รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปี 2558

โครงการวิจัยที่ 3060-3973

เรื่อง การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสำหรับควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่โครงการหลวง

Research and Development of the Entomopathogenic Fungal Products for Control Insect Pests

หัวหน้าโครงการวิจัย

รศ. ดร. นุชนาฏ จงเลขา ศูนย์อารักขาพืช

ได้รับทุนวิจัยสนับสนุนจากมูลนิธิโครงการหลวง

เดือน ตุลาคม 2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ประจำปี 2558

โครงการวิจัยที่ 3060-3973

เรื่องการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสำหรับควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่โครงการหลวง

Research and Development of the Fungal Pesticide Products for Controlling Insect Pests in the Royal Project's Areas.

หัวหน้าโครงการวิจัย

รศ.ดร. นุชนาฏ จงเลขา ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

คณะวิจัย

นางสาวกาญจนา วิชิตตระกูลถาวร ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

นางสาวสุธาศินี นนทะจักร์ ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

นางสาวพิชามญชุ์ เตชะติ ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

นายเผ่าไท ถายะพิงค์ ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

นายกตัญญู บุญรักษา ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

นายสุริยนท์ รินบุตร ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

นายทองสุข มูลเต๋จ๊ะ ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

นางสาวจิราภรณ์ จันทวงศ์ ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง

ได้รับทุนวิจัยสนับสนุนจากมูลนิธิโครงการหลวง

เดือน ตุลาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมูลนิธิโครงการเป็นอย่างยิ่ง ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการวิจัยเป็นเวลา 3 ปี (2556-2558) และขอขอบคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน การทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร . มาลี ตั้งระเบียบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา และเจ้าหน้าที่ส่งเสริมในศูนย์ตีนตก, หน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย (สถานีเกษตรหลวงปางดะ), ห้วยน้ำขุ่น, อ่างขาง , ห้วยโป่ง , แม่ทาเหนือ , พระบาทห้วยต้ม, ปางดะ, ขุนวาง และทุ่งเริง ตลอดจนแผนกยานพาหนะมูลนิธิโครงการหลวงที่อำนวยความสะดวกในเรื่องยานพาหนะ

มูลนิธิ
โครงการหลวง
ROYAL PROJECT FOUNDATION

บทคัดย่อ

ทำการสำรวจหาเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในพื้นที่ของมูลนิธิโครงการหลวง จำนวน 10 ศูนย์/สถานี ได้แก่ ตีนตก, ปางดะ (หน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย), ห้วยน้ำขุ่น , อ่างขาง , ห้วยโป่ง , แม่ทาเหนือ , พระบาทห้วยต้ม , ปางดะ , ขุนวาง และทุ่งเริง จากนั้นทำการคัดแยกเชื้อราจากดินและจาก ตัวอย่างแมลง อาศัย (host insect) ที่รวบรวมได้ จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ มอดกาแฟ เพลี้ยหอยสีแดงแคลิฟอร์เนีย แมลงหางหนีบ มวน เพลี้ยจักจั่น สีเขียว จิ้งหรีด เพลี้ยอ่อน ด้วงเต่าแตง หนอนกระทู้และจักจั่น เชื้อราที่ได้นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์และจัดจำแนกสกุลได้เชื้อรา 16 ไอโซเลท ใน 4 สกุล ได้แก่ *Beauveria* sp. 6 ไอโซเลท รหัส BE001, BE010, BE015, BE021, BE028 และ BE100, *Metarhizium sp.* 1 ไอโซเลท รหัส ME094, *Paecilomyces sp.* 7 ไอโซเลท รหัส PA003, PA012, PA020, PA096, PA097, PA098 และ PA099 และ *Nomuraea* sp. 2 ไอโซเลท รหัส NM074 และ NM075 หลังจากทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อราดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อคือเมล็ดข้าวจ้าวหุงสุก พบว่ามีรา 10 ไอโซเลท ใน 3 สกุล ได้แก่ *Beauveria* sp. 4 ไอโซเลท รหัส BE001, BE021, BE028 และ BE100, *Metarhizium* sp. 1 ไอโซเลท รหัส ME094 และ *Paecilomyces* sp. 5 ไอโซเลท รหัส PA020, PA096, PA097, PA098 และ PA099 เจริญเติบโตและสร้างสปอร์ในเมล็ดข้าวจ้าวได้ดี เมื่อนำเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเสี้ยนดิน (*Dorylus orientalis*) โดยนำแต่ละไอโซเลทมาคลุกกับดินในอัตราส่วน 1 กรัมต่อดิน 10 กรัม บรรจุในกล่องเลี้ยงแมลง 30 ตัว/กล่อง เปรียบเทียบผลกับการใช้เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (MS) และชุดควบคุม วัดผลโดยใช้เปอร์เซ็นต์การตายของเสี้ยนดินที่ 3, 5 และ 6 วัน ผลปรากฏว่า ราไอโซเลท ME094 มีประสิทธิภาพสูงสุด มีเปอร์เซ็นต์การตาย 98.89% ที่ 3 วัน (ชุดควบคุมตาย 2.22%)

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราบูเวเรียในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ (*Hypothenemus hampei*) และแมลงค่อม ทอง (*Hypomeces squamosus*) ซึ่งเป็นแมลงศัตรู พืชที่สำคัญของส้ม โดยใช้เชื้อราบูเวเรีย 5 ไอโซเลท พ่นลงบนตัวแมลงที่ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลิลิตร (จำนวน 10 ตัว/ 1 กล่อง) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเชื้อรา *Beauveria bassiana* (BS) วัดผลเช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น ผลปรากฏว่า ไอโซเลท BE100 มีประสิทธิภาพสูงสุด มีมอดตาย 87.85%, 92.85% และ 100% ที่ 3, 4 และ 5 วัน ตามลำดับ เมื่อทดสอบเชื้อราบูเวเรียไอโซเลท BE100 กำจัดมอดเจาะผลกาแฟในสภาพแปลง ปลูก พบว่าหลังจากพ่น ราบูเวเรีย BE100 เป็นเวลา 5 วัน พบเปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุดที่ 46.59% ส่วนในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราบูเวเรียในการควบคุมแมลงค่อมทอง พบว่าราไอโซเลท BE145 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่ 86.67 % ในเวลา 5 วัน จากการทดสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการทำลายแมลงหวี่ขาว ในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อราบูเวเรีย ไอโซเลท BE100 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุดถึง 77.36% หลังจากพ่นเชื้อรา 3 วัน รองลงมา คือ ราไอโซเลท BS ตาย 59.23% และ BE145 ตาย 46.23% สำหรับ การทดสอบเชื้อราโนมูเรียในการ

ทำลายหนอนกระทู้ผัก หลังจากพ่นเชื้อราเป็นเวลา 7 วันพบว่า เชื้อราไอโซเลท NM141 ให้เปอร์เซ็นต์การต ายสูงที่สุดที่ 66.67%

คำสำคัญ : เสี้ยนดิน, แมลงค่อมทอง, มอดเจาะผลกาแฟ, แมลงหวี่ขาว, หนอนกระทู้ผัก, *Beauveria* sp., *Metarhizium sp.*, *Paecilomyces* sp., *Metarhizium anisopliane*, *Nomuraea* sp.

มูลนิธิโครงการหลวง
ROYAL PROJECT FOUNDATION

Abstract

Surveys of entomopathogenic fungi were made in 10 Royal Project Development Centers/stations e.g. TeenTok, PangDa (Pong Noi Citrus Research Unit), Huai Nam Khun, Angkhang, Huai Pong, Mae Tha Nuea, Phra Baat Huai Tom, Pang Da, Khun Wang and Tung Roeng. Collection and isolation of fungi were carried out from soil and 10 infected hosts e.g. coffee berry borer, California red scale, earwigs, bug (Miridae), green rice leaf hopper, cricket, aphid, cucurbit beetle, common cutworm and cicada. The isolated fungi were purified once again, 16 isolates were obtained and classified to 4 genera : Six isolates of *Beauveria* sp. codes BE001, BE010, BE015, BE021, BE028 and BE100; 1 isolate of *Metarhizium sp.* code ME094; 7 isolates of *Paecilomyces sp.* codes PA003, PA012, PA020, PA096, PA097, PA098, PA099 and 2 isolates of *Nomuraea* sp. codes NM074 and NM075. After the fungal growth testing on cooked rice medium, it was found that 10 fungal isolates in 3 genera grew and sporulated well e.g. 4 isolates of *Beauveria* sp. codes BE001, BE021, BE028 and BE100; 1 isolate of *Metarhizium sp.* code ME094 and 5 isolates of *Paecilomyces sp.* codes PA020, PA096, PA097, PA098 and PA099. The ten fungal isolates were efficacy tested in the laboratory on controlling subterranean ant or s-ant (*Dorylus orientalis*). One gram of this culture mixed with 10 g. of sterilized soil was put in each insect rearing box with 30 insects/box. The results were compared with *Metarhizium anisopliae* (MS) and the control treatment. Results were measured by percentage of dead insect at 3, 5 and 6 days respectively. It was found that isolate ME094 gave highest efficacy at 98.89% death at 3 days (2.22% in Control).

Testing efficacy of *Beauveria* isolates for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei)* and green weevil (*Hypomeces squamosus*) major pests of citrus. Using 5 isolates in the rearing box (10 insects/box) in comparism with *B. bassiana* (BS). Results were measured as mentioned before. It was found that Isolates BE100 gave highest efficacy at percent death of 87.85%, 92.85% and 100% at 3, 4 and 5 days after treatment respectively. When testing *Beauveria* isolates with coffee berry borer in the planting area, result showed that BE145 gave highest percent death at 66.67% in 5 days. For the test of *Beauveria* isolates with white flies in the laboratory it was found that BE100 gave highest efficacy at percent death of 77.36% at 3 days after spray, while the BS gave 59.23% and BE145 gave 46.23%. *Nomuraea* sp. was tested with army worm it was found that isolate NM141 gave highest percent death of the worm at 66.67%, 7 days after spray.

Keywords: s-ant, green weevil, coffee berry borer, white flies, army worm, *Beauveria* sp., *Metarhizium sp.*, *Paecilomyces sp.*, subterranean ant, *Metarhizium anisopliane*

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและแนวคิดที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	14
บทที่ 4 ผลการวิจัย	20
บทที่ 5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	42
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	

มูลนิธิโครงการหลวง ROYAL PROJECT FOUNDATION

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้จากดินและแมลงอาศัย 8 ชนิด ในพืชต่างๆ และนำมาเลี้ยงได้เชื้อราบริสุทธิ์ได้ 20 ไอโซเลท ใน 5 สกุล	22
2	เชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 16 ไอโซเลท ใน 3 สกุล ที่สามารถเจริญได้ดีในเมล็ดข้าวจ้าวหุงสุก	31
3	เชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 10 ไอโซเลท ใน 3 สกุล ที่สามารถเจริญได้ดีในเมล็ดข้าวจ้าวหุงสุก	33
4	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราบูเวเรีย 4 ไอโซเลท เมทาไรเซียม 1 ไอโซเลท เพซิโลมัยซีส 5 ไอโซเลท กับชุดควบคุม และกับเชื้อราเมทาไรเซียมที่จำหน่ายในท้องตลาด ในการกำจัดเสี้ยนดิน	34
5	เปรียบเทียบประสิทธิภาพของด้วยเชื้อราบูเวเรีย 5 ไอโซเลท และชุดควบคุมในการกำจัดมอดเจาะเมล็ดกาแฟ	36
6	เปอร์เซ็นต์การตายของมอดเจาะผลกาแฟด้วยเชื้อราบูเวเรีย ในสภาพแปลงเป็นเวลา 5 วัน	38
7	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมด้วยเชื้อราบูเวเรีย 9 ไอโซเลท กับชุดควบคุม	39
8	เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงหวี่ขาวด้วยเชื้อราบูเวเรีย 3 ไอโซเลท กับชุดควบคุม	41
9	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักด้วยเชื้อราโนมูเรีย 3 ไอโซเลท กับชุดควบคุม	42

มูลนิธิโครงการหลวง ROYAL PROJECT FOUNDATION

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แปลงปลูกผักกาดขาวปลีที่ได้สำรวจพบ เชื้อราสาเหตุโรคแมลง	14
2	การทดสอบความสามารถของเชื้อราบูเวเรียกับมอดเจาะผลกาแฟ	19
3	ชนิดแมลงที่พบเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเข้าทำลาย	23
4	ลักษณะเชื้อราสาเหตุโรคแมลงชนิดต่างๆ ที่เจริญบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA)	24
5	ลักษณะเชื้อรา *Beauveria bassiana*	25
6	ลักษณะเชื้อรา *Paecilomyces* sp	25
7	ลักษณะเชื้อรา *Metarhizium* sp.	26
8	ลักษณะเชื้อรา *Nomuraea* sp.	27
9	ลักษณะเชื้อรา *Nectria* sp.	27
10	การเก็บรักษาเชื้อบน MEA Slant	28
11	การเก็บรักษาเชื้อในน้ำกลั่น	29
12	การเก็บแบบแห้ง Paper culture	29
13	การเก็บรักษาเชื้อใน mineral oil	30
14	เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่สามารถเจริญได้ดีในเมล็ดข้าวจ้าวหุงสุก	31
15	ลักษณะเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่สามารถเจริญได้ดีในเมล็ดข้าวจ้าวหุงสุก	32
16	ลักษณะชีวภัณฑ์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ปั่นละเอียด ในรูปแบบผง	32
17	เปอร์เซ็นต์การตายของเสี้ยนดินด้วยเชื้อรา 3 สกุล 10 ไอโซเลท เทียบกับชุดควบคุมและที่เป็นการค้า	35
18	เปรียบเทียบการเข้าทำลายเสี้ยนดินของเชื้อราแมลงกับชุดควบคุม	35
19	เปอร์เซ็นต์การตายของมอดด้วยเชื้อราบูเวเรีย จำนวน 5 ไอโซเลท เทียบกับชุดควบคุม	37
20	มอดเจาะผลกาแฟที่ถูกเชื้อราบูเวเรียเข้าทำลาย	37
21	เชื้อราบูเวเรียที่ขึ้นบนมอดเจาะผลกาแฟ	38
22	เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมด้วยเชื้อราบูเวเรีย จำนวน 9 ไอโซเลท เทียบกับชุดควบคุม	40
23	แมลงค่อมที่ถูกเชื้อราบูเวเรียเข้าทำลาย	40
24	ตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวที่ถูกเชื้อราบูเวเรียเข้าทำลาย	41
25	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักด้วยเชื้อราโนมูเรีย จำนวน 3 ไอโซเลท เทียบกับชุดควบคุม	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	หนอนกระทู้ผักที่ถูกเชื้อราโนมูเรียเข้าทำลาย	43
27	หนอนกระทู้ผักในชุดควบคุมถูกเชื้อแบคทีเรียเข้าทำลาย	43

มูลนิธิโครงการหลวง ROYAL PROJECT FOUNDATION

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของหัวข้อวิจัย

มูลนิธิโครงการหลวง ได้ส่งเสริมให้เกษตรกรบนที่สูงปลูกพืชที่มีรายได้ดีในพื้นที่จำกัด เพื่อทดแทนการปลูกพืชเสพติด จากผลการดำเนินงานตลอด 40 ปีที่ผ่านมาสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้เป็นผลสำเร็จ เกษตรกรมีรายได้จากการปลูกพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ เช่น ผัก ไม้ดอก ไม้ผล เป็นต้น ปัจจุบันได้มีความพยายามพัฒนาขบวนการผลิตพืชที่มีคุณภาพสูงและปลอดภัยจากสิ่งปนเปื้อนต่าง ๆ ซึ่งเป็นหน้าที่รับผิดชอบของศูนย์อารักขาพืช ในการที่จะควบคุมคุณภาพของผลผลิตโดยเฉพาะพืชผักให้มีความปลอดภัยจากการเข้าทำลายของศัตรูพืช รวมถึงปลอดภัยจากการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืช การควบคุมการเข้าทำลายของศัตรูพืช ใช้หลักการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (Integrated Pest Management) โดยมีเป้าหมายมุ่งสร้าง ความสมบูรณ์แข็งแรงให้กับพืช ขณะเดียวกันต้องลดการใช้สารเคมีให้เหลือน้อยที่สุด โดยใช้วิธีการอื่นทดแทน เช่น การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธี (Biological control) ซึ่งปัจจุบันมีการนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมศัตรูพืชมากมายหลายชนิด เช่น การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา สำหรับการควบคุมแมลงศัตรูพืชก็มีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่นำมาใช้ เช่น ไส้เดือนฝอยปราบหนอน เชื้อแบคทีเรียควบคุมหนอน รวมถึงเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (Entomopathogenic Fungi) ที่มีรายงานการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด เช่น เชื้อราบูเวเรีย (Beauveria) ใช้ควบคุมแมลงหวี่ขาว (Whitefly) เพลี้ยไฟ (Thrips) ไรแดง (Red spider mite) เพลี้ยอ่อน (Aphids) เพลี้ยไก่แจ้ (Asian citrus psyllid) หนอนศัตรูพืช เพลี้ยแป้ง และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เป็นต้น เชื้อราเมทาไรเซียม (Metarhizium) ใช้ควบคุมตั๊กแตน หนอน เพลี้ยแป้ง เพลี้ยอ่อน หนอนด้วง ต่างๆ และด้วงต่างๆ แมลงดำหนาม เป็นต้น

เชื้อราสาเหตุโรคแมลง สามารถเข้าทำลายแมลงทางผนังลำตัว แต่มีบางชนิดเข้าทำลายตามช่องเปิดต่าง ๆ เช่น รูหายใจ หรือบาดแผลที่ผนังลำตัว การเข้าทำลายเริ่มจากโคนิเดียของเชื้อราตกลงบนผนังลำตัวของแมลง เมื่อความชื้นเหมาะสม เชื้อราจะสร้าง germ tube แทงทะลุผนังลำตัวของแมลงเข้าไป โดยปกติเชื้อราจะเข้าบริเวณผนังที่บางๆ เช่น รอยต่อระหว่างปล้อง หรือข้อต่อของรยางค์ต่าง ๆ การแทงทะลุผนังลำตัวของแมลงแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของเชื้อรา บางชนิดสร้าง appressorium สำหรับแทงทะลุผนัง บางชนิดแทงทะลุผ่านด้วยเส้นใย นอกจากนี้เชื้อรายังมีการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น lipase ช่วยย่อยสลายชั้นไขมันที่ผนังลำตัว หรือเอนไซม์ chitinase และ proteinase เมื่อเชื้อราเข้าไปในช่องว่างภายในตัวแมลงจะแย่งอาหารเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างเส้นใยจนเต็มตัวแมลง เส้นใยเหล่านี้จะไปเบียดเบียน ทำลายอวัยวะต่าง ๆ ภายในตัวแมลง ทำให้แมลงตาย เมื่อแมลงตายเชื้อราจะแทงทะลุผ่านผนังลำตัวออกมา โดยทั่วไปจะแทงออกมาในจุดที่แทงเข้าไป จากนั้นจะสร้างก้านชูสปอร์และสปอร์บนผนังลำตัว แพร่กระจายเข้าทำลายแมลงตัวอื่นต่อไป หรือบางชนิดอาจสร้างสารพิษฆ่า

แมลงได้รวดเร็ว ความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลงขึ้นกับชนิดของเชื้อรา เพราะเชื้อราต้องการอาหารที่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ เช่น อัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน ดังนั้นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง จึงมีความเฉพาะเจาะจงสูง นอกจาก นี้เชื้อราสาเหตุโรคแมลง ยังไม่มีพิษตกค้างในผลผลิต ไม่ก่อให้เกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อม ไม่ทำให้แมลงสร้างความต้านทานได้ง่าย สามารถใช้กำจัดแมลงที่มีวงจรชีวิตอยู่ในดินได้ ใช้กำจัดแมลงปากดูดที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นใช้ไม่ได้ผล มีความปลอดภัยต่อศัตรูธรรมชาติหรือแมลงที่มีประโยชน์ เช่น ผึ้ง นอกจากนี้ยังสามารถใช้ร่วมกับการจัดการวิธีการอื่นได้ โดยไม่ก่ อให้เกิดโรคกับพืช สัตว์ชนิดต่าง ๆ รวมถึงคนอีกด้วย ซึ่งปัจจุบันเชื้อราสาเหตุโรคแมลง มีจำหน่ายในท้องตลาดหลายยี่ห้อ แต่ไม่ได้รับการยอมรับจา กเกษตรกร เนื่องจากผลิตภัณฑ์มีราคาแพง และเห็นผลช้า เนื่องจากเชื้อราใช้เวลาในการทำลายแมลงนาน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการค้นหาเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพและมีศักยภาพในพื้นที่ของมูลนิธิโครงการหลวงซึ่งเป็นพื้นที่สูง และสามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ส่งเสริมให้เกษตรกรของมูลนิธิโครงการหลวงใช้ในราคาถูก รวมถึงนำไปใช้ได้ง่าย เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงใกล้เก็บเกี่ยวผลผลิต เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

