

การจัดจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของ
ไอโซเลตเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีศักยภาพก่อโรคกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

Identification and Biomolecular Phylogenetic Analysis of Potential *Metarhizium* spp. Isolates
Infecting Brown Planthopper

อารยา บุญศักดิ์^{1,2,3} วิภา หอมหวล^{1,3} วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ^{1,3} และ
สุพรรณิกา อินตะนันท์^{1,3*}

Araya Bunsak^{1,2,3}, Wipa Homhaul^{1,3}, Weerathep Pongprasert^{1,3} and Suphannika Intanon^{1,3*}

Received: April 3, 2023

Revised: May 25, 2023

Accepted: May 7, 2023

Abstract: Brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* (Stål), is an importantly economic insect pest of rice in Asia. The use of *Metarhizium* spp., entomopathogenic fungi, is one of the highly effective tools to control BPH. The total of 15 highly potential *Metarhizium* spp. isolates to control BPH was discovered from forest soils in Phetchabun area. This study aimed to identify and reconstruct phylogenetic relationships of those *Metarhizium* spp. isolates based on morphological characters (colony and conidia) and the ITS region of 18S rDNA. Their morphology data of colony and conidia were analyzed by cluster analysis together with those of *M. anisopliae* (PB-75), *M. anisopliae*, *M. album*, *M. majus* and *M. granulomatis* and a dendrogram of their relationships was constructed. Whereas, molecular identification was done by submitting ITS sequences of all isolates to GenBank using BLAST program. Then, phylogenetic analysis using neighbor-joining method was performed with the closely related *Metarhizium* spp. retrieved from GenBank and *M. frigidum* and *M. minus* were designated as the outgroups. The morphological identification results presented that all isolates were potentially identified as *Metarhizium anisopliae* based on the length of conidia less than 9 μm as well as a dendrogram constructed from cluster analysis that all isolates were grouped with *M. anisopliae*. Meanwhile, BLAST results showed that ITS region of 18S rDNA of those isolates were closely related to *M. anisopliae* with the similarity index higher than 99%. Phylogenetic analysis clustered all 15 isolates with the group of *M. anisopliae* and clearly separated from outgroup species.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, identification, phylogenetic analysis

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

¹ Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand.

² หลักสูตรสาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก 65000

² Agricultural Science Program, Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok 65000, Thailand.

³ ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

³ National Biological Control Research Center, Lower Northern Regional Center, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

*Corresponding author : suphannikai@nu.ac.th

บทคัดย่อ: เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stål)) จัดเป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญทางเศรษฐกิจในเอเชีย เชื้อราเมตาไรเซียมเป็นเชื้อราก่อโรคกับแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงมากในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จากการคัดแยกเชื้อราเมตาไรเซียมจากดินป่าในจังหวัดเพชรบูรณ์ พบเชื้อราจำนวน 15 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดี ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดและสร้างรูปแบบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคโคนีเดียของเชื้อที่พบร่วมกับข้อมูลจากชิ้นส่วนสายพันธุ์กรรมของ ITS จาก 18S rDNA ทำการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคโคนีเดียด้วย cluster analysis และสร้างแผนผังความสัมพันธ์ร่วมกับเชื้อรา *M. anisopliae* (PB-75), *M. anisopliae*, *M. album*, *M. majus* และ *M. granulomatis* ส่วนการจัดจำแนกทางชีวโมเลกุลนั้นได้จากการเทียบเคียงสายพันธุ์กรรมของ ITS จาก 18S rDNA กับข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST และทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการร่วมกับข้อมูลเชื้อรา *Metarhizium* spp. ใกล้ชิด จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยวิธีการ neighbor-joining โดยมี *M. frigidum* และ *M. minus* เป็น outgroups ผลการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่า เชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลต มีแนวโน้มจัดเป็นเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เนื่องจากมีความยาวของโคโคนีเดียน้อยกว่า 9 ไมโครเมตร และผลการวิเคราะห์รูปแบบความสัมพันธ์ได้จัดทุกไอโซเลตรวมกลุ่มใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* ในขณะที่ ผลการค้นหาด้วย BLAST พบว่าสายพันธุ์กรรมของ ITS จาก 18S rDNA ของเชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตมีความใกล้ชิดหรือเหมือนกับข้อมูลของเชื้อรา *M. anisopliae* ด้วยสัดส่วนที่สูงกว่า 99% ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าเชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 15 ไอโซเลตรวมกลุ่มใกล้ชิดกับเชื้อรา *M. anisopliae* แยกออกจากกลุ่ม outgroup อย่างชัดเจน

คำสำคัญ: เชื้อราเมตาไรเซียม เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล การจัดจำแนก การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

คำนำ

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stål)) จัดเป็นแมลงศัตรูสำคัญของข้าวในประเทศไทยและหลายประเทศในเอเชีย (สุวัฒน์, 2544) ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเจาะดูดน้ำเลี้ยงจากบริเวณโคนต้นข้าว ตั้งแต่ระยะกล้า จนถึงระยะออกรวง ทำให้ข้าวมีอาการแห้งและไหม้ตาย หรือไม่สามารถออกรวงได้ นอกจากนี้ยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสโรคเขียวเตี้ย (grassy stunt) และโรคใบหงิก (ragged stunt) มาสู่ข้าว ทำให้ผลผลิตลดลงเป็นอย่างมาก (Savary *et al.*, 2012; Helina *et al.*, 2019) การควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนิยมใช้สารเคมีฆ่าแมลงเป็นหลัก เนื่องจากสะดวก รวดเร็วและให้ผลที่ชัดเจน (สำนวน และวีรเทพ, 2548; วีรยุทธ และคณะ, 2556) อย่างไรก็ตามผลกระทบของสารเคมีฆ่าแมลงที่มีต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมที่เกิดขึ้นตามมานั้นทำให้ต้องตระหนัก หลีกเลี่ยง ลดหรือหยุดการใช้ และค้นหาวิธีการอื่นๆ เข้ามาทดแทนการใช้

เชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราเมตาไรเซียม จัดเป็นทางเลือกที่สำคัญและมีศักยภาพควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดี (Chinniah *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตามเนื่องจากเชื้อราเมตาไรเซียมนี้มีความแปรปรวนในเชิงพันธุกรรมสูงทั้งในส่วนของการก่อโรค ความรุนแรง เอนไซม์ เมแทโบไลต์ และสารพันธุกรรม ซึ่งสามารถพบได้แม้ในระดับของไอโซเลต (อารยา และคณะ, 2558; Chen *et al.*, 2019) ทำให้ปัจจุบันการค้นหาเชื้อราเมตาไรเซียมไอโซเลตใหม่ๆ จากแหล่งธรรมชาติต่างๆ เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง

ในช่วงระยะที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยได้ทำการค้นหาเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีศักยภาพในการลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากดินป่าในจังหวัดเพชรบูรณ์ พบเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีศักยภาพสามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ร้อยละ 100 จำนวน 16 ไอโซเลต การจัดจำแนกเชื้อราเมตาไรเซียมในเบื้องต้นใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และโคโคนีเดียซึ่งสามารถระบุได้ในระดับของ Genus

Metarhizium (อารยา และคณะ, 2564; Bunsak et al., 2023) โดยในบางกรณีสามารถใช้ระบุถึงระดับชนิดได้ เช่น กรณีของ *M. flavoviride* และ *M. anisopliae* กับ *M. majus* (Tulloch, 1976) แต่อย่างไรก็ตาม ผลของการจัดจำแนกยังไม่สามารถครอบคลุมได้อย่างชัดเจนในทุกชนิดของเชื้อราเมตาไรเซียม และบางกรณีทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการจัดจำแนกได้ เช่น กรณีของ *M. album* คัดแยกจากเพลี้ยกระโดดในศรีลังกา (Petch, 1931) และ *M. brunneum* คัดแยกจากซากแมลงพวก homopteran ในฟิลิปปินส์ (Petch, 1935) ซึ่งเดิมจัดเป็น synonyms กับ *M. anisopliae* รวมทั้งการระบุว่า *M. album* นั้นจัดเป็นระยะ immature ของ *M. anisopliae* แต่ภายหลังพบว่า เป็นชนิดเดียวกับเชื้อรา *M. anisopliae* ที่พบจากตัว *Costelytra zealandica* (Latch, 1965) เป็นต้น แต่ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ประโยชน์จากเชื้อราเมตาไรเซียม นั้นจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลที่ชัดเจนมีความละเอียดในระดับของชนิดหรือต่ำกว่าสำหรับการอ้างอิงถึงประสิทธิภาพและศักยภาพในการใช้ประโยชน์ ซึ่งการจัดจำแนกทางชีวโมเลกุล (Hibbett and Taylor, 2013) เป็นวิธีการที่ได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และในปัจจุบันสามารถให้รายละเอียดได้ถึงระดับชนิดหรือต่ำกว่าได้อย่างสะดวก รวดเร็ว และมีความแม่นยำในการจัดจำแนกสูง รวมทั้งสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของเชื้อราที่ศึกษาได้เพิ่มเติมด้วย ขึ้นอยู่กับวิธีการและระดับทางชีวโมเลกุลที่เลือกใช้ในการจัดจำแนก ทั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ทำการจัดจำแนกในขั้นต้นด้วยสายพันธุ์ ITS 18S rDNA ของเชื้อราเมตาไรเซียม PB-75 ซึ่งได้คัดแยกจากดินในพื้นที่ป่าจังหวัดเพชรบูรณ์ พบว่าเป็นเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Bunsak et al., 2023) ซึ่งสามารถใช้อ้างอิงและเป็นแนวทางในการจัดจำแนกเชื้อราเมตาไรเซียมครั้งนี้ได้ ในการวิจัยนี้ มีจุดมุ่งหมายเพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อราเมตาไรเซียมที่คัดแยกจากตัวอย่างดินป่าของจังหวัดเพชรบูรณ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดีจำนวน 15 ไอโซเลตเพิ่มเติม โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโคนีและโคโคนีเดีย

ของเชื้อรา และด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับรหัสสารพันธุกรรมของชิ้นส่วนสารพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA ของเชื้อราที่พบกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ GenBank และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงและคัดเลือกเชื้อราดังกล่าวสำหรับใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

เพาะเลี้ยงเชื้อราเมตาไรเซียมไอโซเลต คัดแยกได้จากตัวอย่างดินป่า จังหวัดเพชรบูรณ์ และผ่านการคัดเลือกด้วยคุณสมบัติที่สามารถฆ่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ร้อยละ 100 ในช่วงระยะเวลาที่สั้นที่สุด จำนวน 15 ไอโซเลต คือ PB-01, PB-02, PB-10, PB-19, PB-28, PB-47, PB-51, PB-71, PB-76, PB-95, PB-101, PB-114, PB-117, PB-123 และ PB-125 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโคนี (รูปร่างและสีของโคโคนี) และโคโคนีเดีย (ขนาดด้านกว้างและด้านยาวรวมทั้งรูปร่างของโคโคนีเดีย) (Tulloch, 1976) บันทึกผล วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย cluster analysis และสร้างรูปแบบความสัมพันธ์ด้วย dendrogram โดยมีข้อมูลสัณฐานวิทยาของ *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ซึ่งได้รับการจัดจำแนกแล้ว (Bunsak et al., 2023) ร่วมกับเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Bridge et al., 1993), *Metarhizium album* (Anderson and Trueman, 2000; Driver et al., 2000), *Metarhizium majus* (Anderson and Trueman, 2000; Bischoff et al., 2009; Nishi et al., 2011) และ *Metarhizium granulomatis* (Schmidt et al., 2017) สำหรับอ้างอิงเปรียบเทียบ

จากนั้นสกัดสารพันธุกรรมจากเชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลต เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนสายพันธุ์ ITS จาก 18S ribosomal DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR ใช้ไพรเมอร์ และถอดรหัสพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ ITS1 (forward: TCCGTAGGT-GAACCTGCGG) และ ITS4 (reverse: TCCTC-CGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990) โดย

