การประเมินคุณสมบัติเชิงปริมาณและคุณภาพของสปอร์เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin ที่ผ่านการแยกด้วยเครื่องแยกสปอร์เพื่อการพัฒนาชีวภัณฑ์กำจัดแมลง

Quantitative and Qualitative Evaluation of Green Muscadine Fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin Collected by the Spore Separation Machine for Development of Insect Pest Biological Control Agent

ปาริชาติ จำรัสศรี[1,2] และ โสภณ อุไรชื่น[1,2*]

Parichat Jamrutsri[1,2] and Sopon Uraichuen[1,2*]

Abstract: Quantitative and qualitative evaluation of green muscadine fungus, *Metarhizium anisopliae* (GMF) collected by the spore separation machine was conducted to develop a biological control agent for the control of sugarcane longhorn stem borer (SLSB) *Dorysthenes buqueti*. The results showed that the number of GMF spores was decreased 29.84 percent after being filtered through the spore separator machine. Virulence and pathogenicity of GMF inoculum was then tested against SLSB larvae with 50-60 percent accumulative mortality after 30 days infection for the both spore suspension tested. Evaluation effect of tested formulations on viability of GMF conidia was hence taken place. After 12 months of storage at room temperature, GMF conidia obtained from spore separation machine mixed with sterile soil and coconut dust in different ratio was observed for its viability after 24 hours of incubation comparing with GMF sample kept without agent. The best formulation (mixing of soil and coconut dust at 3:1 ratio) gave the best performance with 58.47 percent of germination with the virulence SLSB larvae providing 60 percent of accumulative mortality whereas no mortality was observed from conventional product. This study has demonstrated that GMF could be mass produced in large quantity on rice substrate, then conidia separated and kept in suitable agent for at least 12 months with enough viability and pathogenicity for SLSB control.

Keywords: Biological control, Sugarcane insect pest, Entomopathogenic fungi

บทคัดย่อ: คุณสมบัติเชิงปริมาณและคุณภาพของเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* (GMF) ที่ผ่านการแยกด้วยเครื่องแยกสปอร์เพื่อพัฒนาชีวภัณฑ์เชื้อราเขียวที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ควบคุมหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *Dorysthenes buqueti* (SLSB) โดยผลการทดสอบพบว่าจำนวนสปอร์ของเชื้อราเขียวเมื่อทำการแยกสปอร์ออกจากข้าวสุก และกรองผ่านเครื่องแยกสปอร์มีความเข้มข้นของสปอร์ลดลง 29.84 เปอร์เซ็นต์ โดยคุณภาพการงอกก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์ที่ 24 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบการก่อโรคของเชื้อราเขียวที่ได้ทดสอบกับตัวอ่อนวัย 7 ของ *D. buqueti* พบว่า สามารถก่อโรคกับแมลงศัตรูอ้อยชนิดนี้ได้

[1]ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

[2]ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

[1]Department of Entomology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2]National Biological Control Research Center, Central Regional Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

*corresponding author: sopon.u@ku.ac.th

โดยมีค่าการตาย 50-60 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการนำสปอร์เชื้อราเขียวเก็บรักษาในรูปแบบผลิตภัณฑ์ต่างๆ เป็นเวลา 12 เดือน พบว่าเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อราเขียวหลังเก็บรักษาชีวภัณฑ์ โดยกรรมวิธีใส่ดินต่อขุยมะพร้าว (3:1) ผสมผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ มีการงอกที่มากที่สุดเท่ากับ 58.47 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเข้าก่อโรคในหนอนด้วงยาวเจาะลำต้นอ้อยได้ 60 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่รูปแบบชีวภัณฑ์แบบดั้งเดิมไม่ก่อให้เกิดการตายของ *D. buqueti* ดังนั้น รูปแบบชีวภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถเก็บไว้ได้นานอย่างน้อย 1 ปี โดยยังคงประสิทธิภาพการก่อโรคกับหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี แมลงศัตรูอ้อย เชื้อราก่อโรคแมลง