วัตถุประสงค์ของการทดลอง และขอบเขตของการวิจัย

- เพื่อสำรวจหาเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ในพื้นที่ของมูลนิธิโครงการหลวง
- เพื่อคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชสำหรับพื้นที่สูงของมูลนิธิโครงการหลวง
- เพื่อพัฒนาเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ที่มีประสิทธิภาพให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาถูกและสามารถนำไปใช้ได้ง่าย สำหรับเกษตรกร
- เพื่อลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกรและให้เกษตรกรลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ได้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีอยู่ในพื้นที่ของมูลนิธิโครงการหลวง
- ได้ผลิตภัณฑ์จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพ ราคาถูกและสามารถนำไปใช้ได้ง่าย สำหรับเกษตรกร
- เกษตรกรสามารถลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

บทที่ 2

ทฤษฎี และแนวคิดที่เกี่ยวข้อง

แนวความคิดที่ใช้ในการแก้ปัญหา

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันแล้วว่า การใช้สารเคมี ในการปราบศัตรูพืช ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ ซึ่งทั่วโลกตระหนักถึงพิษภัยนี้ ดังเช่นประเทศที่พัฒนาแล้วได้เริ่มเข้มงวดต่อการนำเข้าสินค้าที่ปลอดภัยจากสารพิษมากขึ้น ศูนย์อารักขาพืชจึงมีแนวคิดที่จะลดการใช้สารเคมีและ ได้ปฏิบัติมาแล้ว อย่างต่อเนื่องนับ 10 ปี โดยใช้ หลักการ Integrated pest management (IPM) เป็นแกนของการผลิตพืชผักในทุกระบบการปลูกพืช โดยเน้นเรื่องการจัดการดิน การจัดการพืช การจัดการน้ำ ร่วมกับการจัดการศัตรูพืช โดยให้มี การใช้ศัตรูธรรมชาติ การใช้สารปลอดภัยแทนการใช้สารเคมี ซึ่งศูนย์อารักขาพืชได้มีการวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้ และได้นำผลงานวิจัยมาใช้ เ ช่น การใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช การใช้เชื้อแบคทีเรียในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรีย การใช้เชื้อราควบคุมไส้เดือนฝอย รวมถึงการนำน้ำหมักสมุนไพรมาใช้ป้องกันกำจัดโรคและศัตรูพืชอีกด้วย เนื่องจากชีวภัณฑ์ (ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากสิ่งมีชีวิต) ซึ่งมีทั้งเชื้อราแ ละเชื้อแบคทีเรีย ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมีราคาค่อนข้างสูง ประกอบกับผล ของการใช้ชีวภัณฑ์ดังกล่าว เห็นผลช้า เกษตรกรจึงไม่นิยมใช้ ศูนย์อารักขาพืชจึงพยายามที่จะผลิตเชื้อสดเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดโรคและแมลงได้สูงขึ้นและราคาไม่แพง เนื่องจากคิดราคาต้นทุน ทำให้เกษตรกรยอมรับ ในการนี้ได้พยายามที่จะค้นหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในพื้นที่ของมูลนิธิโครงการหลวงเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพที่สูงยิ่งขึ้นอีก เพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้และลดละเลิกการใช้สารเคมีไปในที่สุด

การดำเนินการสำหรับงานวิจัย

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในพื้นที่ของมูลนิธิโครงการหลวง
2. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการควบคุมแลงศัตรูพืชผัก (เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว หนอนกระทู้ผัก) ในสภาพห้องปฏิบัติการ
3. การจัดจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ได้จากข้อ2
4. การผลิตเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในรูปผลิตภัณฑ์
   - ศึกษารูปแบบผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมในการควบคุมศัตรูพืช
   - ศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมในการควบคุมศัตรูพืช
5. การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ในการควบคุมศัตรูพืชเป้าหมายในแปลงปลูก
   - ศึกษาอัตราและวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมในการควบคุมศัตรูพืช

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อราสาเหตุโรคแมลง (Entomopathogenic Fungi) จากเอกสารทางวิชาการเรื่องเชื้อรากำจัดแมลง ซึ่งผลิตโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา (2551) ทำให้ทราบข้อมูลของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงดังนี้

มีเชื้อรามากกว่า 400 ชนิด ที่เป็น สาเหตุ ของโรค แมลง ซึ่ง สามารถ นำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยมีการผลิตเป็นการค้า คือ

- *Beauveria bassiana* ควบคุมผีเสื้อทำลายสน หนอนเจาะลำต้นข้าวโ พด และแมลงศัตรูพืชอีกหลายชนิด
- *Metarhizium anisopliae* ควบคุมเพลี้ยต่างๆ ด้วงแรดมะพร้าว ด้วงต่าง ๆ
- *Hirsutella thompsoni* ควบคุมไรสนิมส้ม
- *Verticillium lecanii* ควบคุมเพลี้ยอ่อน และแมลงหวี่ขาว

การเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแม ลงนี้ สามารถเข้าสู่ร่างกายของแมลงได้ โดยแทงทะลุผ่านเข้าไปทางผิวหนังและไปเจริญเติบ โตภายในตัวแมลงโดยจะสร้างสารพิษ (Toxin) ทำลายเนื้อเยื่ อและระบบต่าง ๆ ทำให้แมลงตายได้หรือบางครั้งเชื้อราอาจเข้าไปทางปากแต่ไม่มีผลต่อแมลง เพราะจะถูกถ่ายออกทางอุจจาระ การเกิดโรคของ แมลงจะเกิดได้ดีและรวดเร็ว เมื่อแมลงอ่อนแอ และถูกสัมผัสโดยตรงกับเชื้อราที่มีความรุนแรงในสภาพแวดล้อมที่พอเหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อรานั้นๆ การติดเชื้อโรคของแมลงจะเป็นไปด้วยดี รวดเร็ว มีประสิทธิภาพหรือไม่ขึ้นอยู่กับสิ่งต่าง ๆ ต่อไปนี้

1. ส่วนต่าง ๆ ของอวัยวะแมลงที่ไวต่อการติดเชื้อร า เช่น บริเวณเนื้อเยื่อบางๆ ระหว่างกะโหลกศีรษะปล้องอก ปล้องต่าง ๆ ในส่วนท้อง ขา และหนวด เป็นต้น และแมลงบางชนิดจุดอ่อนอยู่ที่ปากหรือส่วนก้น

2. การเจริญและการงอกของเชื้อรา การงอกของเชื้อราขึ้นอยู่กั บอุณหภูมิและความชื้นที่เห มาะสม เช่น เชื้อราเขียวจะเจริญและงอกได้ดีบนผิวหนังข องหนอนด้วงแรดที่อุณหภูมิประมาณ 27 - 28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศประมาณ 90% แต่จะไม่เจริญเลยในสภาพอากาศแห้งแล้ง

3. การแทงทะลุของเส้นใยผ่านผิวหนังชั้นต่าง ๆ ของแมลง เส้นใยของเชื้อราจะแทงทะลุ ผ่านผิวหนังของแมลงหลังจากการงอก พร้อมทั้งสร้างสารเอนไซม์ไคติเนส (Chitinase) ไปย่อยสลายโปรตีน และ Chitin ในผิวหนังแมลงทำให้เกิดช่องว่างและประกอบกับมีแรงดันเป็นกลไกที่ทำให้เส้นใยสามารถแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อของแมลง แล้วเข้าไปขยายจำนวนและแพร่กระจายไปในเลือดได้ต่อไป

4. ความสัมพันธ์ ระหว่างการติดโรคและการลอกคราบ การติดโรคราของแมลงจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับจำนวนของเชื้อราที่เข้าไปขยายในเส้นเลือด ถ้าเชื้อรางอกและแทงทะลุเข้าไปได้เพียงผิวหนังชั้นนอก และตรงกับ

ช่วงที่แมลงมีการลอกคราบ เชื้อราก็จะห ลุดติดไปกับคราบออกไปจากตัวแมลง การติ ดเชื้อโรคราแมลงก็จะไม่เกิดขึ้น แต่หากเชื้อรางอกแทงทะลุและชอนไชผ่านเข้าไปถึงผิวหนังชั้นใน และมีการลอกคราบเกิดขึ้น หลังจากแมลงลอกคราบแล้วเชื้อราก็ยังคงอยู่และสามารถชอนไชเข้ าสู่เส้นเลือดไปขยายเพิ่มจำนวน และแพร่กระจายไปทั่วตัวแมลงทำให้แมลงมีโอกาสตายด้วยการติดเชื้อราได้ ดังนั้นพอจะกล่าวได้ว่าแมลงที่เกิดโรคราขึ้นนั้น จะต้องอยู่ในสภาพที่อ่อนแอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงต่อเนื่องระหว่างการลอกคราบ และสภาพที่เห มาะเฉพาะเจาะจงในส่วนของผิวหนัง ช่องว่างภายในลำตัวขอ งแมลงที่สัมผัสโดยตรงกับเชื้อรา รวมถึงจำนวนปริมาณของเชื้อราที่มากพอและสภาพสิ่งแวดล้อมจากอุณหภูมิ ความชื้น ทั้งภายในและภายนอกลำตัวแมลงเหมาะสมทำให้เชื้อราเจริญเติบโตขยายปริมาณเพิ่มขึ้นจนทำให้แมลงตายได้ในที่สุด ดังมีรายละเอียดของเชื้อราแต่ละชนิด รวมทั้งงานวิจัยที่ผู้รายงานไว้ดังต่อไปนี้

เชื้อราเขียว (*Metarhizium anisopliae*)

เชื้อราเขียวเป็นเชื้อที่ทำลายแมลงได้หลายชนิด เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณ หภูมิ 24 – 26 องศาเซลเซียส มีสปอร์ (Conidia) รูปรีสีเขียวคล้ำ ขนาด 2 – 4 ไมครอน และมีการสร้าง conidia ได้ดี โดยที่อุณหภูมิ 10 – 30 องศาเซลเซียส เชื้อราเขียวสามารถเจริญเติบโตดีเป็นปกติ และพบว่าสภาพความเป็นกรดเป็นด่างที่ 4.7 – 10 เป็นช่วงที่ราเขียวเจริญเติบ โตได้เป็นปกติ และที่เหมาะสมคือ 6.9 – 7.4 ในสภาพธรรมชาติ มีรายงานว่าเชื้อราเขียวมีชีวิตอยู่ในดินนาน 1 ปี และสามารถมีชีวิตอยู่ ในแหล่งขยายพันธุ์ของด้วงแรดเป็นเวลา 3 ปี นอกจากด้วงแรดมะพร้าวแล้ว เชื้อราเขียวยังมีคุณสมบัติในการควบคุมแมลงช นิดต่าง ๆ อีกหลายชนิด (กลุ่มงานชีววิธี ส่วนบริหารศัตรูพืช สำนักงานพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร.ไม่ระบุปีที่พิมพ์)

พัชรินทร์ ครุทเมือง (2554) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลท กับหนอนกระทู้ผักวัย 2 โดยให้สัมผัสกับเชื้อราโดยตรงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาพห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น พบว่ามีเชื้อราเขียว 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผัก คือ BCC1858, BCC4849 และ Khon Kaen ซึ่งทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 2 วัน นอกจากนี้ ได้ศึกษาสรีรวิทยาของ *M. anisopliae* โดยนำไปทดสอบกับอาหารชนิดต่างๆ 8 ชนิด พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mungbean agar (MU) สามารถส่งเสริมเส้นใยและสปอร์ได้ดีที่สุด อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติ บโตของเชื้อราเขียวอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส ในช่วงแสง 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมงสามารถสร้างสปอร์สีเขียวมากกว่าการทดลองอื่น สำหรับการ ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา เขียว 3 ไอโซเลทกับหนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 โดยใช้ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 10^7, 10^8, 10^9 และ 10^{10} สปอร์ /มล. พบว่าเชื้อราเขียวไอโซเลท 4849 ที่ระดับความเข้มข้น 6×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำให้หนอนกระทู้ผักวัย 3 มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด คือ 79.49% ภายใน 7 วัน นอกจากนี้ เศรษฐพงศ์และคณะ (2553) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมปลวกสายพันธุ์ *Coptotermes*

curvignathus ศัตรูในต้นยางพารา โดยการพ่นปลวกด้วยสปอร์แ ขวนลอยของเชื้อราที่ความเข้มข้น $5x10^7$สปอร์ต่อมิลลิลิตร และสารจากเชื้อราที่มีความเข้มข้นของ สปอร์เริ่มต้น $1x10^8$, $5x10^7$ และ $2.5x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าจำนวนปลวกที่ตาย ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 90, 89, 95 และ 93 ตามลำดับ

กลุ่มงานชีววิธี ส่วนบริหารศัตรูพืช สำนั กงานพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร (ไม่ระบุปีที่พิมพ์) ได้สรุปกลไกการเข้าทำลายของเชื้อราเขียว ไว้ดังนี้

เชื้อราเข้าทำลายแมลงศัตรูพืช เช่น ด้วงแรดมะพร้าว โดยเชื้อราจะเข้าทางผนังลำตัวทางตำแหน่งต่ าง ๆ ของตัวหนอนด้วงแรดมะพร้าว เช่น เยื่อบาง ๆ ที่อยู่ระหว่างกะโหลกศีรษะ รอยต่อระหว่างปล้องของหนอน สปอร์ที่ติดอยู่ตรงบริเวณที่เหมาะสม กับการเข้าทำลายของเชื้อราเขียว จะงอกเข้าสู่ผิวหนังของ แมลง โดยต้องมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม กล่าวคือ มีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 27 – 28 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์ไม่ต่ำกว่า 90% โดยสปอร์จะงอกเป็นเส้นใยแทงเข้าสู่ร่างกายแมลง หลังจากงอกผ่านผิวหนังชั้นนอกของแมลงแล้ว เส้นใยของเชื้อราเขียวจะแทงทะลุผ่าน ผิวหนังชั้นต่าง ๆ ของตัวแมลง โดยจะมีกลไกและเอนไซม์ Chitinase ซึ่งสร้างโดยเชื้อราเข้าย่อยสลายโปรตีนและ Chitin ในผิวหนังแมลงเกิดช่องว่างและประกอบกับมีแรงดันเป็นกลไก เส้นใยจึงสามารถแทรกเข้าสู่เนื้อเยื่อและเข้าไปขยายจำนวนในเลือดแมลงได้

ขั้นตอนการเข้าทำลายแมลงของเชื้อรา

1. ระยะติดเชื้อ (infective stage) ของเชื้อรา คือ สปอร์ตกลงบนผนังลำตัวแมลง
2. สปอร์ที่ตกบนตัวแมลงงอกเข้าสู่ผิวหนังแมลง
3. หลังจากงอกแล้วสปอร์จะสร้างอวัยวะที่เรียกว่า germ tube แทงผ่านผนังลำตัวเข้าสู่ภายในลำตัวแมลง
4. สร้าง hyphal body ซึ่งช่วงนี้เชื้อราจะมีการสร้างสารพิษ (Toxic substance) หรือสารพิษที่มีผลต่อขบวนการ Metabolism (Toxic metabolite)
5. เส้นใยเจริญขึ้นปกคลุมอวัยวะต่าง ๆ ของแมลง
6. เส้นใยแทงออกนอกตัวแมลง
7. สร้างสปอร์

ลักษณะอาการของหนอนด้วงแรดมะพร้าวที่เกิดจากเชื้อราเขียว

1. แมลงเคลื่อนไหวช้า
2. เบื่ออาหาร
3. ซากของแมลงจะถูกปกคลุมด้วยสปอร์และเส้นใยสีเขียว
4. ซากของแมลงแข็งเหมือนมัมมี่ (Mumified)

กลุ่มงานชีววิธี ส่วนบริหารศัตรูพืช สำนักงานพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร (ไม่ระบุปีที่พิมพ์) พบว่านอกจาก เชื้อราเขียวแล้วยังมีเชื้อราอีกชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการคว บคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด คือ

เชื้อรา**บูเวเรียหรือบิวเวอเรีย** (*Beauveria* sp.) เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถทำลายแมลงได้หลายชนิด เช่น แมลงหวี่ขาว (Whitefly) เพลี้ยไฟ (Thrips) ไรแดง (Red spidermite) เพลี้ยอ่อน (Aphids) และเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (Asian citrus psyllid) เป็นต้น

การเข้าทำลายแมลงของเชื้อราบิวเวอเรีย

เชื้อบิวเวอเรีย บาสเซียน่า เป็นเชื้อราชนิดเบียนภายใน (endoparasite) จะทำลายแมลงให้ตายได้อย่างรวดเร็ว โดยการเข้าทำลาย หรือย่อยสลายเนื้อเยื่อในตัวแมลง

กลไกลการทำลายแมลง

โดยเชื้อราบิวเวอเรีย บาสเซียน่า ระยะที่เป็นสปอร์จะไปติดอยู่กับผนังลำตัวแมลง

(I) เส้นใยของเชื้อราจะงอกออกจากสปอร์แทงผ่านผนังลำตัวของแมลงเข้าสู่เนื้อเยื่อของแมลงทำลายชั้นไขมันและแพร่ขยายเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัว เส้นใยจะเพิ่มจำนวนจนอัดแน่นอยู่ภายในซากแมลง

(II) แมลงที่ตายแล้ว เส้นใยจะพัฒนาต่อไปโดยแทงผ่านผนังลำตัวแมลงขึ้นมาและสร้างสปอ ร์ ขึ้นปกคลุมผนังลำตัวด้านนอกของแมลง

(III) สปอร์จะแพร่กระจายไปตามลม ฝน หรือติดไปกับตัวเบียนขณะมากินเพื่อขยายพันธุ์

ลักษณะอาการของแมลงที่ถูกเชื้อรา บิวเวอเรีย เข้าทำลาย

แมลงที่ถูกเชื้อราขาว บิวเวอเรีย เข้าทำลายส่วนใหญ่จะมีเส้นใยของเชื้อราอยู่ในหรือบนตัวของแ มลงในระยะของการเข้าทำลายแมลงจะแสดงอาการของการเป็ นโรค คือ เบื่ออาหาร กินน้อยลง อ่อนเพลีย และไม่เคลื่อนไหว สีผนังลำตัวของแมลงจะปรากฏจุดสีดำ ต รงบริเวณที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย นอกจากนี้ยังพบผงสีขาวของสปอร์ปกคลุมตัวแมลงที่ถูกทำลา ยอีกด้วย สำหรับ หลักการสำคัญที่ใช้ เป็นแนวทางในการใช้เชื้อราขาวบิวเวอเรียได้ให้ไว้ดังนี้

1. ต้องพยายามรักษาสปอร์ที่พ่นไปติดตามลำตัวแมลงหรือพืชให้ดำรงชีวิตได้ยาวนานที่สุด
2. สปอร์จะงอกเส้นใยได้ดีและแทงเข้ าผนังลำตัวแมลงหรือไรได้รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพดีมาก เมื่ออุณหภูมิอยู่ระหว่าง 20 - 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ถ้าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นน้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ สปอร์จะงอกน้อยห รือไม่งอกเลย) (กลุ่มงานชีววิธี ส่วนบริหารศัตรูพืช สำนักงานพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร, ไม่ระบุปีที่พิมพ์)

สิริญา คัมภิโรและคณะ(2554) ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการควบคุมแมลงหวี่ขาวโรงเรือน *Trialeurodes vaporariorum* Westwood ในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบการเข้าก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง จำนวน 29 ไอโซเลท จากเชื้อ 17 ชนิด ใน 5 สกุล ด้วยการพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงบนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวโรงเรือนวัยที่2 พบว่า มีเชื้อราเพียง 6 ไอโซเลท จากเชื้อ

6 ชนิด ใน 3 สกุล ที่สามารถทำให้แมลงหวี่ขาวโรงเรือนเกิดโรคตายได้ โดยมีอัตราการตายระหว่างร้อยละ 3.85 - 92.44 เชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลท Pt 6073 ก่อโรคกับแมลงหวี่ขาวโรงเรือนสูงสุดร้อยละ 92.44 รองลงมาคือเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท BCC 4849 มีค่าร้อยละ 72.67 โดยมีค่า LC_{50} 2.219 x 10^6 และ 1.005 x 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่เวลา7 วัน หลังจากได้รับเชื้อ

จากข้อมูลที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีด้วยกันหลายชนิด ซึ่งการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราดังกล่าว สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ

1. **การจำแนกชนิดเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา** (วิจัย รักวิทยาศาสตร์, 2546)