บริษัท MacroGen Inc. Laboratory, IT and Business Headquarter & Support Center Geumcheon-gu, Seoul, Korea

ทำการปรับลำดับรหัสสารพันธุกรรมของ 18S rDNA ที่ได้รับกับสัญญาณการอ่านผลรหัสสารพันธุกรรมด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.2 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) (Hall, 1999) เทียบเคียงสารพันธุกรรมของยีน 18S rDNA ของเชื้อเมตาไรเซียมที่ผ่านการคัดเลือกแต่ละไอโซเลตกับข้อมูลใน GenBank จาก the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) ด้วยโปรแกรม BLAST (Altschul *et al.*, 1990) ตรวจสอบผลการเปรียบเทียบและประเมินค่าความเหมือน (similarity index) และจัดจำแนกชนิดของเชื้อราเมตาไรเซียมแต่ละไอโซเลตคัดเลือกไอโซเลตของเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีความใกล้เคียงจากฐานข้อมูลของ GenBank บันทึกข้อมูลรหัสสารพันธุกรรมของยีน 18S rDNA และข้อมูลเปรียบเทียบอื่นๆ ทำการเทียบเรียง (alignment) ลำดับรหัสสารพันธุกรรมของเชื้อราเมตาไรเซียมที่ได้จากฐานข้อมูลใน GenBank และที่ได้จากการคัดเลือก ด้วยโปรแกรม BioEdit v.7.2 (Hall, 1999) และ Clastal W (Thompson *et al.*, 1997) ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับรหัสสารพันธุกรรมของเชื้อราเมตาไรเซียมที่ได้เทียบเรียงโดย phylogenetic analysis ด้วยวิธีการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) คำนวณสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี P-distance (Nei and Kumar, 2000) และคำนวณความค่าความเชื่อมั่นของความสัมพันธ์ในแต่ละระดับด้วยวิธีการ bootstrap จำนวนซ้ำ 1000

ครั้ง (Felsenstein, 1985) ด้วยโปรแกรม MEGA 11 (<http://www.megasoftware.net/>) (Hall, 2013; Tamura *et al.*, 2021) เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และค้นหาเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีความใกล้เคียง และเทียบเคียงข้อมูลคุณลักษณะกับเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด

ผลการทดลองและวิจารณ์

ข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *M. anisopliae* เช่น สีของโคโคนี รูปทรงและขนาดความกว้างและความยาวของโคโคนีเดียวสามารถใช้จัดจำแนกกลุ่มของไอโซเลตเชื้อราเมตาไรเซียมได้ (Luangsa-ard *et al.*, 2007, 2009; Dugan, 2017) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของความยาวของโคโคนีเดียวของ *M. anisopliae* (Driver *et al.*, 2000; Bischoff *et al.*, 2009) โดย Rombach *et al.* (1987) ระบุว่าโคโคนีเดียวของ *M. anisopliae* ควรมีความยาวที่น้อยกว่า 9 ไมโครเมตร จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 15 ไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือกจากคุณสมบัติการก่อโรคโดยสามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 100 และมีระดับความรุนแรงของการก่อโรคที่ LT_{50} อยู่ในช่วง 2.9-4.2 วัน พบว่าโคโคนีของเชื้อเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตมีลักษณะกลม สีเขียวเข้มดำเข้มหรือเขียวโอลีฟขอบโคโคนีมีสีขาว ส่วนโคโคนีเดี่ยวมีรูปทรงกระบอกปลายมน คล้ายแคปซูล ขนาดของความยาว อยู่ในช่วง 5.0-8.9 ไมโครเมตร และความกว้างอยู่ในช่วง 2.0-4.6 ไมโครเมตร และมีแนวโน้มของการจัดจำแนกเป็นเชื้อรา *M. anisopliae* (Rombach *et al.*, 1987; Tangthirasunun *et al.*, 2010; Thaochan and Sausa-ard, 2017) (Table 1)

Table 1 Morphology of colonies and conidia of 15 *Metarhizium* isolates, screened and selected based on their highly potential to kill brown planthopper and those of *Metarhizium anisopliae*, *M. album*, *M. majus* and *M. granulomatis* were added for cluster analysis.

Isolates	Colony morphology		Conidia morphology		LT_{50} (days)
	Shape	Color	Size (length x width) (μ m)	Shape	
PB-01	circle	dark green	5.7(5.3-7.1) x 3.1(2.5-4.0)	cylindrical	3.7
PB-02	circle	dark green	6.0(5.5-7.0) x 3.0(2.6-3.4)	cylindrical	3.1
PB-10	circle	dark green	5.5(5.0-6.9) x 4.0(3.6-4.5)	cylindrical	3.8

Table 1 (continued).

Isolates	Colony morphology		Conidia morphology		LT ₅₀ (days)
	Shape	Color	Size (length x width) (μ m)	Shape	
PB-19	circle	olivaceous green	7.1(6.4-7.9) x 3.5(3.1-4.6)	cylindrical	3.7
PB-28	circle	olivaceous green	6.5(6.0-7.1) x 3.2(2.9-4.0)	cylindrical	3.2
PB-47	circle	dark green	7.0(6.5-8.9) x 4.3(4.0-4.5)	cylindrical	3.7
PB-51	circle	dark green	6.7(6.2-8.4) x 3.1(2.5-4.2)	cylindrical	4.0
PB-71	circle	dark green	5.6(5.0-6.1) x 3.0(2.4-3.9)	cylindrical	3.2
PB-76	circle	dark green	7.1(6.5-8.1) x 4.0(2.9-4.6)	cylindrical	3.5
PB-95	circle	olivaceous green	5.8(5.1-6.5) x 2.9(2.3-3.2)	cylindrical	3.9
PB-101	circle	dark green	6.7(6.3-7.1) x 3.1(2.7-4.1)	cylindrical	3.6
PB-114	circle	olivaceous green	6.4(5.5-6.7) x 2.8(2.0-3.9)	cylindrical	3.9
PB-117	circle	olivaceous green	5.8(5.0-7.1) x 2.7(2.0-3.2)	cylindrical	3.3
PB-123	circle	olivaceous green	6.5(5.8-7.5) x 2.2(2.4-2.6)	cylindrical	3.4
PB-125	circle	dark green	6.5(6.0-7.5) x 3.5(2.9-3.9)	cylindrical	4.2
PB-75 ¹	circle	olivaceous green	5.7(5.0-6.0) x 3.1(2.4-4.0)	cylindrical	2.9
<i>M. anisopliae</i> ²	circle	dark green	6.5(4.5-8.4) x 2.4(1.6-3.2)	cylindrical	
<i>M. granulomatis</i> ³	circle	brown-gray	3.6(3.3-3.8) x 1.4(1.2-1.6)	cval	
<i>M. majus</i> ⁴	circle	olivaceous green	11.8(8.4-15.1) x 3.6(2.4-4.7)	cylindrical	
<i>M. album</i> ⁵	circle	pale brown	5.0(4.0-6.0) x 2.0(1.5-2.5)	ellipsoid	

