



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาดัชนีภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

Metarhizium anisopliae โดยวิธีการอนุพัณศาสตร์

โดย

ดร. พิชรินทร์ ดร.ทมี้อง

เมษายน 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาศักยภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

Metarhizium anisopliae โดยวิธีทางอนุพันธุศาสตร์

พัชรินทร์ ครุฑเมือง

ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนวิจัยหลังปริญญาเอก ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เพื่อพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนการวิจัยในลักษณะองค์ความรู้พื้นฐานและขอขอบคุณโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนเครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ทางด้าน molecular biology สำหรับใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ. ดร. จริยา วิสิทธิ์พานิช ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย และเอื้อเพื่ออุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการทดลอง ทำให้งานทดลองลุล่วงไปได้ด้วยดี

พัชรินทร์ ครูทเมือง

รหัสโครงการ: MRG5080071

ชื่อโครงการ: การศึกษาศักยภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* โดยวิธี ทางอนุพันธุศาสตร์

ชื่อนักวิจัย: พชรินทร์ ครุฑเมือง

สถาบัน: ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail address: p-charin@chiangmai.ac.th

บทคัดย่อ

จากการนำเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผักวัย 2 โดยให้สัมผัสกับเชื้อราโดยตรงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น พบว่ามีเชื้อราเขียว 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผัก คือ BCC1858, BCC4849 และ Khon Kaen ซึ่งทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 100 เปอร์เซ็นต์ภายใน 2 วัน การศึกษาสรีรวิทยาของ *M. anisopliae* โดยนำไปทดสอบกับอาหารชนิดต่างๆ 8 ชนิด พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mungbean agar (MU) สามารถส่งเสริมเส้นใยและสปอร์ได้ดีที่สุด อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส ในช่วงแสง 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมงสามารถสร้างสปอร์สีเขียวมากกว่าการทดลองอื่น

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว 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 สปอร์/มล. ทำให้หนอนกระทู้ผักวัย 3 มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด คือ 79.49 % ภายใน 7 วัน

Project Code: MRG5080071

Project Title: Molecular analysis of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*.

Investigator: Dr. Patcharin Krutmuang

Department of Entomology, Faculty of Agriculture,

Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

E-mail address: p-charin@chiangmai.ac.th

Abstract

Ten isolates of green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae* were used to test for pathogenicity on second instar of common cutworm, *Spodoptera litura* under the laboratory conditions. The tested larvae were placed in Petri dishes containing green muscardine fungus and they were allowed to make a direct contact with the particular entomogenous fungus. It was revealed that 3 isolates of green muscardine fungus, BCC1858, BCC4849 and Khon Kaen were effectively killed 100% of the cutworm larvae within 2 days. Subsequently, *M. anisopliae* isolates were brought to examine with 8 different media for physiological properties. The result showed that mungbean agar (MU) was the best for mycelial growth and sporulation. Moreover, the optimum temperature for growth was ranged around 30-35 °C. When the isolates were kept in the room with 12 hours light alternated with 12 hours dark, they were produced more green spores than the other. [The best conditions for sporulation were observed when the isolates were kept at 30-35 °C with 12 hours light alternated with 12 hours dark.]

When the 3 most effective isolates were tested with the 1st, 2nd and 3rd instars of cutworm at 4 concentration levels included of 10⁷, 10⁸, 10⁹ and 10¹⁰ spores/ml. The result indicated that the isolate 4849 with the concentration of 6x10⁸ spores/ml was the most effective one. It was observed to cease the 3rd instar of cutworm by 79.49 % within 7 days.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ ภาษาไทย/ อังกฤษ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญเรื่อง	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
1 บทนำ	1
2 การตรวจเอกสาร	3
3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	8
4 ผลการทดลอง	16
5 วิเคราะห์ผลการทดลอง	36
เอกสารอ้างอิง	39
Output จากโครงการ	45

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การศึกษาความปลอดภัยของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> กับสัตว์ชนิดต่างๆ	10
2	แหล่งที่มาของเชื้อราเขียวสายพันธุ์ต่างๆ	18
3	ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions การเจริญของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> 3 ไอโซเลท บนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน	17
4	การเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> จำนวน 3 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ กัน โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เมื่ออายุ 15 วัน	18
5	ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions การเจริญของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> 3 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน	22
6	การเจริญของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> จำนวน 3 ไอโซเลท ที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน	23
7	ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions การเจริญของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> 3 ไอโซเลท ที่สภาพแสงแตกต่างกัน 3 แบบ หลังการทดสอบ 15 วัน	25
8	การเจริญของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> จำนวน 3 ไอโซเลท ที่สภาพแสงแตกต่างกัน 3 แบบ บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน	26
9	ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions เชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> 3 ไอโซเลท , ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ และ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัยที่ 1, 2 และ 3 หลังทดสอบ 7 วัน	28
10	แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 หลังฉีดพ่นเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลท BCC 4849 ที่ 3, 5 และ 7 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ	29

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลุ่มหนอนกระทู้ผักบนใบคะน้า	10
2	การเลี้ยงหนอนกระทู้ผักในห้องปฏิบัติการ	10
3	กล่องดักแด้ เปิดฝาไว้ในกรงที่มีหญ้าม้าเลเซีย เพื่อเป็นที่วางไข่ ในระยะที่เจริญเป็นผีเสื้อ	10
4	ผีเสื้อหนอนกระทู้ผัก ตัวเมีย (ขวา) ตัวผู้ (ซ้าย)	10
5	กลุ่มไข่หนอนกระทู้ผักบนหญ้าม้าเลเซีย	11
6	หนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 ตามลำดับ	11
7	สไลด์นับสปอร์ (Haemocytometer)	12
8	Plate ที่มีหนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 ถูกพ่นด้วยเชื้อราเขียว ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ	13
9	ลักษณะสปอร์ของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> (1000X) 3 ไอโซเลท	16
10	การเจริญของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> 3 ไอโซเลท บนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน	18
11	ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลท BCC4849 ที่เจริญบนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน	19
12	ลักษณะโคโลนีเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลท BCC1858 ที่เจริญบนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน	20
13	ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลท Khon Kaen ที่เจริญบนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน	21
14	การเจริญของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> จำนวน 3 ไอโซเลท คือ เชื้อ BCC4849, BCC1858 และเชื้อ Khon Kaen (ที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35)	24

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	การเจริญของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> จำนวน 3 ไอโซเลท คือ เชื้อ BCC4849, BCC1858 และเชื้อ Khon Kaen (แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง แสง 24 ชั่วโมง และ มืด 24 ชั่วโมง) บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน	27
16	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก วัชที่ 1, 2 และ 3	30
17	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก (ปฏิกริยาร่วมระหว่างไอโซเลทเชื้อราเขียว กับระดับความเข้มข้น 4 ระดับ)	30
18	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัชที่ 1, 2 และ 3 ของเชื้อราเขียว <i>M. anisopliae</i> ไอโซเลท BCC 4849 (ที่เกิดปฏิกริยาร่วมระหว่างระดับความเข้มข้น 4 ระดับกับหนอนกระทู้ผักวัชที่ 1, 2 และ 3)	32
19	หลังฉีดพ่นเชื้อราเขียว 7 วัน หนอนที่ตายมีเส้นใยสีขาว (mycelium) ปกคลุม (A) และ หลังฉีดพ่นเชื้อราเขียว 14-15 วัน หนอนที่ตายมีสปอร์สีเขียว (B)	33
20	ตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ของ <i>M. anisopliae</i> ด้วยไพรเมอร์ 8 คู่	34
21	ตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ของ <i>M. anisopliae</i> ด้วยไพรเมอร์ 5 คู่	35

บทที่ 1

บทนำ

ผักตระกูลกะหล่ำ เป็นพืชผักอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อชีวิตมนุษย์ เป็นแหล่งอาหารเยื่อใยหรือเซลลูโลส และวิตามินต่าง ๆ อีกทั้งเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย พืชผักตระกูลกะหล่ำ ได้แก่ กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวปลี คะน้า กวางตุ้ง ผักกาดหัว และ บรอกโคลี เป็นต้น (วินัย, 2535) ปัญหาในการปลูกพืชตระกูลกะหล่ำ คือ มีแมลงศัตรูหลายชนิดเข้าทำลาย โดยเฉพาะ หนอนกระทู้ผัก ตัวหนอนเริ่มทำลายพืชตั้งแต่ฟักออกมาจากไข่ใหม่ ๆ โดยอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ในระยะแรกๆ ในระยะต่อมาจะเริ่มทำลายยอดอย่างรุนแรงมาก สามารถกัดกินใบ ก้าน ดอก ผัก ได้ทุกส่วนทำความเสียหายให้กับพืชผักมาก เนื่องจากเป็นหนอนที่มีขนาดใหญ่และแพร่ระบาดได้รวดเร็วตลอดทั้งปี จึงมีการใช้สารเคมีกันอย่างมากในการกำจัดแมลงในผักตระกูลกะหล่ำ (มูลนิธิโครงการหลวง, 2548)

เชื้อ *Metarhizium anisopliae* เป็นเชื้อราเขียวที่ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ซึ่งประสบความสำเร็จอย่างกว้างขวางทั่วโลก (มลิวัลย์, 2523; Rombach *et al.*, 1986; Samuels *et al.*, 1989; Zimmermann, 1992) ในต่างประเทศ เช่น บราซิลได้นำมาใช้ในเชิงพาณิชย์ภายใต้ชื่อการค้า *Metaquino* ใช้สำหรับควบคุมเพลี้ยกระโดดสีดํา ในไร่อ้อย (Moscardi, 1989) ในประเทศไทยได้มีการนำเข้ามาจำหน่ายเป็นเชื้อราเขียวสำเร็จรูป มีชื่อการค้าว่า เมทาซาน อย่างไรก็ตามยังมีเชื้อราเขียวหลายสายพันธุ์ที่เป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นในประเทศไทยที่คาดว่าสามารถนำมาใช้ป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผักได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของ *M. anisopliae* ไอโซเลทต่างๆ กับหนอนกระทู้ผัก เพื่อให้ได้เชื้อราเขียวสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก

ปัจจุบันผู้บริโภคคำนึงถึงสุขภาพมากขึ้น และได้ตระหนักถึงพิษภัยจากอาหาร โดยเฉพาะสารเคมีจากการเกษตร ที่ตกค้างอยู่ในผลผลิตทางการเกษตร แต่ละปีประเทศไทยมีการใช้สารเคมีในภาคการเกษตรเป็นจำนวนมาก ซึ่งสารเคมีเหล่านี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ คิดเป็นมูลค่านับหมื่นล้านบาทต่อปี และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ในปี 2546 มีข้อมูลการนำเข้าสารเคมีกำจัดวัชพืชและศัตรูพืช จำนวน 50,331 ตัน คิดเป็นมูลค่า 11,380 ล้านบาท ทำให้ประเทศสูญเสียเงินตราอย่างมหาศาล ปัญหาการใช้สารเคมีในภาคการเกษตร เพื่อกำจัดศัตรูพืช นอกจากจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคแล้ว ยังมีผลต่อการดื้อยาของแมลง ทำให้ต้องใช้สารที่ออกฤทธิ์แรงมากขึ้น ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพของตัวเกษตรกรเอง และสารเคมีเหล่านี้ยังตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม เป็นการสร้างปัญหาวางกว้างต่อบุคคลทั่วไปในสังคม รัฐบาลได้ตระหนักถึงปัญหานี้เป็นอย่างดี และเริ่มวางมาตรการต่างๆ เพื่อลดการใช้สารเคมีในภาคการเกษตร ดังเช่นกำหนดให้ปี 2547 เป็นปีแห่งความปลอดภัยด้านอาหาร มีการรณรงค์ให้ใช้ปุ๋ย

อินทรีและสารต่อต้านศัตรูพืชชีวภาพอย่างแพร่หลาย และประกาศให้การผลิตแบบเกษตรอินทรีย์ เป็นวาระแห่งชาติตั้งแต่ปลายปี 2547 ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงตอบสนองนโยบายของรัฐบาลโดยศึกษาหาทางเลือกใหม่ให้เกษตรกรไทย ได้ผลิตอาหารที่ปลอดภัยต่อสังคมและสภาพแวดล้อมโดยนำเอาทรัพยากรที่มีอยู่ในประเทศ ออกมาใช้ประโยชน์

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาหาเชื้อราเขียว *M. anisopliae* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก
2. เพื่อศึกษาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (DNA marker) ที่มีความจำเพาะต่อ *M. anisopliae* แต่ละสายพันธุ์
3. เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรใช้เชื้อราธรรมชาติทดแทนการใช้สารเคมี

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

แมลงศัตรูพืช เป็นปัญหาที่สำคัญต่อการผลิตผักของประเทศ โดยเฉพาะหน่อเนื้อมะเขี๋ย้ หน่อเนื้อมะเขี๋ย้ที่เข้าทำลายผักตั้งแต่เริ่มพักจากไข่ โดยตัวหน่อเนื้อมะเขี๋ย้จะกัดกินใบ และระยะต่อมาจะเริ่มทำลายรุนแรงขึ้น สามารถกัดกินได้ทุกส่วนของต้น เช่น ใบ ก้าน ดอก สร้างความเสียหายต่อผลผลิตพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น มะเขี๋ย้ กวางตุ้ง กระหล่ำปลี ผักกาดขาว รวมถึงไม้ดอกไม้ประดับ และพืชไร่ เช่น ข้าวโพด ยาสูบ ถั่ว เนื่องจากหน่อเนื้อมะเขี๋ย้มีพืชอาหารหลากหลายชนิดทำให้ขยายพันธุ์ได้เกือบตลอดทั้งปี และพบการระบาดทุกปี ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาการติดต่อสารปราบแมลง จึงทำให้การใช้สารปราบแมลงศัตรูพืชชนิดเดิมไม่ได้ผล ทำให้เกษตรกรต้องใช้สารฆ่าแมลงในปริมาณมากขึ้น ซึ่งปัญหาต่าง ๆ ก็เกิดตามขึ้นมา เพราะสารเคมีไม่เพียงแต่ทำลายหรือกำจัดแมลงศัตรูพืชเท่านั้น ยังทำลายแมลงที่มีประโยชน์และก่อให้เกิดปัญหาพิษตกค้างบน ต้นพืช ในดิน ในน้ำ และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังเป็นอันตรายถึงชีวิตต่อคนและสัตว์เลี้ยง และทำให้ต้นทุนการผลิตสูง เนื่องจากสารฆ่าแมลงมีราคาแพง ดังนั้นจึงได้มีการคิดถึงการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีอื่นที่ให้ผลดีมีประสิทธิภาพ ปลอดภัย และประหยัด ใช้ได้อย่างถาวรในระยะยาว (กรมวิชาการเกษตร, 2539)

