยวกับการจำแนกชนิดเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. อย่างเป็นระบบซึ่งเพียงพอ สำหรับการศึกษาค้นคว้าเพื่อให้เกิดองค์ความรู้เพื่อการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ จึงได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ที่พบทำลายแมลงชนิดต่าง ๆ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบและรวบรวมได้ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ด้วยวิธีการที่เหมาะสม

1.2.2 ศึกษาลักษณะพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคแมลงสกุล *Cordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ในปีที่สองนี้ (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559) จะทำการศึกษาแนวทางการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารเทียมและจำแนกชนิด ตลอดจนศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับชีวโมเลกุลของเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบและรวบรวมได้

กลุ่มเป้าหมายที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ เกษตรกร ประชาชนโดยทั่วไปที่มีความสนใจ นักวิชาการและนักวิจัย ในหน่วยงานต่าง ๆ ที่ศึกษา วิจัยและทำงานเกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรชีวภาพ ด้านความหลากหลายทางชีวภาพ ทางเกษตร เช่น กรมส่งเสริมการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ทางการแพทย์ ภายใต้กระทรวงสาธารณสุข เช่น กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และกรมการแพทย์แผนไทย หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา รวมทั้งนิสิตและนักศึกษา และ สถาบันการศึกษาที่มีการเรียนการสอนที่เกี่ยวข้อง

1.4 สมมติฐานการวิจัย

เชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุลหนึ่งซึ่งมีความหลากหลายทางชนิดสูง อีกทั้งสามารถพบได้ในพื้นที่ประเทศไทยเป็นจำนวนกว่า 400 ชนิด ทั้งนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อรา *Ophiocordyceps* หลายชนิดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ โดยมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ที่มีฤทธิ์ทางยาและเภสัชกรรมบางชนิด ที่มีฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง ต่อต้านเชื้อรา และแบคทีเรีย ซึ่งก่อโรคกับมนุษย์ รวมทั้งการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์ เช่นสาร cordycepin สาร ophiocordin สาร galactomannan และสาร polysaccharide รวมทั้งอาจผลิตสารซึ่งอาจมีสรรพคุณทางยาอีกหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราที่ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ คือ “caterpillar fungus” หรือ *Ophiocordyceps sinensis* หรือ “ถั่งเช่า” ซึ่งพบในพื้นที่ซึ่งมีอากาศเย็นในพื้นที่สูงในแถบเทือกเขาหิมาลัย

แต่ทั้งนี้ยังมีเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ชนิดอื่น ๆ ที่สามารถตรวจพบที่สามารถผลิตสารชีวภาพดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นได้เช่นกันในประเทศไทย เช่น พื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่หนึ่งที่มีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรความหลากหลายทางชีวภาพ รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ อีกทั้งยังเป็นพื้นที่ซึ่งมีสภาพอากาศเย็น จึงน่าที่จะมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ซึ่งบางชนิดอาจมีการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีฤทธิ์ทางยาและเภสัชกรรม

1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

การแพร่กระจายเชิงพื้นที่ (Spatial distribution) หมายถึง รูปแบบการกระจายตัวหรือกระจุกตัว (การจัดเรียง) ของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งในพื้นผิวโลกและลักษณะภูมิศาสตร์ โดยเป็นไปตามปรากฏการณ์ธรรมชาติ (Wikipedia, 2014)

ถั่งเช่า (Chóng cǎo) หรือ ตั่งถั่งเช่า (Dōng chóng cǎo) หรือ ตั่งถั่งแห่เช่า (Dōng chóng xià cǎo) หมายถึง สมุนไพรจีน มีความหมายว่า “หญ้าหนอน” หรือ “ฤดูหนาวเป็นหนอน ฤดูร้อนเป็นหญ้า” เกิดจากหนอนผีเสื้อแถบที่ราบสูงทิเบต ที่จำศีลอยู่ใต้ดินในฤดูหนาว ถูกสปอร์ของเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* อาศัยเป็นปรสิตและเติบโตสร้างเส้นใยออกมาทางส่วนหัวของตัวหนอนในฤดูร้อน เชื้อราชนิดนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ophiocordyceps sinensis* (สารานุกรมเสรี, 2557)

เชื้อราโรคแมลง (Entomopathogenic fungi) หมายถึง เชื้อราที่เข้าทำลายแมลง สามารถเจริญเติบโต ขยายพันธุ์ และเพิ่มปริมาณได้ในตัวของแมลง ซึ่งทำให้เกิดโรคกับแมลงโดยขบวนการต่าง ๆ เช่นการใช้อาหารจากตัวแมลง และ/หรือ การสร้างสารพิษกับแมลง (Steinhaus, 1967, p.756)

แผนที่การแพร่กระจาย หรือ แผนที่แสดงลักษณะเฉพาะเรื่อง (Distribution Map) หรือ แผนที่การแพร่กระจายแบบจุด (Dot distribution map หรือ Dot density map) หมายถึง แผนที่ประเภทหนึ่งซึ่งแสดงลักษณะตามธรรมชาติของสิ่งที่เราสนใจ เช่น จุดที่พบสิ่งมีชีวิตที่เป็นเป้าหมายในการศึกษา ซึ่งจะเชื่อมโยงและบ่งบอกการแพร่กระจายเชิงพื้นที่ได้

เทเลโอเมอร์ฟ (Teleomorph) หมายถึง ระยะเวลาเจริญซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราชนิดใดชนิดหนึ่ง

เพอริเธเซีย (Perithecia) หมายถึง ส่วนผลิตสปอร์ของเชื้อราในกลุ่ม Ascomycota ซึ่งห่อหุ้ม asci โดยอาจมีรูปร่างคล้ายขวดรูปชมพู่ (flask-shaped) หรือรูปทรงกลม (globose) (Dictionary.com, 2014)

นิเวศวิทยาประชากร (Population ecology) หมายถึง การศึกษานิเวศวิทยาในระดับประชากรของสิ่งมีชีวิตในด้านจำนวน การแพร่กระจาย ความสัมพันธ์ภายในชนิดเดียวกันและระหว่างชนิด และความสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมในบริเวณที่อยู่อาศัย (กนก เลิศพานิช, 2557)

ระบบสารสนเทศภูมิศาสตร์ (Geographic Information System: GIS) หมายถึง กระบวนการทำงานเกี่ยวกับข้อมูลในเชิงพื้นที่ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ ที่ใช้กำหนดข้อมูลและสารสนเทศ ที่มีความสัมพันธ์กับตำแหน่งในเชิงพื้นที่ เช่น ที่อยู่ บ้านเลขที่ สัมพันธ์กับตำแหน่งในแผนที่ ตำแหน่ง เส้นรุ้ง เส้นแวง (คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2557)

สโตรมา (Stroma) หมายถึง กลุ่มเส้นใยซึ่งมีการรวมตัวกันอย่างแน่นหนา ซึ่งผลิตโดยเชื้อรา โดยมีหน้าที่สำหรับเป็นก้านชูอวัยวะสำหรับสร้างสปอร์ของเชื้อรานั้น (Thefreedictionary, 2014)

สารคอร์ดิเซพิน (Cordycepin) หมายถึง สารเคมี 3'-deoxyadenosine ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ nucleoside adenosine มีความแตกต่างจาก nucleoside adenosine ตรงการที่ไม่พบออกซิเจนในตำแหน่ง 3' ในส่วน ribose โดยสารนี้สกัดได้ครั้งแรกจากเชื้อราในสกุล *Cordyceps* *millitaris* แต่ปัจจุบันสามารถผลิตได้ในรูปแบบสารสังเคราะห์เลียนแบบแล้ว (Wikipedia, 2014)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) คือ สารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจง เช่น มีฤทธิ์จำเพาะต่อเซลล์ของมะเร็งเต้านม มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อวัณโรค มีฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อมาลาเรีย เป็นต้น (วรรณฤดี หิรัญรัตน์, 2557)

แอสคัส (Ascus) หมายถึง โครงสร้างที่มีรูปร่างคล้ายถุง ซึ่งผลิตสปอร์ที่เรียกว่าแอสโคสปอร์ (ascospores) ที่โดยมากมี 8 สปอร์ต่อแอสคัส (ascus) ระหว่างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราในคลาส

อะนามอร์ฟ (Anamorph) หมายถึง ระยะเวลาเจริญซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราชนิดใดชนิดหนึ่ง

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 สามารถสำรวจ รวบรวม จำแนกชนิด และศึกษาความหลากหลายทางชนิด ของเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

1.6.2 เกิดองค์ความรู้เพิ่มเติมเรื่องความหลากหลายทางชนิด และตัวอาศัยของเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่

1.6.3 สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบด้วยวิธีที่เหมาะสม และทราบลักษณะพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Cordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps*

การจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธาน (classification) ของเชื้อราในสกุล *Cordyceps* มีวิวัฒนาการพอสมควร จากการจัดตั้งเดิมใน Steinhaus (1967, p.756) มีการเปลี่ยนแปลงไปบ้างใน Tanada and Kaya (1993, p.666) ต่อมา มีการปรับเปลี่ยนอีกโดยเชื้อราในสกุล *Cordyceps* ถูกจัดให้อยู่ใน Kingdom Fungi หรือ Mycota ใน Division หรือ Phylum Ascomycota (sac fungi), Class Sordariomycetes อันดับ Hypocreales และวงศ์ Clavicipitaceae เมื่อ Sung *et al.* (2007, pp.5-59) แยกวงศ์ Clavicipitaceae ออกเป็น Clavicipitaceae และ Cordycipitaceae พร้อมกับเสนอตั้งวงศ์ใหม่ขึ้นมาอีกวงศ์หนึ่งคือ Ophiocordycipitaceae และจากการทบทวนชื่อสกุล *Cordyceps* หลายชนิดออกเป็นสกุลใหม่ คือ *Ophiocordyceps* ส่วนสกุล *Cordyceps* เดิมหลายชนิดยังคงจัดไว้ในวงศ์ Cordycipitaceae

เชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* จัดเป็นเชื้อราที่ก่อโรคแมลง หรือ เชื้อราสาเหตุโรคแมลง หรือเชื้อราโรคแมลง (entomopathogenic fungi หรือ entomopathogens) เชื้อรา *Ophiocordyceps* เป็นเชื้อราที่มีการบันทึกถึงครั้งแรกในประเทศจีน ในสมัยราชวงศ์ถัง และมีการบันทึกเกี่ยวกับสรรพคุณทางยาในเขตปกครองตนเอง ทิเบตในช่วงตั้งแต่ศตวรรษที่ 15 ถึง 18 จากนั้นจึงมีรายงานการศึกษาในเชิงวิทยาศาสตร์มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2300 (Holliday and Cleaver, 2008, pp. 219-234) โดยคำว่า “Cordyceps” มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกคำว่า “kordyle” หรือภาษาละตินคำว่า “cord” ซึ่งแปลว่า “ไม้กระบอง (Club)” และภาษาละติน คำว่า “ceps” ซึ่งแปลว่า “หัว (head)” โดยเป็นความหมายซึ่งอธิบายลักษณะของสโตรมา (Stroma) ก้านชูสปอร์ (fruiting body) รูปไม้กระบอง ซึ่งงอกออกจากตัวของแมลงที่ติดเชื้อดังกล่าว ซึ่งมักพบเจริญออกจากหนอนผีเสื้อหิมาลัย (Himalayan ghost moth, *Thitarodes armoricanus* = *Hepialis armoricanus*) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *O. sinensis* ซึ่งรู้จักกันในชื่อ ถั่งเช่า (ภาพที่ 2.1) ซึ่งมีการนำมาใช้เป็นสมุนไพรจีนโดยเข้าใจว่าเป็นเห็ดชนิดหนึ่งที่ใช้เพื่อรักษาโรค และบำรุงสมรรถนะทางเพศ และบำรุงกำลังมาเป็นเวลานานมาแล้ว (Jones, 1993)

ในธรรมชาติแมลงที่ติดเชื้อรา *Ophiocordyceps* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *O. sinensis* สามารถพบได้ในบริเวณพื้นที่สูง ในแถบเทือกเขาหิมาลัย เขตปกครองตนเองทิเบต ประเทศจีน (ภาพที่ 2.2) ซึ่งมีความยากลำบากในการเก็บรวบรวม จึงทำให้ *O. sinensis* กลายเป็นยาสมุนไพรที่มีราคาสูง โดยในปี พ.ศ. 2547 มีรายงานอ้างว่าการขายหนอนที่ติดเชื้อรานี้ในปริมาณ 5,000 กิโลกรัม รวมเป็นมูลค่าถึง 225 ล้านเหรียญสหรัฐ (Winkler, 2008, pp. 291-305) ในปัจจุบันมีข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ชี้ว่าเชื้อราดังกล่าวเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง โดยมีรายงานว่าเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* และสกุลใกล้เคียงทั่วโลก ซึ่งมีจำนวนชนิดมากกว่า 680 ชนิดนั้น มีชนิดที่มีการศึกษาเกี่ยวกับสรรพคุณทางยา ได้แก่ *Cordyceps militaris*, *Ophiocordyceps sobolifera*, *Tolypocladium inflatum*. (= *Cordyceps subssesilis*) และ *Tolypocladium ophioglossoides* (*Cordyceps ophioglossoides*) เป็นต้น (Blackwell, 1984, pp.763-765; Hobbs, 1995; Mizuno, 1998) ส่วนในประเทศไทยมี

รายงานพบเชื้อราแมลงเหล่านี้กว่า 400 ชนิด (สุชาติ มงคลสมฤทธิ์ และคณะ, 2553, น.163) และยังมีการพบเชื้อราที่สกุลเดิมคือ *Cordyceps* และที่เปลี่ยนไปเป็น *Ophiocordyceps* ชนิดต่างที่มีรายงานในประเทศไทยอีกหลายชนิด ซึ่งมีการรายงานเป็นครั้งแรกในประเทศไทย เช่น *Cordyceps khaoyaiensis*, *C. pseudomilitaris*, *O. sphecocephala*, *O. nutans*, *O. myrmecophila* และ *C. cylindrica* (Hywel-Jones, 1994, pp.939-942; Hywel-Jones, 1995a, pp.154-158; Hywel-Jones, 1995b, pp.724-726; Hywel-Jones, 1996, pp.613-619; Hywel-Jones, 2002, pp.2-3; Hywel-Jones and Sivichai 1995, pp.809-812; Srivilai et al., 2013, pp.587-595)

วินันท์ดา หิมะมาน และคณะ (2554, น.13) ในรายงานผลงานวิจัยเรื่อง “ราทำลายแมลงและแมงมุมในกลุ่มป่าแก่งกระจาน” รายงานว่าในพื้นที่ศึกษาต่าง ๆ สามารถพบเชื้อราทำลายมด เพลี้ยหอย มวน แมลงสาบ แมลงวัน เพลี้ยกระโดด ต่อ แตน จักจั่น จิ้งหรีด ผีเสื้อ แมงเม่า และแมงมุม รวม 2,433 ตัวอย่าง ที่สามารถจำแนกได้รวม 44 ชนิด ซึ่งนอกจากเชื้อราชนิดต่าง ๆ แล้ว ได้พบเชื้อราในสกุล *Cordyceps* รวม 4 ชนิดคือ *Cordyceps buaoides* บนแมงมุม *C. martialis* บนแมลงในอันดับ Coleoptera, *C. tuberculata* บนแมลงในอันดับ Lepidoptera และ *Cordyceps* sp. บนแมลงในอันดับ Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera และ Lepidoptera รวมทั้งเชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* รวม 11 ชนิดคือ *Ophiocordyceps communis* บนปลวก; *O. dipertigena* บนแมลงในอันดับ Diptera; *O. humbertii* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera; *O. irangiensis* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera; *O. irangiensis myrmecophila* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera; *O. myrmecophila* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera; *O. nutans* บนแมลงในอันดับ Hemiptera; *O. pseudolloydii* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera; *O. sobolifera* บนแมลงในอันดับ Hemiptera; *O. sphaecocephala* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera และ *O. unilateralis* บนแมลงในอันดับ Hymenoptera

ส่วนวิธีการจำแนกชนิดของเชื้อราในสกุลเหล่านี้ สามารถดำเนินการได้ตั้งแต่การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological study) เช่น Evan and Samson (1982, pp.431-453) ได้อธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Cordyceps* spp. ที่พบทำลายมดในระบบนิเวศในป่าเขตกึ่งร้อน นอกจากนี้ได้อธิบายลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา *O. gracilis*, *C. ishikariensis*, *C. liangshanensis*, *C. martialis*, *C. militaris*, *O. nutans*, *O. pruinosa*, *O. sinensis*, *O. sphecocephala* และ *O. tricornis* ที่พบทำลายแมลงชนิดต่างๆ เช่น หนอนผีเสื้อ *Hepialus* sp. ตัวอ่อนจักจั่น หนอนผีเสื้อ หนอนด้วง ตัวอ่อนมวน ดักแด้ผีเสื้อในวงศ์ Limacodidae ผี และต่อ รวมทั้งตัวเต็มวัยของต่อ ในประเทศเนปาล โดยใช้ความแตกต่างของสี จำนวน และลักษณะรูปร่างของสโตรมา (stroma) ร่วมกับขนาดและรูปร่างของ perithecia ในการจำแนกชนิด (Shrestha and Sung, 2005, pp.235-239) (ภาพที่ 2.3) นอกจากนั้น Baral and Maharjan (2012, pp.38-42) รายงานว่าสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราในสกุล *Cordyceps* ออกจากเชื้อราสกุลอื่น ๆ เช่น *Aspergillus flavus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Verticillium* sp., *Alternaria solani*, *Acremonium strictum*, *Trichoderma virens*, *Curvularia lanata* และ *Thielaviopsis* sp. ได้ จากรูปร่างลักษณะของ stroma ขนาดและรูปร่างของสปอร์ และลักษณะการเรียงตัวของสปอร์ใน ascus (ภาพที่ 2.4) รวมทั้งสามารถนำไปใช้สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อราในสกุล *Cordyceps* ได้อีกด้วย ซึ่ง