คำนำ

เชื้อราก่อโรคในแมลง (Entomopathogenic fungi) เป็นกลุ่มของเชื้อราที่มีในธรรมชาติ มีความสำคัญในการควบคุมปริมาณของแมลงให้อยู่ในสมดุล ปัจจุบันถูกพัฒนาใช้เพื่อจัดการแมลงศัตรูพืชหลายชนิด มีความจำเพาะสูง ปลอดภัยต่อแมลงที่มีประโยชน์ คน สัตว์ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ไม่มีสารพิษตกค้าง สามารถนำมาใช้ร่วมกับสารเคมีฆ่าแมลงได้ง่าย ส่วนข้อเสียคือจำเป็นต้องกำหนดเวลาการใช้ให้ถูกต้อง (ทิพย์วดี และคณะ, 2546) สำหรับเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* เป็นเชื้อราที่มีสีเขียวหม่น ที่มีการนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด ตัวอย่าง แมลงในอันดับ Diptera เช่น ยุงลายบ้าน ยุงลายสวน *Aedes albopictus* ยุงรำคาญ *Culex quinquefesciatus* ยุงก้นปล่อง *Anoppheles gambiae* (Scholte *et al*., 2003; Scholte *et al*., 2007) อันดับ Hemiptera เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* (เพชรหทัย และอัจฉราภรณ์, 2550; อารยา และคณะ, 2558), แมลงหวี่ขาว (*Bemisia argentifolii*) (Wraight *et al*., 2000) และอันดับ Coleoptera เช่น ด้วงแรดมะพร้าว *Oryctes rhinoceros* L. (เสาวนิตย์ และคณะ, 2561) ด้วงเจาะไม้ *Scolytus scolytus* (F.) (Doberski, 1981) และเป็นศัตรูธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพสามารถทำลายด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย (*Dorysthenes buqueti Guerin*) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูสำคัญของอ้อย (Kernasa, 2016) ได้ทุกระยะ ตั้งแต่ระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งทำลายระยะหนอนได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นการควบคุมโดยชีววิธีที่มีประสิทธิภาพมากวิธีหนึ่ง รวมทั้งเชื้อราชนิดนี้สามารถมีชีวิตอยู่ในดินได้นานกว่า 3 ปี ทำให้มีระยะการควบคุมได้นาน (ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านอารักขาพืช, 2011)

การนำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* มาใช้ประโยชน์จำเป็นต้องมีกระบวนการเพิ่มปริมาณอย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันใช้ข้าวเสาไห้หุงแบบกึ่งสุกกึ่งดิบมาเพาะเลี้ยงเป็นเชื้อสดก่อนนำไปใช้ประโยชน์ แต่ไม่สามารถเก็บรักษาเชื้อสดในรูปแบบข้าวไว้ได้นาน เชื้อมีความรุนแรงลดลง ไม่สะดวกและยากต่อการขนส่ง เนื่องจากมีน้ำหนักมาก ต้องมีชีวิตรอดจนกว่าจะเกิดการสัมผัสกับแมลง และต้องมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อเกษตรกรในการนำไปใช้ (ทิพย์วดี และคณะ, 2546)

ในปี พ.ศ. 2560 ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง ได้มีโครงการจัดทำเครื่องมือสำหรับแยกสปอร์ของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ออกจากเมล็ดข้าว และกระบวนการผลิตสปอร์ของเชื้อราเขียวอยู่ในรูปแบบที่มีน้ำหนักเบา เพื่อความสะดวกต่อการนำไปใช้ของเกษตรกรชาวไร่อ้อยควบคุมด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อยในพื้นที่มีการระบาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Uraichuen *et al*., 2018)

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณและคุณภาพของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ที่ผ่านเครื่องแยกสปอร์ว่าไม่แตกต่างจากก่อนผ่านเครื่องแยกสปอร์ดังกล่าว เพื่อนำไปพัฒนากระบวนการผลิตได้รวดเร็วขึ้น เก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานานขึ้น ใช้ง่าย น้ำหนักเบา และสะดวกต่อเกษตรกรในการนำไปใช้ในไร่อ้อย

Agricultural Science and Management J. 2 (2) : 25-34 (2019)

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* ที่ปลอดเชื้อราเขียว *M. anisopliae*

เก็บรวบรวมหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย D. buqueti จากแปลงปลูกอ้อยในเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม (N14º02.077' E099º55.255') นำกลับมาเลี้ยงด้วยอาหารเทียม (Southland Products, 2017) ในภาชนะพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร จำนวน 1 ตัวต่อกล่อง ในห้องปฏิบัติการอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก 7 วัน เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อเป็นการยืนยันว่าหนอนไม่ติดเชื้อราเขียว M. anisopliae มาจากแปลง หนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย D. buqueti ที่ใช้ทดสอบเป็นหนอนที่อยู่ในวัย 7 ทำการเพาะเลี้ยง ณ ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