แนวทางที่จะช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้อย่างยั่งยืน และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และตัวเกษตรกร รวมถึงรักษาสภาพแวดล้อม มีผู้ทำการศึกษามากกว่า 100 ปี คือการใช้วิธีการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี (Biological control) อาทิเช่น การใช้แมลงตัวห้ำตัวเบียน การใช้สารสกัดธรรมชาติควบคุมแมลงศัตรูพืช และการใช้เชื้อจุลินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูพืช

ในปี 1879 Metchnikoff ชาวรัสเซียพบโรคราเขียว (green muscardine fungus) เกิดจากเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ทำให้เกิดโรคกับแมลงศัตรูข้าวสาลี (Wheat cockchafer) ในปีต่อมาเขาสามารถผลิตเชื้อรานี้ได้บนอาหารเทียมและนำไปควบคุมแมลงศัตรูข้าวสาลี ในปี 1886 ต่อมา เชื้อ *Metarhizium* sp. เป็นเชื้อราเขียวที่ได้รับความสนใจในการนำมาใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ซึ่งประสบความสำเร็จอย่างกว้างขวาง (มลิวัลย์, 2523; Zimmermann, 1992) และมีการรายงาน ว่าเชื้อราเขียว *M. anisopliae* สามารถมีชีวิตอยู่ในดินได้นานกว่า 3 ปี (Milner et al, 2003) สำหรับในประเทศไทย ได้มีการนำไปควบคุมด้วงแรดมะพร้าว (*Oryctes rhinoceros*) ตลอดจนมีการส่งเสริมให้มีการใช้และให้มีการผลิตขึ้นอย่างแพร่หลายมานานแล้ว (มลิวัลย์, 2523; มลิวัลย์ และสุรพล, 2526) หลังจากนั้นได้มีการศึกษาเชื้อรา *M. anisopliae* เพิ่มมากขึ้นทั้งในด้านการกำจัดแมลงในบ้านเรือน เช่น ปลวก (Krutmuang, 1996) ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ โดยการนำของ วิวัฒน์และคณะ (2548) ได้ทำการสำรวจและวิจัยเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ซึ่งเป็นศัตรูธรรมชาติของหน่อเนื้อมะเขี๋ย้และลำต้นอ้อย *Dorystenes*

buqueti Guerin (Coleoptera: Cerambycidae) ซึ่งเชื่อดังกล่าวสามารถเข้าทำลายด้วงได้ทุกระยะ ตั้งแต่ระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัย และสามารถลงทำลายหนอนได้ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ งานวิจัยดังกล่าวได้ประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดีและได้ถ่ายทอดเทคโนโลยีดังกล่าวสู่เกษตรกรผู้ปลูก อ้อยแล้ว จัดว่าการใช้เชื้อราเขียวควบคุมแมลงเป็นวิธีการทางชีววิธีที่มีประสิทธิภาพ

การนำเชื้อรามาใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

ในต่างประเทศนั้นมีการศึกษาเชื้อราชนิดนี้มาเป็นเวลานานมากกว่า 70 ปี โดย ทำการศึกษาถึงศักยภาพในการป้องกันแมลงศัตรูพืช (Hashim *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 1999, 2001) เช่น แมลงที่เข้าทำลายต้นหญ้าในสนามกอล์ฟ พบว่าเมื่อมีการใช้เชื้อ *M. anisopliae* 2 ไอโซเลท ร่วมกันคือ ไอโซเลท CLO53 และ CLO54 จะทำให้แมลงตายได้มากถึง 90 % แต่ถ้าใช้เพียงไอโซเลทเดียวจะตายเพียง 10-62 % (Ansari *et al.*, 2004)

Scholte *et al.* (2004) ได้ทำการทดลองใช้เชื้อ *M. anisopliae* กับตัวอ่อนยุงวัยที่ 3 ผลปรากฏว่าหลังจากที่แมลงได้รับเชื้อ 48-72 ชั่วโมง ตัวอ่อนยุงวัยที่ 3 จะเริ่มตาย

Kao and Tsai (1989) ได้ทำการทดลองใช้เชื้อ *M. anisopliae* ร่วมกับ *B. bassiana* ซึ่งสามารถควบคุมหนอนกระทู้หอมได้ดีกว่าการใช้สารฆ่าแมลงบางชนิด

Silva *et al.* (2003) รายงานว่า *M. anisopliae* ความเข้มข้น 10^6 conidia/ml ทำให้ หนอนใยผักระยะวัยที่ 2 มีอัตราการตายตั้งแต่ 57 % ถึง 96 %

Metchnikoff (1888) ได้ศึกษาการผลิตสปอร์ของเชื้อราเขียวและได้มีการประยุกต์ใช้ เชื้อราในไร่ เพื่อควบคุมด้วงงวงอ้อย ปรากฏว่ามีอัตราการตายของหนอน 55 ถึง 80%

Schabel (1976) ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียบางชนิดและเชื้อราที่พบบนผิวหนังของแมลง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคได้ ในด้วงงวงสนมีเชื้อราและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนบนผิวหนัง ของด้วงที่ยับยั้งการสร้างเชื้อรา *M. anisopliae*

McCauley *et al.* (1968) ได้ทำการศึกษาเชื้อราที่สามารถทำให้เกิดโรคในแมลง โดย การผ่านเข้าทางรูอากาศและส่วนอื่นของร่างกายที่เปิดไว้ เชื้อ *M. anisopliae* บางครั้งสามารถ ทำให้เกิดโรคกับหนอนด้วงดัดโดยผ่านเข้าไปทางรูอากาศและรูขุมขนของระบบร่างกาย ต่อมา Zacharuk (1973) รายงานว่าเชื้อ *M. anisopliae* สามารถประยุกต์ใช้กับหนอนด้วงดัดในช่วงเวลาสั้นๆ ก่อนที่จะมีการลอกคราบ

Burodeos and Villacarlos (1989) ทดสอบเชื้อ *B. bassiana* 2 ไอโซเลท และเชื้อ *M. anisopliae* 5 ไอโซเลทกับด้วงมันเทศภายใต้ห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมอุณหภูมิ เชื้อ *B. bassiana* และ *M. anisopliae* ใช้ LC_{50} ที่ 1×10^8 spores/ml ทำให้มีอัตราการตาย 50 % หลังจาก มีการทดลอง 3 และ 4 วัน ตามลำดับ

ในเคนยา Maniana (1992) ได้ศึกษาเชื้อ *B. bassiana* และ *M. anisopliae* กับ หนอนกอลายใหญ่และ หนอนกออเมริกันในห้องปฏิบัติการ เชื้อ *B. bassiana* สามารถทำให้หนอนกอลายใหญ่ มีอัตราการตาย 3 -100% และ หนอนกออเมริกัน มีอัตราการตาย 30 – 84 % เชื้อ *M. anisopliae* มีระดับความเป็นพิษสูงสำหรับแมลงศัตรูพืชทั้ง 2 ชนิด ซึ่งมีอัตราการตาย 65 - 100% การเจริญของเชื้อราจะมีระยะเวลานานในหนอนกออเมริกัน (LT_{50} เป็นเวลา 6.2-13.2 วัน) ซึ่งมากกว่าหนอนกอลายใหญ่ (LT_{50} เป็นเวลา 1.9-5.4วัน) เชื้อราทั้ง 2 ชนิด มีศักยภาพในการควบคุมหนอนกอลายใหญ่และ หนอนกออเมริกัน

Hajek *et al.* (2006) รายงานว่า มีการใช้เชื้อ *M. anisopliae* และ *B. brongniartii* ในการควบคุม ตัวหนอนดียว

Sabbour (2002) ทำการศึกษาเชื้อ *B. bassiana* และ *M. anisopliae* กับ หนอนผีเสื้อเจาะหัวมันฝรั่ง ซึ่ง LC_{50} ของ *B. bassiana* และ *M. anisopliae* ที่มีผลกับหนอน มีค่าเท่ากับ 3.4×10^6 และ 8.61×10^7 conidia/ml ตามลำดับ

Milner *et al.* (1997) รายงานว่าทดสอบเชื้อ *M. anisopliae* (ไอโซเลท FI610) กับ ปลวก 2 species คือ *Coptotermes acinaciformis* และ *Nasutitermes exitiosus* ที่ความชื้น ที่ลดลงถึง 86 % พบว่าเป็นความชื้นที่ต่ำสุดที่ปลวกจะมีชีวิตอยู่รอด แต่ถ้าความชื้นสูงกว่า 93% ทำให้ปลวกมีการตายเกิดขึ้น

Sosa *et al.* (1997) ศึกษา conidial ของเชื้อ *M. anisopliae* บนมวนเขียวพบว่าหลังจากที่มีการเพาะเชื้อ 24 ชั่วโมง มี conidial เพียง 5-20 % เท่านั้น

Bruck *et al.* (2005) รายงานว่าเชื้อ *M. anisopliae* 3 ไอโซเลท (F 52, ATCC62176 และ ARSEF5520) และ เชื้อ *B. bassiana* (GHA) ทดสอบกับแมลงวันหนอนชอนรากกะหล่ำ ร้วย 2 พบว่าเชื้อ *M. anisopliae* (F52) ทำให้หนอน มีค่าเฉลี่ยอัตราการตาย 85 % และค่าเฉลี่ย LC_{50} และ LC_{95} ของ F52 ที่มีผลต่อหนอนวัย 2 เท่ากับ 2.7×10^6 และ 1.8 spores/g

Mullen and Goldsworthy (2005) มีการทดสอบเชื้อ *M. anisopliae* var. *acridum* 2 ไอโซเลท คือ IMI330189 และ ARSEF 728 กับ ตั๊กแตน พบว่า ไอโซเลท IMI330189 สามารถทำให้เกิดการเป็นโรคได้สูง ซึ่งอาจประยุกต์ใช้ในส่วนของ conidia หรือ การฉีด blastospores แต่ ไอโซเลท ARSEF 728 สามารถก่อให้เกิดโรค โดยการฉีด blastospores เท่านั้น ถ้ามีการฉีด blastospores ที่ได้จากไอโซเลท IMI330189 จะทำให้ เอนไซม์ phenoloxidase ที่อยู่ในระบบเลือด เพิ่มขึ้น ซึ่งพบในตัวอ่อนวัย 5 และ ตัวเต็มวัยของตั๊กแตน

Uma *et al.* (2006) ได้ทำการทดลองเชื้อ *B. bassiana* และ *Nomuraea rileyi* กับหนอนกระทู้ผักวัย 2 พบว่าเชื้อ *B. bassiana* สามารถทำให้หนอนเป็นโรคได้ ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียสและเชื้อ *N. rileyi* สามารถทำให้หนอนเป็นโรคได้ ที่อุณหภูมิ 32 ± 2 องศาเซลเซียส (8 ชั่วโมง) สลับกับอุณหภูมิ 21 ± 2 องศาเซลเซียส (16 ชั่วโมง)

สำหรับการนำเอาเชื้อ *M. anisopliae* มาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ในประเทศไทยนั้น เมื่อปี พ.ศ. 2521 มลิวัลย์ และอัจฉรา ได้ทำการศึกษาเชื้อรา *M. anisopliae* เพื่อควบคุมตัวอ่อนของด้วงแรดมะพร้าว

Pongpanich (1992) ได้ทดลอง เชื้อ *Beauveria* sp. และ *Metarhizium* sp. กับ หนอนกินใบสัก โดยวิธี dipping และ topical method ปรากฏว่าวิธี dipping มีประสิทธิภาพดีกว่า topical method ต่อมา Sakchoowong (1994) ได้ทำการศึกษาเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* กับ หนอนกินใบสัก พบว่า เชื้อ *B. Bassiana* ทำให้เกิดโรคและมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า *M. anisopliae* ซึ่งเชื้อ *B. bassiana* ทำให้หนอนตาย 60.24 % และเชื้อ *M. anisopliae* ทำให้หนอนตาย 37.69 %

Kirtibutr (1994) รายงานว่าได้มีการเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* บนอาหาร Latch's medium ระยะเวลา 30 วัน และ 45 วัน จากนั้นมีการนำเชื้อเข้าสู่ปลวก โดยการกินและสัมผัส spores ซึ่งผลปรากฏว่าระยะเวลา 45 วัน สามารถควบคุมปลวกได้ดีกว่าระยะเวลา 30 วัน ด้วย LC_{50} ที่ 2.27×10^7 spore/cm² / mg ต่อมา Krutmuang (1996) ทำการทดลองเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* กับปลวก *Coptotermes* sp. และ *Microcerotermes* sp. พบว่า *M. anisopliae* var. *anisopliae* สามารถทำให้เกิดโรคได้มากกว่า *M. anisopliae* var. *majus* และเปอร์เซ็นต์การตายของปลวกขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ spore suspension และ generation ของเชื้อราและรวมทั้ง variety ของเชื้อรา

Youngchaitrakul (1999) รายงานว่า *M. anisopliae* var. *anisopliae* ที่ระดับความเข้มข้น 2×10^8 สปอร์/ มล. ทำให้หนอนแมลงวันบ้านวัย 3 มีอัตราการตายเฉลี่ย 84.88 %

ศิริวัลย์ และคณะ (2544) ได้ทำการศึกษา *M. anisopliae* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท พบว่าการเข้าทำลายตัวเต็มวัยของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (ดัดแปลงตามวิธีของ Samules, 1986) โดยไอโซเลท 5MfKK มีค่าสูงสุด คือ 88.78 % ส่วนการผลิตมวลชีวภาพของเชื้อพบว่าอาหาร SDB (Sabouraud dextrose broth) ให้ผลผลิตของน้ำหนักแห้งของเส้นใยสูงสุด

ทิพย์วดี และคณะ (2546) ได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ พบว่าเพลี้ยแป้งอ่อนแอต่อเชื้อรา *M. anisopliae* และ *Fusarium solani*

การนำเชื้อราเขียวไปใช้ประโยชน์นั้น จำเป็นต้องทราบคุณสมบัติของเชื้อเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลและเพื่อประสิทธิภาพในการควบคุม เนื่องจากเชื้อราเขียวมีความหลากหลาย ทางชีวภาพ (biodiversity) ทั้งในแง่ชนิด (species) และสายพันธุ์ (variety) ฉะนั้นการนำไปใช้จึงจำเป็นต้องทราบชนิดและสายพันธุ์ที่แน่นอน เนื่องจากแต่ละสายพันธุ์จะเข้าทำลายแมลงได้อย่างเฉพาะเจาะจง ดังนั้นการศึกษาหาสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. anisopliae* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทย ที่มีศักยภาพต่อการทำลายแมลงศัตรูพืช จึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนสอดคล้องกับนโยบายของรัฐบาลให้เป็นปีแห่งความปลอดภัยด้านอาหาร ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงเป็น