เหล่านี้นอกจากนี้การศึกษาพันธุกรรมในระดับชีวโมเลกุล เช่น การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR และการหาลำดับเบสบริเวณ internal transcribe spacer (ITS) และการจัดกลุ่มสายพันธุกรรม (phylogenetic tree) เช่นในกรณีของเชื้อรา *O. cuboidea*, *C. sensu lato*, *C. alboperitheciata* และ *O. prolifica* (Ban et al., 2009, pp.261-272; Sung et al., 2007, pp. 5-59) เป็นต้น

เชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* เข้าสู่ตัวแมลงอาศัย (host insects) โดยตรง ผ่านทางผิวหนังของแมลง (cuticle) โดยมีการปล่อยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งถูกผลิตขึ้นในขณะที่สปอร์ของเชื้อรากำลังงอก ทั้งนี้สปอร์มักมีการปรับเปลี่ยนแปลงสภาพโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี เพื่อให้สามารถยึดติดแน่นอยู่กับผิวของแมลง และเมื่อเข้าไปในช่องว่างในตัวแมลงอาศัย (haemocoel) แล้ว เชื้อราจะใช้สารอาหารในร่างกายแมลงเพื่อการดำรงชีวิต และขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นขบวนการที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นเชื้อจะแพร่กระจายจนเต็มช่องว่างลำตัวแมลงโดยการสร้างเส้นใยและหน่วยสืบพันธุ์ ทำให้แมลงขาดอากาศ หรือ อดตาย หรือ ตายเนื่องจากสารพิษที่เชื้อราผลิตขึ้น ในอีกทางหนึ่ง ในขณะที่เส้นใยของเชื้อราเจริญเติบโต จะดูดน้ำและสารอาหารจากแมลงอาศัย ทำให้ซากแมลงแห้ง เชื้อราทำลายแมลงส่วนใหญ่ เส้นใยจะแทงออกมาจากตัวแมลงอาศัยหลังจากแมลงตายแล้ว ยึดซากแมลงให้ติดกับต้นพืชหรือถูกทำให้ยึดติดโดยขบวนการเกิดโรค จากนั้นไมซีเลียมที่อยู่ภายนอกจะสร้างสปอร์ และสปอร์จะค่อยๆ ถูกปล่อยฟุ้งกระจายเข้าสู่วงจรการเข้าทำลายต่อไป (ภาพที่ 2.5) ทั้งนี้เชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* สามารถก่อโรคกับแมลงหลากหลายชนิด เช่นหนอนของด้วงชนิดต่าง ๆ เช่น *O. prolifica*, *C. alboperitheciata* และ *O. cuboidea* (Ban et al., 2009, pp. 261-272) หนอนผีเสื้อ ได้แก่ หนอนผีเสื้อหิมาลัย (Himalayan ghost moth, *Thitarodes armoricanus* (= *Hepialis armoricanus*) และหนอนผีเสื้อชนิดต่าง ๆ (Holliday and Cleaver, 2008, pp. 219-234; Hywel-Jones, 1994, pp.939-942) ในมด เช่น *O. kniphofioides* และ *O. cucumispora* (Evan and Samson, 1982, pp.431-453) ในผึ้งและต่อ เช่น *O. sphecocephala* (Hywel-Jones, 1995a., pp.154-158) และปลวก ได้แก่ *O. bispora* และ *O. octospora* (Blackwell, 1984, pp.763-765) เป็นต้น โดยสามารถพบเชื้อราชนิดนี้บนซากแมลงที่อาศัยตามพื้นดิน เช่นหนอนของด้วงชนิดต่าง ๆ เศษซากใบไม้แห้ง เช่นผีเสื้อตัวเต็มวัยและหนอนผีเสื้อ ไต้ทรงพุ่มไม้ ตามยอดหญ้า เช่น *O. sinensis* หรือถ้ำเช่า และตามส่วนต่าง ๆ ของต้นพืชซึ่งมักมีความสูงไม่เกิน 2 เมตร โดยสามารถพบได้ในตั้งแต่พื้นที่สูงในเทือกเขาหิมาลัย ในประเทศจีน เขตปกครองตนเองทิเบต ประเทศจีน และเนปาล ที่ราบเขตอบอุ่น เขตกึ่งร้อน และเขตร้อนชื้น (Evan and Samson, 1982, pp.431-453; Holliday and Cleaver, 2008, pp.219-234; Steinhaus, 1967, p.756) อีกทั้งมีรายงานการพบเชื้อราชนิดนี้แพร่กระจายในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย เช่น อุทยานแห่งชาติในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก รวม 22 แห่งรวมทั้งอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

เชื้อราในสกุล *Ophiocordyceps* หลายชนิดสามารถเพาะเลี้ยงได้บนอาหารเทียมเช่น Potato dextrose agar (PDA), Corn meal agar (CMA), Malt extract agar (MEA), Protease peptone agar (PPA) และ Brain heart infusion agar (BIFA) เป็นต้น (Ban et al., 2009, pp.261-272; Blackwell, 1984, pp.763-765; Evan and Samson, 1982, pp.431-453) ทั้งนี้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive substances) ที่ตรวจพบโดยวิธี HPLC ในเชื้อราเช่นเชื้อรา

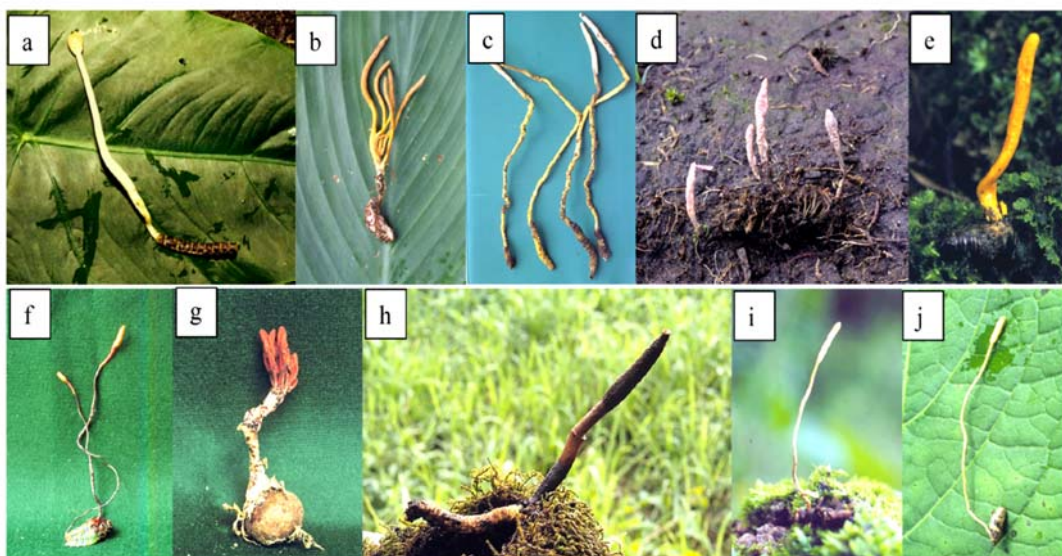
Ophiocordyceps spp. มีหลากหลายชนิด เช่น สาร cordycepin, ophiocordin, galactomannan และ polysaccharide ที่สามารถตรวจพบได้จากส่วนก้านชูสปอร์ (fruiting body) ซึ่งมีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อการก่อเซลล์มะเร็ง (antitumor) ต่อด้านแบคทีเรีย (antibacterial) และต่อต้านเชื้อรา (antifungal) (Bok *et al.*, 1999, pp. 891-898) อีกทั้งมีรายงานยืนยันว่าสารสกัดบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) ซึ่งควบคุมเซลล์ที่เจริญมากผิดปกติ (Chen *et al.*, 1997, pp. 2349–2359) ที่พบในเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบกรดอะมิโนและวิตามินหลายชนิดในเชื้อรานี้ เช่น กรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acids) วิตามิน K วิตามิน B วิตามิน B1 วิตามิน B2 และ วิตามิน B12 อีกด้วย (Holliday and Cleaver, 2008, pp.219-234) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ ชี้ให้เห็นว่าเชื้อราโรคแมลงในสกุล *Ophiocordyceps* เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ทำให้ประโยชน์แก่มนุษย์โดยเฉพาะด้านการแพทย์และเภสัชกรรม



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของหนอนผีเสื้อที่ถูกทำลายจากเชื้อรา *Ophiocordyceps sinensis* หรือที่เรียกว่า ถังเช่า (Dōng-chóng-xià-cǎo)
ที่มา: TCM Wiki (2014)

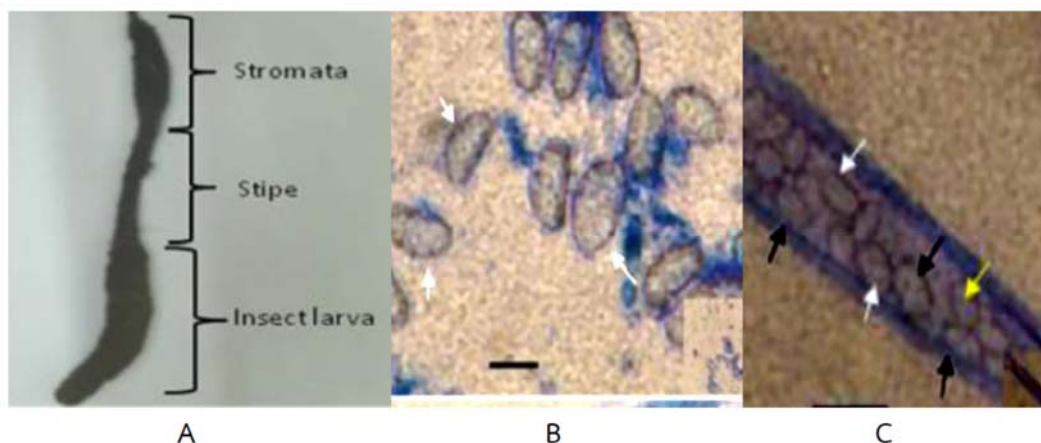


ภาพที่ 2.2 แผนที่การแพร่กระจายของเชื้อรา *Ophiocordyceps sinensis* ในเขตปกครองตนเอง
ทิเบต ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน
ที่มา: Boesi and Cardi (2009, pp. 52-61)

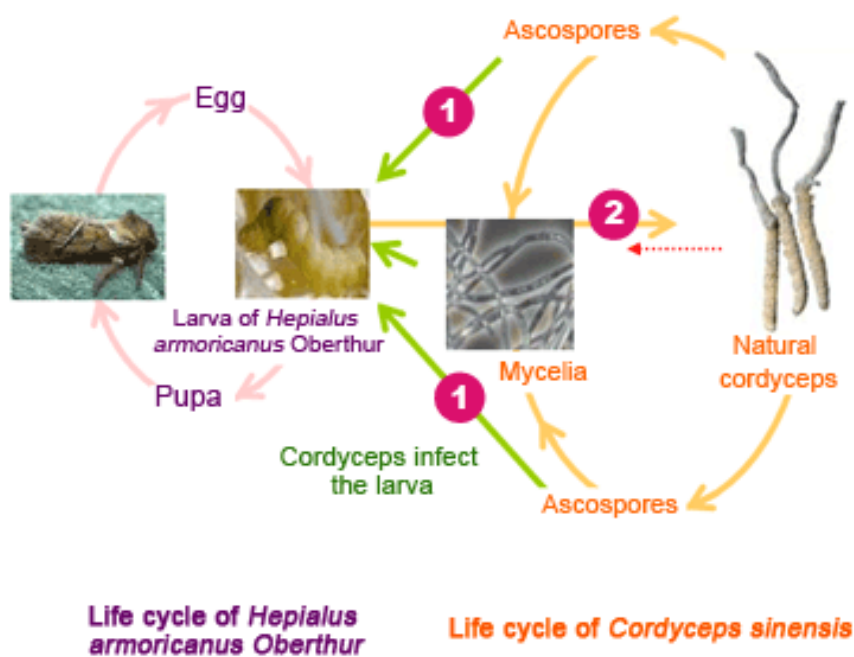


ภาพที่ 2.3 เชื้อราสกุล *Cordyceps* และ *Ophiocordyceps* ชนิดต่างๆ ที่มีการเก็บตัวอย่างได้จาก
ประเทศเนปาล ได้แก่ *O. gracilis* (a); *C. ishikariensis* (b); *C. liangshanensis* (c); *O. martialis*
(d); *C. militaris* (e); *O. nutans* (f); *O. pruinosa* (g); *O. sinensis* (h); *O. sphecocephala*
(i) และ *O. tricornis* (j) ตามลำดับ

ที่มา: Boesi and Cardi (2009, pp. 52-61)



ภาพที่ 2.4 ลักษณะส่วน stroma (A), สปอร์ (B) และ ascus (C) ของเชื้อรา *Ophiocordyceps* ที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา
ที่มา: ดัดแปลงจาก Baral and Maharjan (2012, pp. 38-42)



ภาพที่ 2.5 การเข้าทำลายแมลงและวงจรชีวิตของเชื้อรา *Ophiocordyceps sinensis* (*Cordyceps sinensis*)

ที่มา: Chang Gung Biotechnology (n.d.)

2.2 เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง พื้นฐานของเทคนิค AFLP คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณปฏิกิริยาพีซีอาร์ เทคนิค AFLP พัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos และได้จดสิทธิบัตร

ในปี 1993 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจาก การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดยการเชื่อมต่อกับอะแดปเตอร์ (adapter) เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งที่ตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดยอะแดปเตอร์เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้น ๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียว (sticky end) เหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ดังนั้นจึงสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้โดยใช้ปลายเหนียว (sticky end ligation) และทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป ด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้ โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับบริเวณของอะแดปเตอร์รวมกับบริเวณของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในคราวเดียวกันมีมาก ไม่สามารถแยกจากกันหรือตรวจสอบโดยวิธีทั่วๆ ไป เช่น การทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ดังนั้นการสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำ AFLP จึงเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกลงไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสที่อยู่ต่อกับบริเวณตัดจำเพาะสอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เท่านั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วน และสามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไบนั่นเอง ในทางปฏิบัติต้องการให้มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 50-100 แถบ ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสใน denaturing polyacrylamide gel (สุรินทร์ ปิยะโชคณกุล, 2545)

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิค AFLP ในการศึกษาลักษณะทางจีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิต เช่น การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร การศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการความหลากหลายทางชีวภาพ และยังมีการนำไปใช้ทำแผนที่จีโนม โดยข้อดีของเทคนิคนี้ คือ ไม่ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ทำได้รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย ในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (Multilocus) ทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมจำนวนมาก สามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ และเทคนิคนี้ยังสามารถใช้กับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใดก็ได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณกุล, 2545)

2.3 โปรแกรมจำลองการทดลอง AFLP (*In Silico* AFLP analysis) ของจีโนมจุลินทรีย์

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค *In Silico* analysis มาใช้ทำการทดลองเสมือนจริงและการคาดคะเนผลการทดลอง โดยอาศัยคอมพิวเตอร์กับฐานข้อมูลลำดับเบสจีโนมของสิ่งมีชีวิตและเชื้อจุลินทรีย์ โดยโปรแกรม *In Silico* AFLP พัฒนาขึ้นโดย Bikandi *et al.* (2004) ซึ่งเป็นโปรแกรมจำลองการทดลองด้วยเทคนิค AFLP ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ต โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับเบสของเชื้อที่เก็บอยู่ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) ผู้ใช้สามารถเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะและกำหนดเบสคัดเลือกลงในส่วนของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองได้ ซึ่งโปรแกรมจะแสดงผลเป็นข้อมูลจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด และลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอพร้อมทั้งภาพเสมือนจริงของอะครีลาไมด์เจล ช่วยในการวางแผนก่อนการทดลองจริงได้ ซึ่งช่วยประหยัดทั้งเวลาและทรัพยากร

2.4 เทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR)

Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction หรือ rep-PCR เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกเชื้อ โดยไพรเมอร์เป็นส่วนของ Repetitive sequence ซึ่งในจีโนมของเชื้อมีชุดลำดับเบสที่ซ้ำ ๆ (Repetitive DNA sequence) การกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม และมีลักษณะอนุรักษ์สูง เช่น Repetitive extragenic palindromic sequence (REP) และ Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) โดยมีลำดับเบสขนาด 35-40 คู่เบส และ 124-127 คู่เบส มีโครงสร้างเป็น Stem-loop (Louws *et al.*, 1994)

REP จากรายงานโดย Versalovic *et al.* (1991) พบ REP ในเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* และ eubacteria ซึ่งออกแบบจากดีเอ็นเอตัวตรวจ REPALL โดยใช้ลำดับเบสทางปลายแต่ละข้างของ palindromic sequence ของดีเอ็นเอตัวตรวจจากการศึกษากับแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อ *E.coli* พบว่าไพรเมอร์ REP ของเชื้อ *E.coli* ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะ (strain-specific) ในแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* ส่วนไพรเมอร์ ERIC หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Intergenic repeat unit (IRUs) พบใน *E.coli* และ *S.typhimurium* เช่นเดียวกับ REP ซึ่ง ERIC มีการแพร่กระจายทั่วไปในบริเวณที่มีการถอดรหัส (transcribed region) (Wilson and Sharp, 2006) โดยไพรเมอร์ ERIC ออกแบบจากส่วนนิวคลีโอไทด์ ERICALL ซึ่งอยู่ในส่วนกลางของลำดับเบสซ้ำ ๆ ที่มีการอนุรักษ์ (core inverted repeat) ไพรเมอร์ ERIC (ERIC และ ERIC2) ออกแบบมาจากลำดับเบสแต่ละข้างของ Core inverted repeat (Versalovic *et al.*, 1991)