ส่วนที่ 1 การศึกษาคุณสมบัติเชิงปริมาณ คุณภาพและการก่อโรคของสปอร์เชื้อราเขียวก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์

การทดลองย่อยที่ 1.1 ศึกษาความเข้มข้นของสปอร์ก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์ นำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* อายุ 14 วัน ที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าวเสาไห้หุงแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ 250 กรัม เป็นไอโซเลทของศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง มาแช่น้ำกลั่นที่ผสม Triton X 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นกรองสปอร์แขวนลอยออกจากเมล็ดข้าว นำสปอร์แขวนลอยที่ได้ไปตรวจนับความเข้มข้นของสปอร์ จำนวน 10 ซ้ำ และนำสปอร์แขวนลอยไปผ่านเครื่องแยกสปอร์ (Uraichuen *et al*., 2018) ทำการตรวจนับความเข้มข้นของผงสปอร์ที่ได้หลังจากผ่านเครื่องมือแยกสปอร์เปรียบเทียบกับความเข้มข้นก่อนผ่านเครื่องมือแยกสปอร์ และวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยสถิติ Dependent-Sample *t* test

การทดลองย่อยที่ 1.2 ศึกษาคุณภาพการงอกของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์ นำสปอร์แขวนลอยสปอร์ก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดบนอาหาร PDA และเกลี่ยให้ทั่วบริเวณของผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA เป็นสี่เหลี่ยมขนาด 1x1 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้นต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งหมด 5 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ย้ายชิ้นวุ้นวางบนแผ่นสไลด์ โดยหงายด้านที่มีสปอร์ขึ้น หยด Lactophenol cotton blue ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นับจำนวนสปอร์ที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากจำนวน 300 สปอร์ โดยสปอร์ที่งอกพิจารณาจากความยาวของ germ tube ต้องยาวมากกว่าขนาดความกว้างของสปอร์ (วนิดา, 2559) นำข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยสถิติ Dependent-Sample *t* test

การทดลองย่อยที่ 1.3 การทดสอบประสิทธิภาพการเข้าก่อโรคของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* กับหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* นำสปอร์ของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (pathogenic bioassay) ต่อการก่อโรคกับหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* วัย 7 เตรียมสปอร์แขวนลอย โดยนำสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* ก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นหยดสปอร์แขวนลอย ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงบนอกปล้องแรกของหนอนด้วงหนวดยาววัย 7 (Kernasa, 2016) จำนวน 10 ตัว อีก 10 ตัว ไม่ได้รับการหยดสปอร์แขวนลอย (ชุดควบคุม) สังเกตการตายของหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* บันทึกผลทุกวัน เป็นเวลา 20 วัน นำผลการตายของหนอนไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti*

ส่วนที่ 2 การศึกษารูปแบบชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา และฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ต่อการเกิดโรคบนหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti*

การเตรียมชีวภัณฑ์ นำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ที่ผ่านเครื่องแยกสปอร์ในส่วนที่ผสมดิน (ดินที่ใช้ทดสอบมาจากแปลงอ้อยในศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ขนาดไม่เกิน 400 ไมครอน) และขุยมะพร้าว (จากโรงงานแปรรูปมะพร้าว ต.จอมปลวก อ.บางคนที จ.สมุทรสงคราม ขนาดไม่เกิน 400 ไมครอน) นึ่งฆ่าเชื้อในดินและในขุยมะพร้าวด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นผสมวัสดุต่างๆ โดยน้ำหนักลงในขวดขนาด 20 มิลลิลิตร ให้ได้ 10 กรัมตามอัตราส่วนต่างๆ ทั้ง 7 กรรมวิธี (Table 1) ใส่ผงสปอร์ลงไป ใช้ Vortex ในการทำให้วัสดุในขวดเข้ากัน เป็นเวลา 5 นาที แบ่งมา 5 กรัมต่อกรรมวิธี (50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักในแต่ละกรรมวิธี) ยกเว้นกรรมวิธีผงสปอร์ไม่ผสมวัสดุใดๆ ใช้ผงสปอร์หลังผ่านเครื่องแยกสปอร์ 0.2 กรัม จากน้ำหนักเริ่มต้น 10 กรัม ซึ่งคิดเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ นน./นน.[(0.2 กรัมx100)/10 กรัม] เพื่อใช้ทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอก และฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการเกิดโรคของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ต่อด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* ในขั้นตอนต่อไป