หนทางที่จะช่วยให้เกษตรกรไทย มีความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น มีสุขภาพที่ดี ซึ่งวิธีดังกล่าวจะใช้ควบคู่กับวิธีการกำจัดแมลงโดยชีววิธีอื่น ๆ เพื่อเป็นการลดการใช้ปริมาณสารเคมีลงหรือทดแทนสารเคมีไปในที่สุด

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อราเขียว

3.1.1 การคัดเลือกเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก

นำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ Maejo, Chonburi, Suphan, Khon Kaen, BCC4849, BCC4951, BCC1707, BCC4810, BCC2074, BCC1858 (ตารางที่ 2) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA จนเจริญเต็มที่ สร้างสปอร์ แล้วไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราหรือจุลินทรีย์อื่นๆ นาน 7 วัน จากนั้นนำหนอนกระทู้ผักวัย 2 ใส่ใน plate เชื้อราเขียว ประมาณ 30 นาที แล้วเขี่ยหนอนใส่ใน plate ที่มีใบคะน้า ซึ่งแต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ หลังจากนั้นตรวจนับผลการตาย

ตารางที่ 2 แหล่งที่มาของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* สายพันธุ์ต่างๆ

3.1.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

นำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาเปรียบเทียบผลการเจริญเติบโต ในอาหารชนิดต่าง ๆ จำนวน 8 ชนิด คือ Sabouraud

ลำดับ	รหัส	สายพันธุ์	ตัวอย่างที่เก็บ	สถานที่
1	BCC1707	<i>M. flavoviride</i>	Homoptera-nymph	ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
2	BCC1858	<i>M. anisopliae</i>	Coleoptera-Lampyridae	
3	BCC2074	<i>M. anisopliae</i>	Lepidoptera-silkworm	
4	BCC4810	<i>M. anisopliae</i>	-	
5	BCC4849	<i>M. anisopliae</i>	-	
6	BCC4951	<i>M. anisopliae</i>	-	
		var. <i>anisopliae</i>		
7	Maejo	<i>M. anisopliae</i>	ตัวอย่างดิน	สภาวิจัยแห่งชาติ
8	Chonburi	<i>M. anisopliae</i>	ตัวอย่างดิน	สภาวิจัยแห่งชาติ
9	Suphan	<i>M. anisopliae</i>	ตัวอย่างดิน	สภาวิจัยแห่งชาติ
10	Khon Kaen	<i>M. anisopliae</i>	ตัวอย่างดิน	สภาวิจัยแห่งชาติ

dextrose agar (SDA), Sabouraud dextrose agar with yeast extract (SDAY), Sabouraud maltose agar with yeast extract (SMAY), Potato dextrose agar (PDA), Malt agar (MA),

Mungbean agar (MU), Fungus agar (FA), Latch 's medium (L) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ซม. ตัดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน นำไปเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น 8 ชนิด ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 ± 2 องศาเซลเซียส) นาน 15 วัน แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ หลังจากบ่มเชื้อได้ เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละไอโซเลต โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ แต่ละไอโซเลต ที่ 7, 11 และ 15 วัน (สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, $10 \times 8 \times 3$) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows

3.1.3 ผลของอุณหภูมิต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

นำเชื้อราเขียว 3 ไอโซเลต ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ PDA, SDAY และ MU จากนั้นบ่มเชื้อไว้ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 ± 2 องศาเซลเซียส) 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละไอโซเลต โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ แต่ละไอโซเลต ที่ 7, 11 และ 15 วัน (สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, $3 \times 3 \times 3$) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows

3.1.4 ผลของแสงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

นำเชื้อราเขียว 3 ไอโซเลต ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ PDA, SDAY และ MU จากนั้นบ่มเชื้อไว้ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28 ± 2 องศาเซลเซียส) และ 1) ที่มีแสง 12 ชั่วโมงสลับกับที่มืดอีก 12 ชั่วโมง 2) ที่มีแสงตลอด 24 ชั่วโมง และ 3) ที่มีมืด 24 ชั่วโมง แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ ทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยวัดขนาดของโคโลนีของเชื้อราเขียว ในแต่ละ plate ที่ 7, 11 และ 15 วัน (สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, $3 \times 3 \times 3$) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows

3.2 การเพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก

เก็บใบคะน้าที่มีกลุ่มไข่และตัวหนอนขนาดต่างๆ จากแปลงปลูกผักของเกษตรกร ต.สันผีเสื้อ จังหวัดเชียงใหม่ ใส่กล่องพลาสติกขนาด $24.5 \times 17 \times 9$ เซนติเมตร โดยสามารถสังเกตได้จากใบพืชจะมีลักษณะรอยทำลายและโปร่งแสง เมื่อพลิกดูใต้ใบจะพบกลุ่มหนอนรวมอยู่กันเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 1) จากนั้นนำหนอนกระทู้ผักที่เก็บมาจากแปลงมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ที่

อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 26.21 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย 31.71 องศาเซลเซียส โดยนำหนอนกระทู้ผักเปลี่ยนไปใส่กล่องพลาสติกใหม่ขนาดเดิม พร้อมใบคะน้า (ภาพที่ 2) จนกระทั่งเข้าดักแด้ จึงแยกไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติกขนาด 8 x 10 x 8 เซนติเมตร เปิดฝา แล้วนำไปใส่ในกรงที่มีหญ้าม้าเลเซีย (ภาพที่ 3) เมื่อดักแด้ออกเป็นตัวเต็มวัย (ภาพที่ 4) จึงให้อาหารฝัสดั่ว ซึ่งเป็นน้ำผึ้งที่มีความเข้มข้น 10 % โดยฝัสดั่วผสมพันธุ์และวางไข่บนหญ้าม้าเลเซีย (ภาพที่ 5) จึงตัดใบหญ้าม้าเลเซียไปใส่กล่องพลาสติกขนาด 17 x 24 x 11 เซนติเมตร แล้วให้อาหารด้วยยอดคะน้า รอนจนกระทั่งหนอนที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เจริญเป็นหนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 (ภาพที่ 6) จึงนำหนอนไปทดสอบกับเชื้อราเขียว



ภาพที่ 1 กลุ่มหนอนกระทู้ผักบนใบคะน้าในห้อง



ภาพที่ 2 การเลี้ยงหนอนกระทู้ผักในห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 3 กล่องดักแด้ เปิดฝาไว้ในกรงที่มี (ซ้าย)

หญ้าม้าเลเซีย เพื่อเป็นที่วางไข่ ในระยะที่เจริญเป็นฝัสดั่ว



ภาพที่ 4 ฝัสดั่วหนอนกระทู้ผัก ตัวผู้

ตัวเมีย (ขวา)



ภาพที่ 5 กลุ่มไข่หนอนกระทู้ผักบนหญ้า

ตาม

มาเลเซีย



ภาพที่ 6 หนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3

ลำดัด

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก

นำเชื้อราเขียวจำนวน 3 ไอโซเลต ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาเลี้ยงบนอาหาร MU จนเจริญเต็มที่ สร้างสปอร์ แล้วไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อรา หรือจุลินทรีย์อื่น ๆ มาทดสอบ หา ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก

เตรียม spore suspension ของเชื้อราเขียว 3 ไอโซเลต ที่สร้างสปอร์บนอาหาร แล้วชูดออกจากอาหารมาผสม กับน้ำกลั่น กรองด้วยผ้าขาวบางที่นำมาทบทัน 2 ชั้น (ทำให้ผ้าเปียก ก่อนนำมากรอง) การใช้ haemocytometer ในการนับสปอร์ นั้นทำได้โดยการปิด cover slip ให้คลุม scale ทั้งสอง จากนั้นใช้ loop จุ่มลงใน spore suspensions ที่เขย่าจนเข้ากันดีแล้วและ ย้าย loop ไปแตะตรงบริเวณขอบสไลด์ทั้งสองด้าน spore suspensions จะซึมเข้าไปจนเต็ม บริเวณ scale ทั้งสอง อย่าใช้ dropper ในการย้าย spore suspension มาใส่ haemocytometer เพราะจะได้ spore suspension มากเกินไปและไหลลงช่องข้าง scale ซึ่งจะพาเอาสปอร์ที่นับ ได้ไม่ตรงตามความเป็นจริง เมื่อใส่ spore suspensions แล้วก็ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้ สปอร์นอนกันก่อนจึงนับจำนวนสปอร์

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ haemocytometer (ภาพที่ 7)

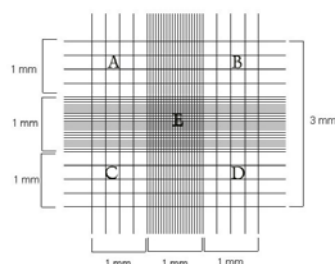
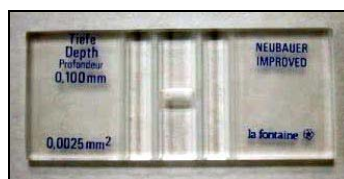
1. ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรง กลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (small squares) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นจะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (smallest squares) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จำนวนทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้ รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณ ขอบของตารางทุกช่องด้วย
2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ $25 \times 16 \times 1/400$ ตารางมิลลิเมตร
3. หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก 1/10 มิลลิเมตร) จะเท่ากับ $25 \times 16 \times 1/400 \times 1/10$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 0.1 ลบ.มม.

4. สมมุตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลบ.มม.
5. ต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย 1 ลบ.ซม. หรือ 1 มล. ซึ่ง 1 มล. เท่ากับ 1000 ลบ.มม.

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น ในปริมาตร 0.1 ลบ.มม. นับสปอร์ได้} &= Y \quad \text{สปอร์} \\ \text{ถ้าใน 1000 ลบ.มม. (1 มล.) จะมีสปอร์} &= Y \times 1000 \times 1/0.1 \text{ สปอร์} \\ &= Y \times 1 \times 10^4 \\ &\text{สปอร์/มล.} \end{aligned}$$

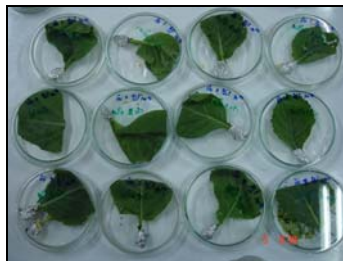
6. ในกรณีสปอร์ หรือเซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมุติจำนวนสปอร์ได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มล. = $Z/5 \times 1 \times 10^4$ สปอร์/มล.
7. การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้ Suspension กระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับหลายๆครั้ง เช่น 5 – 10 ครั้ง แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลัง หรืออาจจำเป็นต้องเติม wetting agent เช่น Tween 20 ลงไปเพื่อช่วยให้สปอร์ หรือเซลล์ กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้น ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น)
8. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์ หรือเซลล์ของเชื้อแล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธีคำนวณข้างต้น

โดยในการทดลองได้ใช้ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 6×10^7 สปอร์/มล., 6×10^8 สปอร์/มล., 6×10^9 สปอร์/มล. และ 6×10^{10} สปอร์/มล.



ภาพที่ 7 สไลด์นับสปอร์ (haemacytometer)

นำหนอนวัย 1, 2 และ หนอนวัย 3 ใส่ใน plate ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ฉีดพ่นเชื้อราเขียวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ภาพที่8) หลังจากนั้นตรวจนับผลการตายที่ 3, 5 และ 7 วัน



ภาพที่ 8 Plate ที่มีหนอนกระทุ้กล้วย 1, 2 และ 3 ถูกพ่นด้วยเชื้อราเขียวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

การวิเคราะห์ข้อมูล

แปลงค่าจำนวนหนอนกระทุ้กล้วย 1, 2 และ 3 ที่ตายในทุกกรรมวิธีเป็นเปอร์เซ็นต์การตายตามสูตร

$$\% \text{ การตายของหนอนกระทุ้กล้วย} =$$

$$\frac{(\text{จำนวนหนอนก่อนทดสอบเชื้อราเขียว}-\text{จำนวนหนอนหลังทดสอบเชื้อราเขียว}) \times 100}{\text{จำนวนหนอนก่อนทดสอบเชื้อราเขียว}}$$

จำนวนหนอนก่อนทดสอบเชื้อราเขียว

ถ้ามีการตายของกรรมวิธีควบคุม (control) มากกว่า 5 % ให้ทดลองใหม่

ถ้ามีการตายของกรรมวิธีควบคุม (control) อยู่ในช่วง 0-5 % ให้ปรับค่าเปอร์เซ็นต์ การตายของหนอนกระทุ้กล้วยด้วย Abbott's formula ดังนี้

$$\text{Abbott's formula, } Pt = \frac{Po - Pc}{100 - Pc} \times 100$$

$$100 - Pc$$

$$Pt = \% \text{ Corrected mortality}$$

$$Po = \% \text{ Observed mortality}$$

$$Pc = \% \text{ Control mortality}$$

(สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, 3x3x3x4) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows บันทึก รูปร่างลักษณะ สีของโคโลนี และสปอร์ของเชื้อแต่ละไอโซเลต แล้ว

นำไปวินิจฉัยเพื่อยืนยันข้อมูลเปรียบเทียบกับที่เคยรายงานไว้จากฐานฐานวิทยา และลักษณะการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราเขียว

การค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (DNA marker)

การค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อ *M. anisopliae* แต่ละสายพันธุ์เพื่อศึกษาข้อมูลทางด้านโมเลกุล โดยใช้วิธี Amplified fragment length polymorphism (AFLP) นั้นประกอบด้วย:

- 1 สกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* แต่ละสายพันธุ์
- 2 การตัด ตัวอย่าง DNA ของเชื้อรา (250 นาโนกรัม) ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *Taq I*
- 3 DNA fragments จะเชื่อมด้วย Eco-adaptor (5'-ctcgtagactgcgtacc -3', 5'-aattggtacgcagtcta-3') และ Taq-adaptor (5'-gacgatgagtcctgag-3', 5'- cgctcaggactcat-3') สำหรับด้านปลายที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *Taq I* ตามลำดับ
- 4 preamplification DNA fragments ด้วย pre-*EcoRI* primer (5'-gactgcgtaccaattca-3') pre-*TaqI* primer (5'-gatgagtcctgagcgaa-3')
- 5 เลือก amplify DNA fragment จาก PCR product ในข้อ 4.4 ด้วย *EcoRI*-NNN primer (5'-gactgcgtaccaattcNNN-3') และ *TaqI*-NNN primer (5'-gatgagtcctgagcggaNNN-3') เมื่อ N คือ นิวคลีโอไทด์ A, C, G หรือ T การเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ชุด primer สำหรับ PCR program เริ่มต้นด้วยอุณหภูมิ 95 °C นาน 3 นาที และ denaturation ที่ 95 °C นาน 30 วินาที annealing ที่ 62 °C นาน 1 นาที และ elongation ที่ 72 °C นาน 1 นาที จำนวน 3 รอบ จากนั้น ทำซ้ำอีก 12 รอบ โดยทุกๆ 3รอบ จะลดอุณหภูมิของ annealing ลง 2 °C จากนั้นใช้อุณหภูมิ denaturation 95 °C นาน 30 วินาที annealing ที่ 52 °C นาน 1 นาที และ elongation ที่ 72 °C นาน 1 นาที ทำซ้ำ จำนวน 20 รอบ และต่อด้วยที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที PCR product ที่ได้จะถูกนำไปแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ใน denaturing polyacrylamide gel และย้อมแถบ DNA ด้วย silver staining

ไพรเมอร์สำหรับคัดกรองเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ

Primer	Sequence (5' to 3')	Primer	Sequence (5' to 3')
E-02	GACTGCGTACCAATTCACC	T-03	GATGAGTCCTGACCGACAC
E-03	GACTGCGTACCAATTCACG	T-04	GATGAGTCCTGACCGACAG
E-06	GACTGCGTACCAATTCAGC	T-05	GATGAGTCCTGACCGACAT
E-07	GACTGCGTACCAATTCAGG	T-06	GATGAGTCCTGACCGACCA
E-12	GACTGCGTACCAATTCATC	T-20	GATGAGTCCTGACCGACGA
E-13	GACTGCGTACCAATTCATG	T-22	GATGAGTCCTGACCGACTG
E-15	GACTGCGTACCAATTCAAG	T-23	GATGAGTCCTGACCGACGT
E-16	GACTGCGTACCAATTCAAC	T-25	GATGAGTCCTGACCGAGAC

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและการรวบรวมข้อมูล

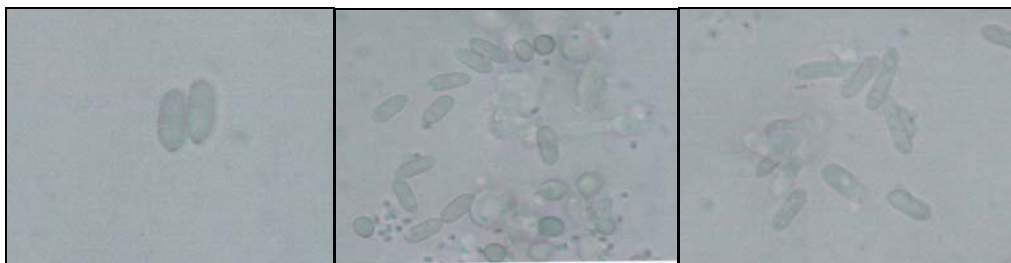
ภาควิชาภูมิวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการ
กลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทุ้ง

จากการนำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลท มาทดสอบกับหนอนกระทุ้งวัย 2 ผลปรากฏว่า เชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ เชื้อราเขียว BCC1858, BCC4849 และ Khon Kaen ซึ่งทำให้หนอนกระทุ้งวัย 2 มีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 2 วัน และลักษณะสปอร์ของเชื้อราเขียวทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่า มีรูปทรงกระบอกตรงและรูปทรงค่อนข้างกลม สปอร์มีสีเขียว (ภาพที่ 9)



BCC1858

BCC4849

Khon Kaen

ภาพที่ 9 ลักษณะสปอร์ของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* (1000X) 3 ไอโซเลท

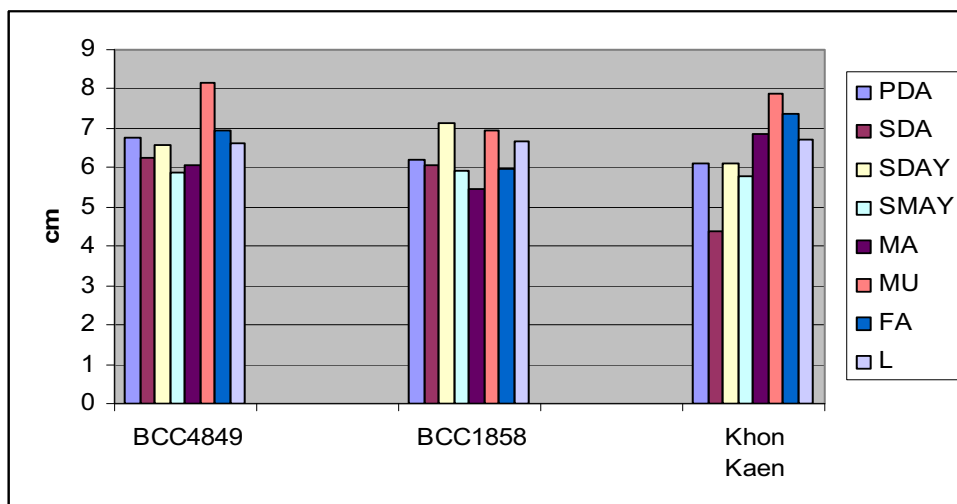
4.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 8 ชนิด เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า เกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างไอโซเลทเชื้อราเขียว กับชนิดของอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P = 0.01$ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ Mungbean agar (MU) ทำให้เชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC4849 และ Khon Kaen เจริญดีที่สุด มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่ 15 วัน เท่ากับ 8.14 และ 7.89 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC 1858 เจริญดีที่สุดบนอาหาร L, MU และ SDAY เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่ 15 วัน เท่ากับ 6.66, 6.93 และ 7.15 เซนติเมตร รายละเอียดผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 และ ภาพที่ 10

ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเชื้ออายุ 15 วัน คือ เชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC4849 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MU มีเส้นใยสีขาว โคโลนีหนาแน่น คล้ายกำมะหยี่ต่อมาบางแห่งยุบลงมีสีเหลือง บริเวณกลางโคโลนีมีการสร้างสปอร์ที่มีสีเขียว เชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC1858 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDAY เริ่มต้นโดยการสร้างเส้นใยสีขาว บางๆ โดยแผ่แนบไปผิวอาหารโดยแผ่เป็นวง ๆ ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เนื่องจากมีการสร้างสปอร์สีเหลือง จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเขียวบางบริเวณของโคโลนี สปอร์มีสีเขียว และเชื้อราเขียว ไอโซเลท Khon Kaen บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MU ซึ่งสร้างเส้นใยสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ขอบโคโลนีมีสีขาว ลักษณะของสปอร์คล้ายผงมีสีเขียว (ภาพที่ 11-13)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* 3 ไอโซเลท บนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน

Source	df	MS	F	P
Rep	3	0.05		
Isolate (I)	2	1.11	20.50	0.00
Media (M)	7	4.87	90.06	0.00
I*M	14	1.49	27.52	0.00
Error	69	0.05		
Total	95			
Coefficient of variance	3.61%			



ภาพที่10 การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* 3 ไอโซเลท บนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน

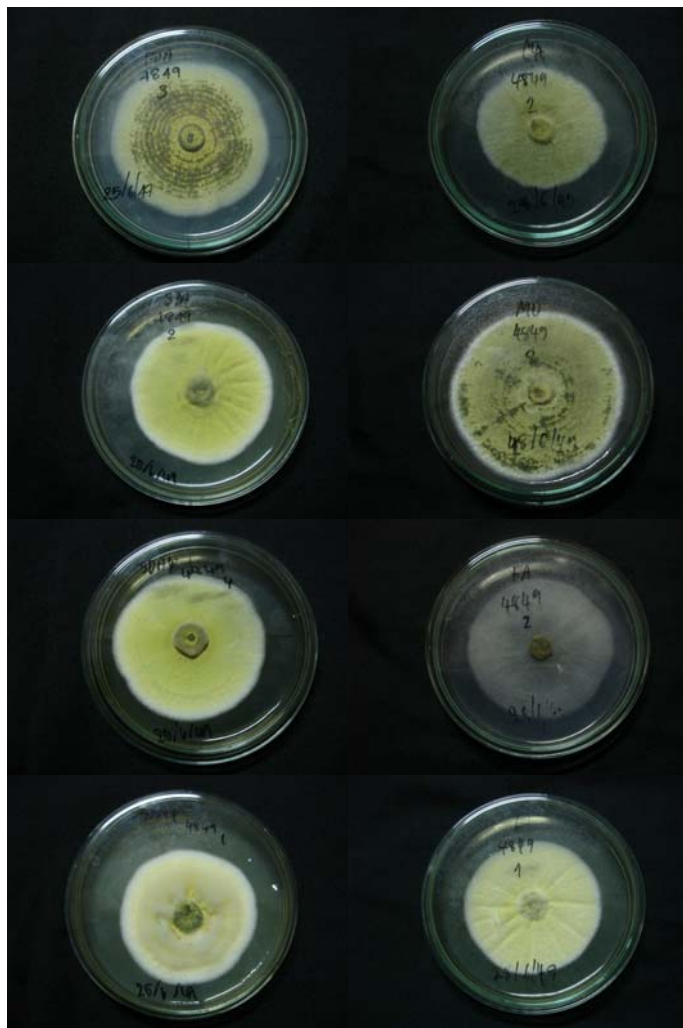
ตารางที่ 4 การเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ กัน โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เมื่ออายุ 15 วัน

เชื้อ	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ (ซ.ม.) ¹							
	PDA	SDA	SDAY	SMAY	MA	MU	FA	L
BCC4849	6.75	6.26	6.59	5.89	6.04	8.14	6.93	6.61
BCC1858	6.18	6.08	7.15	5.90	5.45	6.93	5.95	6.66
Khon Kaen	6.11	4.40	6.11	5.78	6.85	7.89	7.36	6.71

$$\text{LSD}_{0.05} = 0.33$$

$$\text{LSD}_{0.01} = 0.44$$

¹ ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ



ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลต BCC4849 ที่เจริญบนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน

PDA = Potato dextrose agar

SDA = Sabouraud dextrose agar

SDAY = Sabouraud dextrose agar with yeast extract

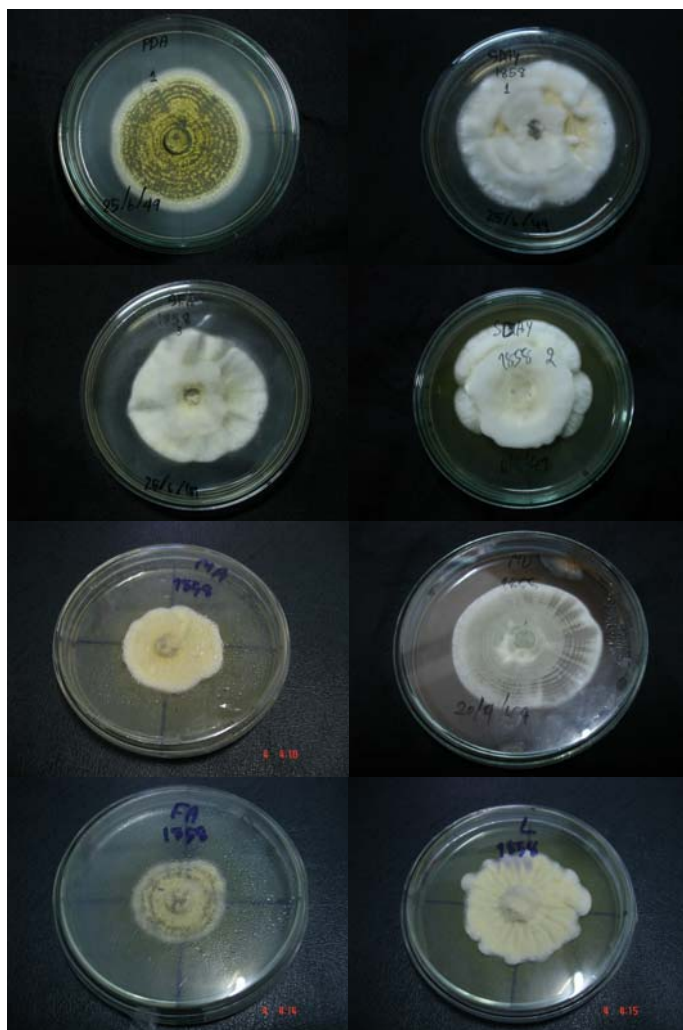
SMAY = Sabouraud maltose agar with yeast extract

MA = Malt agar

MU = Mungbean agar

FA = Fungus agar

L = Latch 's medium



ภาพที่ 12 ลักษณะโคโลนีเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลท BCC1858 ที่เจริญบนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน

PDA = Potato dextrose agar

SDA = Sabouraud dextrose agar

SDAY = Sabouraud dextrose agar with yeast extract

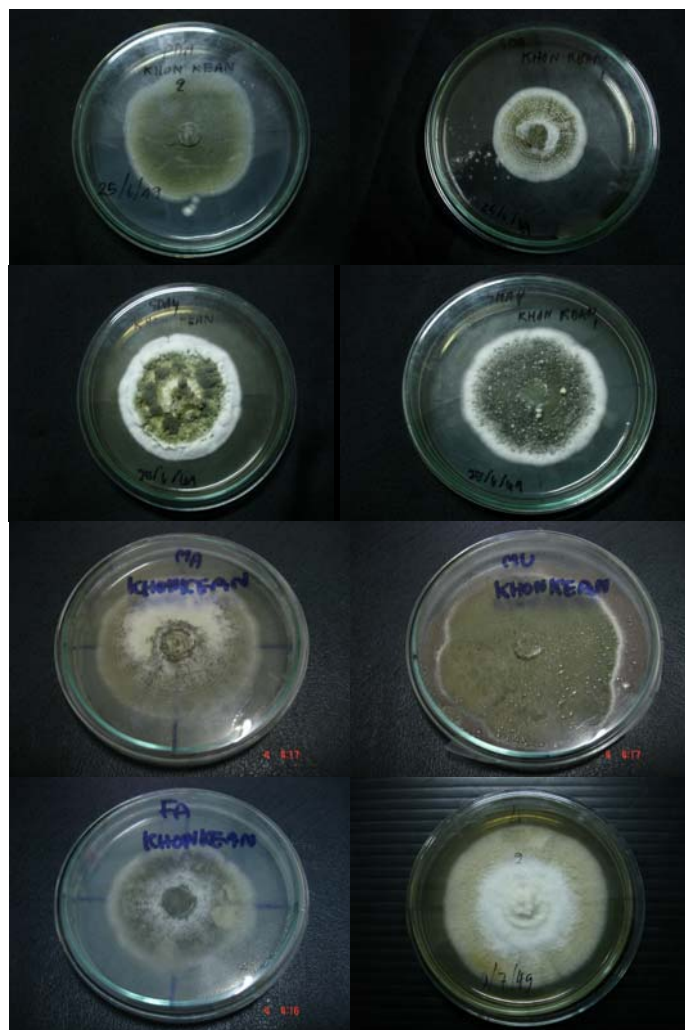
SMAY = Sabouraud maltose agar with yeast extract