หลักการของ rep-PCR คือ การสังเคราะห์ oligonucleotide primer ที่เข้าคู่กันกับ repetitive element (rep-element) เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวร่วมกับการใช้ปฏิกิริยาอุณหภูมิสูง จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในขอบเขตที่จำเพาะชัดเจน เฉพาะช่วงลำดับที่อยู่ระหว่าง REP, ERIC และ BOX เท่านั้น (ตำแหน่งต่าง ๆ ของ repetitive elements ซึ่งกระจายรอบจีโนมจะจำเพาะแน่นอนและเหมือนกันสำหรับสายพันธุ์เดียวกัน แต่แตกต่างกันเมื่อเป็นคนละสายพันธุ์) ซึ่งเรียกปฏิกิริยานี้ว่า REP-PCR, ERIC-PCR และ BOX-PCR ตามลำดับ โดยเรียกรวมกันว่า rep-PCR และผลที่ได้จากปฏิกิริยานี้คือผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR products หรือ amplification products) ที่มีขนาดของชิ้นส่วนโมเลกุลดีเอ็นเอที่ต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งบนจีโนมที่ไพรเมอร์เข้าไปจับ เมื่อนำผลผลิตดีเอ็นเอมาแยกขนาดของโมเลกุลผ่านอะกาโรสเจลโดยใช้ปฏิกิริยา electrophoresis จะได้ rep-PCR genomic fingerprinting patterns คล้ายกับบาร์โค้ด (barcode) ซึ่งเป็นสัญลักษณ์เฉพาะตัวแต่ละสายพันธุ์ สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของลักษณะพันธุกรรมของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากคุณสมบัติของไพรเมอร์ REP (REP1R และ REP2) กับไพรเมอร์ ERIC (ERIC2 และ ERIC1R) (Versalovic *et al.*, 1991) ได้มีการนำไปใช้ในการจัดจำแนกชนิดเชื้อหลายชนิด สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงในระดับสายพันธุ์ และ pathovar และยังพบว่าสามารถจำแนกเชื้อได้ในระดับ Pathovar และสายพันธุ์ (Strain) เช่นเดียวกับเทคนิคโมเลกุลอื่น ๆ (Louws *et al.*, 1994)

2.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต โดยการวิเคราะห์จัดกลุ่มข้อมูล และตัวอย่าง (Cluster analysis) เป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการจำแนกแบ่งข้อมูล หรือ ตัวอย่างที่ศึกษาออกเป็นกลุ่มย่อยตั้งแต่ 2 กลุ่มขึ้นไป กลุ่มที่แบ่งออกจะแสดงให้เห็นว่าข้อมูลหรือ ตัวอย่างที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันมีลักษณะที่คล้ายกันหรือมีความสัมพันธ์กันมาก ขณะที่ข้อมูลหรือ ตัวอย่างที่อยู่ต่างกลุ่มกันจะมีลักษณะที่ต่างกันหรือมีความสัมพันธ์กันน้อยหรือไม่มีความสัมพันธ์กัน ข้อมูลที่เป็นการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอของกลุ่มตัวอย่างที่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP สามารถนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธีการต่าง ดังนี้ (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2544)

2.5.1 การจัดกลุ่มข้อมูลหรือตัวอย่าง

วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มมี 3 วิธี ได้แก่ Distance function, Maximum likelihood และ Maximum parsimony โดย Distance function หรือวิธี UPGMA เป็นการคำนวณหาระยะห่างจากตัวอย่างที่ต้องการจัดกลุ่มไปยังค่ากลางของกลุ่ม ถ้าระยะห่างของตัวอย่างนั้น ห่างจากค่ากลางของกลุ่มใดต่ำที่สุดสามารถจัดตัวอย่างนั้นให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สำนักงานพัฒนานิวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2544)

วิธีการทั้ง 3 นี้ นำไปใช้การวิเคราะห์การจัดกลุ่มข้อมูลแตกต่างกัน โดยการจัดกลุ่มและแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างหรือสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาเป็นการประเมิน (Estimate) ความสัมพันธ์ หรือประวัติวิวัฒนาการ (Evolutionary relationship) แสดงในรูปแบบไฟโลเจเนติกทรี (Phylogenetic tree) หรือไฟโลแกรมแบบต่างๆ โดยมี 2 แนวทางในการศึกษา ได้แก่ Cladistic และ Similarity โดย Cladistic เป็นการศึกษาเน้นถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ มีการอ้างอิงถึงบรรพบุรุษร่วม (ancestor) ภาพที่ใช้ในการแสดงนั้นเรียก Cladogram ขณะที่ไฟโลแกรมที่ใช้แนวทาง Similarity หรือ Distance เป็นการประเมินความสัมพันธ์กันของตัวอย่างหรือสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาโดยอาศัยความสัมพันธ์ (Correlation) และความน่าจะเป็น (Probability) ในการจัดกลุ่ม โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ Distance function ที่จะคำนวณความเหมือน (Similarity) หรือความต่าง (Distance) ของตัวอย่างหรือสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา จากนั้นนำค่าที่ได้มาจัดกลุ่มตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่มีค่าความเหมือนกันมากที่สุดหรือมีค่าความต่างกันมากจะจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ขณะที่ตัวอย่างที่มีค่าความเหมือนกันน้อยหรือมีค่าความต่างกันมากจะจัดให้อยู่ต่างกลุ่มกัน วิธีการ Similarity หรือ Distance สามารถบอกได้ว่าสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา มีความเหมือนหรือแตกต่างกันมากหรือน้อย แต่ไม่สามารถอ้างอิงเป็นวิวัฒนาการได้ เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการจำแนกนั้นไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นลักษณะที่มีการถ่ายทอดจากบรรพบุรุษร่วม (Homologous) หรือเป็นลักษณะวิวัฒนาการที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับบรรพบุรุษร่วม (Homoplasy) ภาพที่ใช้แสดงความสัมพันธ์ของการจัดกลุ่มแบบนี้เรียก Dendrogram ข้อมูลที่ใช้ในการจัดกลุ่มแบบนี้ เช่น ผลผลิตต่อพื้นที่ จำนวนรวงต่อพื้นที่ ความสูงต้น ลักษณะต้านทานต่อโรคหรือแมลง และข้อมูลลักษณะการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากเทคนิคต่าง ๆ เช่น RAPD, AFLP หรือ RFLP เป็นต้น (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2544)

2.5.2 การตรวจสอบความถูกต้องของเดนโดแกรม (Dendrogram)

วิธีการที่ใช้ตรวจสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของเดนโดแกรมที่สร้างได้ ได้แก่

1) Cophenetic Correlation หรือค่า r เป็นค่าที่บอกถึงการจัดกลุ่มที่ได้ดีเพียงใด ซึ่งดูได้จากค่า goodness of fit โดยคำนวณค่า r ถ้าหากมีค่ามากกว่า 0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดีมาก ถ้าค่า r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าการจัดกลุ่มได้ดี ส่วนค่า r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่าจัดกลุ่มได้ปานกลาง แต่ถ้าหากค่า r น้อยกว่า 0.7 ถือว่าการจัดกลุ่มได้ไม่ดี

2) Bootstrap เป็นค่าความน่าเชื่อถือของกลุ่มที่จัดได้ว่ามีมากน้อยเท่าไร โดยบอกเป็นเปอร์เซ็นต์ของโอกาสที่จะมีการจัดกลุ่มเหมือนเดิม เมื่อมีการสุ่มตัวแปร (Variable) ใดตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการคำนวณการจัดกลุ่มออกตามจำนวนครั้งที่ต้องการ กลุ่มตัวอย่างที่มีค่า Bootstrap มาก แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่จัดได้มีความน่าเชื่อถือ โอกาสที่การจัดกลุ่มจะเปลี่ยนไปน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีค่า Bootstrap น้อย ตัวอย่างที่แยกออกเป็นกลุ่มเดียวไม่สามารถคำนวณเป็นค่า Bootstrap ได้

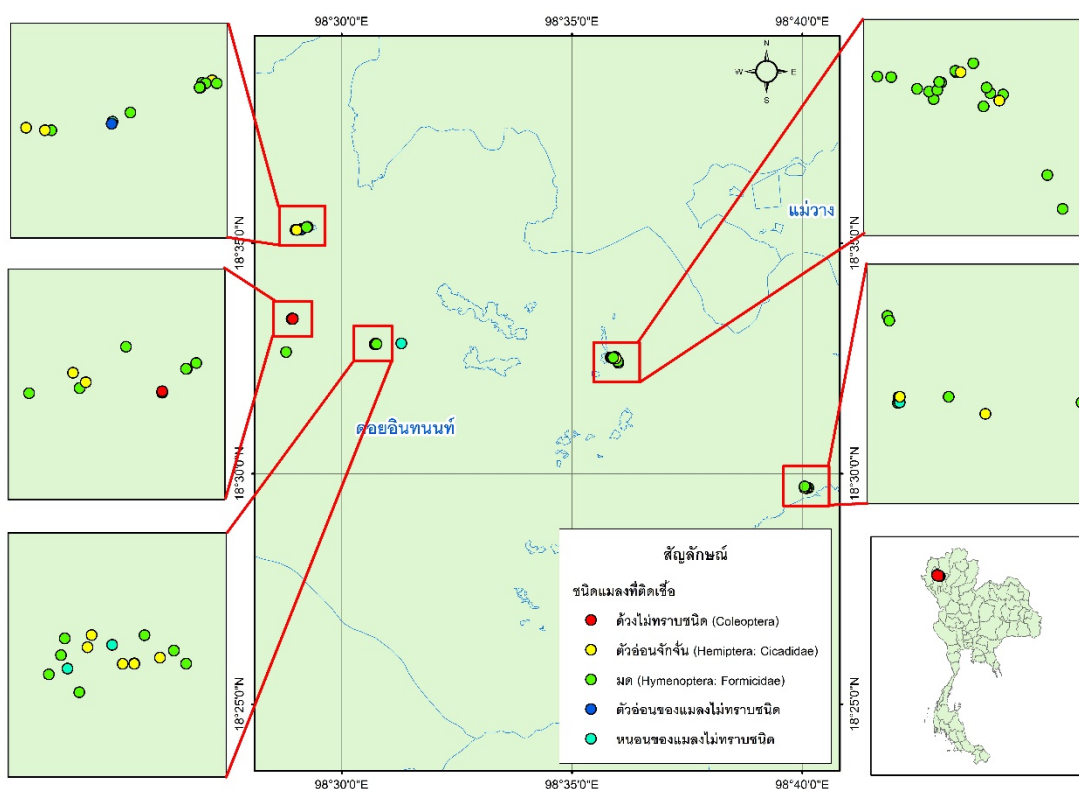
2.5.3 วิธีการสำหรับใช้จัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี Principal Components Analysis (PCA)

การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis) เป็นวิธีการทางสถิติ วิธีการหนึ่งใช้วิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร (Multivariate data) ซึ่งทำให้เห็นว่าข้อมูลอยู่ในรูปหลายมิติ (Dimension) การจะอธิบายข้อมูลโดยรวมทำได้ยาก การลดมิติของข้อมูลให้สามารถอธิบายได้โดยจำนวนน้อยมิติจึงเป็นสิ่งจำเป็น แต่การลดมิตินั้นจะต้องสามารถคงรายละเอียดของข้อมูลโดยส่วนใหญ่ไว้ได้หรือมีข้อมูลหายไปพร้อมกับการลดมิติน้อย ดังนั้น PCA จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อลดจำนวนตัวแปร โดยยังคงรักษาความแปรปรวนของข้อมูล และนำตัวแปรมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และอธิบายการกระจายของข้อมูล และโครงสร้างความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรโดยใช้องค์ประกอบหลักที่อยู่ในรูป Linear combination ของตัวแปรเดิม หากจำนวนแกนองค์ประกอบหลักที่คำนวณได้มีน้อยกว่าจำนวนตัวแปรเดิมทั้งหมด อาจใช้องค์ประกอบหลักจำนวนน้อยแกนนั้นแทนตัวแปรเดิมได้ โดยจำนวนมิติข้อมูลจะลดลงเหลือเท่ากับจำนวนแกนองค์ประกอบหลักนั้น ๆ นอกจากนี้ PCA ยังช่วยให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรได้ดีขึ้น (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2544)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบจากแมลงตามพิกัดต่าง ๆ ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ โดยคัดเลือกอาหารเทียมที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิด



ภาพที่ 3.1 แผนที่จุดที่พบเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. จากแมลงชนิดต่างๆ ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์
ที่มา: รุ่งเกียรติ แก้วเพชร และศมาพร แสงยศ (2559)

3.1.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์มาแยกให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation และ tissue culture

1) single spore isolation มีวิธีการดังต่อไปนี้

ล้างเศษดิน หรือสิ่งสกปรกต่าง ๆ ออกจากตัวอย่างด้วยน้ำสะอาด ฆ่าเชื้อบริเวณผิวนอกของตัวอย่างโดยใช้วิธี triple surface sterilization ดังนี้ แช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที และแช่ใน sodium hypochlorite 5.25% เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที ล้างสารละลายส่วนเกินออก โดยการแช่น้ำในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 1 นาที แล้ว

นำตัวอย่างวางบนจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อเพื่อซับน้ำให้แห้ง ตัดตัวอย่างตรงส่วน fertile part ตามขวางด้วยใบมีดโกน หยดนํ้ากลั่น ปราศจากเชื้อลงบนสไลด์ 1-2 หยด ใช้ปากคีบคีบตัวอย่างคว่ำด้านที่เป็นรอยตัดบนหยดนํ้ากลั่น 2-3 ครั้ง จะมองเห็น asci ลักษณะชุ่นขาวแขวนลอยในนํ้ากลั่น ใช้เข็มเย็บให้ asci แตกออก ใช้ Pasteur pipette ดูดสารแขวนลอยของสปอร์บนสไลด์ ใส่ลงในสารละลาย chloramphenicol 0.01% ในนํ้ากลั่นปราศจากเชื้อ 2 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่ติดมากับสปอร์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการงอกของสปอร์ ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบใช้ micro pipette ดูดสปอร์หรือ part-spores ที่มีการงอกใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารวุ้น potato dextrose agar (PDA) 5 จุดๆ ละ 1 สปอร์ หรือ 1 part-spore บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน สังเกตการเจริญของเส้นใย ยืนยันผลการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยเส้นใยของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีลักษณะเหมือนกันทุกจุด และไม่พบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นเลี้ยง potato dextrose agar ในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 10°C) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) มีวิธีการดังต่อไปนี้

ล้างเศษดิน หรือสิ่งสกปรกต่าง ๆ ออกจากตัวอย่างด้วยน้ำสะอาด ฆ่าเชื้อบริเวณผิวภายนอกของตัวอย่าง โดยใช้วิธี triple surface sterilization ดังนี้ แช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที แช่ใน sodium hypochlorite 5.25% เป็นเวลา 1 นาที และแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างสารละลายส่วนเกินออก โดยการแช่ในนํ้ากลั่นปราศจากเชื้อ 1 นาที แล้วนำตัวอย่างวางบนจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อเพื่อซับน้ำให้แห้ง และผ่าตรงส่วน fertile part ด้วยใบมีดโกน ใช้เข็มเย็บเนื้อเยื่อที่อยู่ภายใน วางเป็น 5 จุดบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร potato dextrose agar และบ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน จากนั้นสังเกตการเจริญของเส้นใยออกมาจากเนื้อเยื่อ ยืนยันผลการแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยเส้นใยของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีลักษณะเหมือนกันทุกจุด และไม่พบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นเลี้ยง potato dextrose agar ในตู้เย็น (อุณหภูมิประมาณ 10°C) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้น

เพื่อหาชนิดของอาหารวุ้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์ สามารถเจริญได้ดีที่สุด มีวิธีการดังต่อไปนี้

นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์ เพาะเลี้ยงในจานอาหารวุ้น potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนี นำมาวางบนอาหารวุ้นที่ใช้ศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้ corn meal agar, Czapek's agar, malt extract agar (MEA), oat meal agar (OA) และ potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15 วัน สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* บางสปีชีส์ที่เจริญ ได้ช้าได้เพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 30-60 วัน สังเกตและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีโดยใช้ไม้บรรทัด บันทึกผล

3.1.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นที่อุณหภูมิต่างๆ

เพื่อหาอุณหภูมิที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์ สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้น มีวิธีการดังต่อไปนี้

นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์ เพาะเลี้ยงในจานอาหารวุ้น potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีนำมาวางบนอาหารวุ้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* สปีชีส์นั้น ๆ สามารถเจริญได้ดีที่สุด จำนวน 6 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ และนำจานอาหารวุ้นแต่ละชุดการทดลองบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 37, 45°C และอุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) ตามลำดับ ในที่มืด เป็นเวลา 15 วัน สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* บางสปีชีส์ที่เจริญช้าได้เพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 30-60 วัน จากนั้นสังเกตและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและบันทึกผล

3.1.4 การศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นที่ pH ต่างๆ

เพื่อหา pH เริ่มต้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์ สามารถเจริญได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้น มีวิธีการดังต่อไปนี้

นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์ เพาะเลี้ยงในจานอาหารวุ้น potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) ในที่มืด เป็นเวลา 15-60 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีนำมาวางบนอาหารวุ้นที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* สปีชีส์นั้น ๆ สามารถเจริญได้ดีที่สุด จำนวน 6 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองจะปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 โดยใช้ lactic acid หรือ hydrogen peroxide และชุดการทดลองที่ไม่ได้ปรับ pH ตามลำดับ ทำการทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ และนำจานอาหารวุ้นแต่ละชุดการทดลอง บ่มที่อุณหภูมิที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* สปีชีส์นั้น ๆ สามารถเจริญได้ดีที่สุดในที่มืดเป็นเวลา 15 วัน สำหรับเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* บาง สปีชีส์ที่เจริญช้าได้เพิ่มระยะเวลาการบ่มเป็น 30-60 วัน จากนั้นสังเกตและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีโดยใช้ไม้บรรทัดบันทึกผล

3.2 ศึกษาลักษณะพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคแมลงสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์

3.2.1 การตรวจลักษณะพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps* ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ตรวจเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบเพียงเล็กน้อย ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่มีน้ำปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เชื้อกระจายในน้ำ นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที ใช้สารแขวนลอยเชื้อที่ต้ม 2 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยมีองค์ประกอบอื่น ๆ ดังนี้ 1XPCR buffer, MgCl_2 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพรมเมอร์ XOR-F (5'-GCATGACGTCATCGTCCTGT-3') และ XOR-R2 (5'-CTCGGAGCTATATGCCGTGC-3') (Naoto and Takashi, 2000) ชนิดละ 0.24 ไมโครโมลาร์ และ Taq DNA polymerase® (Promega,