Table 1 Treatments applied for germination tests of Green muscadine fungus (GMF), *Metarhizium anisopliae* and pathogenic assay on mortality of 7th instar larvae of Dorysthenes buqueti

Treatment	Formulation
T1	GMF massed on rice half cooked (conventional)[1/]
T2	Pure spore powder[1/]
T3	Soil:Coconut dust (4:0) + pure spore powder 0.2 %[2/]
T4	Soil:Coconut dust (3:1) + pure spore powder 0.2 %[2/]
T5	Soil:Coconut dust (1:1) + pure spore powder 0.2 %[2/]
T6	Soil:Coconut dust (1:3) + pure spore powder 0.2 %[2/]
T7	Soil:Coconut dust (0:4) + pure spore powder 0.2 %[2/]

[1/] Use concentration 1×10^8 spore/milliliter.

[2/] Use pure spore powder 0.2 percent of initial weight (10 g.).

การทดลองย่อยที่ 2.1 การทดสอบรูปแบบชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อการงอกของเชื้อราเขียว M. anisopliae ด้วยการเก็บรักษาในรูปแบบต่าง ๆ ด้วยการเก็บรักษาในรูปแบบต่างๆ 7 กรรมวิธี (Table 1) นำชีวภัณฑ์ที่เตรียมมาทดสอบความงอกทำวิธีการเดียวกับการทดลองย่อยที่ 1.2 ณ เวลา 1, 2, 3 และ 12 เดือน หลังเริ่มการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple-Range Test (DMRT)

Agricultural Science and Management J. 2 (2) : 25-34 (2019)

การทดลองย่อยที่ 2.2 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ต่อการก่อโรคของสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* หลังเก็บรักษาเป็นเวลา 1 ปี กับหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* วัย 7 นำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จากการเก็บรักษารูปแบบต่างๆ (Table 1) มาทำสปอร์แขวนลอย โดยนำสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* แต่ละรูปแบบ น้ำหนัก 5 กรัม มาผสมน้ำกลั่นที่ผสม Triton X ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นให้ได้ 1×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการก่อโรคของสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* วิธีการเดียวกับการทดลองย่อยที่ 1.3 นับจำนวนหนอนตายสะสมจนครบ 20 วัน

ผลการศึกษา

ส่วนที่ 1 ความเข้มข้นของสปอร์ คุณภาพการงอกของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* และการเข้าก่อโรคกับหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* ก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์

ก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์ ความเข้มข้นของสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.91×10^7 และ 1.34×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) มากกว่าความเข้มข้นของสปอร์หลังผ่านเครื่องมือแยกสปอร์ คิดเป็น 29.84 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสปอร์เริ่มต้นก่อนผ่านเครื่องแยกสปอร์

ในส่วนของคุณภาพการงอกของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์ พบว่าค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* มีค่าเท่ากับ 99.6 และ 99.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (Table 2)

Table 2 Quantitative and qualitative comparisons of the green muscadine fungus (GMF), *Metarhizium anisopliae* spore suspension before and after filtering by separation machine

Treatment	Concentration (Spore/ml) Mean±S.D.	Concentration (%)	GMF Germination (%)	Mortality (%)[1/]
Before filter	1.91±0.16	100.00	99.60	50
After filter	1.34±0.77	70.16[2/]	99.19	60
t-test	*		ns	

* Significantly different ($p>0.05$)

ns = Non significant

[1/] Percentage of mortality of the 7th instar larvae, cut off at day 20

[2/] Based on concentration of spore before being filtered by separation machine

การทดสอบการก่อโรคในแมลงของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ในวันที่ 7 วัน ตัวหนอนเริ่มตาย ลำตัวมีสีขุ่นขึ้นจากเดิม (Figure 1(a)) ลำตัวแข็ง (Figure 1(b)) เมื่อผ่านไป 7 วัน สปอร์เริ่มขึ้นที่ลำตัวเป็นสีขาวมีน้อยและยังมองเห็นไม่ชัด ถัดมาในวันที่ 10 สปอร์ขึ้นเป็นสีขาวเต็มลำตัวมองเห็นชัดเจน (Figure 1(c)) และค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียวในวันที่ 12 (Figure 1(d)) โดยก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์หนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* มีการตาย 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 2)