MA = Malt agar

MU = Mungbean agar

FA = Fungus agar

L = Latch 's medium



ภาพที่ 13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลท Khon Kaen ที่เจริญบนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน

PDA = Potato dextrose agar

MA = Malt agar

SDA = Sabouraud dextrose agar

MU = Mungbean agar

SDAY = Sabouraud dextrose agar with yeast extract

FA = Fungus agar

SMAY = Sabouraud maltose agar with yeast extract

L = Latch 's medium

4.3 ผลของอุณหภูมิต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MU ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างไอโซเลทของเชื้อราเขียวกับอุณหภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 5 ($P=0.01$) พบว่า เชื้อราเขียวทั้ง 3 ไอโซเลท เจริญเติบโตได้

ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ BCC 4849 ซึ่งเจริญได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 7.16 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 % การสร้างสปอร์ของเชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC1858 สร้างมากที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC4849 และ เชื้อราเขียว ไอโซเลท Khon Kaen สร้างสปอร์มากที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 14 และตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* 3 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน

Source	df	MS	F	P
Rep	3	0.59		
Isolate (I)	2	18.69	116.49	0.00
Media (M)	2	12.78	79.65	0.00
Temperature (T)	2	14.28	89.04	0.00
isolate x media	4	0.45	2.80	0.03
isolate x temperature	4	3.38	21.06	0.00
M*T	4	0.09	0.62	0.65
I*T *M	8	0.25	1.59	0.14
Error	78	0.16		
Total	107			
Coefficient of variance	7.67 %			

ตารางที่ 6 การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกันบนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน

เชื้อ	อุณหภูมิ	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซ.ม.) ¹
BCC1858	25 องศาเซลเซียส	4.69
	30 องศาเซลเซียส	4.56
	35 องศาเซลเซียส	5.97
BCC4849	25 องศาเซลเซียส	5.25
	30 องศาเซลเซียส	6.19
	35 องศาเซลเซียส	7.16
Khonkean	25 องศาเซลเซียส	6.33
	30 องศาเซลเซียส	5.16
	35 องศาเซลเซียส	6.35

$$\text{LSD}_{0.05} = 0.56$$

$$\text{LSD}_{0.01} = 0.75$$

¹ ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ

เชื้อ 1858

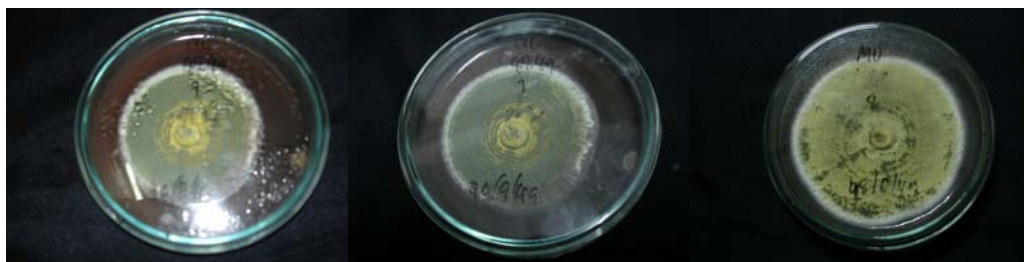


25 องศาเซลเซียส

30 องศาเซลเซียส

35 องศาเซลเซียส

เชื้อ BCC 4849



25 องศาเซลเซียส

30 องศาเซลเซียส

35 องศาเซลเซียส

เชื้อ Khon Kaen



25 องศาเซลเซียส

30 องศาเซลเซียส

35 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 14 การเจริญของเชื้อราเหี่ยว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลต คือ เชื้อ BCC4849, BCC1858 และเชื้อ Khon Kaen (ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส) บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน

4.4 ผลของแสงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

ผลการทดสอบสภาพแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างไอโซเลทของเชื้อราเขียวกับสภาพแสงที่ได้รับ ($P = 0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยที่เชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC1858 และ BCC4849 เจริญเติบโตได้ดีที่แสง 12 ชั่วโมงสลับกับที่มืด 12 ชั่วโมง ส่วนเชื้อราเขียว ไอโซเลท Khon Kaen เจริญเติบโตได้ดีในที่มืด 24 ชั่วโมง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 7.03 เซนติเมตร 7.57 เซนติเมตร และ 7.89 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 % การสร้างสปอร์ของเชื้อราเขียวไอโซเลท BCC1858 และ Khon Kaen สร้างสปอร์มากในที่มืด 12 ชั่วโมงสลับกับที่มืด 12 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ BCC4849 สร้างสปอร์มากในที่มืด 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 15 และ ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* 3 ไอโซเลท ที่สภาพแสงแตกต่างกัน หลังการทดสอบ 15 วัน

Source	df	MS	F	P
Rep	3	0.25		
Isolate (I)	2	31.70	8.78	0.00
Light (L)	2	14.11	12.86	0.00
Media (M)	2	23.74	58.71	0.00
I*L	4	0.39	0.17	0.15
isolate x media	4	1.74	0.42	0.00
light x media	4	0.99	0.84	0.00
isolate x light x media	8	0.45	0.78	0.06
Error	78	0.23		
Total	107			
Coefficient of variance	8.10 %			

ตารางที่ 8 การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่สภาพแสงแตกต่างกัน 3 แบบ บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน

เชื้อ	แสง	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซ.ม.) ¹
BCC1858	แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง	7.03
	แสง 24 ชั่วโมง	5.07
	มืด 24 ชั่วโมง	6.07
BCC4849	แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง	7.57
	แสง 24 ชั่วโมง	6.09
	มืด 24 ชั่วโมง	7.03
Khonkean	แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง	7.69
	แสง 24 ชั่วโมง	5.75
	มืด 24 ชั่วโมง	7.89

$$\text{LSD}_{0.05} = 0.67$$

$$\text{LSD}_{0.01} = 0.89$$

¹ ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ

เชื้อ BCC1858



แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง

แสง 24 ชั่วโมง

มืด 24 ชั่วโมง

เชื้อ BCC 4849



แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง

แสง 24 ชั่วโมง

มืด 24 ชั่วโมง

เชื้อ Khon Kaen



แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง

แสง 24 ชั่วโมง

มืด 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 15 การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลต คือ เชื้อ BCC4849, BCC1858 และเชื้อ Khon Kaen (แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง แสง 24 ชั่วโมง และ มืด 24 ชั่วโมง) บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน

4.5 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ 9 พบว่า ไอโซเลท เชื้อราเขียว กับหนอนกระทู้ผัก วัยที่ 1, 2 และ 3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 % หลังพ่นเชื้อ 7 วัน ปรากฏว่า เชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC1858 มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่หนอนกระทู้ผักวัยที่ 1 คือ 78.95 % ส่วนเชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC4849 และ Khon Kaen มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่หนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 คือ 79.49 % และ 59.46 % ตามลำดับ (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions เชื้อราเขียว *M. anisopliae* 3 ไอโซเลท ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ และ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก วัยที่ 1, 2 และ 3 หลังทดสอบ 7 วัน

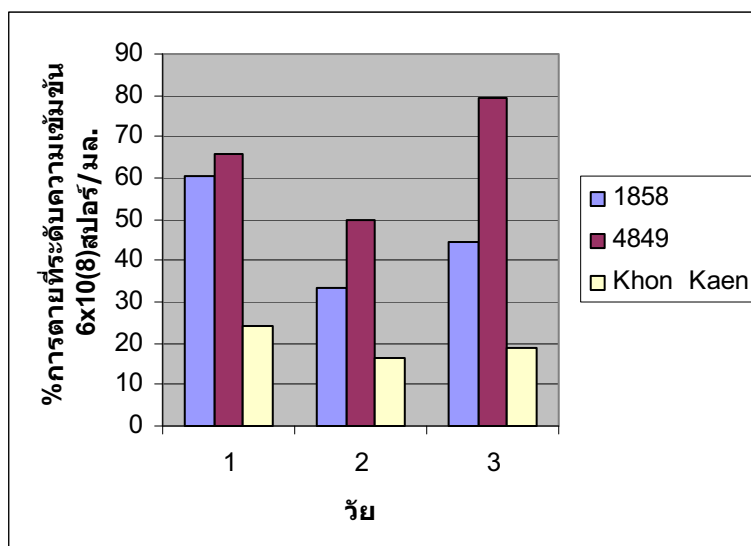
Source	df	MS	F	P
Rep	3	2.53		
Concentration (C)	4	152.92	37.67	0.00
Isolate (I)	2	54.32	13.38	0.00
Larvae (L)	2	6.72	1.65	0.20
concentration x isolate	8	14.89	3.67	0.00
concentration x larve	8	12.46	3.07	0.00
I*L	4	2.63	0.65	0.63
C*I *L	16	2.70	0.66	0.82
Error	132	4.06		
Total	179			
Coefficient of variance	50.80 %			

ตารางที่ 10 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 หลังฉีดพ่นเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลท BCC 4849 ที่ 3, 5 และ 7 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ

ระดับความเข้มข้น	วัย	อัตราการตาย 3 วัน	อัตราการตาย 5 วัน	อัตราการตาย 7 วัน
(สปอร์/มล.)		%การตายที่จริง	%การตายที่จริง	%การตายที่จริง
6×10^7	1	0.00	13.16	15.79
	2	0.00	5.26	13.16
	3	0.00	20.51	53.85
6×10^8	1	2.63	60.53	65.79
	2	10.53	39.47	50.00
	3	2.56	51.28	79.49
6×10^9	1	5.26	42.11	47.37
	2	0.00	55.26	57.89
	3	0.00	33.33	48.72
6×10^{10}	1	15.79	71.05	76.32
	2	2.63	42.11	44.74
	3	2.56	56.41	61.54
control	1	5.00	5.00	5.00
	2	5.00	5.00	5.00
	3	2.50	2.50	2.50

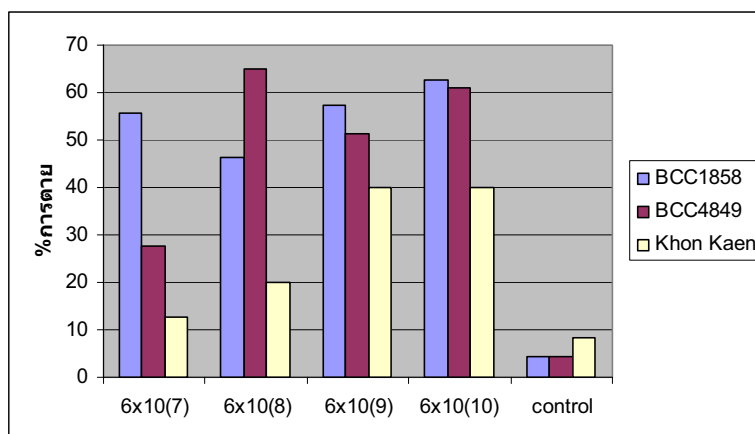
$$LSD_{0.05} = 2.82$$

$$LSD_{0.01} = 3.72$$



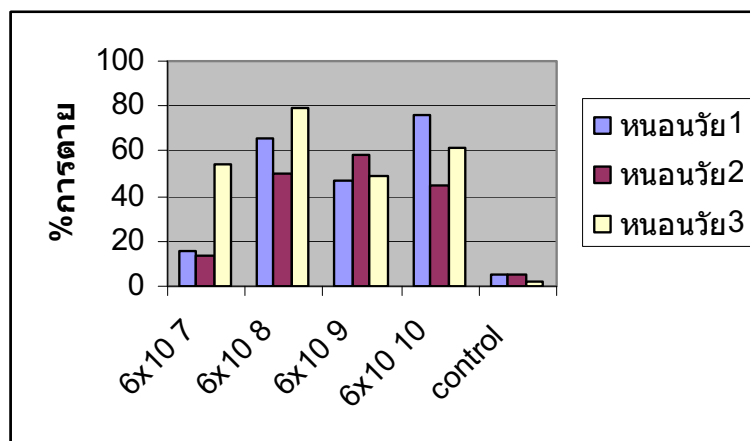
ภาพที่ 16 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก ไร่ที่ 1, 2 และ 3

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลทพบว่า เกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างไอโซเลทของเชื้อราเขียว กับ ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 % หลังพ่นเชื้อ 7 วัน พบว่าระดับความเข้มข้นสูงสุด ทำให้เชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC1858 และ Khon Kaen มีเปอร์เซ็นต์การตาย คือ 62.58 % และ 40.02 % ตามลำดับ ส่วนเชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC4849 ที่ระดับความเข้มข้น 6×10^8 สปอร์/มล. มีเปอร์เซ็นต์การตาย เป็น 65.09 % (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก (ปฏิกิริยาร่วมระหว่างไอโซเลทของเชื้อราเขียว กับระดับความเข้มข้น 4 ระดับ)

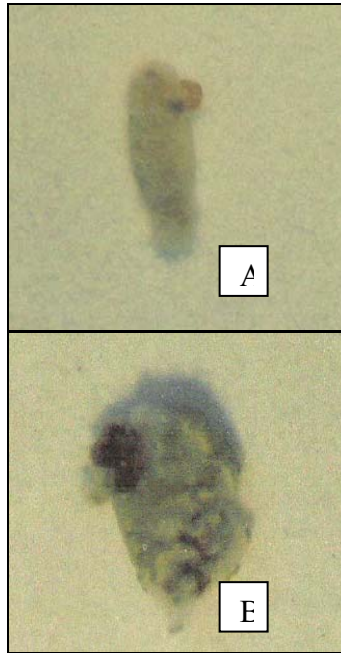
ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท พบว่าเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่าง ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ กับ หนอนกระทู้ผักวัยที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 % ปรากฏว่า เชื้อราเขียวไอโซเลท BCC 4849 ที่ระดับความเข้มข้น 6×10^8 สปอร์/มล. มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผักมากที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด ในช่วง 7 วัน หลังการทดสอบ พบว่า หนอนกระทู้ผักวัยที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การตาย 65.79 % , หนอนกระทู้ผักวัยที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การตาย 50.00 % และ หนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การตาย 79.49 % (ภาพที่ 18 และ ตารางที่ 10)