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะของเซลล์แบบ eucaryotic cell ไม่มีคลอโรฟิลล์ มีทั้งที่เป็นเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ พวกที่เป็นหลายเซลล์นั้น แต่ละเซลล์จะมาเรียงต่อกันเป็นเส้นใย (hypha) ที่อาจแตกแขนงหรือไม่แตกแขนง มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ

- ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อรามีทั้งชนิดที่เป็นเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ ซึ่งเซลล์จะเรียงตัวกันอยู่ในแนวเดียวกัน มีลักษณะเป็นเส้นใยพวกเซลล์เดียวได้แก่ ยีสต์ ส่วนพวกเป็นเส้นใยได้แก่ รา (mold) ต่าง ๆ สำหรับขนาดของเชื้อรามีตั้งแต่ 5 - 50 ไมครอน จนถึงมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า

เชื้อราโดยทั่วไปมีทัลลัสประกอบด้วยเส้นใยเล็ก ๆ ที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า เส้นใยแต่ละเส้นเรียก hypha ซึ่ง hypha ถ้าร่วมกันอยู่มาก ๆ เรียก mycelium

เซลล์ของราและยีสต์มีลักษณะทั่วไปเหมือนพืช โดยแต่ละเซลล์มีผนังเป็นสารพวกเซลลูโลส หรือ Chitin กับเซลลูโลส นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ แตกต่างกันไปในแต่ละชนิด เช่น *Penicillium chrysogenum* จะมี 6 – deoxychoxose rhamnose และ xylose อยู่ด้วย ส่วน *Polystictus sanguineus* มีเฉพาะ xylose เท่านั้น สำหรับที่มีประจุเป็นลบ นอกจากนี้ยังพบ galactosamine ใน *Neurospora sitophila*, *Aspeergillus niger* และ *Botrytis cinerea* อีกด้วย

ส่วนโปรตีนและไขมันที่ผนังเซลล์นั้นมีพบน้อยมาก ในยีสต์พวก *Candida albicans* พบโปรตีนรวมกับ polysaccharide ที่เรียกว่า polysaccharide - protein complex ส่วนใน Saccharomyces จะพบโปรตีนรวมกับ mannan เป็น mannan – protein complex สำหรับ *Allomyces macrogynus* พบไขมันเล็กน้อย แต่ที่ผนังเซลล์ของก้านชูสปอร์ (sporangiophore) ของรา *Phycomyces* มีไขมันมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้อาจพบลิกนินที่ผนังเซลล์อีกด้วย ทำให้ผนังเซลล์ทนต่อการถูกทำลายด้วยกรดได้ ดี ภายในเซลล์ของรามีนิวเคลียสหนึ่งอันหรือมากกว่า ตามปกติการดูเซลล์ของราด้วยกล้องจุลทรรศน์จะไม่เห็นนิวเคลียส เนื่องจากมีขนาดเล็กและโปร่งแสง ต้องใช้วิธีย้อมสีจึงจะเห็นชัดเจนขึ้น

ราบางชนิดจะมีโครงสร้างที่แตกต่างไป เช่น *Rhizopus* และ *Absidia* จะมี rhizoid หรือ hold fast และ *Aspergillus* มี foot cell ยึดเกาะกับวัตถุต่าง ๆ

เส้นใยของรามี 2 ชนิด คือ

1. เส้นใยไม่มีผนังกั้น (non septate hypha) ทำให้เป็นท่อทะลุต่อถึงกันโดยตลอด มีไซโตปลาสซึม และนิวเคลียสอยู่ต่อเนื่องกัน เรียกเส้นใยชนิดนี้ว่า coenocytic hypha ราชนิดนี้เมื่ อมีอายุมากหรือในสภาพที่ไม่เหมาะสมอาจสร้างผนังกั้นขึ้นได้

2. เส้นใยมีผนังกั้น (septate hypha) ซึ่งแต่ละตอนของเส้นใยมีผนังกั้นไว้ ทำให้ดูลักษณะเป็นห้อง ๆ แต่ละห้องมีนิวเคลียสและไซโตปลาสซึม

ลักษณะของเส้นใยดังกล่าวนี้ นำไปใช้ในการจำแนกราเป็นหมวดหมู่

- ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อรา

เชื้อราที่เป็นเส้นใยจะมีการเจริญออกไปได้สองทิศทางคือ ทางขวางจะเจริญไปจนเต็มที่แล้วจึงหยุด ส่วนการเจริญทางด้านยาวนั้น เส้นใยของราจะงอกยาวออกไปและแตกแขนงอย่างไม่จำกัด ตราบเท่าที่สภาพแวดล้อมยังเหมาะสม สายใยเหล่านี้เรียกว่า mycelium ทำให้รามีขนาดใหญ่จนมองเห็นด้วยตาเปล่า mycelium มีสองชนิดคือ vegetatave mycelium เป็นส่วนที่ยึดเกาะกับอาหาร เพื่อทำหน้าที่นำอาหารไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของทัลลัส (thallus) อีกชนิดหนึ่งได้แก่ aerial mycelium เป็นส่วนที่ยื่นไปในอากาศ ทำหน้าที่สร้างสปอร์ จึงเรียก mycelium แบบนี้ว่า reproductive mycelium

ในบางระยะของการเจริญอาจพบ mycelium มาเรียงอัดตัวประสานกันเป็นลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อ มี 2 ชนิด คือ

1. prosenchyma ประกอบด้วย mycelium อัดตัวกันอย่างหลวม ๆ และขนานกันตามความยาว

2. pseudoparenchyma ประกอบด้วย mycelium เรียงอัดตัวกันอย่างหนาแน่น มีลักษณะคล้ายเนื้อเยื่อ parenchyma ในพืชชั้นสูง

ในราชั้นสูงบางชนิด จะสร้างเส้นใยเรียงอัดตัวหนาแน่นมาก จนเส้นใยแต่ละเส้นกลมกลืนเป็นเนื้อเยื่อเดียวกันทำให้ผนังเส้นใยมีความแข็งแรง ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีเรียกว่า Rhizomorph

- การดำรงชีวิตของเชื้อรา

เนื่องจากเชื้อราไม่มีคลอโรฟิลล์ จึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ดังนั้นการดำรงชีวิตส่วนมากจึงต้องอาศัยอาหารสำเร็จรูปที่มีอยู่ในธรรมชาติ ได้แก่ อินทรียสารจากสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว โดยเชื้อราจะปล่อยเอนไซม์มาย่อยสลาย จึงเกิดการเน่าเปื่อยผุพังเป็นสารอินทรีย์ขนาดเล็ก สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ โดยทั่วไปแล้วการดำรงชีวิตของเชื้อรามีหลายแบบดังนี้

1. saprophyte เป็นเชื้อราที่ได้อินทรียสารจากสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้ว เช่น ซากพืชหรือซากสัตว์ต่าง ๆ เป็นอาหาร เชื้อราเหล่านี้ไม่สามารถเจริญบนสิ่งที่มีชีวิตได้จึงจัดว่าเป็นพวก obligate saprophyte

2. parasite เป็นเชื้อราที่ได้อินทรียสารจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ซึ่งเชื้อราพวกนี้บางชนิดเจริญเฉพาะในสิ่งที่มีชีวิตเท่านั้น เรียกว่า พาราไซต์ที่แท้จริง (obligate parasite) แต่บางชนิดสามารถเจริญบนสิ่งที่มีชีวิตและเมื่อสิ่งมีชีวิตนั้นตาย ก็เจริญต่อบนซากสิ่งที่มีชีวิตนั้นได้ เรียกเชื้อราพวกนี้ว่า facultative parasite

3. mutualism เป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน เช่น ไลเคนส์ (lichens) เป็นการอยู่ร่วมกันระหว่างเชื้อรากับสาหร่าย เชื้อราต้องการอาหารสำเร็จรูปเพื่อการดำรงชี วิต แต่บางกรณีพบว่าในที่มีคาร์โบไฮเดรตบางชนิด (เช่น กลูโคสและมอลโตส) และไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ต่าง ๆ รวมทั้งเกลือแร่ ที่จำเป็นบางชนิด เชื้อราจะสามารถสังเคราะห์โปรตีนขึ้นเองได้ จากการศึกษาพบว่ามีแร่ธาตุบางอย่างที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ ฟอสฟอรัส โปตัสเซียม กำมะถัน โบรอน แมงกานีส ทองแด ง โมลิปตินั่ม เหล็ก สังกะสี และแคลเซียม ส่วนแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ได้แก่ กลูโคส แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือสารประกอบอินทรีย์ของไนโตรเจน รองลงมาได้แก่ สารประกอบพวกแอมโมเนีย และไนเตรต เมื่อเชื้อราได้รับอาหารเข้าสู่ เซลล์ ส่วนหนึ่งจะนำไปใช้ ส่วนที่เหลือจะเก็บสะสมไว้ในรูปของน้ำมัน และ glycogen

การจำแนกหมวดหมู่ของเชื้อรา จากเอกสารทางวิชาการเรื่องเชื้อรากำจัดแมลง ซึ่งผลิตโดย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา (2551)

เนื่องจากเชื้อรามีอยู่มากมาย บางชนิดมีลักษณะรูปร่างคล้ายคลึงกันมาก บางชนิดแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน ทำให้นักจุลชีววิทยาพยายามที่จะจัดแบ่งเชื้อราเป็นหมวดหมู่ ในสมัยแรก ๆ การจัดประเภทของเชื้อรายังไม่ถูกต้องตามธรรมชาติที่แท้จริง เพราะขาดความรู้ด้านวิวัฒนาก าร แต่ในปัจจุบันความรู้ด้านวิวัฒนาการก้าวหน้าไปไกล การจัดประเภทของเชื้อราจึงถูกต้องมากขึ้น

เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลงพบใน 2 อาณาจักร (Kingdom) ได้แก่

Kingdom Protoctista ได้แก่ Phylum

Oomycota

Chytridiomycota

Kingdom Mychota ได้แก่ Phylum

Zygomycota

Ascomycota

Deuteromycota

ยกตัวอย่าง การจัดชั้นของเชื้อราบิวเวอเรียมีดังนี้

Family : Moniliales

Order : Deuteromycetes

Class : Fungi Imperfecti

สปอร์รูปกลม ก้านชูสปอร์ ตั้งขึ้น ยาว เรียบ เป็นสายเดี่ยวหรือเป็นกิ่งก้าน กลมของสปอร์ อยู่กันเป็นสาขามารวมกันคล้ายรูปจานมีคุณสมบัติเป็นทั้ง entomogenous fungi และ saprophyte เส้นใยทรงกระบอกมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 - 2.0 ไมครอน สีใส มีผนังกั้นโคโลนี เรียบ คล้ายแป้งหรือคล้ายฝุ่น ชอล์ก ผิวหน้าแตก ลักษณะการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์จะแตกต่ างกันตามชนิดอาหาร เช่น ถ้าเป็น Potato Dextrose Agar (PDA) เชื้อราจะไม่สร้างสปอร์

2. การจำแนกเชื้อราโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (Tanksley *et al*., 1989)

เทคโนโลยีดีเอ็นเอเป็นหัวใจสำคัญของการวิเคราะห์และจัดจำแนกเชื้อ รา เนื่องจากมีประสิทธิภาพแม่นยำในการจำแนกความแตกต่างที่โมเลกุลดีเอ็นเอ เครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซมในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือ polymorphism ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี้เองที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่า งกันออกไปในรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงเข้ามามีบทบาทมากขึ้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค hybridization ตัวอย่างได้แก่ RFLP marker
2. PCR-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ตัวอย่างเครื่ องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ได้แก่ RAPD marker, AFLP marker และ Microsatellite marker หรือ SSR marker มีหลักการดังนี้

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอหลังจากถูกย่อยที่ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์แต่ละชนิด ประกอบด้วยเบส 4-8 คู่เบส ดังนั้น ถ้าใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ โดยหลักการเข้าคู่ของเส้นดีเอ็นเอคู่สม (complementary) แล้วใช้ชิ้นดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) ตรวจพบความเปลี่ยนแปลงนั้นได้ สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์กันย่อมมีลำดับเบสที่แตกต่างกันไม่มากก็น้อย หรือถ้าดีเอ็นเอมาจากแหล่งที่ต่างกันหรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่ง ซึ่งความต่างนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเรียกว่า polymorphism (Saiki *et al*., 1985)

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNAs) เป็นการพัฒนาเทคนิค PCR โดยนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่ม ได้แก่ Williams *et al.* (1990) และ Welsh and McClelland (1990) โดยใช้ random primer (arbitrary primer) เพียงชนิดเดียว เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสที่บริเวณใดเลย primer ที่ใช้จะมีขนาดสั้นกว่าปกติ คือประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ จึงสามารถเข้าคู่กับสารพันธุกรรมต้นแบบได้ หลายตำแหน่งโดยสุ่ม ในจีโนมอาจมีหลายบริเวณที่ไกลกันมาก ๆ หรือทิศทางเดียวกันจะไม่เกิดผลผลิตของ PCR แต่ถ้าไปเกาะได้ในบริเวณที่ใกล้กันและมีทิศทางเข้าหากัน จะเกิดผลผลิตของ PCR เมื่อนำผลผลิตของ PCR มาแยกโดย electrophoresis และย้อมด้วย ethidium bromide จะได้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนหรือแตกต่างกันได้

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งตรวจสอบได้โดยเทคนิค PCR เป็นการรวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน สารพันธุ กรรมจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่ทีตำแหน่งจดจำแตกต่างกัน ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะถูกต่อด้วย adapter 2 ชนิด จากปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR จำนวนของ polymorphism ที่ได้ขึ้นอยู่กับขนาดของจีโนม ความถี่ของเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะและจำนวนเบสที่จับกับ PCR primer ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อที่จะจำแนกชนิดและศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ที่ต่างกันและภายในกลุ่มสปีชีส์เดียวกัน (Vos *et al.,* 1995)

SSR (Simple Sequence Length Polymorphism) หรือ Microsatellite เป็นการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากความแตกต่างของจำนวนชุดของลำดับเบสสั้น ๆ ที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ กัน (simple sequence repeat) เพียง 1-4 คู่เบสหรือไม่เกิน 10 คู่เบส ซึ่งพบกระจายทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต ใช้เป็นเครื่ องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดีโดย polymorphism ที่เกิดขึ้นนั้น เป็นผลเนื่องจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ของ ไมโครแซทเทลไลท์ในโลกัสหนึ่ง ๆ โดยทั่วไปเบสซ้ำเหล่านี้มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่บริเวณรอบ ๆ เบสซ้ำต่อเนื่อง จากลักษณะเฉพาะนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะ ซึ่งจะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่าง unique sequences ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ซึ่งเป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากันนี้ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Powell *et al.*, 1996)

Bielikova *et al.* (2002) ได้ใช้ RAPD-PCR Technique ในการตรวจสอบและจัดจำแนกเชื้อรา *Paecilomyces fumosoroseus*, *Gliocladium virens* และ *Verticillium lecanii* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้ เพื่อบ่งชี้เชื้อราที่แยกได้จากการ re-inoculated บนแมลง และในปี 2006 Inglis และ Tigano ได้จัดจำแนกเชื้อรา *Paecilomyces* spp. โดยการใช้ rDNA-ITS sequence ส่วนในปี 2010 Safavi ได้ทำการแยกเชื้อ รา *Beauveria bassiana* จากดินโดยใช้อาหาร DOC2 ซึ่งเป็น selective media และใช้ Pr1 ในการจัดจำแนกเชื้อรา โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีความยาว 744 bp และในปี 2011 Lv *et al.* ได้ทำการแยก

เชื้อราสาเหตุโรคแมลงจาก *Hemiberlesia pitysophila* ได้จำนวน 15 ไอโซเลต และนำมาจำแนกเชื้อด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาและอณูชีวโมเลกุลโดยใช้ rDNA พบว่า เป็นเชื้อราในกลุ่มของ *Pestalotiopsis* spp.

มูลนิธิโครงการหลวง
ROYAL PROJECT FOUNDATION

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในพื้นที่ของมูลนิธิโครงการหลวง

1.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงที่เป็นโรค

ทำการสำรวจหาเชื้อราสาเหตุโรคแมลงระหว่าง เดือน กันยายน 2555 – มกราคม 2556 ที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จำนวน 10 สถานี/ศูนย์ ได้แก่ ตีนตก , โป่งน้อย , ห้วยน้ำขุ่น , อ่างขาง , ห้วยโป่ง , แม่ทาเหนือ , พระบาทห้วยต้ม , ปางดะ , ขุนวาง และทุ่งเริง แมลงที่เก็บได้จะใส่ไว้ในกล่องพลาสติกที่รองด้วยกระดาษกรอง และพรมน้ำเล็กน้อยเพื่อให้ความชื้นกับตัวอย่าง นำกลับมาทำการศึกษา และแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 แปลงปลูกผักกาดขาวปลีที่ได้สำรวจพบ เชื้อราสาเหตุโรคแมลง

1.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากแมลงที่ได้ในข้อ 1.1

นำตัวอย่างแมลงที่ได้จากการสำรวจมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย Sodium hypochlorite 5% แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง จากนั้นนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเฉพาะเจาะจง ภายใต้สภาพปลอดเชื้อแล้วจึงนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-7 วัน เมื่อพบเชื้อราเจริญเติบโตในอาหารแล้วจึงทำการแยกเชื้อ โดยใช้วิธี hyphal tip isolation หรือ วิธี single spore isolation เพื่อให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์

นำดินที่ต้องการแยกเชื้อมาจำนวน 10 กรัม ใส่ลงใน flask ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้ดินกระจายตัว 20-30 นาที วางทิ้งไว้สักครู่ แล้วใช้ pipette ดูดมา 10 มิลลิลิตร นำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

90 มิลลิลิตร อีกครั้ง เขย่าให้เข้ากันนาน 1 นาที หลังจากนั้นเจือจางต่อไปแบบเดิมเรื่อยๆ จนถึงระดับความเข้มข้น 10^4 แล้วนำ 1 มิลลิลิตร ของสารแขวนลอยดินที่ได้ไปเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA โดยวิธี spread plate

2. การจัดจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

2.1 การจัดจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ผ่านขั้นตอนการแยกเชื้อบริสุทธิ์ (ข้อ1.2) มาเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสม ถ่ายรูปเมื่อเชื้อมีการสร้างโคโลนีจนเต็มจานอาหารดังกล่าว จากนั้นทำ slide culture โดยใช้ เข็มเขี่ยเขี่ยเส้นใยของเชื้อ นำมาวางบนสไลด์ที่หยด lactophenol แล้วปิดด้วย cover slip จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่กำลังข ยาย 400 เท่า สังเกตและบั นทึกรูปร่างลักษณะของสปอร์และ เส้นใย การจัดจำแนกเชื้อ ราใช้หลักการตาม หนังสือ Plant Pathogenic Fungi (Arx, 1987) และส่งตัวอย่างเชื้อให้กับ ผศ.ดร มาลี ตั้งระเบียบ เพื่อยืนยันผลการจำแนกชนิดต่อไป

2.2 การจัดจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR-based method)

- การเตรียมและสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคแมลงบนจานอาหารที่เหมาะสม เช่น PDA จนกระทั่งเชื้อมีการสร้างโคโลนีจนเต็มจานอาหาร เขี่ยปลายเส้นใยมาเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDB ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 - 9 วัน จากนั้นทำการเก็บเส้นใยเชื้อราในหลอดพลาสติก (Eppendorf tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตดูดของเหลวออกให้หมด เก็บเส้นใยไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซสเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการสกัด DNA

การสกัด DNA ดัดแปลงจากวิธีของ Tigano-Milani *et al.* (1995) นำเส้นใยของเชื้อราไอโซเลทละ 1.5 กรัม บดด้วยโกร่งแช่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) หยด lysis buffer 2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 50 mM Tris/HCl, 100 mM EDTA เมื่อบดละเอียดแล้วเทของเหลวที่ได้ใส่ในหลอดสำหรั บเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 500 ไมโครลิตรต่อหลอด แล้วเติม 10%(w/v)SDS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม 5 M NaCl ปริมาตร 75 ไมโครลิตร และสารละลาย CTAB ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10% (w/v)CTAB ใน 0.7M NaCl เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แยกของเหลวใสที่อยู่ด้านบน ถ่ายลงในหลอดทดลองใหม่ เติม chloroform/isoamylalcohol (24:1 v/v) และตกตะกอนด้วย 2-propanol นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที จากนั้นล้าง pellet ด้วย 70%(v/v) จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ฆ่า

เชื้อแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลาย pellet จนกระทั่งเป็นสารละลาย เติม 1% TAE (Tris/Acetic Acid/EDTA) (Sambrook, *et al.* 1989)

- การตรวจผลโดยเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

นำถาดและหวีสำหรับเตรียมเจล ประกอบเข้าด้วยกัน เตรียม 1.5%Agarose gel โดยละลาย agarose 0.45 กรัม ใน 1X TBE buffer 30 มิลลิลิตร หลอมเจลด้วยไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวจนเจลละลายดี ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส นำมาเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เจล แข็งตัวประมาณ 30 นาที นำเจลดังกล่าววางลงใน electrophoresis chamber หยอดดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบลงหลุม และสารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้นมาตรฐาน (DNA Lamda) ที่ทราบความเข้มข้นที่ระดับ 100, 300, 500 และ1,000 ไมโครลิตร ตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide (10µl ใน 0.5X TBE buffer 100 มิลลิลิตร) เขย่าด้วย shaker เป็นเวลานาน 15 นาทีในที่มืด ล้างด้วยน้ำกลั่น (destain) นาน 30 นาที ตรวจดูแถบ DNA ด้วยเครื่อ ง UV transilluminator ปรับความเข้มข้นของ DNA โดยใช้น้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10 ng/µl เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อราด้วยเทคนิค PCR-based method ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อไป

- การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

ปฏิกิริยา PCR ทำโดยเตรียมหลอดขนาด 0.2 ml ใส่ DNA ตัวอย่าง 2.0 ไมโครลิตร จากนั้นผสมส่วนผสมทั้งหมด (master mix) ประกอบด้วย 1 unit Taq polymerase 0.5 ไมโครลิตร , 10X Taq buffer 1.0 ไมโครลิตร , MgCl2 เข้มข้น 25 mM 1.0 ไมโครลิตร , 1 mM dNTPs 2.0 ไมโครลิตร , primer เข้มข้น 5 µM ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใน eppendorf tube 0.5 มิลลิลิตร ทำให้เข้ากันโดยใช้นิ้วดีดเบา ๆ แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติมส่วนประกอบดังกล่าวปริมาตร 8 ไมโครลิตร ลงในหลอดทำปฏิกิริยาที่เตรียมไว้ จากนั้นนำมาทำ PCR ด้วยเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

1. Pre-denaturation เป็นการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1.30 นาที จำนวน 1 รอบ
2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย
   a. Template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที
   b. Primer annealing เป็นการลดอุณหภูมิลงมาที่ 52 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที เพื่อให้ primer จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ
   c. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ
3. Primer extension เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากจุดที่ primer เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยอาศัยเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase โดยใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 6.30 นาที จำนวน 1 รอบ

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วนำไปตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วนำมาตรวจสอบด้วย ethidium bromide (10 µl ใน 0.5X TBE buffer 100 ml) ตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง UV transilluminator

- การวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์โปรแกรม NTSYSpc. Version 2.1 เพื่อวิเคราะห์ทางพันธุกรรมโดยสร้าง phylogenetic tree

2.3 การเก็บรักษาเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

- การเก็บรักษาเชื้อใน MEA Slant

นำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่บริสุทธิ์มาเขี่ยลงในขวด vial ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA (Malt Extract Peptone Agar) จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเมื่อเชื้อราเจริญเติบโตจึงนำไปเก็บไว้ในตู้เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

- การเก็บรักษาเชื้อในน้ำกลั่น

ทำการเตรียมน้ำกลั่นปริมาณ 2-3 มิลลิลิตร บรรจุไว้ในหลอดแก้วฝาเกลียว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้ นำเชื้อที่ต้องการเก็บรักษาย้ายลงเก็บในน้ำกลั่น โดยใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นเชื้อ (culture disc) เก็บในน้ำกลั่นหลอดละ 2-3 ชิ้น ปิดฝา นำไปเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง

- การเก็บแบบแห้ง Paper culture

ทำการเตรียมอาหาร PDA หลังผ่านการฆ่าเชื้อ เทอาหารลงในจานแก้ววขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร รอจนอาหารแข็ง แต่ผิวหน้าอาหารยังไม่แห้งมากนัก นำกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ววางทับลงบนผิวหน้าอาหาร นำชิ้นเชื้อ 1 ชิ้น วางลงตรงกลางของกระดาษกรอง ปิดฝาจานแก้ว นำไปเก็บไว้ รอจนเชื้อรามีการเจริญเต็มผิวหน้าของกระดาษกรอง ใช้ปากคีบที่ปลอดเชื้อ คีบกระดาษกรองที่มีเชื้อเจริญอยู่เต็มไปวางไว้บน silica gel ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อในภาชนะปิด เมื่อกระดาษแห้งดีแล้วจึงนำมาตัดเป็นชิ้นแยกเก็บในภาชนะปลอดเชื้อที่ปิดสนิท

- การเก็บรักษาเชื้อใน Mineral oil

ทำการเตรียม mineral oil บรรจุไว้ในหลอดแก้วฝาเกลียว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้ นำเชื้อที่ต้องการเก็บรักษาย้ายลงเก็บในน้ำกลั่น โดยใช้เข็มเขี่ยย้ายชิ้นเชื้อ (culture disc) เก็บในน้ำกลั่นหลอดละ 2-3 ชิ้น ปิดฝา นำไปเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง

3 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

3.2 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม เสี้ยนดินในสภาพห้องปฏิบัติการ

ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ทำการเตรียม Inoculum เชื้อราสาเหตุโรคแมลง ในเมล็ดข้าวจ้าว โดยนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ ต้องการทดสอบมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวจ้าวแช่น้ำนาน 30 นาที นำไปกรองเอาน้ำออกแล้ว บรรจุลงในถุงพลาสติกใสจำนวน 200 กรัมต่อถุง ปิดปากถุงด้วยยางรัดและเจาะรูด้านบนถุงด้ วยเข็ม หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ รอจนเย็น จึงใส่ชิ้นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA ถุงละ 5 ชิ้น เขย่าให้ชิ้นเชื้อสัมผัสกับข้าวจ้าวให้ทั่วถุง นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าทุกๆ 3 วัน จากนั้นทำการ ทดสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับเสี้ยนดิน โดยใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลง จำนวน 3 สกุล รวม 10 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อ ราบูเวเรีย จำนวน 4 ไอโซเลท คือ BE001, BE021, BE028 และ BE100, เชื้อราเมทาไรเซียม จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ME094 และเชื้อราเพซิลโลมัยซีส จำนวน 5 ไอโซเลท คือ PA020, PA096, PA097, PA098 และ PA099 คลุกกับดินที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อรา 1 กรัม ต่อ ดิน 10 กรัม ในกล่องขนาด 6×9.7×3.6 เซนติเมตร แล้วนำเสี้ยนดินลงไปปล่อยในกล่อง ทำการวางแผนการทดสองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยเชื้อรา แต่ละไอโซเลทถือว่าเป็น 1 กรรมวิธี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว ส่วนชุดที่นำมาเปรียบเทียบมี 2 ชุด คือ ชุดควบคุม คลุกดินกับเมล็ดข้าวจ้าว (ไม่ใส่เชื้อรา) และคลุกดินกับเชื้อ *Metarhizium anisopliane* ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด (MS) ทำการบันทึกผลการทดลอง โดยบันทึกจำนวนแมลง ตายที่ 3, 5 และ 6 วัน และนำแมลงที่ตายมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อราชนิดเดียวกับที่พ่น หรือไม่ จากนั้นนำมาคำนวณ หาเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนแมลงที่ตาย (เสี้ยนดิน)} \times 100}{\text{จำนวนแมลงทั้งหมดที่ใส่ลงไป}}$$

3.2 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม มอดเจาะผลกาแฟ

3.2.1 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพห้องปฏิบัติการ

การเตรียม Inoculum เชื้อราสาเหตุโรคแมลงนำเชื้อราบูเวเรียที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงบนอาหาร MEA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 14 วัน หลังจากนั้น มาทำการล้างสปอร์เชื้อราด้วยน้ำกลั่นที่ ผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ขูดผิวหน้าของเชื้อรา คำนวณหาความเข้มข้นด้วย hemacytometer ปรับความเข้มข้นของเชื้อราให้ได้ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับมอด เจาะผลกาแฟ โดยใช้ เชื้อราบูเวเรีย จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BE001, BE021,

BE028, BE095 และ BE100 ฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนตัวมอดเจาะผลกาแฟที่อยู่ ในกล่องขนาด 6×9.7×3.6 เซนติเมตร ส่วนชุด ควบคุม พ่นน้ำกลั่นที่ ผสม กับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% นึ่งฆ่าเชื้อ วาง แผนการทดสองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยเชื้อรา แต่ละไอโซเลทถือว่าเป็น 1 กรรมวิธี ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว ทำการ บันทึก เปอร์เซ็นต์การตาย หลังพ่นที่ 3, 4, 5 และ 6 วัน และนำแมลงที่ตายมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อราชนิดเดียวกับที่พ่นหรือไม่

3.2.2 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพแปลงปลูก

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราบูเวเรีย BE100 ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดมอดเจาะผลกาแฟในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยเตรียมเลี้ยงเชื้อราบูเวเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นนำมาเชื้อราบนอาหารมาเลี้ยงในข้าวเจ้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 10 วัน เมื่อเชื้อเจริญเติมถุง มาทำการล้างสปอร์เชื้ อราออกจากข้าว และตรวจนับสปอร์บน haemacytometer ปรับความเข้มข้นที่ 1×10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบ โดยก่อนการทดสอบจะทำการล่อมอดเจาะผลกาแฟมาบริเวณต้นกาแฟที่เราจะทดสอบ โดยใช้กับดักล่อเป็นเวลา 3 วัน และทำการตรวจนับจำนวนมอดเจาะผลกาแฟ จากนั้นจะทำการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราบนเมล็ดกาแฟที่มีมอดเจาะผลเข้าทำลาย และโรยเชื้อราสาเหตุรอบบริเวณโคนต้น แล้วนำถุงตาข่ายครอบต้นกาแฟ เพื่อป้องกันการหนีของมอดเจาะผลกาแฟ (ภาพที่ 2) โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยแต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 ต้น ส่วนชุดที่นำมาเปรียบเทียบ ได้แก่ ชุดควบคุมตามวิธีของเกษตรกรใช้ในการป้องกันกำจัด เป็นตัวเปรียบเทียบ บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายหลังพ่นเป็นเวลา 7 วัน โดยการสุ่มนับ 2 ระดับ ได้แก่ ระดับบน และระดับล่าง โดยมีกรรมวิธี 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธี 1 พ่นเชื้อบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น
กรรมวิธี 2 พ่นเชื้อบูเวเรีย BE100 รอบบริเวณโคนต้น + โรยเชื้อราบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น
กรรมวิธี 3 พ่นเชื้อบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น + โรยเชื้อราเมทาไรเซียมรอบบริเวณโคนต้น
กรรมวิธี 4 วิธีที่เกษตรกรใช้ในการป้องกันกำจัด (Control)

ภาพที่ 2 การทดสอบความสามารถของเชื้อราบูเวเรียกับมอดเจาะผลกาแฟ ; A = แขวนกับดักล่อมอดเป็นเวลา 3 วัน, B = ฉีดพ่น spore suspension ของเชื้อราบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น, C = โรยเชื้อราบูเวเรีย และเมทาไรเซียมบริเวณโคนต้น และ D = คลุมมุ้งต้นกาแฟที่ทดสอบ

3.3 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม แมลงค่อมทองในสภาพห้องปฏิบัติการ

เตรียม Inoculum เชื้อราสาเหตุโรคแมลง โดยนำเชื้อรา บูเวเรีย ที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงบนอาหาร MEA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 14 วัน หลังจากนั้น มาทำการล้างสปอร์เชื้อราด้วยน้ำกลั่นที่ ผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ขูดผิวหน้าของเชื้อรา คำนวณหาความเข้มข้นด้วย hemacytometer ปรับความเข้มข้นของเชื้อราให้ได้ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบความสามารถของ เชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับแมลงค่อมทอง โดยใช้ เชื้อราบูเวเรีย จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ BE001, BE010, BE024, BE028, BE095, BE100, BE145, BE146 และเชื้อราบูเวเรียในรูปของการค้า (BS) ฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนตัวแมลงค่อมที่อยู่ในกล่องขนาด 11×16×5 เซนติเมตร ส่วนชุดควบคุมพ่นน้ำกลั่นที่ผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% นึ่งฆ่าเชื้อ วางแผนการทดสองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยเชื้อรา แต่ละไอโซเลทถือว่าเป็น 1 กรรมวิธี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว บันทึกเปอร์เซ็นต์การตาย หลังพ่นที่ 3, 5, 7 และ 10 วัน และนำแมลงที่ตายมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อราชนิดเดียวกับที่พ่น หรือไม่ จากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายของแมลง

3.4 การทดสอบความสามารถเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับแมลงหวี่ขาวในมะเขือเทศ ในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราบูเวเรีย จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ BE100 และ BE145 ในการยับยั้งแมลงหวี่ขาวในมะเขือเทศ โดยเตรียมเลี้ยงเชื้อราบูเวเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA เป็นเวลา 7-10 วัน มาทำการล้างสปอร์เชื้อราด้วยน้ำกลั่นที่ผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ขูดผิวหน้าของเชื้อรา ตรวจนับสปอร์บน haemacytometer ปรับความเข้มข้นที่ 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบ หลังจากนั้นฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราลงบนตัวอ่อนของแมลงหวี่ขาว โดยกำหนดพื้นที่ขนาด 1 × 1 เซนติเมตร และจำนวนตัวอ่อนของแมลงหวี่ขาวก่อนฉีดพ่นเชื้อรา โดยวางแผนการทดสอบแบบ *Randomized* Complete Block Design (RCBD) โดยแต่ละเชื้อทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 พื้นที่ ส่วนชุดที่นำมาเปรียบเทียบมี 2 ชุด ได้แก่ ชุดควบคุมที่ 1 เชื้อราบูเวเรียที่มีจำหน่ายในท้องตลาด (BS) และชุดควบคุมที่ 2 ใช้น้ำกลั่นที่ผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% นึ่งฆ่าเชื้อ บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายหลังพ่น 3 วัน โดยมีกรรมวิธี 4 กรรมวิธี ดังนี้

3.5 การทดสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับหนอนกระทู้ผักในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดสอบเชื้อราโนมูเรีย จำนวน 3 ไอโซเลท คือ NM141, NM146 และ NM147 โดยเพิ่มปริมาณเชื้อราโนมูเรียเพิ่มปริมาณเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ SMAY นำเชื้อราที่มีอายุ 10-14 วัน มาทำการล้างสปอร์เชื้อราด้วยน้ำกลั่นเลี้ยงเชื้อผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ขูดผิวหน้าของเชื้อรา คำนวณด้วย hemacytometer ปรับความเข้มข้นของเชื้อราให้ได้ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ฉีดพ่นสาร

แขวนลอยลงบนตัวหนอนกระทู้ผักที่อยู่ในกล่องขนาด 12×12×3.6 เซนติเมตร โดยวางแผนการทดสอบแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแต่ละเชื้อทำ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ตัว ส่วนที่นำมาเปรียบเทียบคือ ชุดควบคุม ซึ่งใช้น้ำกลั่นที่ผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% เป็นตัวเปรียบเทียบ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายหลังจากพ่น 3 และ 7 วัน โดยมีกรรมวิธี 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธี 1 พ่น spore suspension NM141

กรรมวิธี 2 พ่น spore suspension NM146

กรรมวิธี 3 พ่น spore suspension NM147

กรรมวิธี 4 พ่นน้ำกลั่นที่ผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% นึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

มูลนิธิโครงการหลวง ROYAL PROJECT FOUNDATION

บทที่ 4

ผลงานวิจัย

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในพื้นที่ของมูลนิธิโครงการหลวง

ผลการสำรวจหาเชื้อราสาเหตุโรคแมลงระหว่าง เดือน กันยายน 2555 – มกราคม 2556 ที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวง จำนวน 10 ศูนย์/สถานี ได้แก่ ตีนตก, ปางดะ (หน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย), ห้วยน้ำขุ่น, อ่างขาง, ห้วยโป่ง, แม่ทาเหนือ, พระบาทห้วยต้ม, ปางดะ, ขุนวาง และทุ่งเริง และการคัดแยกเชื้อราจากดินและจากตัวอย่างแมลงอาศัย (host insect) จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ มอด กาแฟ เพลี้ยหอยสีแดงแคลิฟอร์เนีย แมลงหางหนีบ มวน เพลี้ยจักจั่นสีเขียว จิ้งหรีด เพลี้ยอ่อน ด้วงเต่า แตง หนอนกระทู้และจักจั่น ได้เชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมด 20 ไอโซเลท (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้จากดินและแมลงอาศัย 8 ชนิด ในพืชต่างๆ และนำมาเลี้ยงได้เชื้อราบริสุทธิ์ได้ 20 ไอโซเลท ใน 5 สกุล

รหัส	สถานที่เก็บ	แหล่งที่พบ	ชนิดแมลงอาศัย	ชื่อเชื้อ	วันที่เก็บ
BE001	ศูนย์ฯ ตีนตก	เมล็ดกาแฟ (อาราบิก้า)	มอด	*Beauveria* sp.	28/9/55
BE015	ศูนย์ฯ ตีนตก	เมล็ดกาแฟ (อาราบิก้า)	มอด	*Beauveria* sp.	16/10/55
BE010	ศูนย์ฯ ห้วยโป่ง	ผักกาดขาวปลี	หางหนีบ	*Beauveria* sp.	15/10/55
BE021	ศูนย์ฯ ห้วยโป่ง	ผักกาดขาวปลี	หางหนีบ	*Beauveria* sp.	12/11/55
BE024	ศูนย์ฯ ห้วยโป่ง	ผักกาดขาวปลี	เพลี้ยอ่อน	*Beauveria* sp.	19/11/55
BE028	ศูนย์ฯ ปางดะ	มะเขือเทศ	หนอน	*Beauveria* sp.	18/11/55
BE095	ศูนย์ฯ ขุนวาง	มะเขือเทศ	หนอน	*Beauveria* sp.	21/3/56
BE100	ศูนย์ฯ บังค่า	ในดิน	-	*Beauveria* sp.	20/6/56
BE145	ศูนย์ฯ ตีนตก	กาแฟ	มอด	*Beauveria* sp.	1/12/56
PA012	ศูนย์ฯ แม่ทาเหนือ	แตงกวาญี่ปุ่น	จิ้งหรีด	*Paecilomyces* sp.	16/10/55
PA003	ศูนย์ฯ ห้วยผักไผ่	อะโวคาโด	ด้วง	*Paecilomyces* sp.	11/10/55
PA020	ศูนย์ฯ ขุนวาง	-	จักจั่น	*Paecilomyces* sp.	13/11/55
PA096	ศูนย์ฯ อ่างขาง	ในดิน	-	*Paecilomyces* sp.	21/3/56
PA097	ศูนย์ฯ อ่างขาง	ในดิน	-	*Paecilomyces* sp.	21/3/56
PA098	ศูนย์ฯ อ่างขาง	ในดิน	-	*Paecilomyces* sp.	18/10/56
PA099	ศูนย์ฯ แม่แฮ	ในดิน	-	*Paecilomyces* sp.	14/3/56

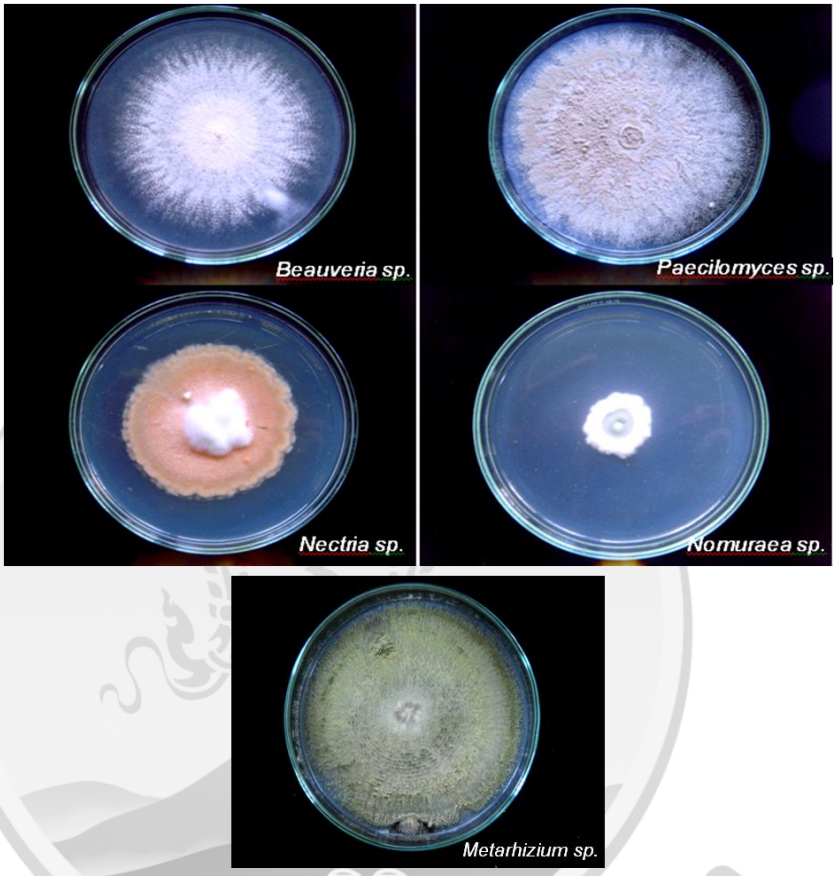
ตารางที่ 1 (ต่อ)