Figure 1 Infected symptoms of the 7th instar larvae of *Dorysthenes buqueti*, untreated and treated with *Metarhizium anisopliae* spore suspension
(a) Untreated treatment, the 7th instar larvae after spore suspension application at 7 days(b) 10 days (c) and 12 days (d)

ส่วนที่ 2 การศึกษารูปแบบชีวภัณฑ์ที่เหมาะสำหรับการเก็บรักษา และฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการเกิดโรคของเชื้อราเขียว *M. anisopliae*

การทดลองย่อยที่ 2.1 การตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* เมื่อเวลาผ่านไปเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลงทุกกรรมวิธี (ชีวภัณฑ์) โดยพบว่า กรรมวิธีที่เก็บในดินต่อขุยมะพร้าว (3:1) ผสมผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ (T4) มีการงอกสูงที่สุด ตลอดระยะเวลา 12 เดือน (58.47 เปอร์เซ็นต์) ถัดมาคือ กรรมวิธีที่เก็บในดินต่อขุยมะพร้าว (4:0) ผสมผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ (T3), กรรมวิธีดินต่อขุยมะพร้าว (1:1) ผสมผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ (T5), กรรมวิธีดินต่อขุยมะพร้าว (1:3) ผสมผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ (T6) และกรรมวิธีดินต่อขุยมะพร้าว (0:4) ผสมผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ (T7) ตามลำดับ แต่สปอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยข้าวเสาไห้หุงแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ (T1) พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกดีในช่วง 2 เดือนแรก และลดลงอย่างมากในเดือนที่ 3 ส่วนกรรมวิธีที่เก็บผงสปอร์ที่ผ่านเครื่องแยกสปอร์และไม่ผสมวัสดุใดๆ (T2) มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำมากตั้งแต่เดือนแรก (4.27 เปอร์เซ็นต์) (Table 3)

Table 2 Percentage of germination (Mean±S.D.) of Green muscadine fungus (GMF), *Metarhizium anisopliae* after being kept for 1, 2, 3 and 12 months under room temperature 25±2 ºC (N=300)

GMF Spore Formulation[1/]	Months[2/]			
	1	2	3	12
T1	83.60±3.56[a]	71.46±2.34[a]	25.53±2.65[a]	00.00±0.00[a]
T2	4.27±1.70[b]	1.13±0.08[b]	00.00±0.00[b]	00.00±0.00[a]
T3	76.20±5.85[c]	55.40±4.41[c]	49.53±4.83[c]	46.13±5.06[b]
T4	90.80±3.38[a]	75.20±4.91[a]	61.73±3.81[d]	58.47±3.42[c]
T5	86.53±5.46[a]	55.80±3.96[c]	48.67±4.83[c]	40.20±3.74[d]
T6	18.66±6.42[d]	26.47±5.77[d]	28.87±4.55[a]	24.07±2.86[e]
T7	25.20±9.58[d]	18.47±18.47[e]	20.47±4.11[e]	15.93±1.75[f]

[1/] See abbreviations details of GMF formulation in Table 1

[2/] Means within a column followed by the same superscript was not significantly different (p>0.05) by DMRT

การทดลองย่อยที่ 2.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (pathogenicity bioassay) ต่อการก่อโรคของสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* หลังเก็บรักษาเป็นเวลา 1 ปี กับหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* เป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่าจำนวนหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* วัย 7 ที่ทดสอบกับชีวภัณฑ์ที่เก็บรักษาในดิน : ขุยมะพร้าว (3:1) ผสมผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ (T4) มีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของหนอนสูงที่สุดเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาคือ กรรมวิธีที่เก็บรักษาในดิน : ขุยมะพร้าว (4:0) ผสมผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ (T3), ดิน : ขุยมะพร้าว (1:1) ผสมผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ (T5), ดิน : ขุยมะพร้าว (1:3) ผสมผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ (T6) และกรรมวิธีดิน : ขุยมะพร้าว (0:4) ผสมผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ (T7) โดยมีค่าเท่ากับ 40, 50, 50 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้การทดสอบในชุดควบคุม, กรรมวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยข้าวเสาไห้หุงแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ (T1) และกรรมวิธีผงสปอร์ไม่ผสมวัสดุใดๆ พบว่าหนอนมีชีวิตรอดทั้งหมด (Figure 2)