ภาพที่ 18 เปรียบเทียบการตายของหนอนกระตุ้ฝักวัยที่ 1, 2 และ 3 ของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลต BCC 4849 (ที่เกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างระดับ ความเข้มข้น 4 ระดับกับหนอนกระตุ้ฝักวัยที่ 1, 2 และ 3)

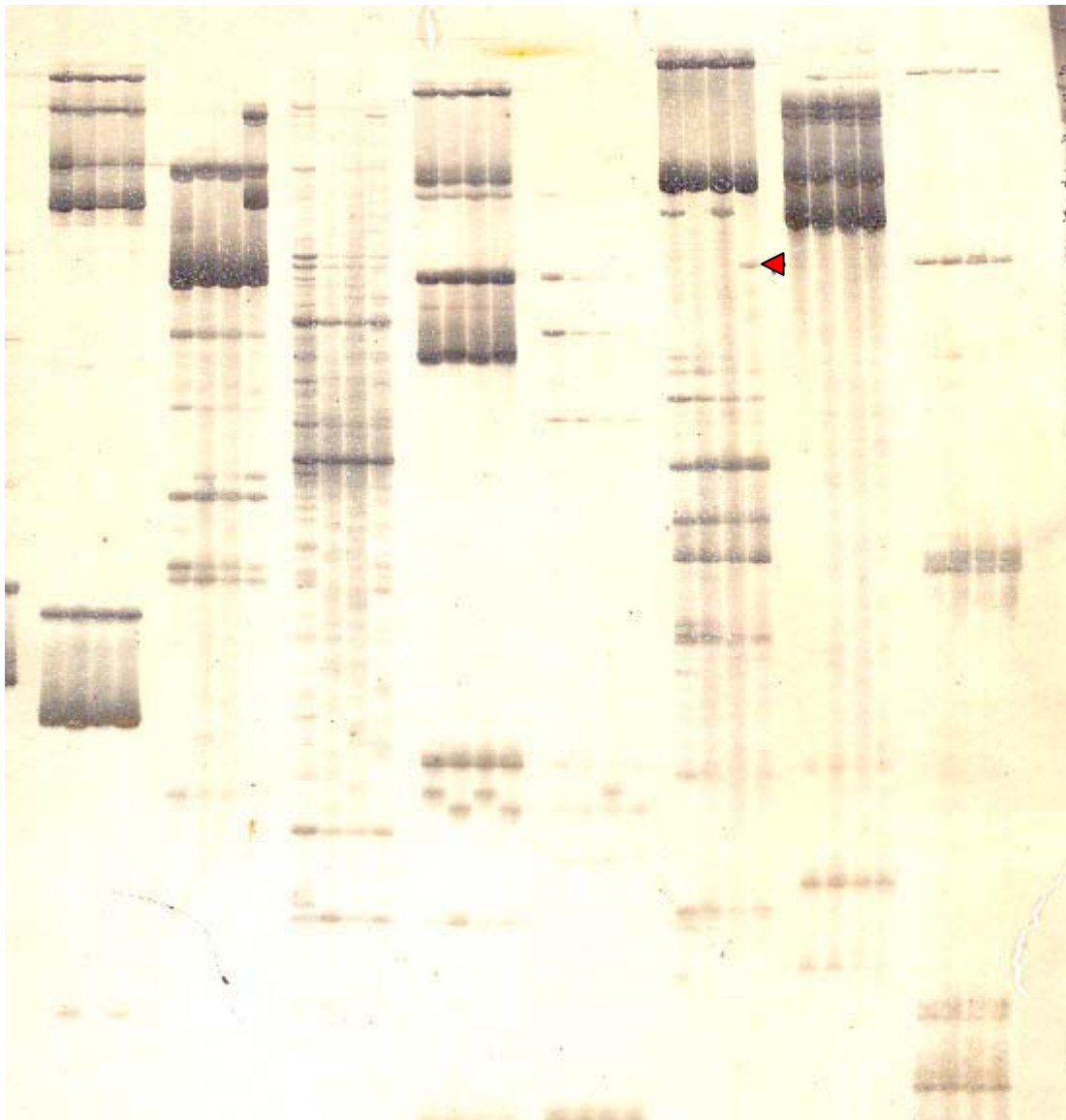
ลักษณะอาการของหนอนกระทู้ผักที่ถูกเชื้อราเขียวเข้าทำลาย

เมื่อนิคพ่นเชื้อราเขียวจำนวน 3 ไอโซเลท บนตัวหนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 หลังจากนิคพ่น 7 วัน พบว่าหนอนที่ตายมีเส้นใยสีขาว (mycelium) บนตัวหนอน หลังจากนั้นประมาณ 14-15 วัน จะเริ่มเปลี่ยนเป็นสปอร์สีเขียว (ภาพที่ 19)

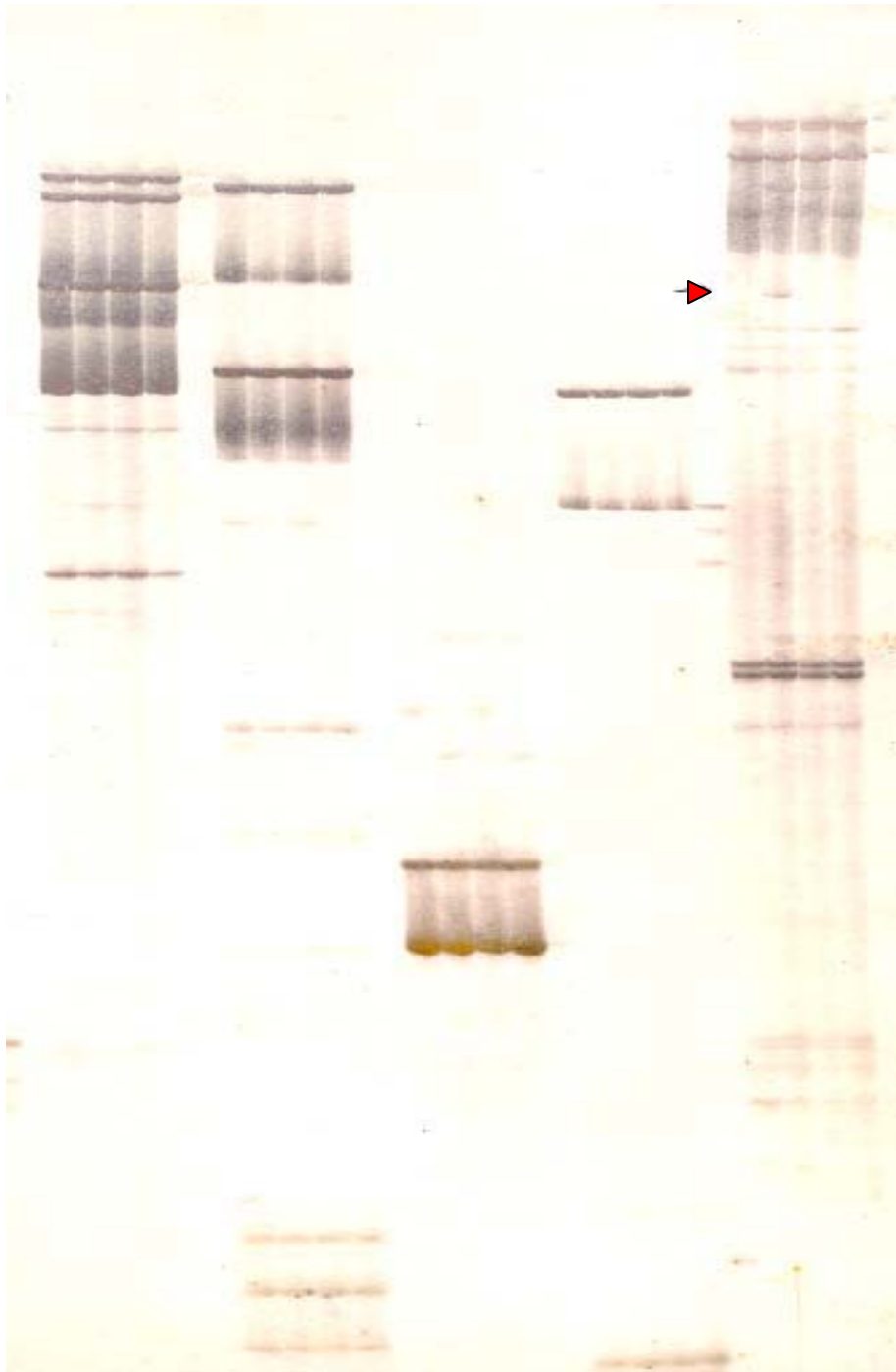


ภาพที่ 19 หลังนิคพ่นเชื้อราเขียว 7 วัน หนอนที่ตายมีเส้นใยสีขาว (mycelium) ปกคลุม (A) และหลังนิคพ่นเชื้อราเขียว 14-15 วัน หนอนที่ตายมีสปอร์สีเขียว (B)

การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล AFLP สำหรับการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อ *M. anisopliae* แต่ละสายพันธุ์เพื่อศึกษาข้อมูลทางด้านโมเลกุล โดยใช้วิธี Amplified fragment length polymorphism (AFLP) นั้น ลายพิมพ์ของเครื่องหมายโมเลกุล AFLP แสดงดังภาพที่ 14-15



ภาพที่ 20 ตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ของ *M. anisopliae* ที่ได้จาก ตัวอย่างดีเอ็นเอในแต่ละสายพันธุ์ และตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*/*TaqI* โดยตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ ทั้งนี้เครื่องหมาย ◀ แสดงตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ที่ปรากฏเฉพาะ



ภาพที่ 21 ตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ของ *M. anisopliae* ที่ได้จาก ตัวอย่างดีเอ็นเอในแต่ละสายพันธุ์ และตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI/TaqI* โดยตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ทั้งนี้เครื่องหมาย ◀ แสดง ตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ที่ปรากฏเฉพาะ

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การคัดเลือกเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก

จากการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว จำนวน 10 ไอโซเลท กับหนอนกระทู้ผัก 2 โดยวิธีปล่อยให้หนอนสัมผัสกับสปอร์ของเชื้อราเขียวในจานเลี้ยงเชื้อ ทั้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วเขี่ยหนอนออกมาวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ พร้อมใบค่น้ำเพื่อเป็นอาหาร พบว่า เชื้อราเขียว 3 ไอโซเลท คือ BCC 1858, BCC4849 และ Khon Kaen ทำให้หนอนตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 2 วัน สาเหตุที่ทำให้หนอนกระทู้ผัก 2 มีเปอร์เซ็นต์การตายสูง อาจเป็นเพราะเชื้อราเขียวทั้ง 3 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้เกิดโรคต่อแมลงและมีระดับความเข้มข้นของสปอร์สูง วิธีการนี้สามารถคัดเลือกหาเชื้อราเขียวที่มีประสิทธิภาพสูง ในการกำจัดแมลง จากจำนวนเชื้อทั้งหมด 10 ไอโซเลท ซึ่งเป็นวิธีประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของเชื้อราเขียว โดยยังไม่ได้คำนึงถึงระดับความเข้มข้นของสปอร์แต่อย่างใด ดังนั้นการศึกษาต่อไปนี้จะเน้นเฉพาะเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแมลงดังกล่าว

5.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 ชนิด ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา 3 ไอโซเลท พบว่าสูตรอาหาร Mungbean agar (MU) มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยทำให้เชื้อราเขียวเจริญได้ดีที่สุด ทั้ง 3 ไอโซเลท โดยสอดคล้องกับการทดลองของ Krutmuang (1996) ที่พบว่าเชื้อราเขียว *M. anisopliae* var. *majus* และ *M. anisopliae* var. *anisopliae* สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mungbean agar ที่ใช้ควบคุมปลวก อย่างไรก็ตามเชื้อราไอโซเลท BCC1858เจริญได้ดีบนอาหาร SDAY แต่ก็ไม่มีความแตกต่างจากการเลี้ยงบนอาหาร MU ขณะที่ยุพาและพิพัฒน์พงษ์ (2533) รายงานว่า เชื้อราเขียวสร้างเส้นใยได้ดีบนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แต่การทดลองครั้งนี้พบว่า สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MU ทำให้เชื้อรา 2 ไอโซเลท BCC 4849 และ Khon kaen เจริญได้ดีแตกต่างจาก PDA ยกเว้น BCC 1858 ที่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสูตรอาหาร PDA และ MU ผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mungbean agar ช่วยส่งเสริมให้เชื้อราเขียวมีการเจริญทางด้านเส้นใยและสปอร์ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่น ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการที่อาหารเลี้ยงเชื้อ Mungbean agar มีถั่วเขียวเป็นส่วนประกอบ

เนื่องจาก ถั่วเขียวมีธาตุไนโตรเจนสูง ซึ่งธาตุไนโตรเจนเจอได้ว่าเป็นธาตุอาหารหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อ (เกวลิน, 2547) และราคาต้นทุนการผลิตถูก วัตถุดิบหาซื้อง่าย ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่น ๆ จึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ Mungbean agar ดังนั้น หากจะมุ่งค้นหาและคัดเลือกหาไอโซเลทของเชื้อราเขียวที่มีศักยภาพในการป้องกันแมลงศัตรูพืช ขณะเดียวกันก็ควรมีแหล่งวัตถุดิบที่เหลือทิ้งในท้องถิ่นมาใช้ผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย จึงเป็นสิ่งที่น่าศึกษาและพัฒนาต่อไปอย่างยิ่ง (Bornos *et al.*, 1975 ; Heale *et al.*, 1989)

5.3 ผลของอุณหภูมิต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา 3 ไอโซเลท พบว่า อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด สำหรับเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท เนื่องจากสามารถสร้างเส้นใยและสปอร์ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Greves (1964), Li (1984) และ Milner *et al.* (1998) ที่กล่าวว่าเชื้อราเขียว *M. anisopliae* และ *B. bassiana* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส และจากรายงานของ Ihara *et al.* (2003) พบว่า เชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลท HF 293 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แต่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

5.4 ผลของแสงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

จากการทดลองเกี่ยวกับแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา 3 ไอโซเลท พบว่า เจริญเติบโตได้ดีที่ แสง 12 ชั่วโมงสลับกับที่มืด 12 ชั่วโมง เป็นช่วงแสงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท ซึ่งตรงข้ามกับการทดลองของ Welling *et al.* (1994) ที่กล่าวว่า *M. anisopliae* และ *M. flavoviridae* เจริญเติบโตได้ดีที่แสง 8 ชั่วโมง สลับกับที่มืด 16 ชั่วโมง