Madison, USA) 0.1 ยูนิต นำเข้าเครื่อง Thermal cycler (Biometra®, Göttingen, Germany) โปรแกรมในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ Predenaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที Denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอน Denaturation ถึงขั้นตอน Extension เป็นจำนวน 30 รอบ และ Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Agarose gel electrophoresis ด้วย agarose 1.0% ใน 0.5X TBE buffer เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range, Fermentas) 200 นาโนกรัม ใช้ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ทำ Agarose gel ย้อมด้วยสารละลาย Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV-Transilluminator (Vilber Lourmat®, Germany)

3.2.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps*

1) การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *Ophiocordyceps* ด้วย *In Silico* AFLP-PCR นำข้อมูลลำดับเบสของจีโนมเชื้อ *Ophiocordyceps* มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR (<http://inSilico.ehu.es>) เลือกกำหนดคู่เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำ 4 และ 6 คู่เบส จำนวน 10 คู่เอนไซม์ ดังนี้ *EcoRI/MseI*, *EcoRI/TaqI*, *BglIII/MseI*, *BglIII/TaqI*, *ApaI/MseI*, *ApaI/TaqI*, *HindIII/MseI*, *HindIII/TaqI*, *PstI/MseI* และ *PstI/TaqI* โดยคู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกรหัสหนึ่งเบส คือ A, C, G, T และ 0 (ไม่เติมเบสใดๆ) ที่บริเวณปลาย 3' จากนั้นเลือกผลการทดลองที่มีคู่เอนไซม์และคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 100-200 แถบ นำไปทดสอบในห้องปฏิบัติการต่อไป

2) การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps* ด้วยเทคนิค AFLP

การเตรียม Genomic DNA

เลี้ยงเชื้อ *Ophiocordyceps* ในอาหาร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ CTAB method นำเชื้อปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,727 x g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนและเทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,727 x g เป็นเวลา 5 นาที ทำเช่นเดิมจำนวน 3 ครั้ง เพื่อลดปริมาณสาร Polysaccharide ของเชื้อ เก็บตะกอนและละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่งเป็นหลอดละ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) 10% ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ Proteinase K (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ RNase ชนิดละ 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ บ่มในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม NaCl 5 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำมาเติม CTAB 10%/NaCl 0.7 โมลาร์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (PCI; 25:24:1) pH 8.0 เติมในปริมาตรที่เท่ากับของเหลวที่ได้ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,727 x g เป็นเวลา 30 นาที แล้วย้ายส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรที่ได้ นำไปปั่นเหวี่ยง 9,727 x g เป็นเวลา 5

นาที่ เพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนด้วย Ethanol 70% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 3 นาที ที่ส่วนที่เป็นของเหลวและตากตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (Ausubel *et al.*, 1999)

การเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำจีโนมดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์จำนวน 150 นาโนกรัม ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI 5 ยูนิต และ MseI 1.25 ยูนิต (FastDigest® Fermentas, Maryland, USA) ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร จากนั้นต่อขึ้นดีเอ็นเอด้วย EcoRI-adaptor และ MseI-adaptor ชนิดละ 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร และ 25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ATP 1 มิลลิโมลลาร์ และใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase 1.2 ยูนิต ใน 1X T4 ligase buffer (10 x ligase buffer 2 ไมโครลิตร, 0.5 M NaCl 2 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 1.0 ไมโครลิตร) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำดีเอ็นเอเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้จีโนมที่ตัดและเชื่อมต่อกับ adapter ปริมาตร 2 ไมโครลิตร คู่ไพรเมอร์จากการทดลองในโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR ได้แก่ EcoRI+0/MseI+A, EcoRI+0/MseI+C, EcoRI+0/MseI+T, EcoRI+A/MseI+0, EcoRI+C/MseI+0, EcoRI+C/MseI+C, EcoRI+G/MseI+G และ EcoRI+0/MseI+0 โดยใช้ไพรเมอร์ EcoRI ชนิดละ 0.1 ไมโครโมลลาร์ และไพรเมอร์ MseI ชนิดละ 0.1 ไมโครโมลลาร์ ทำปฏิกิริยาใน 1X PCR buffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลลาร์ MgCl₂ 0.75 มิลลิโมลลาร์ และ Taq DNA polymerase® (Promega) 0.5 ยูนิต ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร โดยโปรแกรมในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ Predenaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Annealing 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอน Denaturation ถึง Extension เป็นจำนวน 30 รอบ และ Final extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

แยกขนาดขึ้นดีเอ็นเอด้วย Polyacrylamide gel electrophoresis และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Silver staining

นำผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยใช้ Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis 5% ประกอบด้วย acrylamide 30% (acrylamide : bisacrylamide อัตราส่วน 19 : 1 ในยูเรีย 7.5 โมลาร์) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร, 5X TBE ปริมาตร 8 มิลลิลิตร, ยูเรีย 18 กรัม, น้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร, Ammonium persulfate (APS) 10% ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบกระชกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส (Life Technologies/Gibco BRL Model S2) ขนาด 33 x 40 ตารางเซนติเมตร เต็มบัฟเฟอร์ 1XTBE buffer ลงในช่องด้านบน 400 มิลลิลิตร และด้านล่าง 600 มิลลิลิตร ทำ Prerun ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าอุณหภูมิสูงถึง 55-58 องศาเซลเซียส นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์หยดดีเอ็นเอตัวอย่างละ 3 ไมโครลิตร ลงในแต่ละช่องเปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าใช้ความต่างศักย์ 1,500 โวลต์

เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสีของ Xylene cyanol เคลื่อนที่ลงมา 2 ใน 3 ส่วนของเจลปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ดูดบัฟเฟอร์ออกและแยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน

ตารางที่ 3.1 อะแดปเตอร์และไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อ	ลำดับเบส	ที่มา
EcoRI-adaptor	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'	Vos et al.,1999
MseI-adaptor	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 5'-TACTCAGGACTCAT-3'	Vos et al.,1999
EcoRI+0	5'-GACTGCGTACC-3'	Vos et al.,1999
MseI+0	5'-GATGAGTCCTGAG-3'	Vos et al.,1999
EcoRI+A	5'-GACTGCGTACC $\underline{\text{A}}$ -3'	งานวิจัยโครงการนี้
EcoRI+C	5'-GACTGCGTACC $\underline{\text{C}}$ -3'	งานวิจัยโครงการนี้
EcoRI+G	5'-GACTGCGTACC $\underline{\text{G}}$ -3'	งานวิจัยโครงการนี้
MseI+A	5'-GATGAGTCCTGAG $\underline{\text{A}}$ -3'	งานวิจัยโครงการนี้
MseI+C	5'-GATGAGTCCTGAG $\underline{\text{C}}$ -3'	งานวิจัยโครงการนี้
MseI+T	5'-GATGAGTCCTGAG $\underline{\text{T}}$ -3'	งานวิจัยโครงการนี้
MseI+G	5'-GATGAGTCCTGAG $\underline{\text{G}}$ -3'	งานวิจัยโครงการนี้

หมายเหตุ ¹ชนิดเบสคัดเลือกว่าที่เพิ่มบริเวณปลาย 3'ของไพรเมอร์

จากนั้นย้อมกระจกด้วยวิธี Silver staining นำกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่ในสารละลาย Fixative เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า จากนั้นล้างด้วยน้ำ Deionization (DI) 2 ครั้ง ครั้งแรกเป็นเวลา 30 นาที และครั้งที่ 2 เป็นเวลา 5 นาที บนเครื่องเขย่า จากนั้นแช่ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ DI อย่างรวดเร็ว เพื่อล้างซิลเวอร์ที่มากเกินไปแล้วนำแผ่นเจนแช่ในสารละลาย Developer เขย่าเป็นเวลา 5-10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 10% Acetic acid ล้างด้วยน้ำกลั่นและตากให้แห้งเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป (ดัดแปลงจากสุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) นำคู่ไพรเมอร์ และคู่เอนไซม์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (Polymorphysm) มากสุด นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps* ต่อไป

3.2.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps* ด้วยเทคนิค rep-PCR

ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps* ด้วยเทคนิค Repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction หรือ rep-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ REP คือ REPIR-I; 5'-IIICGICGICATCIGGC-3' และ REP2R-I; 5'-ICGIGTTATCIGGCCTAC-3' (Louws et al.,1994) และไพรเมอร์ ERIC ได้แก่ ERICIR; 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' และ ERIC2R; 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' (Versalovic et al., 1991)

เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1X PCR buffer, dNTP 625 ไมโครโมลลาร์ $MgCl_2$ 1 มิลลิโมลลาร์, *Tag* DNA polymerase[®] (Promega) 2 ยูนิต, ไพรมเมอร์ REP (REP1R-I และ REP2R-I) ชนิดละ 2 ไมโครโมลลาร์ และดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตรโดยใช้โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาใน 1 รอบ ดังนี้ Predenaturation 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที Denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing สำหรับไพรมเมอร์ REP เป็น 45 องศาเซลเซียส และไพรมเมอร์ ERIC เป็น 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Extension 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที ทำซ้ำขั้นตอน Denaturation ถึง Extension เป็นจำนวน 30 รอบ และ Final Extension 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Vera Cruze *et al.*, 1996) ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เบื้องต้นด้วย 1.1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE โดยนำดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X Loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใช้ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปตรวจสอบอีกครั้งด้วย 5% Acrylamide gel โดยนำผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับ Sequencing dey แยกขนาดบน 5% Acrylamide gel และตรวจสอบด้วยแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Silver stain

3.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1) การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS

รวบรวมข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP และข้อมูลจากไพรมเมอร์ REP และ ERIC จากเทคนิค rep-PCR โดยให้ข้อมูลเป็นแบบ Binary data คือมีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้คะแนนเป็น “1” หากไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏให้คะแนนเป็น “0” แล้วจึงนำผลไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) version 2.0 1d (Serial number, EY2489QP. Applied Biostatistics, Inc) (Rohlf, 1998)

การเตรียมข้อมูลเพื่อวิเคราะห์

เตรียมข้อมูลที่ได้จากการประเมินลายพิมพ์ดีเอ็นเอในโปรแกรม Excel ในแนวสดมภ์ (Column) โดยช่อง A1 ใส่ตัวเลข 1 เพื่อบอกลักษณะของข้อมูล (Type of matrix) ซึ่งหมายเลข 1 คือข้อมูลจัดรูปแบบเป็น Rectangular data matrix ส่วนของ B1 ระบุจำนวนตัวอย่างในแถว (Rows) ช่อง C1 ให้ระบุจำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายในแนวคอลัมน์และช่อง D1 เป็นช่องที่ระบุว่ามีข้อมูลสูญหายหรือไม่ ซึ่งหมายเลข 0 คือ ไม่มีข้อมูลสูญหาย และหมายเลข 1 คือ มีข้อมูลสูญหายเว้นหนึ่งแถว ในแนวนอน เริ่มป้อนข้อมูลชื่อไอโซเลตเชื้อในแนวคอลัมน์ เริ่มตั้งแต่ช่อง A3 ของไอโซเลตแรก ช่อง A4 เป็นไอโซเลตที่สอง ช่อง A5 เป็นไอโซเลตที่สาม จนครบทุกไอโซเลต และป้อนข้อมูลดีเอ็นเอเครื่องหมายของไอโซเลตแรกในแนวนอน เริ่มตั้งแต่ช่อง B3, C3, D3... เป็นต้นไป ส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมายของไอโซเลตที่สอง เริ่มตั้งแต่ช่อง B4, C4, D4... เป็นต้นไปจนครบทุกไอโซเลต จากนั้นบันทึกไฟล์ที่ต้องการวิเคราะห์ในนามสกุล .xls

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps* โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSY version 2.01d คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของเชื้อสาเหตุโรคแล้วนำไปสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบไฟโลเจเนติกทรีด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pairgroup Method with Arithmetic Average) การสร้างแผนภูมิแสดง

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบไฟโลจี+เนติกส์โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ Distance function ที่จะคำนวณความต่าง (Distance) ของตัวอย่าง

ย้ายข้อมูลในโปรแกรม Excel ที่มีนามสกุล .xls ตามวิธีการเตรียมข้อมูลในข้อ 5.1.1 เมื่อเข้าสู่โปรแกรม NTSYS version 2.01d โดยเข้าโปรแกรมย่อย NT edit เลือก File/Import Excel จากนั้นเลือกไฟล์ที่ต้องการ บันทึกข้อมูล file/save file as ซึ่งไฟล์ที่ได้จะมีนามสกุลเป็น .nts นำไฟล์ข้อมูลที่ได้จาก NT edit สร้างเดนโดรแกรมโดยเข้าโปรแกรมย่อย Similarity วิเคราะห์หาค่า Similarity โดยเลือกโปรแกรม NTSYS version 2.01d และเข้าโปรแกรมย่อย SimQual (similarity for qualitative data) ใช้ในการคำนวณหาค่า Similarity ของข้อมูลที่เป็นลักษณะคุณภาพหรือเป็นมาตรวัดแบบ Nominal scale เช่น ข้อมูลที่เป็นการปรากฏของแถบตีเอ็นเบนเจล หากมีแถบตีเอ็นเออ่านค่าเป็น 1 ถ้าไม่มีมีแถบตีเอ็นเออ่านค่าเป็น 0 ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้สัมประสิทธิ์ Dice's coefficient บันทึกไฟล์ที่ได้จากการวิเคราะห์ค่า Similarity โดยมีสมการดังนี้ (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2544)

$$\text{Dice's coefficient} : \frac{2a}{(2a+b+c)}$$

โดยที่ a, b และ c คือค่าเปรียบเทียบข้อมูลของตัวอย่างที่ i และ j

จากนั้นเลือกวิธีการจัดกลุ่มโดยเลือกโปรแกรมย่อย Clustering เข้าโปรแกรมย่อย SHAN (Sequential Agglomerative Hierarchical Nestedcluster Method) นำไฟล์ที่ได้จากการวิเคราะห์ว่า Similarity มาใช้วิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยเลือกวิธีการจัดกลุ่ม UPGMA จากนั้นดูผลการจัดกลุ่ม โดยเลือกดู tree ได้ที่ tree plot

การวิเคราะห์ Cophenetic Correlation

การคำนวณหาค่า Cophenetic correlation (r) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการตรวจสอบเดนโดรแกรม วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.01d โดยใช้ข้อมูลจากไฟล์ที่ใช้ในการสร้างเดนโดรแกรม คือไฟล์ที่ได้จากการคำนวณ Similarity (SimQ) และ Clustering (SHAN) โดยเข้าที่ Clustering เลือกโปรแกรมย่อย Coph เลือกไฟล์ที่ได้จาก SHAN บันทึกไฟล์ที่ได้จากการคำนวณ จากนั้นไปที่ Graphics เลือก MaxCoph นำไฟล์ที่ได้จากการคำนวณค่า Similarity (SimQ) และไฟล์ที่ได้จาก Coph เพื่อคำนวณหา Cophenetic correlation การอ่านค่า Cophenetic correlation ที่ได้ โดยค่า r มีค่ามากกว่า 0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดี ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าการจัดกลุ่มใช้ได้ หากมีค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่าการจัดกลุ่มได้ปานกลาง และหากค่า r มีค่าน้อยกว่า 0.7 ถือว่าจัดกลุ่มได้ไม่ดี

การคำนวณค่า Bootstrap ด้วยโปรแกรม Winboot

การวิเคราะห์ค่า Bootstrap ด้วยโปรแกรม WinBoot (Yap and Nelson, 1996) การเตรียมข้อมูลในไฟล์ Excel จะแตกต่างจากการเตรียมข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ในโปรแกรม NTSYS เล็กน้อย โดยการเตรียมข้อมูลใน Excel ช่อง A1 ระบุจำนวนแถวของข้อมูล เว้น 2 แถว ระบุจำนวน

สมบัติของข้อมูล การป้อนข้อมูลที่ต้องการวิเคราะห์เริ่มตั้งแต่ช่อง B2 เป็นต้นไป จากนั้นบันทึกไฟล์เป็นนามสกุล .prn และตั้งชื่อไฟล์สำหรับบันทึก ซึ่งไฟล์จะมีนามสกุล .txt จากนั้นกำหนดค่าสัมประสิทธิ์เลือก Dice's coefficient เช่นเดียวกับที่กำหนดในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม NTSYS เลือกจำนวนครั้งที่ต้องการวิเคราะห์ในช่อง Samples จำนวน 1,000 เพื่อให้โปรแกรมคำนวณค่า Bootstrap

การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Principal Component Analysis (PCA) ด้วยโปรแกรม NTSYS

นำข้อมูล Binary data ที่เตรียมใน Excel ตามข้อ 5.1.1 โดย Import ไฟล์ Excel เข้าโปรแกรม NTedit ที่เป็นโปรแกรมย่อยใน NTSYS แปลงไฟล์เป็นนามสกุล .nts หรือจะเลือกใช้ไฟล์ NTedit จากวิธี UPGMA มาวิเคราะห์ก็ได้ จากนั้นเลือกฟังก์ชัน general เข้าโปรแกรมย่อย stand และ Input file ที่ได้จาก NTedit ทำการวิเคราะห์เพื่อคำนวณค่า Standard บันทึกไฟล์ที่ได้จากการวิเคราะห์ stand ขั้นตอนต่อมาเลือกฟังก์ชัน similarity เข้าโปรแกรมย่อย simint และ Input file ที่ได้จาก stand โดยเลือกสัมประสิทธิ์ (coefficient) CORR วิเคราะห์และบันทึกไฟล์ที่ได้จาก simint จากนั้นเลือกฟังก์ชัน Ordination เข้าโปรแกรมย่อย Eigen และ Input file ที่ได้จากการวิเคราะห์ simint วิเคราะห์และบันทึกไฟล์ที่ได้จาก Eigen โดยขั้นตอนนี้ การวิเคราะห์จะคำนวณค่า eigenvector และ eigenvalue บันทึกไฟล์ที่ได้ในนามสกุล .txt และโปรแกรมจะแสดงภาพ 3 มิติ หมุนแกนภาพ 3 มิติ ตามความเหมาะสม