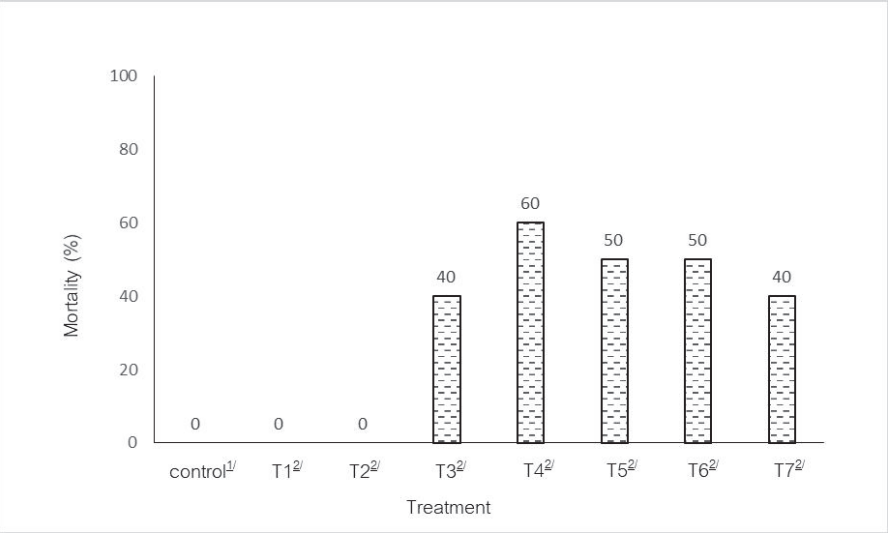

Figure 2 Percentage of mortality of 7th instar larvae *Dorysthenes buqueti* treated with Green muscadine fungus (GMF), *Metarhizium anisopliae*, cut off after day 20.
1/control = Distilled water + Triton X 0.05 percent
2/See abbreviations details of GMF formulation in Table 1

วิจารณ์

คุณภาพการงอกของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ก่อนและหลังผ่านเครื่องแยกสปอร์มีความใกล้เคียงกับงานทดลองของ Ibrahim *et al*. (2015) ที่รายงานว่า การงอกของสปอร์ที่หุงด้วยข้าวก่อนนำไปทำให้แห้งมีเปอร์เซ็นต์การงอก 98.2 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากนำไปทำให้แห้ง มีความงอกของสปอร์เท่ากับ 83.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการตรวจนับความเข้มข้นของสปอร์ก่อนและหลังจากผ่านเครื่องมือแยกสปอร์ พบว่าก่อนผ่านเครื่องมือแยกสปอร์ สปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* มีความเข้มข้น 1.91×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มากกว่าความเข้มข้นของสปอร์หลังผ่านเครื่องมือแยกสปอร์ ซึ่งมีความเข้มข้นเพียง 1.34×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งความเข้มข้นที่ได้ในการทดลองนี้มีค่าต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสปอร์ที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าวเสาไห้อายุ 10 วัน ของ นริศ และคณะ (2552) ที่มีความเข้มข้น 1.6×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การทดสอบรูปแบบชีวภัณฑ์แบบต่างๆ ของสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* หลังผ่านเครื่อง

แยกสปอร์ ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผงสปอร์ที่ผ่านเครื่องแยกสปอร์แล้วแต่ไม่มีการผสมวัสดุใดๆ มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เพียง 4.26 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นเพราะสปอร์ได้รับน้ำระหว่างผ่านเครื่อง และต่อมาถูกทำให้แห้ง สปอร์อาจมีการสร้างเส้นใยขึ้นมาแต่ไม่สร้างสปอร์ขึ้นมาใหม่เพราะไม่มีตัวนำพาให้เจริญเติบโต ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Magan (2001) ที่รายงานไว้ว่า คุณภาพของสปอร์เมื่อถูกน้ำแล้วเก็บไว้มีผลกระทบต่อการมีชีวิตรอด จึงทำให้เกิดการงอกน้อยหรือไม่เกิดการงอกของสปอร์ นอกจากนี้ ในงานทดลองของ ตุลยา (2551) ได้รายงานว่า ผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* 3 สูตร ซึ่งมีการปรับสภาพกรด-ด่าง เท่ากับ 7 เมื่อผ่านไป 15 วัน มีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ 81.17-93.37 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ถึง 52 วัน มีอัตราการรอดชีวิตต่ำถึง 1.36 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าการงอกของสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* ที่เก็บไว้นานขึ้นจะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การงอกลดต่ำลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษา และสอดคล้องกับ Hamid *et al*., (2005) ที่รายงานว่า เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* ลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเวลาผ่านไปโดยมีอุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ซึ่งพบว่าอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Roberto et al., (2002) ที่รายงานว่า การเก็บรักษาเชื้อรากำจัดศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีการงอกของสปอร์สูงกว่าการงอกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส อีกทั้งการผสมสารพาชนิดต่างๆ เช่น ดิน ทราย หรือวัสดุทางการเกษตร ลงไปในผงสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* ที่ได้ สามารถยืดอายุของเชื้อราได้นานยิ่งขึ้น (Daoust *et al*., 1983) และยังสอดคล้องกับงานทดลองของนวลศิริ และคณะ (2561) ที่รายงานไว้ว่า สารพาทุกชนิดมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดิน อินทรียวัตถุ และทราย