5.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลทกับ หนอนกระทู้ผักวัยที่ 1, 2 และ 3 พบว่าเชื้อราเขียวไอโซเลท BCC4849 ที่ระดับความเข้มข้น 6×10^8 สปอร์/มล. มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักสูงสุด โดยหลังจากทดสอบ 5 วันพบว่า หนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตาย 51.28 % และหลังจากทดสอบ 7 วันพบว่า หนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตาย 79.49 % จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ที่ระดับความเข้มข้น 6×10^8 สปอร์/มล. สามารถทำให้หนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 มีอัตราการตายสูง โดยที่ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า 6×10^8 สปอร์/มล. มีอัตราการตายน้อย อาจเกิดจากการใช้ระดับความเข้มข้นที่สูงเกินไป ซึ่งสอดคล้องกับ Bandara

and Ahangama (1994) ที่กล่าวว่าหากใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินไป จะมีผลไปลดประสิทธิภาพของเชื้อรา ซึ่งเชื้อราเกิดภาวะแข่งขันซึ่งกันและกัน ในการเข้าทำลายแมลง เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงต่ำ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงยังไม่สูงเท่าที่ควร อาจเป็นเพราะสภาพอุณหภูมิ และความชื้น ในการทดลองนี้อาจยังไม่เหมาะสมและอีกสาเหตุที่ทำให้เปอร์เซ็นต์การตายที่ไม่สูงมาก คือ การเก็บเชื้อไว้นานและการเก็บรักษาไม่เหมาะสม ทำให้เชื้อมีความรุนแรงลดลง ซึ่งอาจแก้ปัญหาโดยการใช้วิธี spray – drying technique โดยทำให้ blastospore ของเชื้อราแห้งและ/หรือ submerged conidia ซึ่งไม่ทำให้สูญเสียความมีชีวิตและเป็นการยืดเวลาการสูญเสียประสิทธิภาพของเชื้อรา ซึ่งสามารถใช้ได้กับเชื้อรา *M. anisopliae*, *M. flavoviridae* และ *B. bassiana* โดยใช้อุณหภูมิ inlet และ outlet ที่ 64.2 และ 48.2 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ protective agent ที่ดีที่สุด สำหรับ submerged spore คือ skimmed milk power ที่ความเข้มข้น 10 หรือ 20 เปอร์เซ็นต์ เติมน้ำตาล 2.5 เปอร์เซ็นต์ sugar beet syrup ลงไปเพื่อปรับปรุงความมีชีวิต หลังจากทำ spray – drying และการทดสอบการงอกของ spore เหล่านี้กับสปอร์ใหม่ๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งวิธีนี้สามารถเก็บรักษาสปอร์ของเชื้อราโรคแมลงได้ (Stephan and Zimmermann, 1998) ซึ่งขณะทำการทดลองมีการฉีดพ่นเชื้อราในตอนเย็น ซึ่งเป็นช่วงที่อุณหภูมิลดต่ำลง จึงไม่เป็นอันตรายต่อเชื้อราและการทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการนั้น เชื้อราไม่ได้รับแสงแดดโดยตรง ซึ่งปัจจัยของแสงมีผลกระทบต่อการใช้ชีวิตและการงอกของสปอร์ แสงอาทิตย์จะฆ่าสปอร์ของเชื้อราได้ (Roberts and Yendol, 1971) เชื้อราโรคแมลงในกลุ่ม Deuteromycetes จะไม่งอกที่ความชื้นต่ำกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ (Walstad et al. 1970) ความชื้นมีความสำคัญต่อการงอกของเชื้อราและยังมีอิทธิพลต่อการสร้างสปอร์บนตัวแมลงที่ตาย ซึ่งจะทำให้แพร่ระบาดไปยังแมลงตัวอื่นๆ ต่อไปได้ (Roberts and Yendol, 1971)

ผลการศึกษาครั้งนี้ พบเชื้อราเขียว *M. anisopliae* เป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตายนั้นสามารถยืนยันได้ เนื่องจากเมื่อพ่นเชื้อนี้ให้หนอนกระทู้ผักที่มีชีวิตอยู่ แล้วเมื่อมีการตายของหนอนกระทู้ผักเกิดขึ้น ได้นำซากหนอนมาฆ่าเชื้อที่ผิวทันที แล้วนำมาทำ moist chamber ก็พบเชื้อราเขียว *M. anisopliae* เจริญคลุมตัวหนอนกระทู้ผัก และในประเทศไทยมีการจำหน่ายเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ในรูปการค้า เช่น เมทาซาน ซึ่งอยู่ในรูปผงเปียกน้ำ เข้มข้น 1×10^9 cfu/gm อัตราที่ใช้ฉีดพ่น 50-100 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร เริ่มพ่นตั้งแต่ปริมาณของแมลงยังน้อยอยู่ และฉีดซ้ำทุก ๆ 5-7 วัน จนกว่าแมลงจะหยุดระบาด ซึ่งให้ผลดีในการป้องกันกำจัดแมลงปากดูดหลายชนิด อาทิเช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยอ่อน เพลี้ยจักจั่นสีเขียว หนอนด้วง และหนอนของผีเสื้อ สามารถใช้ผสมน้ำฉีดพ่นพืชผัก ไม้ผล ไม้ดอกและไม่ประดับทุกชนิด และทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช (บริษัท แอปพลายเค็ม ประเทศไทย, 2550)

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2534. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อรา. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการ เกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 167-176.
- ณรรฐพล วิลลีย์ลักษณ์. 2526. แมลงศัตรูพืชของประเทศไทย. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหา- วิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 205 หน้า.
- บริษัท แอปพลายเค็ม (ประเทศไทย) จำกัด. 2550. เมทาซาน. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล:
[http // appliedchem.net/TH/Doc/Metazan.pdf](http://appliedchem.net/TH/Doc/Metazan.pdf), 1 กันยายน 2550.
- ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535. โรควิทยาของแมลง. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 205 หน้า.
- ทิพย์วดี อรรถธรรม, กรรณิการ์ สีนวลมาก และจิรภา ปัญญาศิริ. 2546. เชื้อราของแมลงและ ศักยภาพในการใช้ควบคุมกำจัดเพลี้ยไฟ เรื่องเต็ม การประชุมวิชาการอารักขา พืชแห่งชาติครั้งที่ 6 เรื่องหนึ่งทศวรรษแห่งการอารักขาพืชในประเทศไทย. วันที่ 24- 27 พฤศจิกายน 2546 . ขอนแก่น. หน้า 704-717.
- ทัศนีย์ แจ่มจรรยา. 2526. แมลงศัตรูสำคัญทางเศรษฐกิจ. ภาควิชากีฏวิทยา คณะ เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 115 หน้า.
- มลิวัลย์ ปันยารชุน และอัจฉรา ดันติโชค. 2521. โรคราของแมลงในประเทศ ไทยและผล ของสิ่งแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อการงอกของเชื้อราของแมลง. แมลงและ สัตว์ศัตรูพืช 2521. กองกีฏ และสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 42 -54 .
- มลิวัลย์ ปันยารชุน. 2523. รายงานสรุปผลงานค้นคว้าวิจัยกีฏและสัตววิทยา. กองกีฏและ สัตว-วิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 58-59.
- มูลนิธิโครงการหลวง. 2548. คู่มือศัตรูไม้ดอกและการป้องกันกำจัด. เชียงใหม่. 160 หน้า.
- ยุพา หาญบุญทรง และ พิพัฒน์พงษ์ แคนลา. 2533. ศักยภาพการใช้เชื้อราเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sorok ในการป้องกันกำจัดปลวกใต้ดิน. ภาควิชา กีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ และ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น. 16 หน้า.
- วินัย รัชตปกรณชัย. 2535. แมลงศัตรูพืชผักตระกูลกะหล่ำและแนวทางการบริหาร. แมลงและ สัตว์-ศัตรูพืช 2535. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 142-151.
- สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2526. แมลงศัตรูพืชทางการเกษตรของประเทศไทย. ภาควิชาชีววิทยา คณะ วิทยา -ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 424 หน้า.
- ศิริวัลย์ สิริมังกรรัตน์. 2533. โรควิทยาของแมลง. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 140 หน้า.

ศิริลัย สิริมังกรรัตน์. 2544. การพัฒนาเพื่อผลิตมวลชีวภาพของเชื้อชีวินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูสำคัญทางเศรษฐกิจของข้าวหอมมะลิในเชิงพาณิชย์. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Alexopoulos, C. J., and C. W. Mims. 1979. Introductory Mycology. John Wiley & Sons Inc., New York. 632 p.

Ansari, M. A., S. Vestergaard, L. Tirry, and M. Moens. 2004. Selection of a highly virulent fungal isolate, *Metarhizium anisopliae* CLO 53, for controlling *Hoplia philanthus*. *J. Inverteb. Pathol.* 85(2): 89-96.

Baird, R. B. 1956. A list of attempts to control insects by means of entomogenous fungi. A supplement to use of fungous diseases in biological control of insects. 10th Intern. Congr. *Entomol.*, Montreal, Quebec.

Baird, R. B. 1958a. Use of fungous diseases in biological control of insects. 10th Intern. Congr. *Entomol.*, Montreal, vol 4: 689-692.

Baird, R. B. 1958b. The artificial control of insects by means of entomogenous fungi. a compilation of references with abstracts. 300 references. Entomology Laboratory, Belleville Ontario.

Bandara, J. M. R. S., and D. Ahangama. 1994. *Metarhizium* sp. : a new biocontrol agent for brown plant hopper management in rice fields. *Internat. Rice Res. News Lett.* 19(4): 19.

Bornos, G. D., D. J. Beethel, R. D. Eikenbary, J. T. Criswell, and G. R. Gentry. 1975. Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. *J. Inverteb. Pathol.* 25: 301-305.

Bruck, D. J., J. E. Snelling, A. J. Dreves, and S. T. Jaronski. 2005. Laboratory bioassays of *Delia radicum* (L.) larvae. *J. Inverteb. Pathol.* 89: 179-183.

Burdeos, A. T., and L. T. Villacarlos. 1988. Pathogenicity of three entomopathogenous fungi to adult sweet potato weevil, *Cylas formicarius* (F.). Pest Control Council of the Philippines, Philippines. 1 p.

Cobb, B. D., and J. M. Clarkson. 1993. Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. *Microbiology Letters.* 112: 319-324.

Greaves, T. 1964. Temperature studies of termite colonies in living tree. *Aust. J. Zool.* 12: 250-262.

Hajek, A. E., B. Huang, T. Dubois, M. Smith, and Z. Li. 2006. Field studies of control of

- Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae) using fiber bands containing the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*. 16: 329-343.
- Hashim, N., and Y. B. Ibrahim. 2003. Efficacy of entomopathogenic fungi, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *majus* against *Crocidolomia binotalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Pertanika. J. Trop. Agric. Sci.* 26(1): 134-139.
- Hawksworth, D. L. 1974. *Mycologist's Handbook*. Commonwealth Mycological Institute, England. 231 p.
- Heale, J. B., J. E. Isaac, and D. Chandler. 1989. Prospects for strain improvement in entomopathogenic fungi. *Pest. Sci.* 26: 79-92.
- Ibrahim, Y. B., and G. H. Tan. 1999. Bioefficacy of entomogenous fungal isolates of *Paecilomyces fumosoroseus*, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *majus* on *Hellula undalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Plant Prot. Tropics*. 12(2): 134-139.
- Ibrahim, Y. B., and F. Liu. 2001. Comparative pathogenicity of several isolates of *Metarhizium anisopliae* on *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *J. Biosci.* 12(1): 45-50.
- Ihara, F., T. Sato, and M. Toyama. 2003. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* to the chestnut weevil larvae under laboratory and field conditions. *Applied Entomology and Zoology*. 38: 461-456.
- Kao, C. W., and Y. S. Tsai. 1989. Control of Beet armyworm with entomopathogenic fungi. *Chinese J. Entomol.*, Special Publ., 4: 214-225.
- Kirtibutr, N. 1994. Microbial Control of wood Eating Termites. Report Research to the National Research Council of Thailand, Thailand. 47 p.
- Krutmuang, P. 1996. Laboratory studies on green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae* for control of termites (Isoptera). M.S. Thesis. Graduate school, Kasetsart University, Bangkok.
- Li, Y. H. 1984. The nest temperatures of Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. *Entomol. Knowledge* 21, 170-172 (in Chinese).

- Madelin, M. F. 1963. Disease caused by Hyphomycetous fungi, pp. 233-271. In E.A. Steinhaus (ed.). *Insect Pathology, An advanced Treatise*. Vol. 2. Academic Press, New York.
- Madelin, M. F., R. K. Robinson, and R. J. Williams. 1967. Appressorium like structures insect parasitizing Deuteromycetes. *J. Inverteb. Pathol.* 9: 404-412.
- Maniana, N. K. 1992. Pathogenicity of entomophagous fungi, (Hyphomycetes) to larvae of the stem borer, *Chio partellus* Swinhole and *Busseola fusca* Fuller. *Insect Science and Its Application* (ICIPE) 13(5): 691-696.
- McCauley, V. J. E., R. Y. Zachruk, and R. D. Tinline. 1968. Histopathology of green muscardine in larve of four species of Elateridies (Coleoptera). *J. Inverteb. Pathol.* 12: 444-459.
- Metchnikoff, E. 1888. *Pasteuria ramosa*, un représentant des bactéries a division longitudinale. *Ann Inst Pasteur* 2, 165-170.
- Milner, R. J., Staples, J. A. Staples and G. G. Lutton. 1997. The Effect of Humidity on Germination and Infection of Termites by the Hyphomycete, *Metarhizium anisipliae*. *J. Inverteb. Pathol.* 69: 64-69.
- Milner, R. J., J. A. Staples, and G. G. Lutton. 1998. The selection of an isolate of the hyphomycete fungus, *Metarhizium anisipliae* for control of termites in Australia. *Biol. Control.* 11, 240-247.
- Müller- Kögler, E. 1965. Pilzkrankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schadlingsbekämpfung an Grandlagen der Insektenmykologie, Pual Parey, Berlin.
- Mullen, L. M., and G. J. Goldsworthy. 2005. Immune responses of locusts to challenge with the pathogenic fungus *Metarhizium* or high doses of laminarin. *J. Insect. Physiol.* 52: 389-398.
- Pongpanich, K. 1992. Testing for Pathogenecity of Field Collection of *Beauveria* sp. and *Metarhizium* sp. on Teak Defoliator (*Hybleaea puera* Cramer). Progress Report of Reserarch Project. Office of Technical Forestry. Royal Forest Dept., Bangkok. 2 p.
- Roberts, D. W. 1970. Infection process of fungi, 14th Intern, Congr. *Entomol.* Abstract (Pathology) Kyoto, Japan 3-9 August 1970.