3.3 เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ

กล้องจุลทรรศน์แบบ Compound microscope และกล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo microscope ซึ่งติดตั้งเครื่องมือสำหรับบันทึกภาพถ่ายดิจิทัล ยี่ห้อ Olympus ที่มีการตรวจสอบคุณภาพโดยบริการหลังการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ รวมทั้งมีการจัดการด้านพื้นฐานการใช้และการดูแลเบื้องต้นโดยผู้ใช้และดูแลอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ เช่น การเก็บกล้องจุลทรรศน์ไว้ในที่ที่ปราศจากฝุ่นละออง ไม่มีความชื้นสูง ในห้องมีอากาศถ่ายเทได้สะดวก หลีกเลี่ยงจากสถานที่ที่มีเชื้อรา การเตรียมสไลด์ที่เหมาะสมกับการใช้กล้อง การเช็ดเลนส์ต้องใช้กระดาษเช็ดเลนส์ทุกครั้งโดยน้ำยาที่ใช้เช็ดเลนส์ ได้แก่ xylene 85% ผสม ether 15% หรือ alcohol 80% ผสม ether 20% ส่วนไมโครมิเตอร์ที่ใช้วัดขนาดของสิ่งที่ส่องได้กล้อง ได้มีการเทียบค่าระยะห่างของแต่ละช่องกัน stage micrometer เมื่อต้องการวัดขนาดวัตถุ ให้ใส่แผ่นกระจกกลมในกระบอกเลนส์ใกล้ตา วางแผ่น stage micrometer บนแท่นวางสไลด์ หลังปรับกล้องให้เห็นภาพชัดแบ่งบนสไลด์ แล้วเทียบระยะห่างแต่ละช่องบนแผ่นกระจกกลมกับขีดแบ่งบนแผ่นสไลด์ และ คำนวณค่าของระยะห่างของช่องบนแผ่นกระจกกลมตามสูตร ค่า 1 ช่องของ ocular micrometer = จำนวนช่องของ stage micrometer / จำนวนช่องของ ocular micrometer x ค่า 1 ช่องของ stage micrometer

อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาอื่น ๆ เช่น เครื่องแก้วและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ขนาดเล็ก และอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขาย จากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

ตู้ให้ความเย็น Mirage รุ่น F2-269, ซันโย (ยูนิเวอร์แซลอิเล็กทริก ประเทศไทย)

อุปกรณ์สำหรับจัดทำสไลด์ตัวอย่างของสปอร์ รวมทั้งส่วนต่างๆ ของเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. เช่น แผ่นสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์ (cover slip) น้ำยาสำหรับจัดทำสไลด์ถาวร เช่น Hoyer's solution และ Canada balsam เข็มเขี่ย ตะเกียงแอลกอฮอล์ และฟู่กัน เป็นต้น อุปกรณ์สำหรับให้ความชื้น Devatec Stream Humidifier (Energy Solution & Technology บางขุนเทียน กรุงเทพฯ) ที่มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น (Temperature and Humidity Data Logger รุ่น SKL200THIIa, (SK Sato, Japan) ซึ่งมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการขาย จากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ ภาชนะบรรจุตู้ให้ความเย็น (cooler) และสารเคมีให้ความเย็น ได้แก่ น้ำแข็งแห้ง (dry ice) แบบสำเร็จรูป

วัสดุและอุปกรณ์ คอมพิวเตอร์ สำหรับการจัดเก็บ และวิเคราะห์ข้อมูลดิจิทัล และการจัดทำข้อมูลสารสนเทศภูมิศาสตร์ ได้แก่คอมพิวเตอร์ตั้งโต๊ะ ยี่ห้อ Acer รุ่น Pavilion 20 สำหรับการบันทึก และวิเคราะห์ข้อมูลในห้องปฏิบัติการ คอมพิวเตอร์แบบ laptop ยี่ห้อ Dell รุ่น Inspiron N4050 สำหรับบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูลระหว่างการทำงานภาคสนามเมื่อมีความจำเป็นต้องพักค้างคืน ระหว่างการเก็บตัวอย่าง เครื่องพิมพ์ยี่ห้อ Fuji Xerox รุ่น C Ducuprint CP 105b รวมทั้งอุปกรณ์สำหรับการเก็บรวบรวมข้อมูลดิจิทัล เช่น USB drive ซึ่งมีความจุตั้งแต่ 1 - 32 GB และแผ่น CD Rom เป็นต้น

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้มีการสั่งซื้อจากตัวแทนจำหน่ายที่ได้รับความเชื่อถือ รวมทั้งมีการคัดเลือกบริษัทผู้ผลิตที่มีคุณภาพ มีการตรวจสอบสภาพและอายุการใช้งาน และการใช้ในอัตรา และวิธีการตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด โดยสารเคมีที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่

1. corn meal agar
2. Czapek's agar
3. Malt extract agar
4. Oat meal agar
5. Potato dextrose agar
6. Melzer's iodine reagent
7. Lactophenol cotton blue
8. Immersion oil
9. Sodium hypochlorite (5.25%)
10. Ethyl alcohol (70% และ 95%)
11. Chloramphenicol
12. น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
13. Ammonium persulfate
14. Bovine serum albumin
15. Calcium hypochloride
16. Cophenetic

14. Hexadecyltrimethylammonium bromide
15. Cupric nitrate
16. Ethylenediaminetetraacetic acid
17. Hydrogen peroxide
18. Hydrogen sulfide
19. Potassium hydroxide
20. Magnesium chloride

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบโดยคัดเลือกอาหารเทียมที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิด

4.1.1 ผลการแยกเชื้อบริสุทธิ์

จากการนำตัวอย่างของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์มาฆ่าเชื้อบริเวณผิว โดยใช้วิธี triple surface sterilization แล้วแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation และ tissue culture ในอาหารวุ้น potato dextrose agar จากการทดลองในขั้นต้นพบว่า การแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี single spore isolation ให้ผลที่ดีกว่าวิธี tissue culture เนื่องจากพบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์น้อยกว่า จึงเลือกใช้วิธีการนี้ในการแยกเชื้อ และสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ได้ทุกสปีชีส์

4.1.2 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นชนิดต่าง ๆ

จากการนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด คือ corn meal agar, Czapek's agar, malt extract agar, oat-meal agar และ potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) เป็นเวลา 15-60 วัน พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในอาหาร potato dextrose agar รองลงมาคืออาหาร malt extract agar, corn meal agar, oat meal agar และ Czapek's agar ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์พบว่า *Ophiocordyceps* sp.1 *Ophiocordyceps* sp.2 และ *Ophiocordyceps* sp.3 เจริญได้อย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่ *O. nutans* เจริญได้ค่อนข้างช้า (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *Ophiocordyceps* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) เป็นเวลา 15-60 วัน

<i>Ophiocordyceps</i>	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ (mm)				
		Corn meal agar	Czapek's agar	Malt extract agar	Oat meal agar	Potato dextrose agar
<i>O.irangiensis</i>	30	15	7.5	19.5	17.5	18.5
<i>O.myrmecophila</i>	30	7.4	5.5	10	7.5	16
<i>O.nutans</i>	60	8	5.5	15.5	8	18
<i>O.sphecocephala</i>	30	16	6.5	18.5	13	22.5
<i>Ophiocordyceps</i> sp.1	15	47	24.5	51.5	46.5	54

ตารางที่ 4.1 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *Ophiocordyceps* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) เป็นเวลา 15-60 วัน (ต่อ)

<i>Ophiocordyceps</i>	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อ (mm)				
		Corn meal agar	Czapek's agar	Malt extract agar	Oat meal agar	Potato dextrose agar
<i>Ophiocordyceps</i> sp.2	15	49.5	26.5	53	49	57
<i>Ophiocordyceps</i> sp.3	15	48	25	52	47	54

4.1.3 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นที่อุณหภูมิต่างๆ

เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์เลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar ซึ่งเป็นอาหารที่เชื้อเจริญได้ดีที่สุด บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 15-60 วัน พบว่า เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20, 25 และที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) โดยเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25°C แต่มี 4 สปีชีส์ ได้แก่ *O. iranensis*, *Ophiocordyceps* sp.1 *Ophiocordyceps* sp.2 และ *Ophiocordyceps* sp.3 เจริญได้ที่อุณหภูมิ 30°C จากการทดลองไม่มีสปีชีส์ใดที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 45°C (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *Ophiocordyceps* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 15-60 วัน

<i>Ophiocordyceps</i>	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (mm) *					
		อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ \text{C}$)	20°C	25°C	30°C	37°C	45°C
<i>O. irangiensis</i>	30	20.5	19	20	7	-	-
<i>O. myrmecophila</i>	30	17	17.5	19	-	-	-
<i>O. nutans</i>	60	18	21	22.5	-	-	-
<i>O. sphecocephala</i>	30	22.5	23	25	-	-	-
<i>Ophiocordyceps</i> sp.1	15	54	55.6	59	6	-	-
<i>Ophiocordyceps</i> sp.2	15	57	59.5	63	37	-	-
<i>Ophiocordyceps</i> sp.3	15	56	57	60	37	-	-

* - หมายถึง ไม่มีการเจริญ

4.1.4 การศึกษาการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวันที่ pH ต่างๆ

เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* แต่ละสปีชีส์เลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar ซึ่งเป็นอาหารที่เชื้อเจริญได้ดีที่สุด ที่ปรับ pH เป็น 4, 5, 6, 7 และ 8 เทียบกับชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 25° C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญได้ดีที่สุด เป็นเวลา 15-60 วัน พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในอาหาร potato dextrose agar ที่มี pH เริ่มต้น 5-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 8 เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญได้ไม่มากนัก (ตารางที่ 4.3)

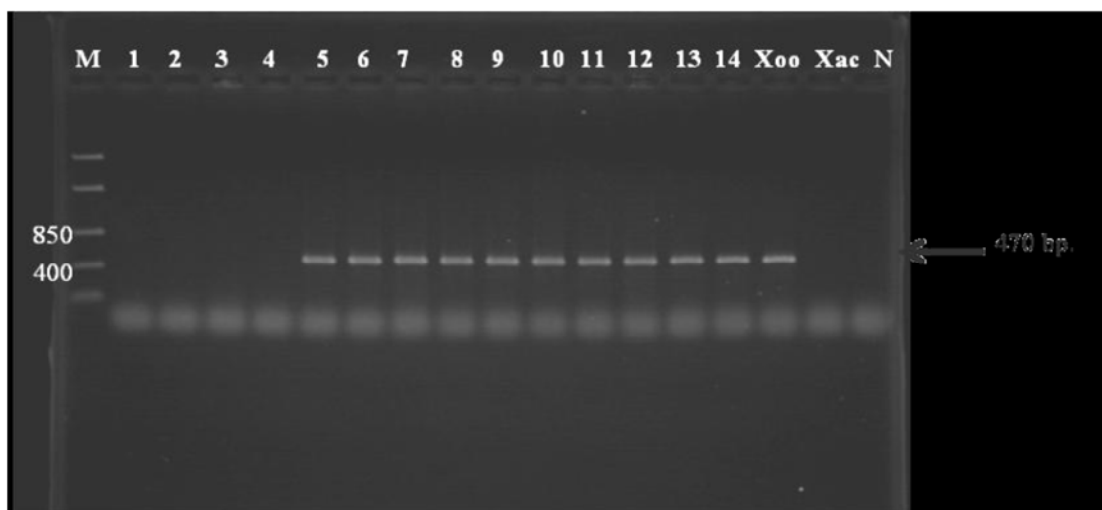
ตารางที่ 4.3 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของ *Ophiocordyceps* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่ pH ต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 25° C เป็นเวลา 15-60 วัน

<i>Ophiocordyceps</i>	ระยะเวลา บ่ม (วัน)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (mm) *					
		ชุดควบคุม (pH ~5.6)	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
<i>O.irangiensis</i>	30	21	18	21	21.5	16.5	15
<i>O.myrmecophila</i>	30	18	17	18.5	18	14.5	13.5
<i>O.nutans</i>	60	23.5	20	22	22.5	13	10.5
<i>O.sphecocephala</i>	30	25	23.5	25	25.5	22	21
<i>Ophiocordyceps</i> sp.1	15	59	56	59	61	54	52.5
<i>Ophiocordyceps</i> sp.2	15	63	59.5	62.5	63	56.5	54.5
<i>Ophiocordyceps</i> sp.3	15	59	57	58	62	55	53

4.2 ศึกษาลักษณะพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคแมลงสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์

4.2.1 การตรวจเชื้อด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

จากการตรวจเชื้อจำนวน 105 ไอโซเลท ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ XOR-F และ XOR-R2 เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 470 คู่เบส ของบริเวณ 16S-23S rDNA spacer ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Ophiocordyceps* (Naoto and Takashi, 2000) พบว่ามีเชื้อที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 470 คู่เบส เช่นเดียวกับเชื้อ *Ophiocordyceps* -0019 ที่เป็นสายพันธุ์อ้างอิง ในขณะที่มีเชื้อ 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CM L4-4, NW L1-1, NW L1-2, PRL2-1, PRL4-1, CH L8-2, BR L1-1 และ PG L1-1 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 470 คู่เบส



ภาพที่ 4.1 ผลการตรวจเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แลบดีเอ็นเอของสายพันธุ์เชื้อ *Ophiocordyceps* จากการเพิ่มปริมาณยีน 16S-23S spacer ขนาด 470 คู่เบส (ลูกศรชี้) ช่องที่ 1-14, M: Middle range DNA marker (Fermentas, Ontario, Canada)

4.2.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps*

การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *Ophiocordyceps* ด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR

จากการวิเคราะห์คูเอนไซม์และคูไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR (Bikandi *et al.*, 2004) โดยอาศัยข้อมูลจีโนมของเชื้อ *Ophiocordyceps* จากฐานข้อมูล NCBI และข้อมูลของเอนไซม์ตัดจำเพาะจาก Roberts *et al.* (2003) การทดสอบนี้ พบว่าเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* โดยมีไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสคัดเลือกว่าบริเวณปลาย 3' จำนวน 6 คู่ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 100-200 แถบ ได้แก่ คูไพรเมอร์ *EcoRI*+A/*MseI*+0, *EcoRI*+C/*MseI*+0, *EcoRI*+0/*MseI*+A, *EcoRI*+0/*MseI*+C, *EcoRI*+G/*MseI*+G และ *EcoRI*+0/*MseI*+T แต่ละคูไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 131, 198, 136, 182, 111 และ 183 แถบ ตามลำดับ โดยมีขึ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่สุด 2,987 bp. จากคูไพรเมอร์ *EcoRI*+A/*MseI*+0 และขนาดเล็กสุด 12 bp. จากคูไพรเมอร์ *EcoRI*+0/*MseI*+C จึงนำข้อมูลทั้ง 6 คูไพรเมอร์ที่ได้มาทดสอบจริงในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังมีคูเอนไซม์และคูไพรเมอร์อื่น ๆ ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 100-200 แถบ ซึ่งมีจำนวนและขนาดที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนอะครีลาไมด์เจล

1) การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *Ophiocordyceps* เพื่อหาคูเอนไซม์และคูไพรเมอร์ที่เหมาะสมด้วยเทคนิค AFLP

นำข้อมูลคูไพรเมอร์ที่ได้จาก *In Silico* AFLP-PCR จำนวน 6 คู่ ได้แก่ คูไพรเมอร์ *EcoRI*+A/*MseI*+0, *EcoRI*+C/*MseI*+0, *EcoRI*+0/*MseI*+A, *EcoRI*+0/*MseI*+C, *EcoRI*+G/*MseI*+G และ *EcoRI*+0/*MseI*+T ร่วมกับอีก 2 คูไพรเมอร์ ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ ได้แก่ *EcoRI*+0/*MseI*+0 และ *EcoRI*+0/*MseI*+G โดยนำมาทดสอบจริงในห้องปฏิบัติการกับเชื้อ *Ophiocordyceps* พบว่าสามารถแบ่งคูไพรเมอร์ออกเป็นสามกลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรก คูไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด (total band) จำนวนมาก ไม่สามารถประเมินได้ด้วยสายตา ได้แก่ *EcoRI*+0/*MseI*+0 และ *EcoRI*+0/*MseI*+G

กลุ่มสอง เป็นกลุ่มคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ ทั้งหมดที่สามารถประเมินได้ด้วยสายตา แต่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism band) น้อย ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+0/*MseI*+A, *EcoRI*+0/*MseI*+C, *EcoRI*+0/*MseI*+T มีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดเท่ากับ 105 แถบ, 105 แถบ และ 102 แถบ และให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เท่ากับ 11 แถบ, 8 แถบ และ 10 แถบ ตามลำดับ และกลุ่มสามเป็นกลุ่มคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดสามารถประเมินได้ด้วยสายตา และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากที่สุดจากไพรเมอร์ที่ทดสอบ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+A/*MseI*+0, *EcoRI*+C/*MseI*+0 และ *EcoRI*+G/*MseI*+G ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดเท่ากับ 81 แถบ, 81 แถบ และ 94 แถบ และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเท่ากับ 18 แถบ 16 แถบ และ 13 แถบ ตามลำดับ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เท่ากับ 22.22% 19.51% และ 13.82% ตามลำดับ

ผลการทดสอบการวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *Ophiocordyceps* ในห้องปฏิบัติการด้วยคู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+0/*MseI*+0 และ *EcoRI*+0/*MseI*+G ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR คือให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่า 200 แถบ ซึ่งไม่สามารถประเมินบนอะครีลาไมด์เจลได้ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ เพิ่มเบสคัดเลือกรหัสหนึ่งเบสเพียงหนึ่งข้างของไพรเมอร์แต่ละชนิด (+1/0 หรือ 0/+1) จึงทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้ยังมีจำนวนมาก หากเลือกคู่ไพรเมอร์จากการทดลองในโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR ที่ให้แถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 50-100 แถบ อาจช่วยลดจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทดสอบจริงบนอะครีลาไมด์