ในขณะที่การทดสอบประสิทธิภาพของการก่อโรคในแมลงของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ที่มีต่อหนอนด้วงยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* วัย 7 เมื่อเก็บรักษาเชื้อไว้เป็นระยะเวลา 12 เดือน พบว่า ในชุดควบคุมหยดน้ำกลั่นผสม Triton X 0.05 เปอร์เซ็นต์ ผลปรากฏว่าตัวหนอนไม่ตาย ส่วนในชุดการเก็บรักษาในรูปแบบต่างๆ มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอน ในช่วงระหว่าง 30 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความสอดคล้องกับ Kernasa (2016) ที่รายงานว่า ผลการทดสอบหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *D. buqueti* วัยที่ใกล้เข้าดักแด้ (วัย 7, 8 และ 9) มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และยังสอดคล้องกับงานของ Hamid *et al*., (2005) พบว่า สปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 เดือน แม้ว่า มีการงอกของสปอร์เพียง 1.6 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังสามารถมีประสิทธิภาพในการฆ่าตัวอ่อนของ *Oryctes rhinoceros* ได้

สรุป

ความเข้มข้นของสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* ก่อนและหลังจากผ่านเครื่องแยกสปอร์ในเชิงปริมาณมีความแตกต่างกัน 29.84 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังคงมีคุณภาพการงอกได้ 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในเชิงคุณภาพ พบว่าเมื่อนำไปทำการเก็บรักษาในรูปแบบชีวภัณฑ์ต่างๆ พบว่ารูปแบบการเก็บรักษาที่ดีที่สุด คือรูปแบบชีวภัณฑ์ที่พัฒนาขึ้นโดยการเก็บผงสปอร์ 2 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนผสมของดินและขุยมะพร้าวอัตราส่วน 3:1 โดยสามารถเก็บไว้ได้นาน 1 ปี นอกจากนี้สปอร์ยังมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเข้าก่อโรคกับหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อยวัย 7 ได้ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยยังคงประสิทธิภาพการก่อโรคกับหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* เพื่อใช้ควบคุม D. buqueti ต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

ตุลยา กลับแก้ว. 2551. อายุการเก็บรักษาและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *Bacillus thruringensis* JC50 ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 88 หน้า.

ทิพย์วดี อรรถธรรม กรรณิการ์ สีนวลมาก และจีรภา ปัญญาศิริ. 2546. เชื้อราของแมลงและศักยภาพในการใช้ควบคุมกำจัดเพลี้ยไฟ. หน้า 704-717. ใน เรื่องเต็มการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 6 “หนึ่งทศวรรษแห่งการอารักขาพืชในประเทศไทย” วันที่ 24-27 พฤศจิกายน 2546 จังหวัดขอนแก่น.

นริศ ท้าวจันทร์ อนุชิต ชินาจริยวงศ์ และ วิวัฒน์ เสือสะอาด. 2552. การเพิ่มปริมาณสปอร์เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin ด้วยวัสดุทางการเกษตรในการเกษตรอินทรีย์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 40(3) พิเศษ: 555-558.

นวลศิริ สีบุญมี วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ ไสว บูรณพานิชพันธุ์ ปภพ สินชยกุล และจิราพร กุลสาริน. 2561. ประสิทธิภาพสารพาบางชนิดในการเก็บรักษาเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* MRT-PCH 048 เพื่อควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล. วารสารเกษตร 34(2): 227-234.