Sources: 1/ Bunsak *et al.*, 2023; 2/ Bridge *et al.* (1993); 3/ Driver *et al.* (2000) and Anderson and Trueman (2000); 4/ Nishi *et al.* (2011), Bischoff *et al.*, (2009); and Anderson and Trueman (2000); 5/ Schmidt *et al.* (2017)

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มทางสถิติ ด้วย hierarchical cluster analysis วิธี within group-linkage ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตเปรียบเทียบกับ *Metarhizium anisopliae* (PB-75), *M. anisopliae*, *M. album*, *M. majus* และ *M. granulomatis* พบว่า เชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตถูกจัดรวมเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ร่วมกับ *M. anisopliae* (PB-75) และ *M. anisopliae* อ้างอิงและแยกตัวออกจาก *M. album*, *M. majus* และ *M. granulomatis* อย่างชัดเจนภายในกลุ่มถูกจัดแยกออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกประกอบด้วยไอโซเลต PB-51, PB-101, PB-125, PB-01, PB-71, PB-02, PB-10, PB-47 และ PB-76 ร่วมกับ *M. anisopliae* อ้างอิง กลุ่มที่สองประกอบด้วยไอโซเลต PB-95, PB-117, PB-28, PB-114, PB-123 และ PB-19

ร่วมกับ *M. anisopliae* (PB-75) ในกรณีนี้ทำให้เชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตในส่วนของ ingroup นี้มีแนวโน้มจัดเป็นเชื้อรา *M. anisopliae* ได้มากที่สุด (Figure 1) และเมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มดังกล่าวกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 2 กลุ่ม ในเบื้องต้นจัดแยกออกจากกันด้วยลักษณะของสีโคโลนีเป็นหลัก โดยกลุ่มที่ 1 มีสีโคโลนีเขียวเข้มค่อนข้างดำ (dark green) ส่วนกลุ่มที่ 2 มีสีโคโลนีเขียวสว่าง (olivaceous green) (Table 1) อย่างไรก็ตามวิธีการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาในการศึกษานี้ เน้นการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี (รูปร่างและสีของโคโลนี) และโคนินเดีย (ขนาดด้านกว้างและด้านยาวรวมทั้งรูปร่างของโคนินเดีย) ตามแนวทางของ Tulloch (1976) ซึ่งมีความสะดวก รวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายในการจัดจำแนกไม่สูงมาก แต่อย่างไรก็ตาม หากเป็นการจัดจำแนกที่ต้องการ

ความแม่นยำชัดเจนในระดับชนิด หรือละเอียดกว่าชนิด ควรมีข้อมูลในรายละเอียดของฐานฐานวิทยาอื่นๆ เช่น phialides (Mongkolsamrit *et al.*, 2020) และข้อมูลจากผลการทดสอบทางจุลชีววิทยา พิษวิทยา และ ชีวเคมีอื่นๆ เช่น API ZYM และ

isoenzyme (Bridge *et al.*, 1993) เพิ่มเติมประกอบ การจัดจำแนกหรือใช้แนวทางการจัดจำแนกอื่น เช่น เทคนิคทางชีวโมเลกุล เป็นต้น เพื่อรองรับ สนับสนุน และยืนยันผลเพิ่มเติม

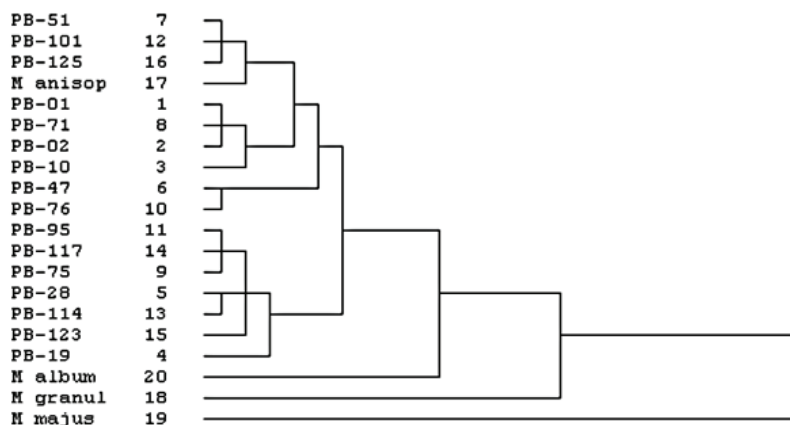


Figure 1 Dendrogram presents the relationship based on morphological data of colonies and conidia of the 16 highly potential *Metarhizium* isolates from Phetchabun province (PB) to control brown planthoppers. *Metarhizium anisopliae* (M anisop), *Metarhizium album* (M album), *Metarhizium majus* (M majus) and *Metarhizium granulomatis* (M granul) were added for cluster analysis.

ในปัจจุบันการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลได้เข้ามามีบทบาทสำคัญมากขึ้น เนื่องจากมีช่องทางให้เลือกหลากหลาย มีความสะดวก รวดเร็วและแม่นยำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้รูปแบบการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถให้รายละเอียดของการจัดจำแนกในระดับต่ำกว่าชนิดได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและความยาวของสายพันธุกรรมที่ใช้ในการเปรียบเทียบ (Dentinger *et al.*, 2011; Raja *et al.*, 2017) ในกรณีการจัดจำแนกเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีความเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมนั้น มักนิยมใช้สายพันธุกรรม 18S rDNA เนื่องจากสายพันธุกรรมประกอบด้วยส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับที่รวดเร็ว ช้ามาก หรือไม่เปลี่ยนแปลง ทำให้สามารถใช้จัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ทั้งในระดับที่ต่ำกว่าหรือสูงกว่าระดับชนิดได้ (Epp *et al.*, 2012; Suzuki *et al.*, 2020; Bich *et al.*, 2021) นอกจากนี้ยังมีบันทึกและรายงานในส่วนนี้ของเชื้อเมตาไรเซียมเป็นจำนวนมาก

ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งสะดวกต่อการเปรียบเทียบและค้นหาชนิดของเชื้อราเมตาไรเซียมได้อย่างรวดเร็ว (Nilsson *et al.*, 2012)

ด้วยไพรเมอร์ ITS1F (forward: TCCGTAG-GTGAACCTGCGG) และ ITS4 (reverse: TCCTC-CGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) ชิ้นส่วนสารพันธุกรรม 18S rDNA ที่ได้รับสำหรับใช้ในการตรวจสอบชนิดของเชื้อราเมตาไรเซียมที่ผ่านการคัดเลือก ครอบคลุมบางส่วนของ 18S ribosomal RNA gene ต่อเนื่องกับ internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2 และ ยาวต่อเนื่องครอบคลุมบางส่วนของ 28S ribosomal RNA gene จำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่อ่านได้อยู่ที่ประมาณ 600-620 bp แต่เมื่อทำการเทียบเรียง (alignment) ลำดับรหัสสารพันธุกรรม จำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ชัดเจนและสามารถใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ 527 หน่วย

ผลการเทียบเคียงลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA ของเชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 15 ไอโซเลตกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าเชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 15 ไอโซเลต มีลำดับสารพันธุกรรมตรงกับเชื้อราเมตาไรเซียมชนิด *Metarhizium anisopliae* (Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Clavicipitaceae; *Metarhizium*) โดยมีสัดส่วนความเหมือนตรงกัน (percent identical) สูงมากกว่าร้อยละ 99 ทั้งนี้โดยหลักการของสัดส่วนความเหมือนตรงกันระบุว่า หากมีค่าที่ร้อยละ 100 สิ่งมีชีวิตนั้นจัดอยู่ในสายพันธุ์ (strain) เดียวกัน หากมีค่าสูงกว่าร้อยละ 99 จัดได้ว่าเป็นชนิดเดียวกัน และหากอยู่ในช่วงร้อยละ 89-99 จัดเป็นสกุล (genus) เดียวกัน (Henry *et al.*, 2000) ดังนั้น เชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 15 ไอโซเลตในการศึกษานี้จึงมีแนวโน้มจัดเป็นชนิด *Metarhizium anisopliae*

ผลการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากสายพันธุ์กรรม 18S rDNA ของเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 15 ไอโซเลต ร่วมกับสายพันธุ์กรรม 18S rDNA ของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 และเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีความใกล้ชิดจากข้อมูล GenBank จำนวน 15 สายพันธุ์ โดยมีสายพันธุ์กรรม 18S rDNA ของเชื้อรา *Metarhizium frigidum* HM055448.1 และ *Metarhizium minus* HM055453.1 เป็น outgroups เปรียบเทียบ พบว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นนั้นได้จัดกลุ่มของไอโซเลตเชื้อราเมตาไรเซียมที่ต้องการจัดจำแนก เชื้อราไอโซเลต PB-75 และเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ใกล้ชิดซึ่งได้จาก GenBank แยกออกจาก เชื้อรา *M. frigidum* HM055448.1 and *M. minus* HM055453.1 อย่างชัดเจนด้วยค่า bootstrap รองรับร้อยละ 100 นั้น โดยในกลุ่มของเชื้อราเมตาไรเซียม (ingroup) นั้น ได้วิวัฒนาการ

แยกออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรก เชื่อมต่อจาก outgroups ประกอบด้วย *M. anisopliae* MG786741.1 ซึ่งมีความใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-76 (H201204-007 O01) จากนั้นสายวิวัฒนาการได้แยกตัวและแบ่งกลุ่มเชื้อรา *M. anisopliae* ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 มีค่า bootstrap รองรับที่ร้อยละ 40 ประกอบด้วย *M. anisopliae* MH165400.1, KU983776.1, OP546104.1, LR792758.1, JN256674.1, MT111550.1, MN892390.1, OL839175.1, MG786733.1 และ MG786736.1 โดยมีเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีรายงานการพบในประเทศไทยคือ OP546104.1 (Sinchayakul *et al.*, 2022) และไอโซเลต PB-47 รวมอยู่ในกลุ่มนี้ โดยไอโซเลต PB-47 ได้ถูกจัดรวมเป็นกลุ่มย่อยขนาดเล็กที่มีความใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* OL839175.1, MG786733.1 และ MG786736.1 กลุ่มที่ 2 มีค่า bootstrap รองรับที่ 40% ประกอบด้วย *M. anisopliae* OP595354.1, KX279869.1, JQ889704.1 ร่วมกับเชื้อราเมตาไรเซียมไอโซเลต PB-125 (H201204-007 C09), PB-71 (H201204-007 G01), PB-19 (H201204-007 G15), PB-10 (H201204-007 K13), PB-02 (H201204-007 K09), PB-101 (H201204-007 O03), PB-01 (H201204-007 G09), PB-51 (H201204-007 K17), PB-117 (H201204-007 C07), PB-28 (H201204-007 K15), PB-95 (H201204-007 G03), PB-114 (H201204-007 K05), PB-123 (H201204-007 O07) และ PB-75 (ON729286.1) และมีการรวมกลุ่มย่อยขนาดเล็กของ เชื้อราเมตาไรเซียมไอโซเลต PB-101 (H201204-007 O03), PB-01 (H201204-007 G09), PB-51 (H201204-007 K17), PB-117 (H201204-007 C07) ร่วมกับ *M. anisopliae* PB75 (ON729286.1) (Bunsak *et al.*, 2023), JQ889704.1 และ KX279869.1 (Figure 2)