จากการใช้เทคนิค *In Silico* AFLP-PCR ช่วยในการวิเคราะห์หาคู่เอนไซม์และคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR กับเทคนิค AFLP พบว่าการทดลองด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR ให้แถบดีเอ็นเอมากกว่าการทดสอบ AFLP ในห้องปฏิบัติการบนอะครีลาไมด์เจล เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR จากเว็บไซต์สามารถวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 20 bp. และนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่มีลำดับเบสต่างกันเข้าไปด้วย ดังนั้น ผลการวิเคราะห์จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงใน *In Silico* AFLP-PCR analysis จึงมากกว่าการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งใช้อะครีลาไมด์เจลในการตรวจแยกแถบดีเอ็นเอ โดยที่แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กอาจเคลื่อนออกนอกแผ่นเจลไป หรือแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่ลำดับเบสที่แตกต่างกันก็ไม่สามารถแยกแถบดีเอ็นเอได้จากเจล

จากข้อมูลการทดสอบเบื้องต้นนี้จึงคงได้นำทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+A/*MseI*+0, *EcoRI*+C/*MseI*+0 และ *EcoRI*+G/*MseI*+G ทดสอบกับเชื้อ เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps* ที่รวบรวมได้

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *In Silico* AFLP-PCR โดยอาศัยฐานข้อมูลจีโนมเชื้อ *Ophiocordyceps* กับการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ *Ophiocordyceps* ที่รวบรวมได้ ด้วยเทคนิค AFLP

ไพรเมอร์	<i>In Silico</i> AFLP-PCR	AFLP gel		
		แถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด	แถบดีเอ็นเอที่ แตกต่าง	% ความ แตกต่าง
<i>EcoRI</i> +0/ <i>MseI</i> +0	734	-	-	-
<i>EcoRI</i> +0/ <i>MseI</i> +G	235	-	-	-
<i>EcoRI</i> +0/ <i>MseI</i> +A	136	105	11	10.47
<i>EcoRI</i> +0/ <i>MseI</i> +C	182	105	8	7.61
<i>EcoRI</i> +0/ <i>MseI</i> +T	183	102	10	9.08
<i>EcoRI</i> +A/ <i>MseI</i> +0	131	81	18	22.22
<i>EcoRI</i> +C/ <i>MseI</i> +0	198	82	16	19.51
<i>EcoRI</i> +G/ <i>MseI</i> +G	111	91	13	13.82

หมายเหตุ – ไม่สามารถประเมินแถบดีเอ็นเอได้

2) วิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *Ophiocordyceps* ด้วยเทคนิค AFLP

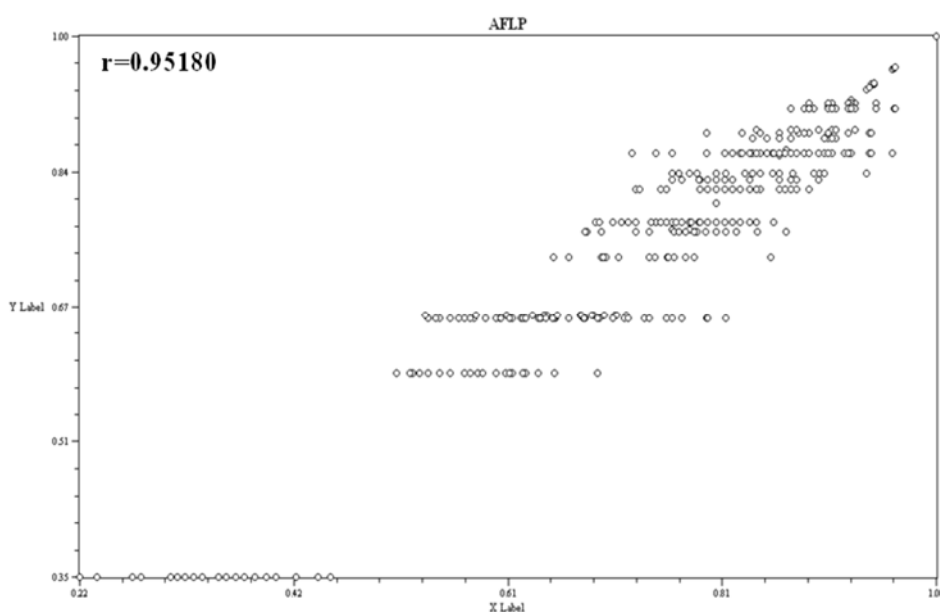
วิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *Ophiocordyceps* มาทดสอบกับเชื้อ *Ophiocordyceps* จำนวน 31 ไอโซเลท ด้วยคู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+A/*MseI*+0, *EcoRI*+C/*MseI*+0 และ *EcoRI*+G/*MseI*+G พบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างเท่ากับ 17 แถบ 24 แถบ และ 20 แถบ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) รวมจำนวนดีเอ็นเอที่แตกต่างได้ทั้งสิ้น 61 แถบ และให้เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างเฉลี่ย เท่ากับ 24.69% โดยพบว่าคู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+C/*MseI*+0 ให้เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างสูงสุดคือที่ 30.76%

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบจำนวนแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ *Ophiocordyceps* จำนวน 31 ไอโซเลท

ไพรเมอร์	AFLP gel		
	แถบดีเอ็นเอทั้งหมด	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง	%ความแตกต่าง
<i>EcoRI</i> +A/ <i>MseI</i> +0	80	17	21.25
<i>EcoRI</i> +C/ <i>MseI</i> +0	78	24	30.76
<i>EcoRI</i> +G/ <i>MseI</i> +G	89	20	22.47
รวม	247	61	24.69

3) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps* จากเทคนิค AFLP ด้วยวิธี UPGMA

เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps* ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้แถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากการทำปฏิกิริยาด้วยคู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+*A/MseI*+0, *EcoRI*+*C/MseI*+0 และ *EcoRI*+*G/MseI*+*G* และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.01d (Applied Biostatistics, Inc) จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วย Dice's coefficient โดยใช้เชื้อ *Ophiocordyceps* เป็นเชื้อ out-group พบว่าสามารถแยกเชื้อทั้งสองได้ที่ค่าความเหมือน (similarity) เท่ากับ 0.35 และพบว่าประชากรเชื้อ *Ophiocordyceps* ที่รวบรวมได้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีค่า goodness of fit ของการจัดกลุ่มโดยคำนวณได้จาก cophenetic correlation (r) ได้ค่าเท่ากับ 0.95180 (ภาพที่ 4.2) หากค่า r มีค่ามากกว่า 0.9 แสดงถึงกลุ่มที่จัดได้อยู่ในระดับที่ดีมาก และมีความน่าเชื่อถือ (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2544)



ภาพที่ 4.2 การกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค AFLP คำนวณด้วยโปรแกรมย่อย MxComp ของโปรแกรม NTSYS version 2.01d ผลคำนวณได้ค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.95180

4) การวิเคราะห์จีโนมของเชื้อ *Ophiocordyceps* ด้วยเทคนิค rep-PCR

จากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ *Ophiocordyceps* ด้วยเทคนิค rep-PCR พบว่าไพรเมอร์ REP ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 36 แถบ โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 23 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง เท่ากับ 63.9% ขณะที่ไพรเมอร์ ERIC ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 30 แถบ และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 14 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง 46.7% (ตารางที่ 4.6)

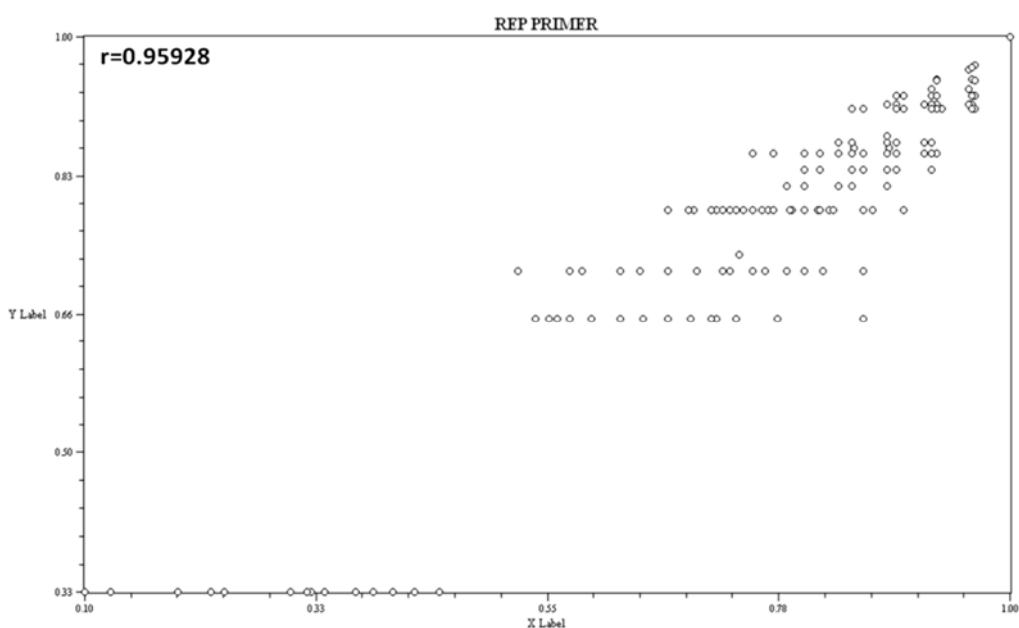
ตารางที่ 4.6 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์จีโนมเชื้อ *Ophiocordyceps* ด้วยไพรเมอร์ REP และ ERIC

ไพรเมอร์	แถบดีเอ็นเอทั้งหมด	แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง	%ความแตกต่าง
REP	36	23	63.9
ERIC	30	14	46.7
รวม	76	37	48.68

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps* จากไพรเมอร์ REP

1) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps* จากไพรเมอร์ REP ด้วยวิธี UPGMA

จากเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Ophiocordyceps* ที่ได้จาก ไพรเมอร์ REP พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Ophiocordyceps* ได้ชัดเจน เมื่อคำนวณค่า cophenetic correlation ได้เท่ากับ 0.95928 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค AFLP (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 การกระจายของข้อมูลในการจัดกลุ่มของเทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP คำนวณด้วยโปรแกรมย่อย MxComp จากโปรแกรม NTSYS version 2.01d ได้ค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.95928

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การสำรวจ รวบรวม จำแนกชนิด และระบุจุดพิกัด ของแมลงที่ถูกเชื้อรา *Ophiocordyceps* spp. ลงทำลาย ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ ตั้งแต่เดือนกันยายน 2558 - กันยายน 2559 ในช่วงพิกัด เส้นรุ้งที่ 18 องศา 24 ลิปดา 00 พิลิปดาเหนือ (พิกัด UTM; 2034381 N) ถึง 18 องศา 40 ลิปดา 00 พิลิปดาเหนือ (พิกัด UTM; 2063808 N) และเส้นแวงที่ 98 องศา 24 ลิปดา 00 พิลิปดา ตะวันออก (พิกัด UTM; 436635 E) ถึง 98 องศา 41 ลิปดา 00 พิลิปดาตะวันออก (พิกัด UTM; 466609 E) ความสูงจากระดับทะเลปานกลาง 2,565 เมตร ครอบคลุม พื้นที่บริเวณอ่างกา กัวแม่ปาน และน้ำตกวชิรธาร ของอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ สามารถเก็บรวบรวม *Ophiocordyceps* spp. จัดจำแนกได้ 4 สปีชีส์ คือ *Ophiocordyceps nutans*, *Ophiocordyceps myrmecophila*, *Ophiocordyceps sphecocephala* และ *Ophiocordyceps irangiensis* และที่ไม่สามารถระบุชื่อ ได้อีก 3 สปีชีส์ คือ *Ophiocordyceps* sp.1 *Ophiocordyceps* sp.2 และ *Ophiocordyceps* sp.3 แยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ทุกสปีชีส์นำไปเพาะเลี้ยงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในอาหารวุ้นที่มีสูตรอาหาร pH และอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 15-60 วันในที่มืด พบว่า ทุกสปีชีส์ได้ดีในอาหาร potato dextrose agar ที่มี pH เริ่มต้น 5-6 ที่อุณหภูมิ 25° C และสร้าง โครงสร้างสืบพันธุ์แบบเต็มได้ ยกเว้น *Ophiocordyceps nutans*

การศึกษาลักษณะพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคแมลงสกุล *Ophiocordyceps* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ ทำให้จัดกลุ่ม *Ophiocordyceps* ด้วย เทคนิค AFLP และ rep-PCR โดยเทคนิค AFLP ใช้ไพรเมอร์ จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ *EcoRI*+*A/MseI*+0, *EcoRI*+*C/MseI*+0 และ *EcoRI*+*G/MseI*+G ส่วนเทคนิค rep-PCR ใช้ไพรเมอร์ REP และ ERIC เมื่อแบ่งกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ที่ค่า similarity 0.80 พบว่าเทคนิค AFLP แบ่งกลุ่มเชื้อ ได้ 9 กลุ่ม ขณะที่เทคนิค rep-PCR พบว่าไพรเมอร์ REP จัดแบ่งกลุ่มเชื้อได้ 5 กลุ่ม และไพรเมอร์ ERIC จัดแบ่งได้ทั้งหมด 9 กลุ่ม โดยทั้งผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP และ rep-PCR ให้ผลสอดคล้องกันคือต่างชี้ให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps* ที่รวบรวมได้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เมื่อพิจารณาจากค่า r พบว่าทั้งสองเทคนิคมีค่า ความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่มสูง โดยเทคนิค AFLP และ REP ไพรเมอร์ มีค่า r ใกล้เคียงกันคือ ที่ 0.95180 และ 0.95928 ในขณะที่ ERIC ไพรเมอร์มีค่า r เท่ากับ 0.85325 ซึ่งน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าผลการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP และ rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ REP มีเชื้อจำนวน 24 ไอโซเลทจาก 31 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 77.41 ของประชากรเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

5.2 อภิปรายผล

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ทำได้ด้วยวิธี single spore isolation และ tissue culture บนอาหาร potato dextrose agar จากการศึกษาในขั้นต้นพบว่าการแยกเชื้อด้วยวิธี tissue culture ใช้เวลานานในการเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อให้เจริญเป็นเส้นใย และมักเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียหรือยีสต์บนชิ้นเนื้อเยื่อที่วางบนอาหาร การแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์จึงทำได้ยากสำหรับการแยกเชื้อโดยวิธี single spore isolation พบว่าสปอร์สามารถงอกเป็นเส้นใย และเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้รวดเร็วกว่า รวมทั้งมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นน้อยกว่าด้วย วิธีนี้จึงน่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps*

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* บนอาหารวุ้น corn meal agar, Czapek's agar, malt extract agar, oat meal agar และ potato dextrose agar ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า *Ophiocordyceps* เจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar ได้ดีกว่าอาหารชนิดอื่น ๆ อาจเนื่องมาจากอาหารชนิดนี้มีสารอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *Ophiocordyceps* มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น (corn meal agar, malt extract agar และ oat meal agar) หรืออาจเป็นเพราะว่าอาหาร potato dextrose agar มีแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* จึงนำไปใช้ได้ง่ายกว่าในขณะที่แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายก่อนจึงจะนำไปใช้ได้ สำหรับอาหารสังเคราะห์ (Czapek's agar) เชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญได้ไม่ดี อาจเป็นเพราะอาหารชนิดนี้มีแหล่งคาร์บอนที่ย่อยสลายยากและยังขาดแคลนวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของเส้นใย ด้วย เชื้อ *Ophiocordyceps* จึงเจริญได้เพียงเล็กน้อย ถ้าหากมีการปรับสูตรอาหาร Czapek's agar ให้มีความเหมาะสมกับการเจริญของ *Ophiocordyceps* ก็อาจนำอาหารชนิดนี้ไปใช้ในการทดสอบความต้องการแหล่งอาหารของเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* ได้ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Wang (1989) ที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* 7 สปีชีส์ และ Sung and Hyun (1995) เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* 6 สปีชีส์ ก็พบว่าสามารถเจริญได้ดีบนอาหาร potato dextrose agar เช่นเดียวกัน

เมื่อเทียบอัตราการเจริญเติบโตในอาหาร potato dextrose agar ของเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* กับการเจริญของฟังไจชนิดอื่นพบว่าเชื้อ *Ophiocordyceps* เจริญได้ค่อนข้างช้า สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะ *Ophiocordyceps* ต้องการสารอาหารบางอย่างจากแมลงในการเจริญของเส้นใยด้วย ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Sung (2000) ที่ทดลองเลี้ยง *Ophiocordyceps militaris* ในอาหารที่มีข้าวและดักแด้ของแมลงเป็นส่วนประกอบ พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญเติบโตได้ดีและยังสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar ที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 20, 25, 30, 37 45° C และที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ$ C) พบว่า *Ophiocordyceps* ทุกสปีชีส์สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20, 25 และที่อุณหภูมิห้อง ($27 \pm 2^\circ$ C) โดยเจริญได้ดีที่ 25° C มีบางสปีชีส์เจริญได้ที่ 30° C แต่เจริญได้ไม่ดึ้นก ที่อุณหภูมิ 37 และ 45° C ไม่พบการเจริญของเชื้อบริสุทธิ์ ผลการทดลองนี้ใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อ *Ophiocordyceps* ของ

Hywel-Jones (1994) และ Sung *et al.* (1995) ที่รายงานว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญได้ที่อุณหภูมิ 22 และ 20° C ตามลำดับ

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* บนอาหาร potato dextrose agar ที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 4, 5, 6, 7, 8 และ ไม่ปรับ pH (pH 5.6) ที่อุณหภูมิ 25° C พบว่าเชื้อบริสุทธิ์ของ *Ophiocordyceps* เจริญได้ในอาหารทุก pH ที่ทดลอง กล่าวคือมีความกว้างของโคโลนีใกล้เคียงกัน โดยอาหารที่มี pH 5-6 จะเป็นอาหารที่เส้นใยของเชื้อบริสุทธิ์เจริญได้ดีที่สุด แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Ophiocordyceps* เจริญได้ในอาหารที่มี pH ทั้งที่เป็นกรดและเบส โดยจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีสภาพเป็นกรดอ่อน