รหัส	สถานที่เก็บ	แหล่งที่พบ	ชนิดแมลงอาศัย	ชื่อเชื้อ	วันที่เก็บ
ME094	ศูนย์ฯ ขุนวาง	ในดิน	-	*Metarhizium* sp.	21/3/56
NM074	ศูนย์ฯ ปางดะ	กันชง	หนอนกระทู้	*Nomuraea* sp.	13/12/55
NM075	ศูนย์ฯ ปางดะ	มะเขือเทศ	หนอนกระทู้	*Nomuraea* sp.	13/12/55
NE009	ศูนย์ฯ อ่างขาง	พืช	เพลี้ยหอย	*Nectria* sp.	24/5/55

ภาพที่ 3 ชนิดแมลงที่พบเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเข้าทำลาย

2. การจัดจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

ผลการจัดจำแนกชนิดของเชื้อได้สาเหตุโรคแมลง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้จำนวน 4 สกุล รวม 16 ไอโซเลท คือ เชื้อรา *Beauveria* sp. จำนวน 6 ไอโซเลท รหัส BE001, BE010, BE015, BE021, BE028 และ BE100, เชื้อรา *Metarhizium sp.* จำนวน 1 ไอโซเลท รหัส ME094, เชื้อรา *Paecilomyces sp.* จำนวน 7 ไอโซเลท รหัส PA003, PA012, PA020, PA096, PA097, PA098 และ PA099 และเชื้อรา *Nomuraea* sp. จำนวน 2 ไอโซเลท รหัส NM074 และ NM075 (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 4) และได้ทำการเก็บเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่จำแนกได้บน PDA Slant ในขวด vial ในตู้เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จำนวน 5 slantต่อเชื้อ เก็บรักษาเชื้อในน้ำกลั่นในสภาพอุณหภูมิห้อง จำนวน 5 slantต่อเชื้อ และเก็บแบบแห้ง Paper culture ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 6-8°C) จำนวน 5 แผ่นต่อเชื้อ

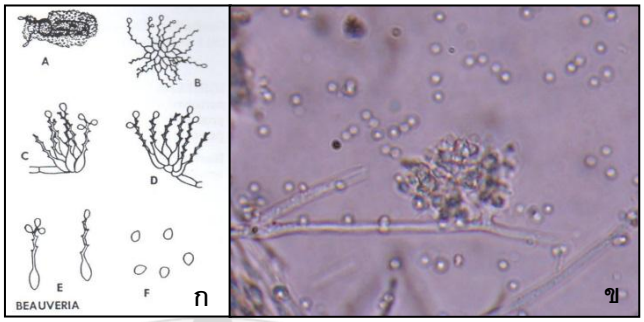


ภาพที่ 4 ลักษณะเชื้อราสาเหตุโรคแมลงชนิดต่างๆ ที่เจริญบน อาหาร Potato dextrose agar (PDA)

เมื่อนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ได้มาจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่

1. *Beauveria* sp.

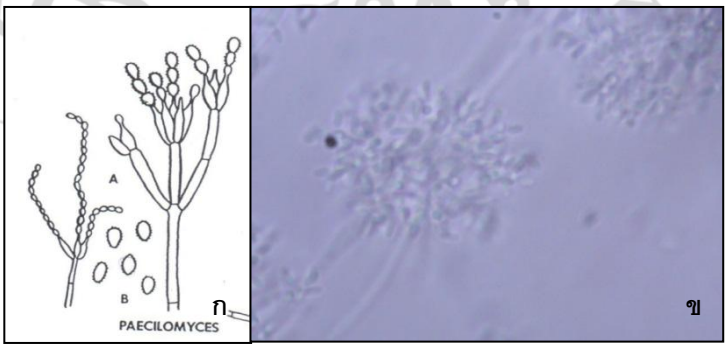
ลักษณะโคโลนีของเชื้อราชนิดนี้ เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีขาวถึงสีครีม เป็นผงคล้ายผงแป้งเมื่อมีอายุมากขึ้น เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยมีผนังกั้น ก้านชูสปอร์ (conidiophore) เป็นแบบเดี่ยวๆ ส่วนฐานขยายออก ปลายเรียวยาวลักษณะ โค้งงอไปมา (zigzag) หลังจากที่มีการสร้างสปอร์ (conidia) แล้ว ก้านชูสปอร์อยู่เป็นกลุ่มแบบเป็นวงแบบก้านร่ม (verticillates) สปอร์มีลักษณะเป็นสปอร์เซลล์เดียว มีสีอ่อน รูปร่างเกือบกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 ไมครอน จากลักษณะดังกล่าวตรงกับลักษณะของเชื้อรา *Beauveria* sp. ซึ่งมีจำนวน 9 ไอโซเลท (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ลักษณะเชื้อรา *Beauveria bassiana*; ก. ด้วงที่ถูกเชื้อ *Beauveria bassiana* เข้าทำลาย (A) กลุ่มของก้านชูสปอร์ (B, C, D) ก้านชูสปอร์ที่มีสปอร์อยู่ที่ปลาย (E) สปอร์ (F) และ ข. รูปร่างลักษณะของเชื้อรา *Beauveria* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

2. *Paecilomyces* sp.

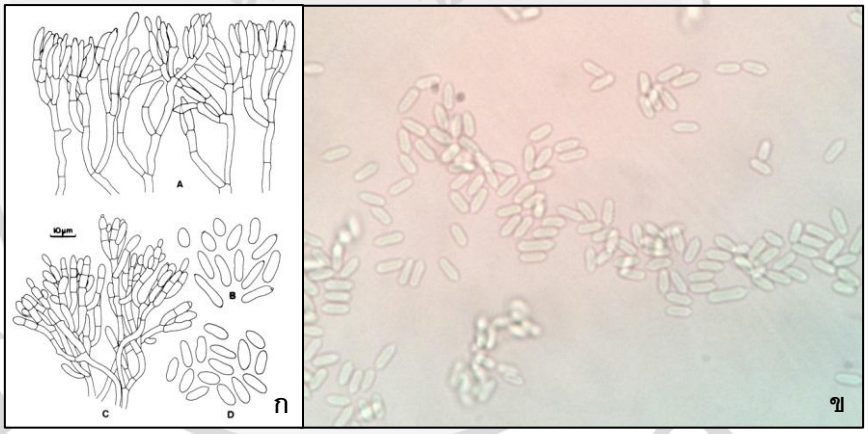
เชื้อราชนิดนี้ เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โคโลนีมีลักษณะเส้นใยเป็นผงและมีปุยคล้ายกำมะหยี่ บางชนิดจะมีสีน้ำตาล อมเหลือง สีน้ำตาลอ่อน (tan) สีเขียวอมเทา สีม่วงหรือสีขาวทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแต่ละสปีชีส์ เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เส้นใยมีผนังกั้น (septate mycelium) ที่ก้านชูสปอร์มี sterigmata หรือ phialides ที่มีลักษณะยาวตรงปลายเรียวแหลมมีสปอร์ (conidia) เกิดขึ้นที่ปลายก้านชูสปอร์ (conidiophore) ลักษณะเป็นท่อ ซึ่งให้กำเนิดสปอร์ (conidia bearing tube) ก้านชูสปอร์มีแขนงลักษณะคล้ายแปรงเช่นเดียวกับ *Penicillium* spp. ตรงปลายของ sterigmata หรือ phialide ซึ่งมีลักษณะยาวและปลายแหลมจะมีสปอร์ รูปร่างเป็นแบบรูปไข่ต่อกันเป็นลูกโซ่ ซึ่งมีลักษณะดังกล่าวตรงกับลักษณะของเชื้อรา *Paecilomyces* sp. จำนวน 7 ไอโซเลท (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ลักษณะเชื้อรา *Paecilomyces* sp; ก. เชื้อรา *Paecilomyces* sp. ก้านชูสปอร์ (A) ภาพขยายก้านชูสปอร์และสปอร์ (B) ข.รูปร่างลักษณะของเชื้อรา *Paecilomyces* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

3. *Metarhizium* sp.

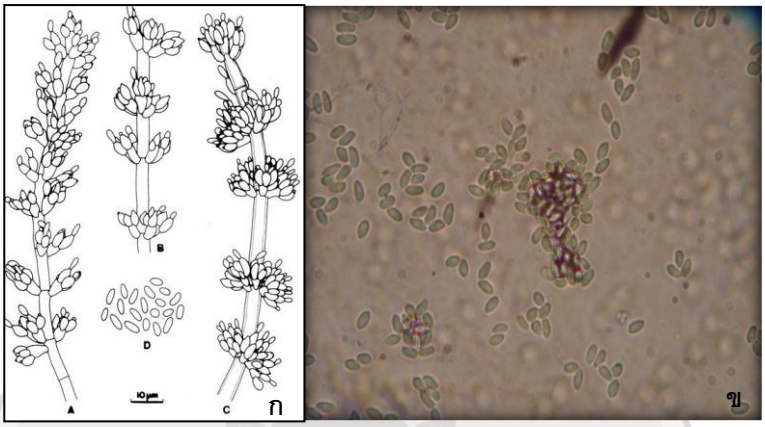
เชื้อราสกุลนี้ เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โคโลนีมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว หลังจากนั้นจะกลายเป็นลักษณะผงสีเขียวเข้มเมื่อมีอายุมากขึ้น เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ ลักษณะเชื้อราเป็นรูปทรงกระบอก เส้นใยมีผนังกั้นเป็นปล้องๆ ไม่มีสี เส้นใยจะแผ่ขยายเจริญเติบโตสร้า งสปอร์ (conidia) เป็นรูปยาวรีคล้ายเมล็ดข้าว เป็นลูกโซ่ต่อกันตรงรอยคอดคอด (conidium) จากการจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าตรงกับลักษณะของเชื้อรา *Metarhizium* sp. จำนวน 1 isolate (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ลักษณะเชื้อรา *Metarhizium* sp.; ก. เชื้อรา *Metarhizium* sp. ก้านชูสปอร์ (A,C) สปอร์ (B,D) ข. รูปร่างลักษณะของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

4. *Nomuraea* sp.

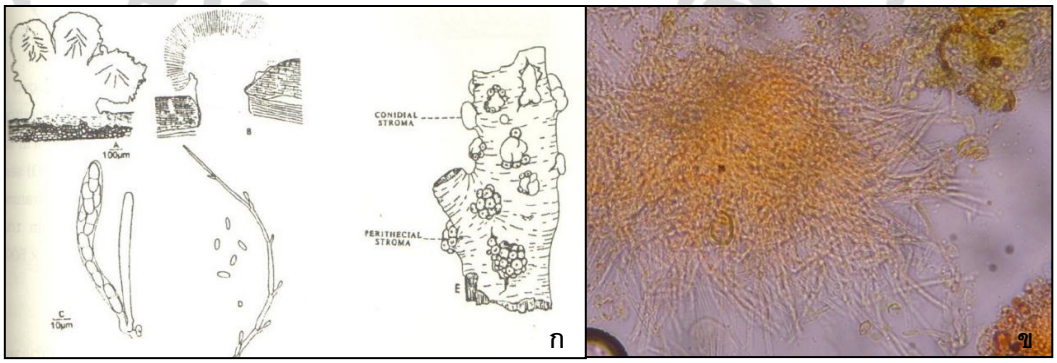
ลักษณะโคโลนีของเชื้อราชนิดนี้ เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เส้นใยมีสีขาว หลังจากนั้นจะกลายเป็นผงสีเขียวเมื่อมีอายุมากขึ้น เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีผนังกั้น ก้านชูสปอร์ (conidiophore) มีแขนงลักษณะคล้ายแปรง เป็นชั้น สปอร์ (conidia) มีสีเขียว จากการจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าตรงกับลักษณะของเชื้อรา *Nomuraea* sp. จำนวน 2 ไอโซเลท (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ลักษณะเชื้อรา *Nomuraea* sp.; ก. เชื้อรา *Nomuraea atypicola* ก้านชูสปอร์ (A, B, C) สปอร์ (D) ข. รูปร่างลักษณะของเชื้อรา *Nomuraea* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

5. *Nectria* sp.

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราชนิดนี้ เมื่อเจริญ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เส้นใยมีสีส้ม เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบลักษณะของ perithicium ที่มีสีสันสดใส ascospore ไม่มีสี และ asexual spore สร้างบน phialides จากการจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าตรงกับลักษณะของเชื้อรา *Nectria* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ลักษณะเชื้อรา *Nectria* sp.; ก. เชื้อรา *Nectria cinnabarina* vertical section ของ perithrcial stroma (A) vertical section ของ conidial stroma (B) ascus และ ascospore (C) conidiophores, phialide และ conidium (D) กิ่งพืชที่ถูกราเข้าทำลาย (E) ข. รูปร่างลักษณะของเชื้อรา *Nectria* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

2.2 การจัดจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR-based method)

หลังจากส่งเชื้อราแมลง 3 ไอโซเลท ได้แก่ ME094, BE100 และ BE145 จัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีการจัดจำแนกทางอณูวิทยา ผลเปรียบเทียบความเหมือนระดับเบสนิวคลีโอไทด์ ไอโซเลท ME094 เหมือนกับเชื้อรา *Matarhizium anisopliae* 100%, ไอโซเลท BE100 และ BE145 เหมือนกับเชื้อรา *Beauveria bassiana* 99%

การเก็บรักษาเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่จำแนกได้

การเก็บรักษาเชื้อใน MEA Slant

1. เตรียม MEA Slant ปริมาณ 2-3 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร สำหรับเก็บเชื้อรา
2. ย้ายเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารที่เตรียมไว้ โดยใช้ เข็มเขี่ยย้าย culture disc วางตรงกลางผิวหน้าอาหารที่ลาดเอียง
3. ปิดฝาหลอดทดลองด้วยฝาเกลียว แล้วใช้แผ่นฟิล์มยืดปิดทับรอยต่อของหลอดทดลองและฝาที่ปิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจากภายนอก
4. วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอเชื้อเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำ MEA Slant เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 10)

ภาพที่ 10 การเก็บรักษาเชื้อบน MEA Slant

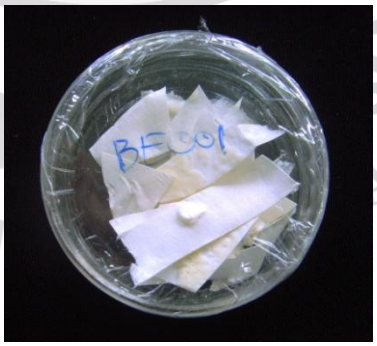
การเก็บรักษาเชื้อในน้ำกลั่น

1. เตรียมน้ำกลั่นปริมาณ 2-3 มิลลิลิตร (หรือใช้ 0.85 % NaCl ในน้ำกลั่น) บรรจุไว้ในหลอดแก้วฝาเกลียว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้
2. นำเชื้อที่ต้องการเก็บรักษาย้ายลงเก็บในน้ำกลั่น โดยใช้เข็มเขี่ยย้าย culture disc ของเชื้อราเก็บในน้ำกลั่นหลอดละ 2-3 ชิ้น ปิดฝา นำไปเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 11)

ภาพที่ 11 การเก็บรักษาเชื้อในน้ำกลั่น

การเก็บแบบแห้ง Paper culture

1. ตรียมอาหาร PDA หลังผ่านการฆ่าเชื้อ เทอาหารลงในจานแก้วขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร รอจนอาหารแข็งแต่ผิวหน้าอาหารยังไม่แห้งมากนัก นำ กระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ววางทับลงบนผิวหน้าอาหาร
2. นำ culture disc 1 ชิ้น วางลงตรงกลางของกระดาษกรอง ปิ ดฝาจานแก้ว นำไปเก็บไว้รอจน เชื้อรามีการเจริญเต็มผิวหน้าของกระดาษกรอง
3. ใช้ปากคีบที่ปลอดเชื้อ คีบกระดาษกรองที่มีเชื้อเจริญอยู่เต็ม ไปวางไว้บน silica gel ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อในภาชนะปิด เมื่อกระดาษแห้งดีแล้วจึงนำมาตัดเป็นชิ้นแยกเก็บในภาชนะปลอดเชื้อที่ปิดสนิท (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 การเก็บแบบแห้ง Paper culture

การเก็บรักษาเชื้อใน Mineral oil

1. เตรียม mineral oil บรรจุไว้ในหลอดแก้วฝาเกลียว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้
2. นำเชื้อที่ต้องการเก็บรักษาย้ายลงเก็บในน้ำกลั่น โดยใช้เข็มเขี่ยย้าย culture disc ของเชื้อราเก็บในน้ำกลั่นหลอดละ 10-20 ชิ้น ปิดฝา นำไปเก็บไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 13)

ภาพที่ 13 การเก็บรักษาเชื้อใน mineral oil

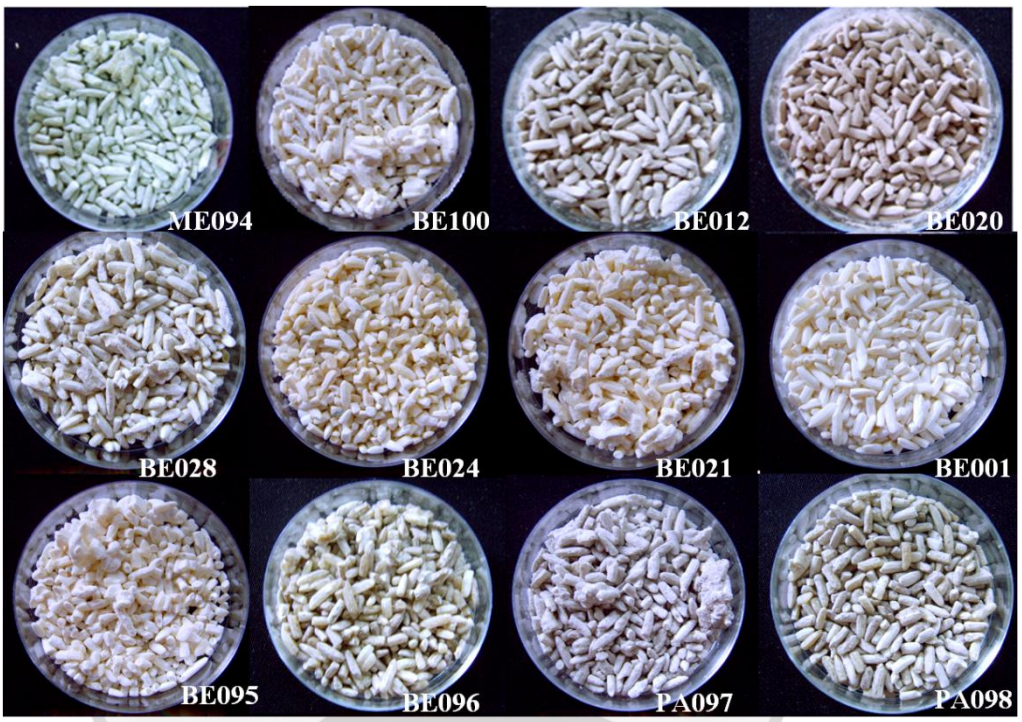
นำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เก็บรักษาไว้มาเพิ่มปริมาณในเมล็ดข้าวจ้าว

นำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ ต้องการทดสอบมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวจ้าวแช่น้ำนาน 30 นาที นำไปกรองเอาน้ำออกแล้ว บรรจุลงในถุงพลาสติกใสจำนวน 200 กรัมต่อถุง ปิดปากถุงด้วยยางรัดและเจาะรูด้านบนถุงด้วยเข็ม หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ รอจนเย็น จึงใส่ชิ้นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA ถุงละ 5 ชิ้น เขย่าให้ชิ้นเชื้อสัมผัสกับข้าวจ้าวให้ทั่วถุง นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าทุกๆ 3 วัน จากการนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เก็บรักษาไว้มาเพิ่มปริมาณในเมล็ดข้าวจ้าว พบว่าเชื้อรา จำนวน 3 สกุล รวม 10 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อ รา *Beauveria* sp. จำนวน 8 ไอโซเลท คือ BE001, BE010, BE021, BE024, BE028, BE095, BE100 และ BE145 เชื้อรา *Metarhizium sp.* จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ME094 และเชื้อรา *Paecilomyces sp.* จำนวน 7 ไอโซเลท คือ PA012, PA003. PA020, PA096, PA097, PA098 และ PA099 สามารถเพิ่มปริมาณในเมล็ดข้าวจ้าวได้ดี (ตารางที่ 2 และภาพที่ 14-15) และนำเชื้อราที่เจริญเต็มถุงไปปั่นละเอียด สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายขึ้น (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 2 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 16 ไอโซเลท ใน 3 สกุล ที่สามารถเจริญได้ดีในเมล็ดข้าวจ้าวหุงสุก