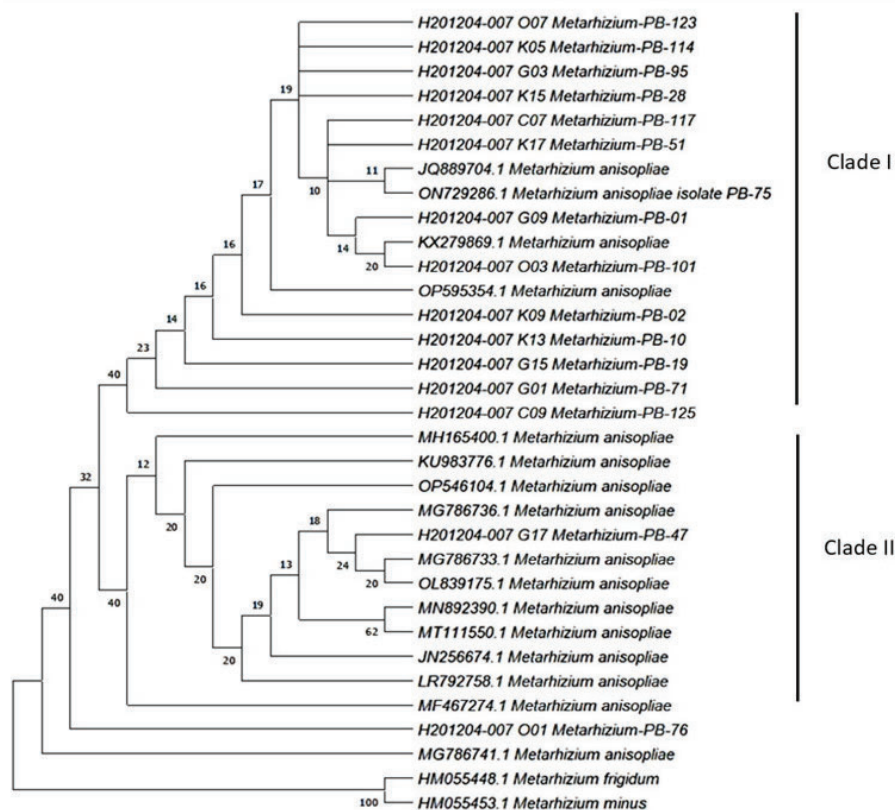


Figure 2 Phylogenetic tree (evolutionary relationships of taxa) obtained by neighbor-joining method with evolutionary distance calculated by P-distance based on the alignment of 18S rDNA of 15 *Metarhizium* isolates and other 16 closely related *M. anisopliae* and 2 outgroup species *M. frigidum* HM055448.1 and *M. minus* HM055453.1 The confidence supporting number on tree branch calculated from bootstraps method with 1000 replications.

ทั้งนี้ กลุ่มของเชื้อราไอโซเลตที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *M. anisopliae* ที่อ้างอิง พบว่า ไอโซเลต PB-117, PB-51, PB-01 และ PB-101 มีการรวมกลุ่มใกล้เคียงกับเชื้อรา *M. anisopliae* PB-75, JQ889704.1 (Xu *et al.*, 2012) และ KX279869.1 (Syazwan *et al.*, 2015) มาก โดยเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 เป็นเชื้อราที่ลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ที่คัดแยกจากจังหวัดเพชรบูรณ์เช่นกัน (Bunsak *et al.*, 2023) ในขณะที่ *M. anisopliae* KX279869.1 ซึ่งเป็นเชื้อ *M. anisopliae* ที่มีข้อมูลจากฐานข้อมูลใน GenBank ระบุว่า ถูกคัดแยกได้จาก Peninsular Malaysia และมีศักยภาพในการลงทำลายปลวก *Coptotermes curvignathus* (Blattodea:

Rhinotermitidae) (Syazwan *et al.*, 2015) ส่วน *M. anisopliae* JQ889704.1 นั้น Xu *et al.* (2012) ระบุว่าคัดแยกได้จากป้าชายเลนของมณฑลไหหนานของสาธารณรัฐประชาชนจีน และบันทึกข้อมูลลำดับรหัสทางพันธุกรรม 18S rDNA ไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank แต่ยังไม่พบรายละเอียดของศักยภาพในการลงทำลายแมลงที่ชัดเจน

ในขณะที่ไอโซเลต PB-47 รวมเป็นกลุ่มย่อยที่มีความใกล้เคียงกับ *M. anisopliae* OL839175.1, MG786733.1 และ MG786736.1 นั้นพบว่า OL839175.1 เป็นเชื้อ *M. anisopliae* ที่ Nawaz (2021) จาก Center of Excellence for Olive Research and Training, Barani Agricultural Research Institute, Chakwal, Punjab, Pakistan

เป็นผู้รายงานการค้นพบ ส่วน MG786733.1 และ MG786736.1 เป็นเชื้อ *M. anisopliae* ที่ Castro-Vasquez *et al.* (2018) จาก Centro de investigacion en biologia celular molecular, University of Costa Rica, Ciudad de la investigacion, San Pedro, San Jose, Costa Rica ระบุว่าคัดแยกได้จากดินใน Costa Rica ซึ่งเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตนี้ได้บันทึกไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank แต่ยังไม่พบรายละเอียดของศักยภาพในการลงทำลายแมลงที่ชัดเจน และในทำนองเดียวกันกับไอโซเลต PB-76 ที่มีความใกล้เคียงกับ *M. anisopliae* MG786741.1 ซึ่งเป็นเชื้อ *M. anisopliae* คัดแยกได้จากดินใน Costa Rica ที่ Castro-Vasquez *et al.* (2018) ได้บันทึกไว้เช่นกัน