- Roberts, D. W., and W. G. Yendol. 1971. Use of fungi for microbial control of insects. In Burges. In Burges, H.D. and Hussey, N.W. (eds.), Microbial control of insects and mites, pp. 441-464. New York: Academic Press.
- Rombach, M. C., R. M. Aguda, B. M. Shepard, and D. W. Roberts. 1986. Infection of rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) with dry mycelium applications of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Phillippine Entomologist* . 6(6): 613-619.
- Sabbour, M. M. 2002. The Role of Chemical Additives in Enhancing the Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Against the Potato Tuber Moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Biosci.* 5 (11): 1155-1159.
- Sakchoowong, W. 1998. Effect of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin on Teak defoliator (*Hyblaea puera*. Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) M.S. Thesis. Graduate school, Kasartsart University, Bangkok.
- Samules, K. D. Z., J. B. Heale, and M. Llewellyn. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *J. Inverteb. Pathol.* 53: 25-31.
- Schabel, H. G. 1976. Oral infection of *Hylobius pales* by *Metarhizium anisopliae*. *J. Inverteb. Pathol.* 27: 377-383.
- Scholte, E. J., B. G. Knol, and W. Takken. 2004. Autodissemination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of the malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Malar J.* 28: 3(1)45.
- Silva, C. A. V., R. Barros, E. J. Marques, and J. B. Torres. 2003. Susceptibility of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Neotrop. Entomol.* 32(4): 653-658.
- Sosa-Gomez, D. R., D. G. Boucias and J. L. Nation. 1997. Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and Aldehydes. *J. Inverteb. Pathol.* 69 : 31-39.

- Stephan, D., and G. Zimmermann. 1998. Development of a spray - drying technique for submerged spores of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*. 8: 3-11.
- Uma, M. R. C., K. U. Devi, and P. A. A. Khan. 2006. Effect of combination treatment with entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Nomurae rileyi* (Hypocreales) on *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology* 16(12): 221- 232.
- Veen, K. H. 1966. Oral infection of second - instar nymphs of *Schistocerca gregaria* by *Metarhizium anisopliae* . *J. Inverteb. Pathol.* 8: 254-256.
- Walstad, J. D., R. F. Anderson, and W. J. Stambaugh. 1970. Effects of environmental condition on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *J. Inverteb. Pathol.* 16: 221-226.
- Welling, M., G. Nachtigall, and G. Zimmermann. 1994. *Metarhizium* spp. Isolates from Madagascar: Morphology and effect of high temperature on locust, *Locusta migratoria*. *J. Biocontrol.* 39: 351-361.
- Yendol, W. G. and J. D. Paschke. 1965. Pathology of an Entomophthora infection in the Eastern subteranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *J. Inverteb. Pathol.* 7: 414-422.
- Youngchaitrakul, S. 1999. An Investigation on the Effect of Using the Fungus, *Metarhizium anisopliae* for the Control of the House Fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). M.S. Thesis. Graduate School, Kasetsart University, Bangkok.
- Zacharuk, R. Y. 1973. Penetration of the cuticular layers of Elaterid larvae by the fungus *Metarhizium anisopliae*, and notes on bacterial invasion. *J. Inverteb. Pathol.* 21: 101-106.
- Zimmermann, G. 1992. *Metarhizium anisopliae* an entomopathogenic fungus. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer.* 45(63): 113-128.
- Zimmermann, G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biological agent. *Pestic. Sci.* 37: 375-379.

Output จากโครงการ

Programs and Abstracts

INTERNATIONAL SYMPOSIUM FOR THE ESTABLISHMENT OF SUSTAINABLE AND RECYCLING-BASED SOCIETY

THE SECOND KAGAWA UNIVERSITY – CHIANG MAI UNIVERSITY JOINT SYMPOSIUM 2008

October 16-18, 2008

Kagawa University,

Kagawa, Japan

Edited by:

Assoc. Prof. Hideyuki Sawada, Faculty of Engineering,

Prof. Takeshi Katayama, Faculty of Agriculture,

Prof. Masaaki Tokuda, Faculty of Medicine,

and Office for the Promotion of International Academic Exchange,

Kagawa University

Published by Kagawa University

Development of entomopathogenic microbial in Thailand

Patcharin Krutmuang¹, Malee Thungrabeab² and Jariya Visitpanich¹

¹Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

²Rajamangala University of Technology Lanna, Lampang

INTRODUCTION

Biological control with pathogenic agents is a promising alternative to chemical control against the insect pest of vegetable. Recently, the need to reduce the use of insecticides in the control of insect pest is more and more increasing. Entomopathogenic fungi are ideal candidates for integrated pest management (IPM) in forests and greenhouses (1). Biocontrol is the use of living organisms such as entomopathogens or natural enemies to kill others and to create a disease epidemic that spreads rapidly but targets only the harmful pest. Entomopathogenic fungi that parasitize insects are valuable weapons for biocontrol and play an important role in promoting integrated pest management. The aim of the present study was to evaluate the capacity of the fungus and select entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* that are highly virulent to *Thrips tabaci*(2) and *Spodoptera litura* (cutworm).

RESULTS AND DISCUSSIONS

Four isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (BCC 1964, 4810, 4849 and 5797) and four isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (BCC 2637, 5436, 6241 and 6966) were evaluated for their pathogenicity against the first instar of *Thrips tabaci* and 3 isolates of *Metarhizium anisopliae* fungus, BCC1858, BCC4849 and Khon Kaen were tested on cutworm. For thrips larvae were exposed by micro sprayer with conidial suspension at a single concentration of $10(8)$ spores/ml under laboratory conditions. *Metarhizium anisopliae* isolates caused cumulative mortality rates ranged from 20.85-97.61% at 5 days post-inoculation. The LT90 values in all the isolates did not exceed 5 days. The highest mortality of 97.61% was achieved by using *Metarhizium anisopliae* BCC 4849. Mortality rates more than 82% were observed in all isolates of *Beauveria bassiana*. For cutworm control, isolate 4849 with the concentration of 6×10^8 spores/ml was the most effective one. Microbial control with fungal pathogens provides promising new avenues for control of insect pest and could be a useful component of an integrated pest management program for the organic crops and ornamental industry.

Table 1 Percent mortality of thrips on vary stain of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*

Fungi	No.	strian	% mortality of 1st larvae at 5 days
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1	BCC 5797	46.27
	2	B CC 4810	20.85
	3	B CC 4849	97.61
	4	B CC 1964	95.00
<i>Beauveria bassiana</i>	5	BCC 6241	82.75
	6	BCC 2637	98.85
	7	BCC 5436	97.75
	8	BCC 6966	84.78

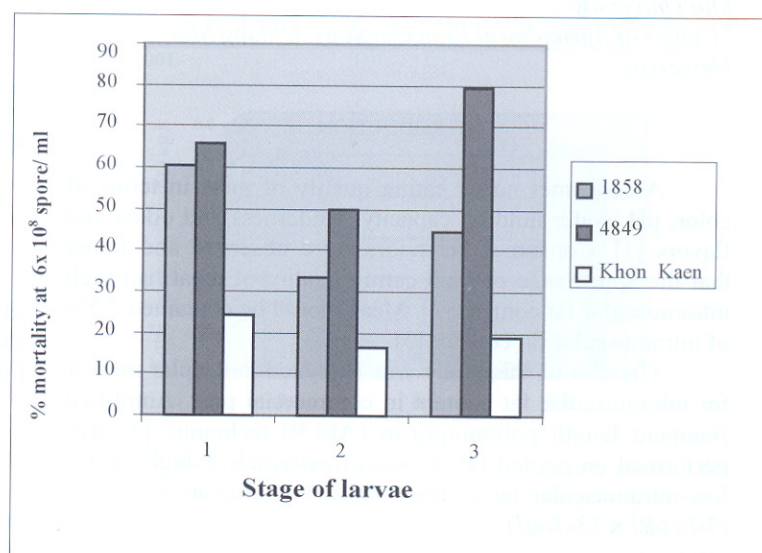


Fig. 1. Percent mortality of larvae of *Spodoptera litula* that treated with 6×10^8 spore/ml of 3 isolates of *Metarhizium anisopliae*

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by the Royal project and Highland Research and Development Institute (Public Organization). The author wish to thank BIOTEC Culture Collection (BCC) of National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) Thailand, for providing us with the various entomopathogenic fungi used in this study.

REFERENCES

- [1] Kaya and Lacey, 2000 H.K. Kaya and L.A. Lacey, Introduction to microbial control. In: L.A. Lacey and H.K. Kaya, Editors, *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, Kluwer Academic Publishers (2000), pp. 1-4.
- [2] Al Mazraawi MS. Interaction effects between *Beauveria bassiana* and imidacloprid against *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *Commun Agric Appl Biol Sci.* 2007;72(3):549-55.



Tropentag, October 7-9, 2008, Hohenheim

“Competition for Resources in a Changing World:
New Drive for Rural Development”

Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Metarhizium Anisopliae* and *Beauveria Bassiana* Against Thrips Tabaci (Thysanoptera: Thripidae)

PATCHARIN KRUTMUANG¹, MALEE THUNGRABEAB²

¹Chiang Mai University, Department of Entomology, Thailand

²Rajamangala University of Technology Lanna, Thailand

Abstract

Thrips tabaci is a polyphagous pest that attacks many different horticultural crop and ornamental plant species. Recently, the need to reduce the use of insecticides in the control of thrips is more and more increasing. On that account, the possibility to make use of the entomopathogenic fungus was tested to Thrips tabaci. Four isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (BCC 1964, 4810, 4849 and 5797) and four isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (BCC 2637, 5436, 6241 and 6966) were evaluated for their pathogenicity against the first instar of Thrips tabaci. Larvae were exposed by micro sprayer with conidial suspension at a single concentration of 10(8) spores/ml under laboratory conditions. (16L: 8D photoperiod, 30 +/- 1 degrees C temperature, 96 % RH). *Metarhizium anisopliae* isolates caused cumulative mortality rates ranged from 20.85–97.61 % at 5 days post-inoculation. The LT90 values in all the isolates did not exceed 5 days. The highest mortality of 97.61 % was achieved by using *Metarhizium anisopliae* BCC 4849. Mortality rates more than 82 % were observed in all isolates of *Beauveria bassiana*. Isolates of both fungal causing more than 80 % mortality will be subjected to dose-response mortality bioassays, 1 × 10(8), 10(7), 10(6), and 10(5) conidia/ml. However, the implications of above results in relation to thrips control in greenhouse and to future research are discussed. Microbial control with fungal pathogens provides promising new avenues for control of Thrips tabaci and related species and could be a useful component of an integrated pest management programme for the organic crops and ornamental industry.

Keywords: Thrips tabaci, *Beauveria bassiana*, entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*



Tropentag, October 7-9, 2008, Hohenheim

“Competition for Resources in a Changing World:
New Drive for Rural Development”

Selection of Entomopathogenic Fungi for *Spodoptera Litura* Control

PATCHARIN KRUTMUANG¹, SUPHATSA PRAKONGSUK², JARIYA VISITPANICH³

¹Chiang Mai University, Department of Entomology, Thailand

²Chiang Mai University, Department of Entomology,

³Chiang Mai University, Department of Entomology,

Abstract

Biological control with pathogenic fungi is a promising alternative to chemical control against the insect pest of vegetable. Ten isolates of green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae* as entomopathogenic fungus were used to test for pathogenicity on second instar of common cutworm, *Spodoptera litura* under the laboratory conditions. The tested larvae were placed in Petri dishes containing green muscardine fungus and they were allowed to make a direct contact with the particular entomogenous fungus. It was revealed that 3 isolates of green muscardine fungus, BCC1858, BCC4849 and Khon Kaen were effectively killed 100 % of the cutworm larvae within 2 days. Subsequently, *M. anisopliae* isolates were brought to examine with 8 different media for physiological properties. The result showed that mungbean agar (MU) was the best for mycelial growth and sporulation. Moreover, the optimum temperature for growth was ranged around 30–35 °C. When the isolates were kept in the room with 12 hours light alternated with 12 hours dark, they were produced more green spores than the other. [The best conditions for sporulation were observed when the isolates were kept at 30–35 °C with 12 hours light alternated with 12 hours dark.] When the 3 most effective isolates were tested with the 1st, 2nd and 3rd instars of cutworm at 4 concentration levels included of 10⁷, 10⁸, 10⁹ and 10¹⁰ spores/ml. The result indicated that the isolate 4849 with the concentration of 6×10^8 spores/ml was the most effective one. It was observed to cease the 3rd instar of cutworm by 79.49 % within 7 days.

Keywords: *Spodoptera litura*, Biological control, Entomopathogenic fungus, *metarhizium anisopliae*



Tropentag, October 11-13, 2006, Bonn

“Prosperity and Poverty in a Globalised World—
Challenges for Agricultural Research”

Aflp Characterisation of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium Anisopliae* Strains from Thailand

PATCHARIN KRUTMUANG

Chiang Mai University, Department of Entomology, Thailand

Abstract

Metarhizium anisopliae is a mitosporic entomopathogenic fungus that has been exploited extensively as biological control agent (BCA) against several pests. *Metarhizium anisopliae* isolates from several insect hosts and from various sugar cane growing areas of Thailand, were examined for genetic diversity using polymerase chain reaction (PCR)-based technology, involving amplified fragment length polymorphism (AFLP) was used to assess the genomic variability between 4 isolates of *Metarhizium* spp strains. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of entomopathogenic fungus evidence provides a means of obtaining a reproducible DNA profile in a relatively short period of time in species for which no sequence information is available. Genomic DNA from mycelium of each strain was optimised and the use of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) and sodium chloride (NaCl) was incorporated. All strains could be typed in these conditions. DNA were double-digested by two restriction endonucleases (EcoRI and MseI) and ligated to oligonucleotide adapters. Two consecutive PCR reactions (pre-amplification and selective amplification) were performed using a modification of the AFLP protocol described by Gibco (Invitrogen, Rockville, MD). The DNA fragments were separated by electrophoresis using silver staining for band visualisation. Based on 23 AFLP primer combinations, a total of 1504 bands were detected. An average of approx. 65 bands were scored for each primer pair. Among of which 3 polymorphic fragments (obtained from E-AGG/M-CAA, E-AGG/M-CAA, E-AGG/M-CAA) were identified as potentially a strain specific. DNA fragments of between 0.26 and 0.38 kp were obtained. These markers have practical utility for (1) establishing conspiracy in the cultivation and distribution of *Metarhizium* sp (2) identifying geographic sources. The results also suggest that AFLP markers may be useful for the tracking of specific biocontrol strains in the field.

Keywords: AFLP, Biological control agent (BCA), Entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*