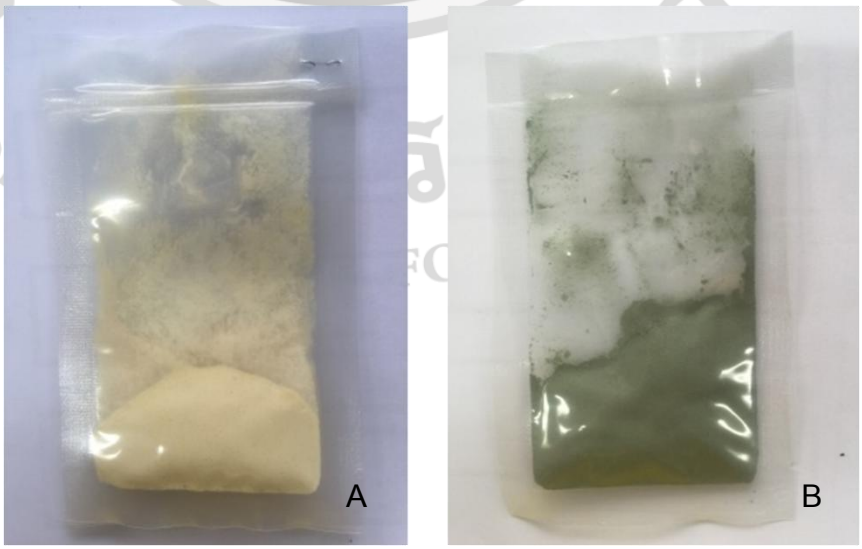
รหัส	สถานที่เก็บ	แหล่งที่พบ	ชนิดแมลงอาศัย	ชื่อเชื้อ
BE001	ศูนย์ฯ ตีนตก	เมล็ดกาแฟ (อาราบิก้า)	มอด	*Beauveria* sp.
BE010	ศูนย์ฯ ห้วยโป่ง	ผักกาดขาวปลี	หางหนีบ	*Beauveria* sp.
BE021	ศูนย์ฯ ห้วยโป่ง	ผักกาดขาวปลี	หางหนีบ	*Beauveria* sp.
BE024	ศูนย์ฯ ห้วยโป่ง	ผักกาดขาวปลี	เพลี้ยอ่อน	*Beauveria* sp.
BE028	ศูนย์ฯ ป่างดะ	มะเขือเทศ	หนอน	*Beauveria* sp.
BE095	ศูนย์ฯ ขุนวาง	มะเขือเทศ	หนอน	*Beauveria* sp.
BE100	ศูนย์ฯ ปังค่า	ในดิน	-	*Beauveria* sp.
BE145	ศูนย์ฯ ตีนตก	กาแฟ	มอด	*Beauveria* sp.
ME094	ศูนย์ฯ ขุนวาง	ในดิน	-	*Metarhizium* sp.
PA012	ศูนย์ฯ แม่ทาเหนือ	แตงกวาญี่ปุ่น	จิ้งหรีด	*Paecilomyces* sp.
PA003	ศูนย์ฯ ห้วยผักไผ่	อะโวคาโด	ด้วง	*Paecilomyces* sp.
PA020	ศูนย์ฯ ขุนวาง	-	จักจั่น	*Paecilomyces* sp.
PA096	ศูนย์ฯ อ่างขาง	ในดิน	-	*Paecilomyces* sp.
PA097	ศูนย์ฯ อ่างขาง	ในดิน	-	*Paecilomyces* sp.
PA098	ศูนย์ฯ อ่างขาง	ในดิน	-	*Paecilomyces* sp.
PA099	ศูนย์ฯ แม่แฮ	ในดิน	-	*Paecilomyces* sp.

ภาพที่ 14 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่สามารถเจริญได้ดีในเมล็ดข้าวจ้าวหุงสุก



ภาพที่ 15 ลักษณะเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่สามารถเจริญได้ดีในเมล็ดข้าวจ้าวหุงสุก

มูลนิธิ



ภาพที่ 16 ลักษณะชีวภัณฑ์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ปั่นละเอียด ในรูปแบบผง ; A= เชื้อราบูเวเรีย และ B= เชื้อราเมทาไรเซียม

3. การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

3.1 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม เสี้ยนดินในสภาพห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบความสามารถของ เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เจริญในเมล็ดข้าวจ้าว พบว่าเชื้อรา จำนวน 3 สกุล รวม 10 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อ รา *Beauveria* sp. จำนวน 4 ไอโซเลท คือ BE001, BE021, BE028 และ BE100, เชื้อรา *Metarhizium sp.* จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ME094 และเชื้อรา *Paecilomyces sp.* จำนวน 5 ไอโซเลท คือ PA020, PA096, PA097, PA098 และ PA099 สามารถเพิ่มปริมาณในเมล็ดข้าวจ้าวได้ดี (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 10 ไอโซเลท ใน 3 สกุล ที่สามารถเจริญได้ดีในเมล็ดข้าวจ้าวหุงสุก

รหัส	สถานที่เก็บ	แหล่งที่เก็บ	ชนิดแมลงอาศัย	ชื่อเชื้อ
BE001	ศูนย์ฯ ตีนตก	เมล็ดกาแฟ (อาราบิก้า)	มอด	*Beauveria* sp.
BE021	ศูนย์ฯ ห้วยโป่ง	ผักกาดขาวปลี	หางหนีบ	*Beauveria* sp.
BE028	ศูนย์ฯ ปางดะ	มะเขือเทศ	หนอน	*Beauveria* sp.
BE100	ศูนย์ฯ ปังค่า	ในดิน	-	*Beauveria* sp.
ME094	ศูนย์ฯ ขุนวาง	ในดิน	-	*Metarhizium* sp.
PA020	ศูนย์ฯ ขุนวาง	-	จักจั่น	*Paecilomyces* sp.
PA096	ศูนย์ฯ อ่างขาง	ในดิน	-	*Paecilomyces* sp.
PA097	ศูนย์ฯ อ่างขาง	ในดิน	-	*Paecilomyces* sp.
PA098	ศูนย์ฯ อ่างขาง	ในดินที่ปลูกต้นพีช	-	*Paecilomyces* sp.
PA099	ศูนย์ฯ แม่แฮ	ในดิน	-	*Paecilomyces* sp.

ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการทำลายเสี้ยนดิน โดยวัดผลจากเปอร์เซ็นต์การตายของเสี้ยนดิน พบว่า ราไอโซเลท ME094 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่ 98.89% ใช้เวลาเพียง 3 วัน แต่ไม่ต่างจาก MS ที่ 95.55% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ชุดควบคุมตาย 2.22% ส่วนราไอโซเลทรองลงมา ได้แก่ PA097 85.55% และBE021 83.33% เมื่อตรวจสอบในวันที่ 5 พบ เสี้ยนดินตาย 100% จากรา 4 ไอโซเลท ได้แก่ ME094, PA020, PA097, PA099 และ MS รองลงมา คือ BE021 และ PA096 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากันคือ 98.89% และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ 4 ไอโซเลท และ MS ที่กล่าวมา ส่วนราไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การตายเป็นอันดับสาม ได้แก่ BE001 และ BE028 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากันคือ 94.44% ในขณะที่ชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การตาย 8.89% เมื่อครบ 6 วัน พบว่าในทุกไอโซเลททำให้เสี้ยนดินมีอัตราการตาย

95.55-100% และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ชุดควบคุมตาย 12.22% (ตารางที่ 4 และภาพที่ 17-18) แต่เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้ว ราไอโซเลท ME094 ให้ผลดีที่สุด เนื่องจากให้ประสิทธิภาพที่รวดเร็ว เพราะใช้เวลาสั้นเพียง 3 วัน อย่างไรก็ดี รา MS (ชีวภัณฑ์การค้า) ก็ให้ประสิทธิภาพสูงเช่นเดียวกัน จากการทดลองจะเห็นว่าราที่ทดสอบทั้ง 3 สกุล รวม 10 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเสี้ยนดินได้ดีทุกไอโซเลท จึงสามารถนำมาใช้ในการควบคุมเสี้ยนดินได้ทั้งหมด แต่ไอโซเลท ME094 ให้ผลเร็ว จึงเหมาะที่จะนำมาใช้มากที่สุด จากเปอร์เซ็นต์การตายของชุดควบคุม สันนิษฐานว่า เสี้ยนดินบางตัวอาจจะอ่อนแอกว่าตัวอื่นๆ

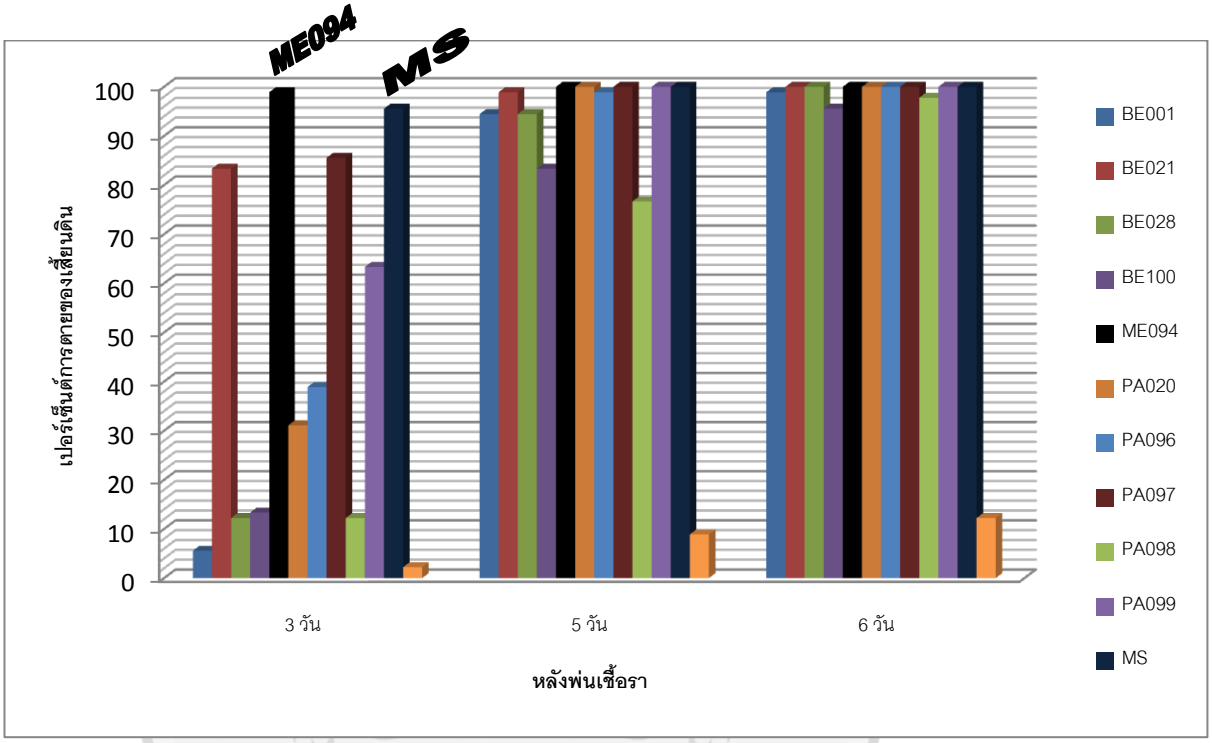
ตารางที่ 4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อราบูเวเรีย 4 ไอโซเลท เมทาไรเซียม 1 ไอโซเลท เพซิโลมัยซีส 5 ไอโซเลท กับชุดควบคุม และกับเชื้อราเมทาไรเซียมที่จำหน่ายในท้องตลาด ในการกำจัดเสี้ยนดิน

ไอโซเลท	% ตายหลังพ่นเชื้อรา[1]		
	3 วัน	5 วัน	6 วัน
BE001	5.55ef	94.44a	98.89a[2]
BE021	83.33ab	98.89a	100a
BE028	12.22ef	94.44a	100a
BE100	13.33def	83.33b	95.55a
ME094	98.89a	100a	100a
PA020	31.11de	100a	100a
PA096	38.88cd	98.89a	100a
PA097	85.55ab	100a	100a
PA098	12.22ef	76.67b	97.77a
PA099	63.33bc	100a	100a
MS*	95.55a	100a	100a
Control	2.22f	8.89c	12.22b
LSD 0.05	26.048	9.9515	6.5529
CV (%)	34.21	6.71	4.23

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

[2] อักษรกำกับที่เหมือนกัน ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบด้วยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

*MS เชื้อราเมทาไรเซียมที่มีจำหน่ายในท้องตลาด



ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การตายของเสี้ยนดินด้วยเชื้อรา 3 สกุล 10 ไอโซเลท เทียบกับชุดควบคุมและที่เป็นการค้า (จากตารางที่ 4)

ภาพที่ 18 เปรียบเทียบการเข้าทำลายเสี้ยนดินของเชื้อราแมลงกับชุดควบคุม; ชุดควบคุม (ก), เชื้อรา *Metarhizium* sp. ไอโซเลท ME094 (ข), เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท MS (ค) และ เชื้อรา *Paecilomyces* sp. ไอโซเลท PA097 (ง)

3.2 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม มอดเจาะผลกาแฟ

3.2.1 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพห้องปฏิบัติการ

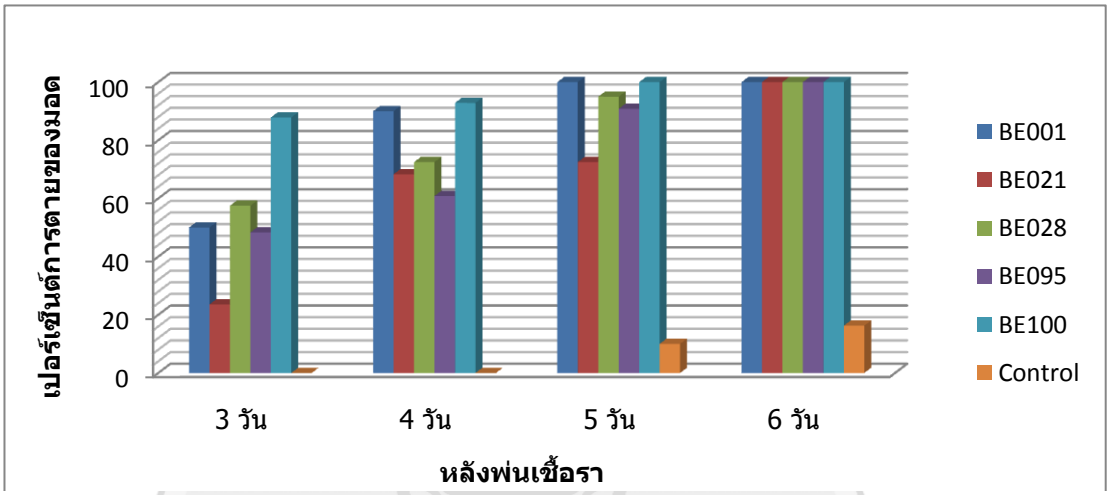
ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ โดยวัดผลจากเปอร์เซ็นต์การตายของมอด พบว่า เชื้อราบูเวเรีย ไอโซเลท BE100 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดถึง 87.85% หลังพ่นเชื้อรา 3 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการตายของมอดเลย ซึ่งมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนรา บูเวเรียไอโซเลท รองลงมา ได้แก่ BE028 ตาย 57.5%, BE001 ตาย 50%, BE095 ตาย 48.33% และ BE021 ตาย 23.57% หลังจากนั้น เมื่อตรวจสอบหลังพ่นเชื้อราที่ 4 วัน พบเปอร์เซ็นต์การตายของมอดเพิ่มขึ้นในทุกไอโซเลท ดังนี้ ราไอโซเลท BE100 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่ 92.85% ส่วนราไอโซเลท รองลงมา ได้แก่ BE001 ตาย 90%, BE028 ตาย 72.5%, BE021 ตาย 68.33% และ BE095 ตาย 60.83% ในขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการตายของมอดเลย และที่หลังพ่นเชื้อรา 5 วัน พบ เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่ 100% ที่ราไอโซเลท BE100 และ BE001 โดยที่ชุดควบคุมตาย 10% ส่วนราไอโซเลท รองลงมา ได้แก่ BE028 ตาย 95%, BE095 ตาย 90.83% และ BE021 ตาย 72.5% เมื่อครบ 6 วัน พบว่าในทุกไอโซเลททำให้มอดมีอัตราการตาย 100% และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ชุดควบคุมตาย 16.25% (ตารางที่ 5 และภาพที่ 19-20) แต่เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้ว ราไอโซเลท BE100 ให้ผลดีที่สุด เนื่องจากให้ประสิทธิภาพที่รวดเร็ว

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของด้วยเชื้อราบูเวเรีย 5 ไอโซเลท และชุดควบคุม ในการกำจัดมอดเจาะเมล็ดกาแฟ

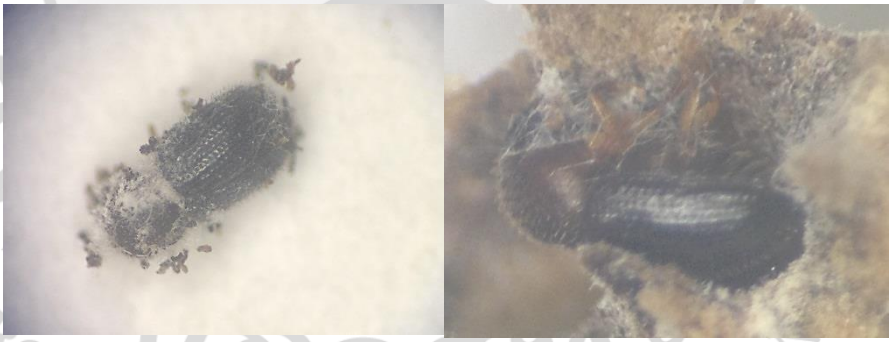
กรรมวิธี	ไอโซเลท	% การตายของมอดเจาะผลกาแฟหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย[1]			
		3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน
1	BE001	50bc	90a	100a	100a[2]
2	BE021	23.57cd	68.33a	72.5a	100a
3	BE028	57.5b	72.5a	95a	100a
4	BE095	48.33bc	60.83a	90.83a	100a
5	BE100	87.85a	92.85a	100a	100a
6	Control	0d	0b	10b	16.25b
LSD 0.05		28.124	33.212	28.523	7.9751
CV (%)		40.97	34.00	24.53	6.30

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

[2] อักษรกำกับที่เหมือนกัน ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบด้วยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์การตายของมอดด้วยเชื้อราบูเวเรีย จำนวน 5 ไอโซเลท เทียบกับชุดควบคุม (จากตารางที่ 5)



ภาพที่ 20 มอดเจาะผลกาแฟที่ถูกเชื้อราบูเวเรียเข้าทำลาย

3.2.2 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพแปลงปลูก

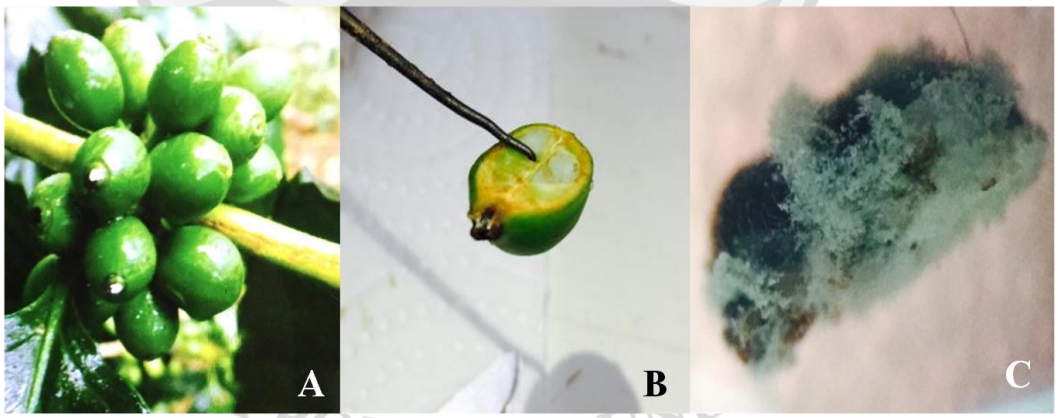
การทดสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการทำลายมอดเกาะผลกาแฟ โดยวัดผลจากเปอร์เซ็นต์การตาย หลังจากพ่นเชื้อราเป็นเวลา 5 วัน พบว่า กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อราบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุดที่ 46.59% รองลงมาคือ กรรมวิธี 2 พ่นเชื้อราบูเวเรีย BE100 รอบบริเวณโคนต้น + โรยเชื้อราบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น ให้เปอร์เซ็นต์การตายที่ 30.93% และกรรมวิธี 3 พ่นเชื้อบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น + โรยเชื้อราเมทาไรเซียมรอบบริเวณโคนต้น ให้เปอร์เซ็นต์การตายที่ 23.61% ส่วนกรรมวิธี 4 วิธีที่เกษตรกรใช้ในการป้องกันกำจัด (Control) ให้เปอร์เซ็นต์การตายที่ 8.6% (ตารางที่ 5 และภาพที่ 21)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การตายของมอดเจาะผลกาแฟด้วยเชื้อราบูเวเรีย ในสภาพแปลง เป็นเวลา 5 วัน