เทคนิค AFLP และ rep-PCR เป็นเครื่องมือที่มีการนำมาใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรเชื้อ *Ophiocordyceps* ก่อนหน้านี้ได้มีการใช้เทคนิค AFLP หรือ rep-PCR (Adhikari *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2012) เพียงเทคนิคใดเทคนิคหนึ่งเท่านั้นในการศึกษา ด้วยวิธีการที่มีประสิทธิภาพทั้งสองวิธีทำให้สามารถศึกษาความสัมพันธ์ของประชากรเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากการสุ่มคัดเลือกลำดับดีเอ็นเอในจีโนมเชื้อ *Ophiocordyceps* จากส่วนที่แตกต่างกันได้มากขึ้น ดังนั้นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อที่นำมาศึกษาจึงเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีทั้งชนิดขนาดและจำนวนที่แตกต่างกัน

เนื่องจากเทคนิค AFLP และ rep-PCR มีหลักในการสุ่มเลือกและเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของจีโนมเชื้อ *Ophiocordyceps* ที่แตกต่างกัน โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก AFLP เป็นการสุ่มเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิดและจำนวนเบสคัดเลือกว่าอยู่ปลายไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในขณะที่ rep-PCR จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในขอบเขตที่จำเพาะชัดเจน โดยอาศัยการเข้าคู่กันระหว่างไพรเมอร์กับ repetitive element (rep-element) เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวร่วมกับการใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในขอบเขตที่จำเพาะชัดเจน เฉพาะช่วงลำดับที่อยู่ระหว่าง REP, ERIC และ BOX เท่านั้น ตำแหน่งต่าง ๆ ของ repetitive elements ซึ่งกระจายรอบจีโนมของเชื้อจะจำเพาะแน่นอนและเหมือนกันสำหรับสายพันธุ์เดียวกัน แต่แตกต่างกันเมื่อเป็นคนละสายพันธุ์ทำให้ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อในระดับ races หรือ strains ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ขั้นตอนการปฏิบัติงานยังสะดวกกว่าเทคนิค AFLP เนื่องจากใช้เทคนิคพีซีอาร์ และการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลได้ ทำให้เหมาะกับการนำมาศึกษาความผันแปรของประชากรเชื้อจำนวนมากและหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันให้ดีขึ้น สามารถเลือกวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยอะครีลาไมด์เจลได้เช่นเดียวกับเทคนิค AFLP อย่างไรก็ตาม rep-PCR มีข้อจำกัดคือมีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ ได้มีจำนวนจำกัด ในขณะที่เทคนิค AFLP สามารถสุ่มเลือกจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจะศึกษาเพิ่มได้ไม่จำกัด เพียงแค่เปลี่ยนชนิดของเอนไซม์หรือไพรเมอร์

5.3 ข้อเสนอแนะในการนำผลงานวิจัยไปใช้และการทำวิจัยครั้งต่อไป

การศึกษาในโครงการนี้ เป็นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสำรวจความหลากหลายทางชนิดของเชื้อราทำลายแมลงชนิดต่าง ๆ ในสกุล *Ophiocordyceps* ที่พบในพื้นที่วนอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ ทำให้ทราบว่า การศึกษา *Ophiocordyceps* ในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก และยังอยู่ในวงจำกัด ข้อมูลต่าง ๆ รวมทั้งหนังสือ หรือรูปวิธานมีอยู่น้อย จึงเกิดปัญหาในการบ่งบอกชื่อวิทยาศาสตร์ในระดับสปีชีส์ จึงควรสอบถามข้อมูลโดยตรงจากผู้เชี่ยวชาญหรือผู้ที่ศึกษา *Ophiocordyceps* มาก่อนควรทำฐานข้อมูลและ pictorial key เพื่อให้งานอนุกรมวิธานทำได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ปัจจัยที่พบว่ามีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ophiocordyceps* ได้แก่ สภาพพื้นที่ของอุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ สภาพแวดล้อมของป่าไม้ และระบบนิเวศที่แตกต่างกัน โดยพบว่าประชากรเชื้อที่รวบรวมได้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

หากต้องการศึกษาประชากรเชื้อจำนวนมากเทคนิค rep-PCR เป็นเทคนิคปฏิบัติงานได้สะดวกและมีประสิทธิภาพกว่าเทคนิค AFLP โดยมีความจำแนกและให้ความถูกต้องของข้อมูลในการศึกษาความหลากหลายของประชากรเชื้อ *Ophiocordyceps* ได้ไม่แตกต่างจากเทคนิค AFLP

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

- กนก เลิศพานิช. (2557). *Population Ecology*. สืบค้นเมื่อ 27 กรกฎาคม 2557. จาก http://www.kmitl.ac.th/agritech/nutthakorn/04090035_2202/multiweb/envirom/pdf/population.pdf.
- กรมแผนที่ทหาร. (2535). *แผนที่สภาพภูมิประเทศจังหวัดเชียงใหม่ มาตราส่วน 1:50,000*. กรุงเทพฯ: กระทรวงกลาโหม.
- คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2557). *ศูนย์วิจัยภูมิสารสนเทศเพื่อประเทศไทย*. สืบค้นเมื่อ 27 กรกฎาคม 2557. จาก <http://www.gisthai.org/about-gis/gis.html>.
- ไทยออฟโรดดอทคอม. (ม.ป.ป.). *แหล่งท่องเที่ยวพื้นที่อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์*. วันที่ 27 กรกฎาคม 2557. <http://www.thailandoffroad.com/>.
- นิวัติ อนงค์รักษ์. (2545). *ลำดับดินบนพื้นที่สูงที่ได้รับสิทธิพลจากการใช้ประโยชน์ที่ดินและสิ่งปกคลุมดินในบริเวณดอยอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่*. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รุ่งเกียรติ แก้วเพชร และสมพร แสงยศ. (2559). *แฟ้มข้อมูลแผนที่เพื่อการวิจัยและการเรียนการสอน*.
- วรรณฤดี หิรัญรัตน์. (2557). *สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟต์ (Bioactive Compounds from Endophytic Fungi)*. สืบค้นเมื่อ 27 กรกฎาคม 2557. จาก http://rms.rdi.tsu.ac.th/ejournal/journaldetail/12_2/10.pdf.
- วินันท์ดา หิมะมาน, จันจิรา อายะวงศ์, กิตติมา ดั่งแคว และกฤษฎา พงษ์พานิช. (2554). *ความหลากหลายของราทำลายแมลงและแมลงมุมในกลุ่มป่าแก่งกระจาน*. สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.
- สารานุกรมเสรี. (2557). *ถ้ำเช่า*. สืบค้นเมื่อ 27 กรกฎาคม 2557. จาก <http://th.wikipedia.org/wiki/ถ้ำเช่า>.
- สุชาดา มงคลสัมฤทธิ์, เจเน็ต เจนนีเฟอร์ เหลืองสะอาด, กนกศรี ทัศนาศัย และสมศักดิ์ ศิริชัย. (2553). *ราก่อโรคในแมลงของประเทศไทย*. ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. ปทุมธานี.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). *จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดี และอาร์เอฟแอลพี*. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (พิมพ์ครั้งที่ 1). สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานพัฒนานิเวศวิทยาและเทคโนโลยีแห่งชาติ. (2544). *การวิเคราะห์การจัดกลุ่มข้อมูลสำหรับงานวิจัยด้านเชื้อราโรคแมลง*, น.34-120. ในรายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการการวิเคราะห์การจัดกลุ่มความหลากหลายของเชื้อราโรคแมลงในระดับโมเลกุล 1-3 มกราคม 2544.

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

- Adhikari, T.B., T.W. Mew and J.E. Leach. (1999). Genotype and pathotypic diversity in *Ophiocordyceps* in Nepal. *Phytopathology*, 89, 687-694.
- Ban, S., Sakane T., Toyama, K. & Nakagiri, A. (2009). Teleomorph-anamorph relationships and reclassification of *Cordyceps cuboidae* and its allied species. *Mycoscience*, 50, 261-272.
- Baral, B. & Maharjan, J. (2012). In-vitro culture of *Ophiocordyceps sinensis* (Yarsagumba) and their associated endophytic fungi of Nepal Himalaya. *Scientific World*, 10(10), 38-42.
- Blackwell, M. (1984). New information on *Cordycepioideus bisporus* and *Cordycepioideus octosporus*. *Mycologia*, 76(4), 763-765.
- Boesi A. & Cardi, F. (2009). *Cordyceps sinensis* Medicinal Fungus: Traditional Use among Tibetan People, Harvesting Techniques, and Modern Uses by *HerbalGram*, 83, 52-61.
- Bok, J.W., Lerner, L., Chilton, J., Klingeman, H. & Towers, G.N. (1999). Antitumour sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry*, 51, 891-898.
- Burrough, P.A. & McDonnell, R.A. (1998). *Principles of geographical information systems*. Oxford: Oxford University Press, 327 pp.
- Copping, L.G. (2009). *The manual of biocontrol agents*. 4th ed. Hampshire, UK: BCPC, 702 pp.
- Chen, X.L., L. Yu, L. Gao, T. Liang, Q.Y. Li and Q. Huang. (2012). Elevation variation in diversity of *Cordyceps* south-west China. *Phytopathology*, 160, 261-268.
- Chen, Y.J., Shiao, M.S., Lee, S.S. & Wang, S.Y., (1997). Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sciences*, 60, 2349-2359.
- Chang Gung Biotechnology. (n.d.). *Ophiocordyceps sinensis* (*Cordyceps sinensis*). Retrieved July 28, 2014. from http://www.cgb.com.tw/j2j0/cus/cus2/rd/rd_main_3_6.jsp
- Dictionary.com. (2014). *Perithecia*. Retrieved July 28, 2014. From <http://dictionary.reference.com/browse/Perithecia?s=t>
- Evan, H. C., & Samson, R.A. (1982). *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems: The *Cephalotes* (Myrmicinae) complex. *Transaction British Mycological Society*, 79 (3), 431-453.

- Evan, H.C., Simon, L.E. & Hughes, D.P. (2011). Ophiocordyceps unilateralis - A keystone species for unraveling ecosystem functioning and biodiversity of fungi in tropical forests? *Communicative & Integrative Biology*, 4(5), 598-602.
- Harmon, K. (2009). Fungus makes zombie ants do all the work". *Scientific American*. Retrieved 2010-08-22.
- Hendricks, C.A. (1981). Soil-vegetation relations in the north continental highland region of Thailand: A preliminary investigation of soil-vegetation correlation. *Soil Survey Report Technical Bulletin*, 32, 1-112.
- Holliday, J. & Cleaver, M. (2008). Medicinal value of the caterpillar fungi species of Genus *Cordyceps* (Hr.) Ling (Sacomycetes). A review. *International Journal of Medicinal Mushroom*, 10(3), 219-234.
- Hobbs, C. (1995). *Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing, & culture*. 2nd ed. Santa Cruz, CA, USA: Botanica Press, 252 pp.
- Hsu, J.H., Jhou, B.Y., Yeh, S.H., Yen-lien Chen, Y.I. and Chin-Chen, C.C. (2015). Healthcare Functions of *Cordyceps cicadae*. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 5(6), 432. Doi: 10.4172/2155-9600.1006432
- Hywel-Jones, N. L. (1994). *Cordyceps khaoyaiensis* and *Cordyceps pseudomilitaris*, two new pathogens of lepidopteran larvae from Thailand. *Mycological Research*, 98, 939-942.
- _____. (1995a). *Cordyceps sphecocephala* and a *Hymenostilbe* sp. infecting wasps and bees in Thailand. *Mycological Research*, 99, 154-158.
- _____. (1995b). *Cordyceps nutans* and its anamorph, a pathogen of Hemipteran bugs in Thailand. *Mycological Research*, 99, 724-726.
- _____. (1995c). *Cordyceps brunneapunctata* sp. nov. infecting beetle larvae (Coleoptera: Elateridae) in Thailand. *Mycological Research*, 99, 1195-1198.
- _____. (1996). *Cordyceps myrmecophila* -like fungi infecting ants in the leaf litter of tropical forest in Thailand. *Mycological Research*, 100, 613-619.
- _____. (2002). Whole ascospores and part-spores in the megagenus *Cordyceps*. *Mycological Research*, 106, 2-3.
- Hywel-Jones, N. L. & Sivichai, S. (1995). *Cordyceps cylindrica* and its association with *Nomuraea atypicola* in Thailand. *Mycological Research*, 99, 809-812.
- Jone, K. (1993). A brief pharmacologic review of *Cordyceps sinensis* and *C. ophioglossoides*. Armana Research.
- Kittakoop, P., Punyaa, J., Kongsaree, P., Lertwerawat, Y., Jintasirikul, A., Tanticharoen, M., & Thebtaranonth, Y. (1999). "Bioactive naphthoquinones from *Cordyceps unilateralis*." *Phytochemistry*. 52 (3): 453-457.

- LeClerc, E.L., Leonard, W.H. & Clark, A.G. (1966). *Field plot technique*. 2nd ed. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing, 373 pp.
- Louws, F.J., D.W. Fulbright, C.T. Stephens and F.J.D. Bruijn. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic fungi and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2286-2295.
- Mizuno, T. (1998). Immunological diet for cancer serious disease. Gendaishorin, Tokyo, 188 pp. *Mycobiology*, 33(4), 235-239.
- Poinar, G.O. Jr. & Thomas, G.M.. (1984). *Laboratory guide to insect pathogens and parasites*. New York: Plenum Press. 392 pp.
- Pontoppidan, M.B., Himaman, W., Hywel-Jones, N., Boomsma, J.J. & Hughes D.P. (2009). "Graveyards on the move: The spatio-temporal distribution of dead *Ophiocordyceps*-infected ants." *PLOS ONE*. 4 (3): e4835.
- Pooma, R. & Barfod, A. (2001). Vegetation type of Northern Thailand, pp. 11-15. In E. Poulsen, F. Skov, S. Lakanavichian, S. Thanisawanyangkura, H. Borgtoft & O. Hoiris. *Forest in Culture- Culture in Forest. Research Centre on Forest and People in Thailand*, Danish. Institute of Agricultural Sciences, Denmark.
- Shannon, C.E. (1948). A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, 27, 379-423.
- Samson, R.A., Even, H.C. & Latgé, J. P. (1988). *Atlas of Entomopathogenic fungi*. New York : Springer-Verlag. 187 pp.
- Shrestha, B. & Sung J.M. (2005). Notes on *Cordyceps* species collected from the Central Region of Nepal. *Mycobiology*, 33(4), 235-239.
- Srivilai, P., Surapron, S. & Louchanwoot, P. (2013). First report of *Cordyceps* sp. isolated from cicada in Northeastern Thailand and their characterizations. *Journal of Biological Sciences*, 13 (7), 587-595. Doi: 10.3923/jbs.2013.587.595
- Steinhaus, E.A. (1967). *Principles of insect pathology*. New York: Hafner Publishing, 756 pp. (Facsimile of the Edition of 1949).
- Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-ard, J.J., Shrestha, B. & Spatafora, J.W. (2007). Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 57, 5-59.
- Sung, J.M., and Hyun, K.L. (1995). Classification of *Cordyceps* spp. By morphological characteristics and protein banding pattern. *Korean Journal of Mycology*, 23, 92-104
- Tanada, Y. & Kaya, H.K. (1993). *Insect pathology*. San Diego: Academic Press, 666 pp.
- TCM Wiki. com. (2014). *Dong-chong-xia-cao*. Retrieved July 27, 2014. from <http://www.tcmwiki.com/wiki/dong-chong-xia-cao>

- Thefreedictionary. (2014). *Stroma*. Retrieved July 28, 2014. from <http://www.thefreedictionary.com/stroma>
- Vera Cruz, C.M., E.Y. Ardales, D.Z. Skinner, J. Talag, R.J. Nelson, F.J. Louws, H. Leung, T.M. Mew and J.E. Leach. (1996). Measurement of haplotypic variation in *Ophiocordyceps* within a single field by rep-PCR and RFLP analysis. *Phytopathology*, 86, 1352-1359.
- Versalovic, J., T. Koeuth and J.R. Lupski. (1991). Distribution of repetitive DNA sequence in eubacterium and application of fingerprinting of bacterium genomes. *Nucleic Acids Research*, 19, 6823-6831.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V.D. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprint. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.
- wikipedia. (2014). Cordycepin. (Online). Retrieved July 27, 2014. from <http://en.wikipedia.org/wiki/Cordycepin>.
- _____. (2014). Spatial distribution. Retrieved July 27, 2014. from http://en.wikipedia.org/wiki/spatial_distribution.
- Wiener, N. (1948). *Cybernetics: or control and communication in the animal and the machine*. Cambridge, MA: Herman et Cie, Paris and MIT Press, 194 pp.
- Winkler, D. (2008). Yartsa Gunbu (*Cordyceps sinensis*) and the fungal commodification of Tibet's rural economy¹. *Economic Botany*, 62(3), 291-305.
- Yap, I.V. and R.J. Nelson. (1996). *Winboot a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendograms*. *IRRI discussion paper series 14*. International Rice Research Institute, Manila, the Philippines.
- Zhu, B.C., Chai, Y.Q., Zhang, S.S., Peng, X.X., Jin, Y.W. & Chen, G.J. (2016). Effects of active components from *Ophiocordyceps sobolifera* on anticonvulsions. *Mycosystema*, 35(5), 619-627.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

corn meal agar

ข้าวโพดอบ	30	กรัม
agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ห่อข้าวโพดที่นำไปบดจนละเอียดด้วยผ้าขาวบาง ต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ประมาณ 30 นาที กรองเอากากออก เติมน้ำ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Czapek's agar