สรุป

ในการจัดจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเชื้อราเมตาไรเซียมคัดแยกจากดินป่าในจังหวัดเพชรบูรณ์ ที่มีศักยภาพก่อโรคกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 100 และมีค่าความรุนแรงของเชื้อ (LT₅₀) ที่ 2.9-4.2 วัน จำนวน 15 ไอโซเลต ประกอบด้วยไอโซเลต PB-01, PB-02, PB-10, PB-19, PB-28, PB-47, PB-51, PB-71, PB-76, PB-95, PB-101, PB-114, PB-117, PB-123 และ PB-125 ผลการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อราทุกไอโซเลตมีความยาวของโคนเดียน้อยกว่า 9 ไมโครเมตร และสามารถจัดเป็นเชื้อราชนิด *M. anisopliae* เมื่อวิเคราะห์ด้วย cluster analysis พบว่า เชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตถูกจัดรวมเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ร่วมกับ *M. anisopliae* (PB-75) และ *M. anisopliae* อ้างอิง และแยกตัวออกจาก *M. album*, *M. majus* และ *M. granulomatis* อย่างชัดเจน มีแนวโน้มจัดเป็นเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้งหมด ในส่วนของการจัดจำแนกทางชีวโมเลกุลด้วย สายพันธุ์กรรม 18S rDNA ของเชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 15 ไอโซเลตเปรียบเทียบกับเชื้อราเมตาไรเซียมในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อรา

เมตาไรเซียมชนิด *M. anisopliae* (Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Clavicipitaceae; *Metarhizium*) PB-117, PB-51, PB-01 และ PB-101 มีการรวมกลุ่มใกล้เคียงกับเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต โดยมีความเหมือนตรงกัน (percent identical) กับเชื้อราที่มีรายงานการค้นพบ ในระดับที่สูงกว่าร้อยละ 99.00 และผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าทั้ง 15 ไอโซเลต จัดอยู่ในกลุ่ม *M. anisopliae* แยกออกจากญาติที่ใกล้เคียงคือ *M. frigidum* และ *M. minus* อย่างชัดเจน โดยในส่วนของกลุ่มเมตาไรเซียมอื่น พบว่า ไอโซเลต PB-117, PB-51, PB-01 และ PB-101 มีการรวมกลุ่มใกล้เคียงกับเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75, JQ889704.1 และ KX279869.1 มาก ไอโซเลต PB-47 รวมเป็นกลุ่มย่อยที่มีความใกล้เคียงกับ *M. anisopliae* OL839175.1, MG786733.1 และ MG786736.1 และ ไอโซเลต PB-76 นั้นมีความใกล้เคียงกับ *M. anisopliae* MG786741.1 ทั้งนี้มีเพียง *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 และ *M. anisopliae* KX279869.1 ที่พบรายงานความเกี่ยวข้องกับการลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและปลวก *Coptotermes curvignathus* ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- วีรยุทธ สร้อยนาค วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ ไสว บวรณพานิชพันธุ์ และสมชาย ธนสินชัยกุล. 2556. ประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงบางชนิดต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย. วารสารเกษตร 29(3): 231-238.
- สุวัฒน์ รวยอารีย์. 2544. เรียนรู้การจัดการศัตรูข้าวโดยผสมผสาน. กองกัญและสัตววิทยา: กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 262 หน้า.
- สำนวน ฉิมพกา และวีรเทพ พงษ์ประเสริฐ. 2548. ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูข้าวของเกษตรกร อำเภอดงพวน จังหวัดพิจิตร. วารสารเกษตรนเรศวร 8(1): 77-94.

- อารยา บุญศักดิ์, วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ, ไสว บุรณพานิชพันธุ์ และจิราพร กุลสาริน. 2558. การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล. วารสารเกษตร 31(3): 291-299.
- อารยา บุญศักดิ์, วิภา หอมหวล, วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ และสุพรรณิกา อินต๊ะนนท์. 2564. การคัดแยกและคัดเลือกเชื้อราสกุลเมธาไรเซียมจากดินป่าในพื้นที่อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์เพื่อควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล. หน้า 716-728. ใน: การประชุมวิชาการนเรศวรวิจัยและนวัตกรรม ครั้งที่ 17. มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215(3): 403-410.
- Anderson, D.L. and J. W.H. Trueman. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Experimental and Applied Acarology 24(3): 165-189.
- Bich, G.A., M.L. Castrillo, F.L. Kramer, L.L. Villalba and P.D. Zapata. 2021. Morphological and molecular identification of entomopathogenic fungi from agricultural and forestry crops. Florestae Ambiente 28(2), doi:10.1590/2179-8087-floram-2018-0086.
- Bischoff, J.F., S.A. Rehner and R.A. Humber. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia 101(4): 512-530.
- Bridge, P.D., M.A.J. Williams, C. Prior and R.R.M. Paterson. 1993. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. Journal of General Microbiology 139: 1163-1169.
- Bunsak, A., W. Homhaul, W. Pongprasert, K. Ruangrit and S. Intanon. 2023. Occurrence of entomopathogenic fungi from natural ecosystems in Phetchabun, Thailand and their virulence against brown planthopper. Current Applied Science and Technology 23(4); DOI: 10.55003/cast.2023.04.23.013
- Castro-Vasquez, R., M. Montero-Astua, S. Hernandez-Villalobos, A. Vargas-Martinez and R. Molina-Bravo. 2018. Identification and molecular characterization of *Metarhizium* spp. from soil of Costa Rica. (Online): Available Source: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG786733.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=ZY3UJ2KR013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG786733.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=ZY3UJ2KR013) (January 30, 2023)
- Chen, W.-H., Y.-F. Han, J.-D. Liang and Z.-Q. Liang. 2019. Morphological and phylogenetic characterization of novel *Metarhizium* species in Guizhou, China. Phytotaxa 419(2): 189-196.
- Chinniah, C., A. Ravikumar, M. Kalyanasundaram and P. Parthiban. 2016. Management of sucking pests, by integration of organic sources of amendments and foliar application of entomopathogenic fungi on chilli. Journal of Biopesticide 9(1): 34-40.
- Dentinger, B.T.M., M.Y. Didukh and J.-M. Moncalvo. 2011. Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (*Agaricomycotina*). PLoS ONE 6(9): e25081, doi:10.1371/journal.pone.0025081.