กรรมวิธี	**เปอร์เซ็นต์การตายของมอดเจาะผลกาแฟ**
กรรมวิธี 1 พ่นเชื้อราบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น	46.59 a
กรรมวิธี 2 พ่นเชื้อราบูเวเรีย BE100 รอบบริเวณโคนต้น + โรยเชื้อราบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น	30.93 ab
กรรมวิธี 3 พ่นเชื้อบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น + โรยเชื้อราเมทาไรเซียมรอบบริเวณโคนต้น	23.61 ab
กรรมวิธี 4 วิธีที่เกษตรกรใช้ในการป้องกันกำจัด (Control)	8.60
LSD (P=0.05)	11.06
CV (%)	69.83

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

[2] อักษรกำกับที่เหมือนกัน ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบด้วยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 21 เชื้อราบูเวเรียที่ขึ้นบนมอดเจาะผลกาแฟ; A = เชื้อบูเวเรียขึ้นมอดเจาะผลกาแฟบนเมล็ด, B = ผ่าเมล็ดกาแฟเพื่อดูมอดที่มีบูเวเรียขึ้น และ C = มอดเจาะผลกาแฟที่มีถูกเชื้อบูเวเรียเข้าทำลาย

3.3 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุม แมลงค่อมทองในสภาพห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการควบคุมแมลงค่อม โดยวัดผลจากเปอร์เซ็นต์การตายของมอด พบว่า เชื้อราบูเวเรีย ไอโซเลท BS ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดถึง 13.33% หลังพ่นเชื้อรา 3 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการตายของแมลงค่อมเลย ซึ่งมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนราบูเวเรีย ไอโซเลท รองลงมา ได้แก่ BE145 ตาย 10%, BE100 ตาย 7%, BE001 ตาย 6.67%, BE095

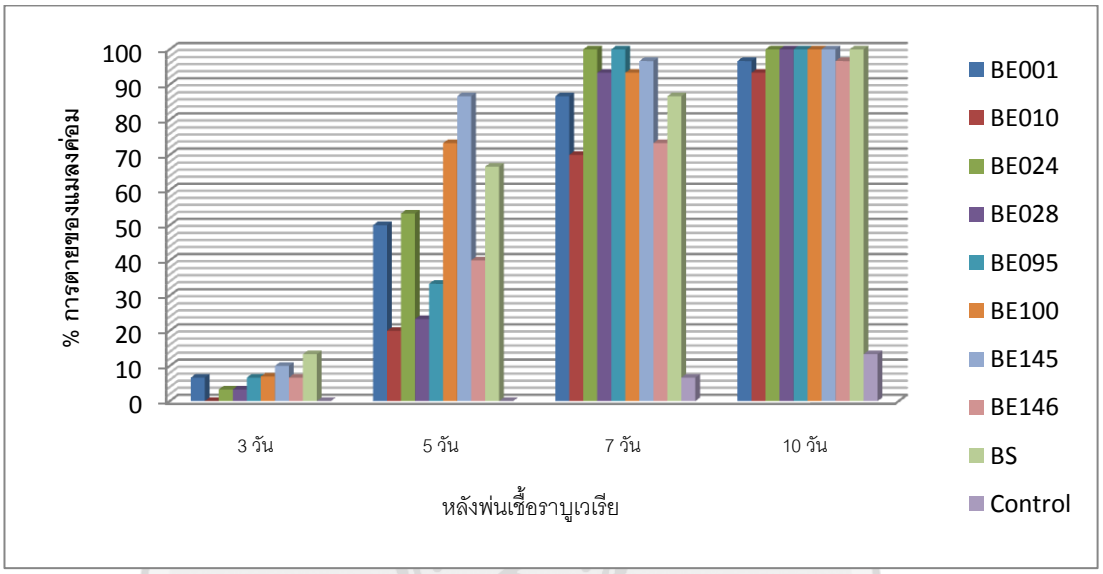
ตาย 6.67%, BE146 ตาย 6.67%, BE024 ตาย 3.33%, BE028 ตาย 3.33% และ BE010 ตาย 0% หลังจากนั้น เมื่อตรวจสอบหลังพ่นเชื้อราที่ 5 วัน พบเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมเพิ่มขึ้นในทุกไอโซเลท ดังนี้ ราไอโซเลท BE145 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่ 86.67 % ส่วนราไอโซเลท รองลงมา ได้แก่ BE100 ตาย 73.33%, BS ตาย 66.67%, BE024 ตาย 53.33%, BE001 ตาย 50%, BE146 ตาย 40%, BE095 ตาย 33.33%, BE028 ตาย 23.33% และBE010 ตาย 20% ในขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการตายของแมลงค่อมเลย และที่หลังพ่นเชื้อรา 7 วัน พบเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่ 100% ที่ราไอโซเลท BE024 และ BE095 โดยที่ชุดควบคุมตาย 6.67% ส่วนราไอโซเลท รองลงมา ได้แก่ BE145 ตาย 96.67%, BE028 ตาย 93.33%, BE100 ตาย 93.33%, BE001 ตาย 86.67%, BS ตาย 86.67%, BE146 ตาย 73.33% และBE010 ตาย 70% เมื่อครบ 10 วัน พบ เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่ 100% จำนวน 6 ไอโซเลท ที่ราไอโซเลท BE024, BE028, BE095, BE100, BE145 และ BS ส่วนราไอโซเลท รองลงมา ได้แก่ BE001 ตาย 96.67%, BE146 ตาย 96.67% และBE010 ตาย 93.33% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ชุดควบคุมตาย 13.33% (ตารางที่ 7 และภาพที่ 22-23) แต่เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้ว ราไอโซเลท BE024 ให้ผลดีที่สุด เนื่องจากให้ประสิทธิภาพที่รวดเร็ว

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมด้วยเชื้อราบูเวเรีย 9 ไอโซเลท กับชุดควบคุม

กรรมวิธี	รหัส	% การตายของแมลงค่อมหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย[1]			
		3 วัน	5 วัน	7 วัน	10 วัน[2]
1	BE001	6.67ab	50.00cd	86.67ab	96.67a
2	BE010	0.00b	20.00ef	70.00b	93.33a
3	BE024	3.33ab	53.33bcd	100.00a	100.00a
4	BE028	3.33ab	23.33e	93.33a	100.00a
5	BE095	6.67ab	33.33de	100.00a	100.00a
6	BE100	7.00ab	73.33ab	93.33a	100.00a
7	BE145	10.00ab	86.67a	96.67a	100.00a
8	BE146	6.67ab	40.00de	73.33b	96.67a
9	BS	13.33a	66.67abc	86.67ab	100.00a
10	Control	0.00b	0.00f	6.67c	13.33b
LSD 0.05		5.3354	10.646	9.4281	3.9441
CV (%)		114.64	29.19	14.31	5.37

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

[2] อักษรกำกับที่เหมือนกัน ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบด้วยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 22 เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมด้วยเชื้อราบูเวเรีย จำนวน 9 ไอโซเลท เทียบกับชุดควบคุม (จากตารางที่ 7)

ภาพที่ 23 แมลงค่อมที่ถูกเชื้อราบูเวเรียเข้าทำลาย

3.4 การทดสอบความสามารถเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับแมลงหวี่ขาวในมะเขือเทศในสภาพห้องปฏิบัติการ

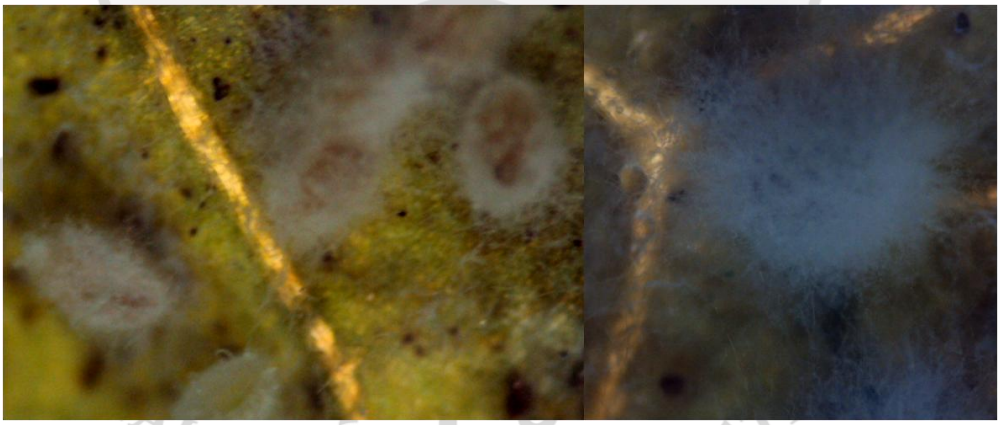
ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการทำลายแมลงหวี่ขาว โดยวัดผลจากเปอร์เซ็นต์การตาย พบว่าเชื้อราบูเวเรีย ไอโซเลท BE100 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุดถึง 77.36% หลังจากพ่นเชื้อรา 3 วัน ในขณะชุดควบคุมพบการตาย 10.37% รองลงมา คือ ราไอโซเลท BS ตาย 59.23% และ BE145 ตาย 46.23% (ตารางที่ 8 และภาพที่ 24) เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้ว เชื้อราไอโซเลท BE100 ให้ผลดีที่สุด

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงหวี่ขาวด้วยเชื้อราบูเวเรีย 3 ไอโซเลท กับชุดควบคุม

กรรมวิธี	% การตายของแมลงหวี่ขาวหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 3 วัน[1]
กรรมวิธี 1 พ่น spore suspension BE100	77.36a[2]
กรรมวิธี 2 พ่น spore suspension BE145	46.67b
กรรมวิธี 3 พ่น spore suspension BS	59.23ab
กรรมวิธี 4 พ่นน้ำกลั่นที่ผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1%	10.37c
LSD 0.05	-
CV (%)	46.16

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

[2] อักษรกำกับที่เหมือนกัน ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบด้วยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 24 ตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวที่ถูกเชื้อราบูเวเรียเข้าทำลาย

3.5 การทดสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับหนอนกระทู้ผักในสภาพห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อราโนมูเรียในการทำลายหนอนกระทู้ผัก โดยวัดผลจากเปอร์เซ็นต์การตาย พบว่า หลังจากพ่นเชื้อราเป็นเวลา 3 วัน (ไม่พบการตายของหนอนกระทู้) เมื่อตรวจสอบเป็นเวลา 7 วัน พบว่า เชื้อราไอโซเลท MN 141 และ NM147 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุดที่ 66.67% ส่วนไอโซเลท NM145 เปอร์เซ็นต์การตายที่ 46.67% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 9 และภาพที่ 25-26) โดยชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การตายที่ 26.67% เนื่องจากติดเชื้อแบคทีเรีย และกินกันเอง (ภาพที่ 27) เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้ว เชื้อราไอโซเลท MN 141 และ NM147 ให้ผลดีที่สุด

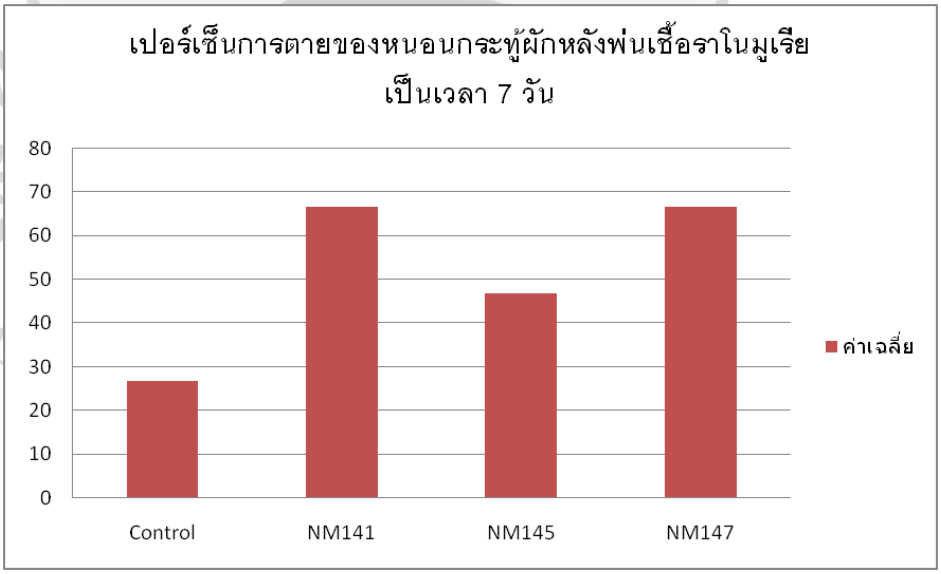
ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักด้วยเชื้อราโนมูเรีย 3 ไอโซเลท กับชุดควบคุม

กรรมวิธี	% การตายของหนอนกระทู้ผักหลังพ่นเชื้อราโนมูเรีย 7 วัน[1]
กรรมวิธี 1 พ่น spore suspension NM141	66.67a[2]
กรรมวิธี 2 พ่น spore suspension NM145	46.67a
กรรมวิธี 3 พ่น spore suspension NM147	66.67a
กรรมวิธี 4 พ่นน้ำกลั่นที่ผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1%	26.67a*
LSD 0.05	23.57
CV (%)	55.87

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

[2] อักษรกำกับที่เหมือนกัน ในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบด้วยวิธี LSD ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

* กรรมวิธี 4 พ่นน้ำกลั่นที่ผสมกับ tween 80 ความเข้มข้น 0.1% มีเปอร์เซ็นต์การตายเนื่องจากติดเชื้อแบคทีเรีย และกินกันเอง



ภาพที่ 25 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักด้วยเชื้อราโนมูเรีย จำนวน 3 ไอโซเลท เทียบกับชุดควบคุม (จากตารางที่ 2)

ภาพที่ 26 ลักษณะหนอนกระทู้ผักที่ถูกเชื้อราโนมูเรียเข้าทำลาย โดยเชื้อราจะมีเส้นใยสีขาวอมเขียวขึ้นปกคลุม

ภาพที่ 27 ลักษณะหนอนกระทู้ผักในชุดควบคุมถูกเชื้อแบคทีเรียเข้าทำลาย โดยตัวนอนจะเปลี่ยนเป็นสีดำและเน่าเละ

บทที่ 5
สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจหาเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในพื้นที่ของมูลนิธิโครงการหลวง จำนวน 10 ศูนย์/สถานี ได้แก่ ตีนตก, ปางดะ (หน่วยวิจัยส้มโป่งน้อย), ห้วยน้ำขุ่น , อ่างขาง , ห้วยโป่ง , แม่ทาเหนือ , พระบาทห้วยต้ม , ปางดะ , ขุนวาง และทุ่งเริง จากตัวอย่าง ดินและจาก แมลงอาศัย (host insect) จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ มอด กาแฟ เพลี้ยหอยสีแดงแคลิฟอร์เนีย แมลงหางหนีบ มวน เพลี้ยจักจั่นสีเขียว จิ้งหรีด เพลี้ยอ่อน ด้วงเต่า แตง หนอนกระทู้และจักจั่น เมื่อนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์และจัดจำแนกสกุลได้เชื้อรา 16 ไอโซเลท ใน 4 สกุล ได้แก่ *Beauveria* sp. 6 ไอโซเลท รหัส BE001, BE010, BE015, BE021, BE028 และ BE100 *Metarhizium* sp. 1 ไอโซเลท รหัส ME094, *Paecilomyces* sp. 7 ไอโซเลท รหัส PA003, PA012, PA020, PA096, PA097, PA098 และ PA099 และ *Nomuraea* sp. 2 ไอโซเลท รหัส NM074 และ NM075 หลังจากทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อราดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อคือเมล็ดข้าวจ้าวหุงสุก พบว่ามีรา 10 ไอโซเลท ใน 3 สกุล ได้แก่ *Beauveria* sp. 4 ไอโซเลท รหัส BE001, BE021, BE028 และ BE100, *Metarhizium* sp. 1 ไอโซเลท รหัส ME094 และ *Paecilomyces* sp. 5 ไอโซเลท รหัส PA020, PA096, PA097, PA098 และ PA099 เจริญเติบโตและสร้างสปอร์ในเมล็ดข้าวจ้าวได้ดี เมื่อนำเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเสี้ยนดิน (*Dorylus orientalis*) ด้วยการนำเชื้อราแต่ละไอโซเลท คลุกกับดิน ผลปรากฏว่า ราไอโซเลท ME094 มีประสิทธิภาพสูงสุด มีเปอร์เซ็นต์การตาย 98.89% ในเวลาเพียง 3 วัน ส่วนไอโซเลท MS ซึ่งมีจำหน่ายในท้องตลาด ให้ผลรองลงมาในระดับที่ใกล้เคียงกัน เมื่อทำการตรวจสอบในวันที่ 5 หลังการทดลอง พบว่า มีรา *Paecilomyces* sp อีก 3 ไอโซเลท ที่ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 100% และมีรา ที่ให้เปอร์เซ็นต์สูงเท่ากันรองลงมาคือ 98.89% ได้แก่ *Beauveria* sp., รา *Paecilomyces sp* อีกอย่างละ 1 ไอโซเลท โดยที่ชุดควบคุมให้เปอร์เซ็นต์การตายที่ 8.89% ในวันที่ 6 พบว่า ทุกไอโซเลทให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 95.55-100% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ชุดควบคุมตาย 12.22% จากการทบทวนเอกสาร ไม่พบรายงานการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสายพันธุ์ *Metarhizium* sp. และ *Paecilomyces* sp. ในการควบคุมเสี้ยนดิน (*Dorylus orientalis*) แต่พบการใช้เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมแมลงในดิน ซึ่งผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ดังเช่นงานวิจัยของ Wright and Cornelius (2012) ได้ศึกษาผลของเชื้อรานี้ต่อการตายและการขับไล่ปลวก (*Coptotermes formosanus*) พบว่า เมื่อพ่นเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ที่ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การตาย 57.5%, 77.5% และ 100% ในระยะเวลา 7, 14, 21 วัน ตามลำดับ แต่ไม่สามารถไล่ปลวกที่อยู่ในทราย , ดินหรือขี้เลื่อยได้ ทั้งนี้คงเป็นเพราะว่าปลวกมีการสร้างรัง จึงทำให้เชื้อราที่ใช้เข้าไปไม่ถึง นอกจากนี้ Masamdu and Simbiken (2000) ได้ศึกษาศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ที่ได้จาก BioCare (Australia) ในการควบคุมด้วงเผือก โดยใช้เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* คลุกกับดินปลูก พบว่ามีความเสียหายน้อยที่สุดที่ 2.79% เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี Chlorpyrifos ซึ่งมีความเสียหายม ากกว่าที่ 17.17% จากรายงานของ Ghayedi and Abdollahi (2013) ได้ศึกษาศักยภาพในการควบคุมทางชีวภาพของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท J2S ที่ได้จาก Boyer-Ahamd ประเทศอิหร่าน นำมาควบคุมไส้เดือนฝอย พบว่า ไอโซเลท J2S มีประสิทธิภาพในการก่อโรคสูงสุด 47.1% ที่ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และน้อยที่สุด 14.9% ที่ความเข้มข้น 10^3 สปอร์ต่อ

มิลลิลิตร จากรายงานของ Kiewnick and Sikora (2003) ซึ่งได้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* สายพันธุ์ 251 ในการควบคุมไส้เดือนฝอย (*Meloidogyne javanica*) ของมะเขือเทศ พบว่า ที่ความเข้มข้น 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใส่ลงไปในพืชก่อนปลูกหนึ่งสัปดาห์ พบว่าสามารถควบคุมไส้เดือนฝอยได้ดีที่สุด และต้องมีการใส่เชื้อในดินอย่างต่อเนื่อง เพื่อที่จะสามารถควบคุมไส้เดือนฝอยในระยะยาวได้ และจากรายงานของ Toledo *et al* (2007) ได้ศึกษาการใช้เชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมแมลงวันผลไม้ พบว่า เชื้อราทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายระยะตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้ ตลอดจนระยะหนอนและระยะดักแด้ซึ่งอยู่ในดินได้ อนึ่ง จากผลงานวิจัยดังกล่าวประกอบกับเชื้ อราที่รวบรวมได้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งให้ประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเสี้ยนดิน จึงมีแผนที่จะทดสอบกับแมลงศัตรูอื่นๆ ต่อไป โดยคาดหวังว่าจะสามารถควบคุมแมลงศัตรูอื่นๆ ได้ดี