NaNO ₃	3	กรัม
K ₂ HPO ₄	1	กรัม
KCl	0.5	กรัม
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5	กรัม
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.01	กรัม
Sucrose	30	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ยกเว้น K₂HPO₄ ให้เติมหลังจากส่วนผสมอื่น ๆ ละลายจนหมดแล้ว เติมน้ำตาลและยูน ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นต้มจนร้อนละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

malt extract agar (MEA)

malt extract	20	กรัม
agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มจนร้อนละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

oat meal agar (OA)

ข้าวโอ๊ตอบ	20	กรัม
salt solution	1	มิลลิลิตร
agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.2	

salt solution 100 มิลลิลิตร :	FeSO ₄ 7H ₂ O	0.1 กรัม
	MnCl ₂ 4H ₂ O	0.1 กรัม
	ZnSO ₄ 4H ₂ O	0.1 กรัม

ต้มข้าวโอ๊ตอบในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 15-20 นาที จนตลอดเวลา จากนั้นกรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำ และ salt solution แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

potata dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
dextrose	20	กรัม
agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	5.6	

ล้างหัวมันฝรั่งให้สะอาด ปอกเปลือก แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1 × 1 × 1 เซนติเมตร ชั่งให้ได้ 200 กรัม แล้วนำมาต้มกับน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นาน 15-20 นาที กรองเอาส่วนที่เป็นกากออก เติมน้ำตาลและนึ่ง ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปต้มจนนึ่งละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

น้ำยาทดสอบและวิธีการเตรียม

น้ำยาทดสอบการติดสีของ ascospores

Melzer's iodine reagent

chloral hydrate	100	กรัม
potassium iodine	5	กรัม
iodine	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชา

ตารางที่ ก-1 คู่ไพรเมอร์ที่ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอในช่วง 200 แถบ เมื่อทดสอบในโปรแกรม *In Silico*

คู่เอนไซม์	คู่ไพรเมอร์ที่ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอในช่วง 100-200 แถบ	จำนวนคู่ที่ได้
<i>EcoRI/MseI</i>	<i>EcoRI</i> +0/ <i>MseI</i> +A, <i>EcoRI</i> +0/ <i>MseI</i> +C, <i>EcoRI</i> +0/ <i>MseI</i> +T, <i>EcoRI</i> +A/ <i>MseI</i> +0, <i>EcoRI</i> +C/ <i>MseI</i> +0, <i>EcoRI</i> +G/ <i>MseI</i> +G	6
<i>EcoRI/TaqI</i>	<i>EcoRI</i> +A/ <i>TaqI</i> +0, <i>EcoRI</i> +C/ <i>TaqI</i> +G, <i>EcoRI</i> +G/ <i>TaqI</i> +A, <i>EcoRI</i> +G/ <i>TaqI</i> +C, <i>EcoRI</i> +G/ <i>TaqI</i> +T, <i>EcoRI</i> +T/ <i>TaqI</i> +A, <i>EcoRI</i> +G/ <i>TaqI</i> +T	7
<i>PstI/MseI</i>	<i>PstI</i> +A/ <i>MseI</i> +0, <i>PstI</i> +C/ <i>MseI</i> +A, <i>PstI</i> +C/ <i>MseI</i> +C, <i>PstI</i> +C/ <i>MseI</i> +G, <i>PstI</i> +C/ <i>MseI</i> +T, <i>PstI</i> +G/ <i>MseI</i> +A, <i>PstI</i> +G/ <i>MseI</i> +G, <i>PstI</i> +G/ <i>MseI</i> +T	8
<i>PstI/TaqI</i>	<i>PstI</i> +A/ <i>TaqI</i> +A	
<i>HindIII/MseI</i>	<i>HindIII</i> +C/ <i>MseI</i> +0	1
<i>HindIII/TaqI</i>	<i>HindIII</i> +0/ <i>TaqI</i> +A, <i>HindIII</i> +0/ <i>TaqI</i> +C, <i>HindIII</i> +0/ <i>TaqI</i> +T, <i>HindIII</i> +A/ <i>TaqI</i> +0, <i>HindIII</i> +G/ <i>TaqI</i> +0	1 5
<i>Apal/MseI</i>	<i>Apal</i> +0/ <i>MseI</i> +A, <i>Apal</i> +0/ <i>MseI</i> +C, <i>Apal</i> +0/ <i>MseI</i> +G, <i>Apal</i> +A/ <i>MseI</i> +0, <i>Apal</i> +C/ <i>MseI</i> +0, <i>Apal</i> +T/ <i>MseI</i> +0	6
<i>Apal/TaqI</i>	<i>Apal</i> +0/ <i>TaqI</i> +G, <i>Apal</i> +C/ <i>TaqI</i> +A, <i>Apal</i> +C/ <i>TaqI</i> +C, <i>Apal</i> +G/ <i>TaqI</i> +0	4

ตารางที่ ก-2 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps* ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* จาก
การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>EcoRI</i> +0	<i>EcoRI</i> +A	<i>EcoRI</i> +C	<i>EcoRI</i> +G	<i>EcoRI</i> +T
<i>MseI</i> +0	734	131	198	331	74
<i>MseI</i> +A	136	30	38	55	13
<i>MseI</i> +C	183	36	53	73	22
<i>MseI</i> +G	235	38	63	111	23
<i>MseI</i> +T	183	27	47	93	16

ตารางที่ ก-3 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps* ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *TaqI* จาก
การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>EcoRI</i> +0	<i>EcoRI</i> +A	<i>EcoRI</i> +C	<i>EcoRI</i> +G	<i>EcoRI</i> +T
<i>TaqI</i> +0	1841	192	800	519	336
<i>TaqI</i> +A	489	52	214	118	103
<i>TaqI</i> +C	568	47	252	170	78
<i>TaqI</i> +G	322	35	146	82	57
<i>TaqI</i> +T	622	58	290	167	105

ตารางที่ ก-4 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps* ตัดด้วยเอนไซม์ *PstI* และ *MseI* จาก
การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>PstI</i> +0	<i>PstI</i> +A	<i>PstI</i> +C	<i>PstI</i> +G	<i>PstI</i> +T
<i>MseI</i> +0	1613	189	574	649	202
<i>MseI</i> +A	458	59	193	172	53
<i>MseI</i> +C	456	59	133	162	64
<i>MseI</i> +G	364	53	104	162	45
<i>MseI</i> +T	339	36	146	117	40

ตารางที่ ก-5 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps* ตัดด้วยเอนไซม์ *Pst*I และ *Taq*I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplication

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>Pst</i> I +0	<i>Pst</i> I +A	<i>Pst</i> I +C	<i>Pst</i> I +G	<i>Pst</i> I +T
<i>Taq</i> I +0	7739	944	2493	3212	1084
<i>Taq</i> I +A	1710	164	535	758	238
<i>Taq</i> I +C	2245	269	737	943	269
<i>Taq</i> I +G	1389	212	444	513	205
<i>Taq</i> I +T	2409	290	756	998	347

ตารางที่ ก-6 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Mse*I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplication

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>Hind</i> III +0	<i>Hind</i> III +A	<i>Hind</i> III +C	<i>Hind</i> III +G	<i>Hind</i> III +T
<i>Mse</i> I +0	295	76	109	93	18
<i>Mse</i> I +A	78	25	29	19	5
<i>Mse</i> I +C	87	16	32	37	3
<i>Mse</i> I +G	76	21	27	21	7
<i>Mse</i> I +T	60	16	24	16	4

ตารางที่ ก-7 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps* ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Taq*I จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplication

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>Hind</i> III +0	<i>Hind</i> III +A	<i>Hind</i> III +C	<i>Hind</i> III +G	<i>Hind</i> III +T
<i>Taq</i> I +0	601	151	232	179	37
<i>Taq</i> I +A	145	45	49	38	13
<i>Taq</i> I +C	193	40	78	70	22
<i>Taq</i> I +G	88	25	33	25	10
<i>Taq</i> I +T	175	44	72	49	23

ตารางที่ ก-8 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps* ตัดด้วยเอนไซม์ *Apal* และ *MseI* จาก
การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>Apal</i> +0	<i>Apal</i> +A	<i>Apal</i> +C	<i>Apal</i> +G	<i>Apal</i> +T
<i>MseI</i> +0	446	102	181	49	112
<i>MseI</i> +A	126	32	51	10	34
<i>MseI</i> +C	129	36	48	15	30
<i>MseI</i> +G	105	17	46	18	24
<i>MseI</i> +T	85	18	36	7	24

ตารางที่ ก-9 จำนวนแถบดีเอ็นเอของเชื้อ *Ophiocordyceps* ตัดด้วยเอนไซม์ *Apal* และ *TaqI* จาก
การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *In Silico* AFLP-PCR amplification

Primer 4 cutter	Primer 6 cutter				
	<i>Apal</i> +0	<i>Apal</i> +A	<i>Apal</i> +C	<i>Apal</i> +G	<i>Apal</i> +T
<i>TaqI</i> +0	1162	237	517	135	273
<i>TaqI</i> +A	276	52	120	41	63
<i>TaqI</i> +C	145	71	134	36	90
<i>TaqI</i> +G	331	40	54	14	37
<i>TaqI</i> +T	410	76	208	44	81

ตารางที่ ก-10 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากเทคนิค AFLP

Factor	Eigenvalue ^{1/}	% of variance ^{2/}	Cumulative % of variance ^{3/}
1	20.53	64.17	64.17
2	1.99	6.24	70.41
3	1.44	4.49	74.91
4	1.09	3.41	78.33
5	0.94	2.92	81.25
6	0.84	2.62	83.87
7	0.76	2.38	86.25
8	0.72	2.26	88.51
9	0.62	1.93	90.44
10	0.46	1.44	91.88
11	0.41	1.29	93.17
12	0.29	0.94	94.11

ตารางที่ ก-10 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากเทคนิค AFLP (ต่อ)

Factor	Eigenvalue ^{1/}	% of variance ^{2/}	Cumulative % of variance ^{3/}
13	0.29	0.91	95.02
14	0.28	0.89	95.90
15	0.24	0.75	96.65
16	0.19	0.60	97.25
17	0.16	0.512	97.76
18	0.12	0.38	98.15
19	0.11	0.36	98.50
20	0.09	0.27	98.78
21	0.08	0.26	99.04
22	0.06	0.19	99.24
23	0.06	0.18	99.42
24	0.05	0.17	99.59
25	0.04	0.12	99.71
26	0.04	0.11	99.83
27	0.02	0.06	99.89
28	0.02	0.05	99.93
29	0.01	0.03	99.96
30	0.01	0.02	99.99
31	0.003	0.01	99.99
32	0.001	0.004	100.00

หมายเหตุ ^{1/} Eigenvalues = ค่าความผันแปรหรือความแปรปรวนทั้งหมดในตัวแปร

^{2/} % of Variance = เปอร์เซนต์ที่แต่ละ Factor สามารถอธิบายความผันแปรได้

^{3/} Cumulative % of variance = ผลบวกสะสมของ % of Variance

ตารางที่ ก-11 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากเทคนิค REP

Factor	Eigenvalue ^{1/}	% of variance ^{2/}	Cumulative % of variance ^{3/}
1	21.19	66.23	66.23
2	2.58	8.07	74.29
3	1.89	5.89	80.19
4	1.48	4.64	84.82
5	1.15	3.61	88.43

ตารางที่ ก-11 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากเทคนิค REP (ต่อ)

Factor	Eigenvalue ^{1/}	% of variance ^{2/}	Cumulative % of variance ^{3/}
6	0.88	2.74	91.17
7	0.69	2.18	93.35
8	0.49	1.53	94.88
9	0.46	1.43	96.32
10	0.39	1.22	97.53
11	0.26	0.81	98.34
12	0.19	0.62	98.96
13	0.16	0.49	99.45
14	0.08	0.26	99.70
15	0.06	0.18	99.89
16	0.04	0.11	>100%
17	0.00	0.00	>100%
18	0.00	0.00	>100%
19	0.00	0.00	>100%
20	0.00	0.00	>100%
21	0.00	0.00	>100%
22	0.00	0.00	>100%
23	0.00	0.00	>100%
24	0.00	0.00	>100%
25	0.00	0.00	>100%
26	0.00	0.00	>100%
27	0.00	0.00	>100%
28	0.00	0.00	>100%
29	0.00	0.00	>100%
30	0.00	0.00	>100%
31	0.00	0.00	>100%
32	0.00	0.00	>100%

หมายเหตุ ^{1/} Eigenvalues = ค่าความผันแปรหรือความแปรปรวนทั้งหมดในตัวแปร

^{2/} % of Variance = เปอร์เซนต์ที่แต่ละ Factor สามารถอธิบายความผันแปรได้

^{3/} Cumulative % of variance = ผลบวกสะสมของ % of Variance

ตารางที่ ก-12 แสดงค่า Eigenvalue ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA จากเทคนิค ERIC

Factor	Eigenvalue ^{1/}	% of variance ^{2/}	Cumulative % of variance ^{3/}
1	18.09	56.54	56.54
2	4.36	13.64	70.18
3	3.12	9.76	79.94
4	1.99	6.23	86.18
5	1.54	4.83	91.00
6	1.20	3.76	94.77
7	0.71	2.23	97.00
8	0.56	1.75	98.75
9	0.22	0.69	99.45
10	0.18	0.55	>100%
11	0.00	0.00	>100%
12	0.00	0.00	>100%
13	0.00	0.00	>100%
14	0.00	0.00	>100%
15	0.00	0.00	>100%
16	0.00	0.00	>100%
17	0.00	0.00	>100%
18	0.00	0.00	>100%
19	0.00	0.00	>100%
20	0.00	0.00	>100%
21	0.00	0.00	>100%
22	0.00	0.00	>100%
23	0.00	0.00	>100%
24	0.00	0.00	>100%
25	0.00	0.00	>100%
26	0.00	0.00	>100%
27	0.00	0.00	>100%
28	0.00	0.00	>100%
29	0.00	0.00	>100%
30	0.00	0.00	>100%
31	0.00	0.00	>100%
32	0.00	0.00	100.00

หมายเหตุ ^{1/} Eigenvalues = ค่าความผันแปรหรือความแปรปรวนทั้งหมดในตัวแปร

^{2/} % of Variance = เปอร์เซนต์ที่แต่ละ Factor สามารถอธิบายความผันแปรได้

^{3/} Cumulative % of variance = ผลบวกสะสมของ % of Variance

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นายรุ่งเกียรติ แก้วเพชร

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2542 ระดับปริญญาตรี วท.บ. (โรคพืชวิทยา)

พ.ศ. 2547 ระดับปริญญาโท วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ด้วยทุนสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ เทคโนโลยีของเอนไซม์ (Enzyme Technology) การใช้
จุลินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร (Microbial
Control of Agricultural Pests)

ประสบการณ์การทำงาน

- รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต พ.ศ. 2548 - 2551
- เลขานุการคณะกรรมการพัฒนางานวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต พ.ศ. 2548 - 2551

ผลงานวิจัยที่สำคัญ

Kawpet, R., W. Sridokchan and A. Aungsuratana. (2011). Performance of Entomopathogenic Fungi Endogenous Strains in Rice Pest Control towards Biological Method, p. 104. In Proceeding of ISSAAS International Symposium & Congress on A Holistic Approach in Establishing Food Security Securing Food Supplies to Meet the Future Demand of the Increasing Population. 7-10 November 2011, International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences. Bogor Agricultural University (IPB), Bogor, Indonesia.

Kawpet, R. and W. Sridokchan. (2012). Entomopathogenic Fungi Endogenous Strains Efficiency on Rice Pest Management towards Organic Farming, p.7. In Proceeding of JKTC Seminar 2012 Natural Environment and Sustainable Agriculture in Asian Countries. 10-12 November 2012, Okayama University, Okayama, Japan.

Detection of Genetic Exchange of Formulated and Indigenous Strains of Entomopathogenic Fungi in the Agro-ecosystem (หัวหน้าโครงการ, พ.ศ. 2555; วช.)

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

สถานที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสวนดุสิต

228-228/1-3 ถนนสิรินธร บางพลัด เขตบางพลัด กรุงเทพฯ 10700

โทรศัพท์/โทรสาร: 0 2423 9403

Email: runkiat99@yahoo.com

ชื่อ นางสาวศมาพร แสงยศ

ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2542 - ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (โรคพืชวิทยา)
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2546 - ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กีฏวิทยา)
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
พ.ศ. 2554 - ปริญญาดุษฎีบัณฑิต (กีฏวิทยา)
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
(ทุนโครงการ Biodiversity Research and Technology Program (BRT
Program) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ)

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ กีฏวิทยาทางการเกษตร (Agricultural Entomology) การควบคุม
แมลงศัตรูพืชและวัชพืชโดยชีววิธี (Biological Control of Insect
Pests and Weeds) และความปลอดภัยทางชีวภาพของพืช
ดัดแปลงพันธุกรรม (Biosafety of Genetically Modified crops)

ประสบการณ์การทำงาน

- นักวิจัย ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (พ.ศ. 2543-2555)
- รองคณบดีฝ่ายวิชาการและมาตรฐานการศึกษา คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัย
แม่โจ้ (พ.ศ. 2557 – 2559)

ผลงานตีพิมพ์และงานวิจัยที่สำคัญ

Saengyot, S. and B. Napompeth. 2008. Simple technique for mass propagation of
Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) for
microbial control in Thailand. Journal of ISSAAS. 13 (Supplement): 96-102.

Saengyot S. and I. Burikam. 2011. Host plants and natural enemies of papaya
mealybug, *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Thailand.
Thai Journal of Agricultural Science 44(3): 197-205.

Saengyot, S. and I. Burikam. 2012. Development and growth ratio of predaceous
coccinellid, *Sasajiscymnus quinquepunctatus* (Weise) on papaya mealybug,
Paracoccus marginatus Williams & Granara de Willink. Kasetsart Journal
(Natural Science) 46(3): 418-426.

Species Diversity and Utilization of Predatory Thrips for Biological Control of
Insect Pests. (หัวหน้าโครงการ, พ.ศ. 2556; สวทช.)

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ

สถานที่ทำงาน หลักสูตรอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตู้ ปณ. 49 แม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290
โทรศัพท์/โทรสาร: 0 5387 5840
Email: samaporn@mju.ac.th