- Driver, F., R.J. Millner and J.W.H. Trueman. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research* 104(2): 134-150. doi:10.1017/S0953756299001756.
- Dugan, F.M. 2017. The Identification of Fungi: An Illustrated Introduction with Keys, Glossary, and Guide to Literature. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. 176 p.
- Epp, L.S., S. Boessenkool, E.P. Bellemain, J. Haile, A. Esposito, T. Riaz, C. Erséus, V.I. Gusarov, M.E. Edwards, A. Johnsen, H.K. Stenøien, K. Hassel, H. Kauserud, N.G. Yoccoz, K.A. Bråthen, E. Willerslev, P. Taberlet, E. Coissac and C. Brochmann. 2012. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology* 21(8): 1821-1833.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-791.
- Hall, B.G. 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution* 30(5): 1229-1235.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Helina, S., S. Sulandari, S. Hartono and Y.A. Trisyono. 2019. Detection and analysis of protein profile on stunt virus-infected rice plant with different severity level on Ciherang and Situ Bagendit varieties. *Journal Perlindungan Tanaman Indonesia* 23(1): 116-124.
- Henry, T., P.C. Iwen and S.H. Hinrichs. 2000. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology* 38(4): 1510-1515.
- Hibbett, D.S. and J.W. Taylor. 2013. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand?. *Nature Reviews Microbiology* 11(2): 129-133.
- Latch, G.C.M. 1965. *Metarrhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture-inhabiting insects. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 8(2): 384-396.
- Luangsa-ard, J., K. Tasanathai, S. Mongkolsamrit and N. Hywel-Jones. 2007. Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand, Volume. 1. National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani. 82 p.
- Luangsa-ard, J.J., K. Tasanathai, S. Mongkolsamrit and N. Hywel-Jones. 2009. Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand, Volume. 2. Bangkok, Thailand: National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani. 88 p.
- Mongkolsamrit, S., A. Khonsanit, D. Thanakitpipattana, K. Tasanathai, W. Noisripoom, S. Lamlertthong, W. Himaman, J. Houbaken, R.A. Samson and J. Luangsa-ard. 2020. Revisiting *Metarhizium* and the description of new species from Thailand. *Studies in Mycology* 95: 171-251.

- Nawaz, H. 2021. *Metarhizium anisopliae* strain Ma01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. (Online): Available Source: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OL839175.1?report=genbank&log\\$=nuclopt&blast_rank=2&RID=ZY2XZXP01R](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OL839175.1?report=genbank&log$=nuclopt&blast_rank=2&RID=ZY2XZXP01R) (January 30, 2023).
- Nei, M. and Kumar, S., 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford: Oxford University Press. 348 p.
- Nilsson, R.H., L. Tedersoo, K. Abarenkov, M. Ryberg, E. Kristiansson, M. Hartmann, C.L. Schoch, J.A.A. Nylander, J. Bergsten, T.M. Porter, A. Jumpponen, P. Vaishampayan, O. Ovaskainen, N. Hallenberg, J. Bengtsson-Palme, K.M. Eriksson, K.-H. Larsson, E. Larsson and U. Koljalg. 2012. Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. MycoKeys 4: 37-63.
- Nishi, O., K. Hasegawa, K. Iiyama, C. Yasunaga-Aoki and S. Shimizu. 2011. Phylogenetic analysis of *Metarhizium* spp. isolated from soil in Japan. Applied Entomology and Zoology 46(3): 301-309.
- Petch, T. 1931. Notes on entomogenous fungi. Transactions of the British Mycological Society 16(1): 55-75.
- Petch, T. 1935. Notes on entomogenous fungi. Transactions of the British Mycological Society 19(3): 161-194.
- Raja, H.A., A.N. Miller, C.J. Pearce and N.H. Oberlies. 2017. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. Journal of Natural Products 80(3): 756-770.
- Rombach, M.C., R.A. Humber and H.C. Evans. 1987. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf-and planthoppers of rice. Transactions of the British Mycological Society 88(4): 451-459.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4(4): 406-425.
- Savary, S., F. Horgan, L. Willocquet and K.L. Heong. 2012. A review of principles for sustainable pest management in rice. Crop Protection 32: 54-63.
- Schmidt, V., L. Klasen, J. Schneider, J. Hübel and M. Pees. 2017. Fungal dermatitis, glossitis and disseminated visceral mycosis caused by different *Metarhizium granulomatis* genotypes in veiled chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) and first isolation in healthy lizards. Veterinary Microbiology 207: 74-82.
- Sinchayakul, P., W. Pongprasert, R. Masmeatathip, W. Sorapongpaisal, W. Homhaul and P. Thepkusol. 2022. Development of *Metarhizium* fungi for controlling insect pests in organic farming system. (Online): Available Source: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OP546104.1?report=genbank&log\\$=nuclopt&blast_rank=13&RID=UFBCH6B9013](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OP546104.1?report=genbank&log$=nuclopt&blast_rank=13&RID=UFBCH6B9013). (January 30, 2023)

- Suzuki, K., K. Takahashi and N. Harada. 2020. Evaluation of primer pairs for studying arbuscular mycorrhizal fungal community compositions using a MiSeq platform. *Biology and Fertility of Soils* 56(6): 853-858.
- Syazwan, S., A. Sajap and R. Mohamed. 2015. *Metarhizium anisopliae* of Peninsular Malaysia origin poses high pathogenicity towards *Coptotermes curvignathus*, a major wood and tree pest. *Malaysian Forester* 78: 41-48.
- Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027.
- Tangthirasunun, N., S. Poeaim, K. Soyong, P. Sommartya and S. Popoonsak. 2010. Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. *Journal of Agricultural Technology* 6(2): 317-329.
- Thaochan, N. and W. Suasa-ard. 2017. Occurrence and effectiveness of indigenous *Metarhizium anisopliae* against adults *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) in Southern Thailand. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 39(3): 325-334.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25(24): 4876-4882.
- Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society* 66(3): 407-411.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In*: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White. (Eds.). *PCR protocols a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego.
- Xu, Y.L., S.X. Bao, H.Q. Huang, M. Liu and J. Zhu. 2012. Diversity and distribution of culturable fungi in mangrove soil in Hainan. (Online): Available Source: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JQ889704.1?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=U83FU99601N](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JQ889704.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=U83FU99601N). (January 30, 2023)