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ ด้วยการพ่นเชื้อราบูเวเรีย 5 ไอโซเลท ผลปรากฏว่า ราไอโซเลท BE100 มีประสิทธิภาพสูงสุด มีเปอร์เซ็นต์การตาย 87.85% ในเวลาเพียง 3 วัน เมื่อทำการตรวจสอบในวันที่ 4 พบว่า มีราไอโซเลท BE100 ที่ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 92.85% และมีรา ที่ให้เปอร์เซ็นต์การตายรองลงมาคือ ไอโซเลท BE001 90%, BE028 72.5%, BE021 68.33% และBE095 60.83% โดยที่ชุดควบคุมไม่พบการตายของมอดเลย ในวันที่ 5 พบว่า มีราไอโซเลท BE001 และBE100 ที่ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 100% และมีรา ที่ให้เปอร์เซ็นต์การตายรองลงมาคือ BE028 95%, BE095 90.83% และBE021 72% โดยที่ชุดควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การตาย 10% ในวันที่ 6 พบว่าทุกไอโซเลทให้เปอร์เซ็นต์การตาย 100% ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ โดยที่ชุ ดควบคุมตาย 16.25% จากการทดสอบเชื้อราบูเวเรียไอโซเลท BE100 กำจัดมอดเจาะผลกาแฟในสภาพแปลง หลังจากพ่นเชื้อราเป็นเวลา 5 วัน พ่นเชื้อราบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุดที่ 46.59% รองลงมาคือ พ่นเชื้อราบูเวเรีย BE100 รอบบริเวณโคนต้น + โรยเชื้อราบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น ให้เปอร์เซ็นต์การตายที่ 30.93% และพ่นเชื้อบูเวเรีย BE100 ทั่วทั้งต้น + โรยเชื้อราเมทาไรเซียมรอบบริเวณโคนต้น ให้เปอร์เซ็นต์การตายที่ 23.61% ส่วน วิธีที่เกษตรกรใช้ในการป้องกันกำจัด (Control) ให้เปอร์เซ็นต์การตายที่ 8.6% จากการทบทวนเอกสาร พบรายงานการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสายพันธุ์ *Beauveria bassiana* ในการควบคุม มอดในเมล็ด ซึ่งผลการวิจัยสอดค ล้องกับงานวิจัยนี้ ดังเช่นงานวิจัยของ Pablo *et al* (2007) ได้ศึกษาการปลูกกาแฟแบบผสมผสาน ซึ่งควบคุมมอดเจาะผลเมล็ดกาแฟโดยการใช้เชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อลดการใช้สารเคมีในประเทศโคลัมเบีย พบว่าเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของมอดเจาะผลกาแฟในปี 1998-2007 มีการลดลงอย่างต่อเนื่อง และสายพันธุ์ของ *Beauveria bassiana* ที่ปรับปรุงพันธุ์จาก Bb9001, Bb9119 และ Bb9024 นอกจากนี้ Francisco J Posada-Flórez (2008) ได้ศึกษาการผลิตเชื้อรา *Beauveria bassiana* ในมล็ดข้าวโดยนำไปควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในประเทศโคลัมเบีย พบว่าเชื้อราบูเวเรียที่เลี้ยงในเมล็ดข้าวเมื่อนำไปพ่นมอดเจาะผลกาแฟแล้ว ให้เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายถึง 92.5% Arnulfo *et al* (2008) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่มีอยู่ในสภาพแปลงในการเข้าทำลายมอดเจาะผลกาแฟ พบว่า การเข้าทำลายของเชื้อราบูเวเรียมีการเข้าทำลายมอดเจาะผลกาแฟผันผวนตามฤดูกาล โดยในแปลงปลูกที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 13.5% ในปี 2004 และในแปลงปลูกที่ 1 44% ในปี 2005 ตามลำดับ De La Rosa *et al* (2000) ซึ่งได้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา

Beauveria bassiana และ *Metarhizium anisopliae* ในการเข้าทำลายมอดเจาะผลกาแฟ พบว่า เชื้อราบูเวเรียรหัส Bb25 และเชื้อราเมทาไรเซียมรหัส Ma4 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเข้าทำลายมอดเจาะผลกาแฟ

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงค่อม ด้วยการพ่นเชื้อราบูเวเรีย 9 ไอโซเลท ผลปรากฏว่า ราไอโซเลท BS มีประสิทธิภาพสูงสุด มีเปอร์เซ็นต์การตาย 13.33% ในเวลาเพียง 3 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการตายของแมลงค่อมเลย รองลงมา คือไอโซเลท BE145 10%, BE100 7%, BE001 6.67%, BE095 6.67%, BE146 6.67%, BE024 3.33%, BE028 3.33% และBE010 0% เมื่อทำการตรวจสอบในวันที่ 5 พบว่ามีราไอโซเลท BE145 ที่ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 86.67% และมีราไอโซเลท ที่ให้เปอร์เซ็นต์การตายรองลงมา คือ BE100 73.33%, BS 66.67%, BE024 53.33%, BE001 50%, BE146 40%, BE095 33.33%, BE028 23.33% และBE010 20% ในขณะที่ชุดควบคุมไม่พบการตายของแมลงค่อมเลย ในวันที่ 7 พบเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่ 100% ที่ราไอโซเลท BE024 และ BE095 โดยที่ชุดควบคุมตาย 6.67% ราไอโซเลท ที่ให้เปอร์เซ็นต์การตาย รองลงมาคือ BE145 96.67%, BE028 93.33%, BE100 93.33%, BE001 86.67%, BS 86.67%, BE146 73.33% และBE010 70 เมื่อครบ 10 วัน พบเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่ 100% จำนวน 6 ไอโซเลท คือ BE024, BE028, BE095, BE100, BE145 และBS ส่วนราไอโซเลท ที่ให้เปอร์เซ็นต์การตาย รองลงมาคือ BE001 96.67%, BE146 96.67% และ BE010 93.33% ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ โดยที่ชุดควบคุมตาย 13.33% จากการทบทวนเอกสาร พบรายงานการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสายพันธุ์ *Beauveria bassiana* ในการควบคุมแมลงค่อม ซึ่งผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ดังเช่นงานวิจัยของ วิวัฒน์ และคณะ (2008) ได้ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราขาว *Beuveria bassiana* ในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชเศรษฐกิจ พบว่า เชื้อรา *B. bassiana* ที่แยกได้จากแมลงค่อมทองสามารถเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด เช่น แมลงวันหนามมะพร้าว มอดเจาะเมล็ดกาแฟ และปลวก อนึ่ง จากผลงานวิจัยดังกล่าวประกอบกับเชื้อราที่รวบรวมได้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งให้ประสิทธิภาพสูงในการกำจัดมอดเจาะผลกาแฟและแมลงค่อม จึงมีแผนที่จะทดสอบกับแมลงศัตรูอื่นๆ ต่อไป โดยคาดหวังว่าจะสามารถควบคุมแมลงศัตรูอื่นๆ ได้ดี

จากการทดสอบความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการทำลายแมลงหวี่ขาว ในห้องปฏิบัติการ โดยวัดผลจากเปอร์เซ็นต์การตาย พบว่าเชื้อราบูเวเรีย ไอโซเลท BE100 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุดถึง 77.36% หลังจากพ่นเชื้อรา 3 วัน ในขณะชุดควบคุมพบการตาย 10.37% รองลงมา คือ ราไอโซเลท BS ตาย 59.23% และ BE145 ตาย 46.23% พบรายงานการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสายพันธุ์ *Paecilomyces tenuipes* และ *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมแมลงหวี่ขาวในโรงเรือน ซึ่งผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ดังเช่นงานวิจัยของ สิริญา (2554) ได้ศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสายพันธุ์ไทยจำนวน 5 สกุล 17 ชนิด 29 ไอโซเลท มาทดสอบการเกิดโรคกับแมลงหวี่ขาวโรงเรือน ด้วยวิธีการพ่นสปอร์แขวนลอยที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร บนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวโรงเรือนวัยที่ 2 พบว่า มีเชื้อราเพียง 3 สกุล 6 ชนิด 6 ไอโซเลท ที่สามารถทำให้ตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวโรงเรือนตายได้ โดยมีอัตราการตายระหว่าง 3.85 - 92.44 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *P. tenuipes* ไอโซเลท 6073 สามารถก่อโรคกับตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวโรงเรือน มี อัตราการตายสูงสุดเท่ากับ 92.44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท BCC 4849 มีการตายเท่ากับ 72.67 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อราโนมูเรียในการทำลายหนอนกระทู้ผัก โดยวัดผลจากเปอร์เซ็นต์การตาย พบว่า หลังจากพ่นเชื้อราเป็นเวลา 3 วัน ไม่พบการตายของหนอนกระทู้ เมื่อตรวจสอบเป็นเวลา 7 วัน

พบว่า เชื้อราไอโซเลท MN 141 และ NM147 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุดที่ 66.67% ส่วนไอโซเลท NM145 เปอร์เซ็นต์การตายที่ 46.67% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การตายที่ 26.67% ซึ่งผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ดังเช่นงานวิจัยของ สุภัสสา (2550) ได้ศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคแมลง โดยจากการนำเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผักวัย 2 โดยให้สัมผัสกับเชื้อราโดยตรงในจาน อาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น พบว่ามีเชื้อราเขียว 3 ไอ โซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผัก คือ BCC1858, BCC4849 และ Khon Kaen ซึ่งทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 2 วัน อีกทั้ง ภัทรดนัย และคณะ (2557) ได้ทำการทดสอบเชื้อรา *Nomuraea rileyi* โดยพ่นสารแขวนลอบของเชื้อราที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร บนหนอนกระทู้วัยที่ 3 ผลปรากฏว่าเชื้อรา *N. rileyi* ไอโซเลท CMU-NR4 ที่แยกได้จากตัวอย่างหนอนกระทู้ผักที่สามารถก่อโรค กับหนอนกระทู้ผักได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

มูลนิธิโครงการหลวง
ROYAL PROJECT FOUNDATION

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มงานชีววิธี ส่วนบริหารศัตรูพืช สำนักงานพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร .ไม่ระบุปีที่พิมพ์. การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี (Biological Control). 41 หน้า.ระบบออนไลน์ แหล่งข้อมูล: www.pmc05.doae.go.th/bio%20control.pdf.

พัชรินทร์ ครุฑเมือง. 2011. การพัฒนาการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ในการกำจัดแมลงศัตรูผัก.ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภัทรดนัย ชัยสวัสดิ์ จิราพร กุลสาริน ไสว บูรณพานิชพันธุ์ และสิริญา คัมภิโร . 2557 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Nomuraea และ Metarhizium* สาเหตุโรคแมลง ในการควบคุมหนอนกระทู้ผักของดาวเรือง . วารสารเกษตร 30 (1): 11-19. ระบบออนไลน์ แหล่งข้อมูล: http://web.agri.cmu.ac.th/agjournal/pdf/J00121_C00906.pdf

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้น. จามจุรีโปรดักท์, กรุงเทพฯ. 351 หน้า.

เศรษฐพงศ์ อัศวรัตน์, กฤษณพัฒน์ จิตจักร,ปองสิทธ์ โพธิคุณ, และอรวรรณ ปิยะบุญ.2553.ประสิทธิภาพของสารจากเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในการกำจัดปลวก *Coptotermes curvignathus* ศัตรูในต้นยางพารา.ระบบออนไลน์ แหล่งข้อมูล :www.scisoc.or.th/stt/33/sec_f/paper/stt33_F_F0028.pdf.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา . 2551. เชื้อรากำจัดแมลง. ฝ่ายบริการวิชาการ สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง . 25 หน้า.

สิริญา คัมภิโร, จิราพร กุลสาริน และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง. 2554. ประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการควบคุมแมลงหวี่ขาวโรงเรือน.วารสารเกษตร 27(1):49-57. ระบบออนไลน์ แหล่งข้อมูล: http://www.w3c.org/TR/1999/REC-html

สุภัสสา ประคองสุข. 2550. ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของ *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลทต่างๆ กับหนอนกระทู้ผัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 61 หน้า.

Arx, Von, J.A. 1987. Plant Pathologenic Fungi. J. Cramer. Berlin Stuttgart, Germany. 288 p.

Bielikova, L., Landa, Z., Osborne, L.S., and Curn, V. 2002. Characterization and Identification of Entomopathogenic and Mycoparasitic Fungi Using RAPD-PCR Technique. Plant Protection Science 38(1): 1-12.

Inglis, P.W. and Tigano, M.S. 2006. Identification and Taxonomy of some Entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) Isolates Using rDNA-ITS Sequences. Gene. Mol. Biol 29(1): 132-136.

Kiewnick, S. and R.A. Sikora. 2003. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* (strain 251) for the control of root-knot nematodes. Communications in agricultural and applied biological sciences 68(4):123-128.

Lv, C., Huang, B., Qiao, M., Wei, B., Ding, B. 2011. Entomopathogenic Fungi on *Hemiberlesia pitysophila*. PLoS ONE 6(8): 236-249.

Masamdu, R.T. and N.A. Simbiken. 2000. The potential of *Metarhizium anisopliae* as a biological control agent for taro beetles. In: Guarino, L., Taylor,M. and Osborn, T. (eds) Proceeding of the taro Symposium, Nadi, Fiji. Secretariat of the Pacific Community, PP.102-106.

Powell, W., Machray, C., and Provan, J. 1996. Polymorphism Revealed by Simple Sequence Repeats. Trends in Plant Sci. 1: 215-222.

Safavi, S.A. 2010. Isolation, Identification and Pathogenicity Assessment of a New Isolate of Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* in IRAN. J. Plant Protect. Research 50(2): 158-163.

Saiki, RK., Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230(4732): 1350–1354.

Samaneh, G. and M. Abdollahi. 2013. *Biocontrol potential* of *Metarhizium anisopliae* (*Hypocreales*: *Clavicipitaceae*), *isolated*from *suppressive soils* of *Boyer-Ahmad region*, *Iran*, *against J2s* of *Heterodera avenae*. Journal of Plant Protection 53(2):165.

Tanklay, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., and Bonierbale, M.W. 1989. RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for and Old Science. Biotechnology, 7: 257-264.

Toledo, J., S.E. Campos, S. Flores, P. Liedo, J.F. Barrera, A. Villaseñor, and P. Montoya. (2007) Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. Journal of Economic Entomology 100(2):291-297.

Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Res. 18: 7213-7218.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.

Wright, M.S. and M.L.Cornelius. 2012. Mortality and repellent effects of microbial pathogens on *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). BMC Microbiol. 15(12):291.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, Tl, Hornes, M., Frijters, Al, Pot, J., Peleman, J. Kuiper, M., and Zebeau, M. 1995. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprintings. Nucleic. Acids. Res. 23: 4407-4414.

มูลนิธิ
โครงการหลวง
ROYAL PROJECT FOUNDATION

ภาคผนวก

การเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร Malt Extract Peptone Agar; MEA

1. มอลล์สกัด 40 กรัม
2. เปปโตน 10 กรัม
3. วุ้น 5 กรัม
4. น้ำกลั่น 1 ลิตร

วิธีการ

1. ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA จะชั่งส่วนผสมตามสูตรอาหารข้างต้น

2. นำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ (Autoclave) โดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากหม้อนึ่งความดันอัตโนมัติ ทิ้งไว้ให้อุ่น (หากเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ร้อนจัดจะทำให้มีหยดน้ำเกาะที่บริเวณใต้ฝาจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะทำให้อาหารเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียได้)

4. เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อภายในตู้ปลอดเชื้อ (โดยลนไฟบริเวณปากขวดด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ก่อนการเทอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อที่บริเวณปากขวดอาหาร) ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA เย็นและแข็งตัว

5. ลนไฟเข็มเขี่ยเชื้อ (needle) ที่มีลักษณะปลายงอเป็นรูปตัว L จนปลายเข็มเป็นสีแดง (เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อ) รอให้เข็มเขี่ยเย็น

6. ใช้ปลายเข็มตัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคแมลง เจริญอยู่ (เลี้ยงไว้ไม่เกิน 30 วัน) ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1 x 1 เซนติเมตร ใช้เข็มเขี่ยเกี่ยวชิ้นวุ้นของเส้นใยเชื้อราที่ตัดวางไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ที่เตรียมไว้ โดยวางชิ้นวุ้นของเส้นใยให้อยู่ตรงกึ่งกลางระหว่างจานเลี้ยงเชื้อเลี้ยงเชื้อปิดขอบจานเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟิล์ม (เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย) นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 25+ 2 องศาเซลเซียส นาน 10-15 วัน (ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยโปรแกรม Statistix 8.0 ด้วยการวิเคราะห์แบบ Completely Randomized Design

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การตายของเสี้ยนดินหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 4 ไอโซเลท เมทาไรเซียม 1 ไอโซเลท เพซิโลมัยซีส 5 ไอโซเลท กับชุดควบคุม และกับเชื้อราเมทาไรเซียมที่จำหน่ายในท้องตลาด ได้ 3 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	11	47032.3	4275.66	17.9	0.0000
Error	24	5734.0	238.92		
Total	35	52766.3			
CV%	34.21				

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตายของเสี้ยนดินหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 4 ไอโซเลท เมทาไรเซียม 1 ไอโซเลท เพซิโลมัยซีส 5 ไอโซเลท กับชุดควบคุม และกับเชื้อราเมทาไรเซียมที่จำหน่ายในท้องตลาด ได้ 5 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	11	2234.6	2031.51	58.3	0.0000
Error	24	837.0	34.87		
Total	35	23183.5			
CV%	6.71				

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การตายของเสี้ยนดินหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 4 ไอโซเลท เมทาไรเซียม 1 ไอโซเลท เพซิโลมัยซีส 5 ไอโซเลท กับชุดควบคุม และกับเชื้อราเมทาไรเซียมที่จำหน่ายในท้องตลาด ได้ 6 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	11	20911.0	1901.00	126	0.0000
Error	24	362.9	15.12		
Total	35	21273.9			
CV%	6.71				

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตายของมอดหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 5 ไอโซเลท เป็นเวลา 3 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	5	14815.8	2963.17	8.27	0.0003
Error	18	6451.0	358.39		
Total	23	21266.8			
CV%	40.97				

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การตายของมอดหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 5 ไอโซเลท เป็นเวลา 4 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	5	18027.8	3605.56	7.21	0.0007
Error	18	8996.6	499.81		
Total	23	27024.3			
CV%	34.00				

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การตายของมอดหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 5 ไอโซเลท เป็นเวลา 5 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	5	23628.3	4725.65	12.8	0.0000
Error	18	6635.5	365.64		
Total	23	30263.7			
CV%	24.53				

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การตายของมอดหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 5 ไอโซเลท เป็นเวลา 6 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	5	23628.3	4725.65	12.8	0.0000
Error	18	6635.5	365.64		
Total	23	30263.7			
CV%	6.30				

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 9 ไอโซเลท เป็นเวลา 3 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	9	472.30	52.4778	1.23	0.3323
Error	20	854.00	42.7000		
Total	29	1326.30			
CV%	114.64				

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 9 ไอโซเลท เป็นเวลา 5 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	9	19146.7	2127.41	12.5	0.0000
Error	20	3400.0	170.00		
Total	29	22546.7			
CV%	29.19				

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 9 ไอโซเลท เป็นเวลา 7 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	9	21120.0	2346.67	17.6	0.0000
Error	20	2666.7	133.33		
Total	29	23786.7			
CV%	14.31				

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 9 ไอโซเลท เป็นเวลา 10 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment	9	19733.3	2192.59	94.0	0.0000
Error	20	466.7	23.33		
Total	29	20200.0			
CV%	5.37				

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยโปรแกรม Statistix 8.0 ด้วยการวิเคราะห์แบบ Randomized Complete Block Design

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงมอดหลังพ่นเชื้อราบูเวเรียไอโซเลท BE100 ในแปลงปลูก เป็นเวลา 5 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment002	2	2362.8	1181.41		
Treatment 001	3	4490.4	1496.80	4.08	0.0225
Error	18	6605.5	366.97		
Total	23	13458.7			
CV%	69.83				

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงหวี่ขาวหลังพ่นเชื้อราบูเวเรีย 2ไอโซเลท เป็นเวลา 3 วัน

Source	DF	SS	MS	F	P
Treatment002	2	2570.9	1285.46		
Treatment 001	3	21505.9	7168.62	14.36	0.0000
Error	30	14979.4	499.31		
Total	35				
CV%	46.16				

มูลนิธิโครงการหลวง
ROYAL PROJECT FOUNDATION