เพชรหทัย ปฏิรูปานุสร และอัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อราทำลายแมลงต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียว. รายงานการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2550. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, กรมการข้าว. กรุงเทพฯ.

วนิดา เพ็ชร์ลมลุ. 2559. การมีชีวิตรอดของสปอร์เชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่ผลิตได้จากกากตะกอนดีแคนเตอร์ และน้ำทิ้งหลังผลิตไฮโดรเจน ภายใต้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 21(1): 14-25.

ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านอารักขาพืช. 2011. เชื้อราเมตตาไรเซียม (ควบคุมด้วงหนวดยาวอ้อย). แหล่งที่มา: http://www.pmc04.doae.go.th/Myweb2011data1/14%20Metarhizium%201/14Metta01.html, 24 ตุลาคม 2561.

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ อิศเรศ เทียนทัด เทธาสิทธิ์ คนการ และอนุสรณ์ พงษ์มี. 2561. การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมแบบอัดเม็ดและประยุกต์ใช้ในการกำจัดด้วงแรด (*Oryctes rhinoceros* L.). วารสารเกษตร 36(2): 199-210.

อารยา บุญศักดิ์ วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ ไสว บูรณพานิชพันธุ์ และจิราพร กุลสาริน. 2558. การคัดเลือกเชื้อรา Metarhizium anisopliae (Metschnioff) Sorokin ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาข้าว. วารสารเกษตร 31(3): 291-299.

Daoust, R. A., M. G. Ward, and D. W. Roberts. 1983. Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. Journal of Invertebrate Pathology 41(2): 151-160.

Doberski, J.W. 1981. Comparative laboratory studies on three fungal pathogens of the elm bark beetle *Scolytus scolytus*: Effect of temperature and humidity on infection by Beauveria bassiana, *Metarhizium anisopliae*, and Paecilomyces farinosus. Journal of Invertebrate Pathology 37: 195-200.

Hamid, N. H., R. Moslim, H. Salim, M.B. Wahid, N. Kamarudin, and S. Hamzah. 2005. Powder formulation of *Metarhizium anisopliae*, its Stability and effects against *Oryctes* beetles tested in

laboratory and small scale field trial. Proceedings of the PIPOC 2005 International Palm Oil Congress (Agriculture, Biotechnology and Sustainability), September 25-29, 2005, Kuala Lumpur, Malaysia.

Ibrahim, L., L. Laham, A. Touma and S. Ibrahim. 2015. Mass production, yield, quality, formulation and efficacy of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* conidia. British Journal of Applied Science and Technology 9(5): 427-440.

Kernasa, N. 2016. Geographical Distribution of *Dorysthenes buqueti* Guerin (Coleoptera: Cerambycidae) and Genetic Diversity of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin in Sugarcane Plantations in Thailand. Ph.D. Thesis, Kasetsart University. 56 pages.

Magan, N. 2001. Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. In ''Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential'' (T. M. Butt, C. Jackson, and N. Magan, eds.), pp. 239–251. CABI Publishing, New York.

Roberto, T.A., R.P. Bateman, G. Jane, P. Chris and R.S. Leather. 2002. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisiopliae* conidia. Neotropical Entomology 31(1): 91-99.

Scholte, E.J., B.N. Nliru, R.C. Smallegange, W. Takken, and B.G. Knol. 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiaes*. s. s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vector with entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Malaria Journal 2(29): doi: 10.1186/1475-2875-2-29.

Scholte, E.J., W. Takken, and B.G. Knol. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. Albophitus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Acta Tropical 102: 151-158.

Southland Products. 2017. Sugarcane Borer Diets. 201 Stuart Island Road Lake Village, Arkansas 71653.

Uraichuen, S., N. Kernasa, T. Cheepsomsong, A. Chinajariyawong and S. Tunnakundecha. 2018. Quantitative and qualitative evaluation of muscadine fungus, *Metarhizium anisopliae* collected by the spore separation machine. Paper presented at the IAPSIT International Sugar Conference, March 6-9, 2018, Charoen Hotel, Udonthani, Thailand.

Wraight, S.P., R.I. Carruthers, S.T. Jaronski, C.A. Bradley, C.J. Garza and S. Galaini-Wraight. 2000. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. Biological Control 17: 203-217.