การคัดเลือกเชื้อรา Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Nilaparvata lugens (Stål))

อารยา บุญศักดิ์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
กรกฎาคม 2558
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stål))"
ของนางสาวอารยา บุญศักดิ์
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร. จิราพร กุลสาริน)

.....ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ)

.....กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไสว บูรณพานิชพันธุ์)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง)

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุรี กระจายกลาง)

อนุมัติ

.....
(ดร.ภาณุ พุทธวงศ์)
รองคณบดีฝ่ายบริหารและวางแผน ปฏิบัติราชการแทน
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

21 ก.ค. 2558

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจากหลาย ๆ ท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในการศึกษาวิจัยอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง และความช่วยเหลือในเรื่องเครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยรวมทั้งเงินทุนในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไสว บูรณพานิชพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.จิราพร กุลสาริน ดร.เยาวลักษณ์ จันทร์บาง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุรี กระจายกลาง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและความช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบพระคุณอาจารย์คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมทุกท่านและบุคลากรศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง ที่ให้คำปรึกษาตลอดจนความช่วยเหลือในเครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ และสถานที่ที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ นายเกียรติศักดิ์ เกิดสุข นางคณิตา เกิดสุข นายพิศชะยดล กันพรม นางสาววณิชญา ฉิมนาค นายวีรยุทธ สร้อยนาค นายชัชวาล ฉิมปรางค์ นางสาวสุพร กิมขาว และน้อง ๆ ที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือทุกอย่างในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา - มารดา และทุกคนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในด้านการเงิน ความรักตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการจัดการแมลงศัตรูข้าวโดยลดการใช้สารเคมีให้แก่ผู้ที่สนใจบ้างไม่มากก็น้อย

อารยา บุญศักดิ์

ชื่อเรื่อง	การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stål))
ผู้วิจัย	อารยา บุญศักดิ์
ประธานที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไสว บูรณพานิชพันธุ์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2557
คำสำคัญ	เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ความเฉพาะเจาะจง

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ประกอบด้วย 5 ส่วนคือ ส่วนแรกค้นหาเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin ที่ก่อโรคกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ส่วนที่สองคัดเลือกเชื้อราเขียวที่มีศักยภาพในการควบคุม ส่วนที่สามทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับแมลงในนาข้าว ส่วนที่สี่การเจริญของเชื้อราเขียวที่อุณหภูมิต่าง ๆ และส่วนที่ห้าความคงทนในสภาพแวดล้อม การค้นหาดำเนินการโดยสุ่มสำรวจพื้นที่นาในจังหวัดพิจิตร ใช้พื้นที่สุ่มขนาด 1X1 เมตร จำนวน 4 จุดต่อพื้นที่ พบซากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเขียวลงทำลาย จำนวน 1 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนเมษายน 2555 ซึ่งมีอุณหภูมิ 40 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 90% ทำการแยกเชื้อราเขียวให้บริสุทธิ์ สุ่มเลือกโคโลนีเชื้อราเขียวจำนวน 50 ไอโซเลท ใส่รหัสเรียงจาก MRT-PCH-01-01 ถึง MRT-PCH-01-50 ทำการทดสอบประสิทธิภาพและคัดเลือกเชื้อราเขียวโดยใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อราเขียวแต่ละไอโซเลทที่ระดับความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร พ่นลงบนต้นข้าวไทชุงเนทีฟ 1 ระยะแตกกอ ปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลวัยที่ 3 จำนวน 30 ตัวต่อหน่วยทดลอง ทำ 4 ซ้ำ พบเชื้อราเขียวจำนวน 4 ไอโซเลท คือ MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตาย 100% ภายใน 6 วันหลังจากสัมผัสเชื้อรา โดยระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตาย 50% (LT_{50}) คือ 3.38, 3.24, 3.31 และ 3.12 วัน ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท กับแมลงในนาข้าว โดยดำเนินการในทำนองเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพข้างต้นแต่ใช้แมลงในนาข้าวแทน พบว่าเชื้อราเขียว

ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถลงทำลาย เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และตั๊กแตนข้าว และไม่พบการลงทำลายแมลงศัตรูธรรมชาติ และแมลงศัตรูข้าวอื่น ๆ โดยเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท ทำให้เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักตายร้อยละ 85.72, 100.00, 100.00 และ 95.24 ตามลำดับ ภายใน 7 วัน และเชื้อราเขียวไอโซเลท MRT-PCH-01-08 ทำให้เพลี้ยจักจั่นสีเขียวตาย 100% ภายในระยะเวลา 7 วัน การทดสอบการเจริญของเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท ในช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 10 – 45 องศาเซลเซียสโดยใช้ช่วงอุณหภูมิทุก 5 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 15 – 35 องศาเซลเซียสโดยเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนการทดสอบความคงทนของเชื้อในสภาพธรรมชาติ โดยนำเชื้อราผสมลงในดินนาบรรจุภาชนะและฝังในนาข้าว ตรวจสอบการคงอยู่ของเชื้อทุกเดือน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดิน ไอโซเลทละ 4 จุด ผสมกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-6} CFU ต่อมิลลิลิตร นำตัวอย่างสารละลาย spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ตรวจนับโคโลนีของเชื้อราเขียวแต่ละไอโซเลท พบว่าเชื้อราไอโซเลท MRT-PCH-01-03 และ MRT-PCH-01-48 คงทนในธรรมชาติได้นานที่สุด 6 เดือน โดยสามารถเพาะเชื้อได้จากตัวอย่างดินเฉลี่ย 4 และ 1 โคโลนี ตามลำดับ

Title	SCREENING ON POTENTIAL *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (METSCHNIKOFF) SOROKIN FOR CONTROLLING BROWN PLANTHOPPER (*NILAPARVATA LUGENS* (STÅL))
Author	Araya Bunsak
Advisor	Associate Professor Weerathep Pongprasert, Ph.D.
Co - Advisor	Associate Professor Sawai Buranapanichpan, Ph.D.
Academic Paper	Thesis M.S. in Agricultural Sciences, Naresuan University, 2014
Keywords	*Metarhizium anisopliae*, *Nilaparvata lugens* (Stål), host specificity

ABSTRACT

The objectives of this research were composed of 5 main parts: the first part was the survey of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, against brown planthopper (BPH), the second part was screening and selecting potential fungal isolates, the third part was the specificity of selected fugal isolates on rice insects, the fourth part was the growth ability of selected fungal isolates cultured under various temperature and the fifth part was the persistence of selected fungal isolates in the environment. The survey was carried out in rice paddy fields in Phichit area using 4 of 1x1 sampling sizes per one rice paddy field. BPH sample infected by *M. anisopliae* was collected in April 2012 from paddy field at temperature of 40 °C with 90% RH. The fungal spores was spread on specific media and the total of 50 colonies (isolates) were sampled, numbered from MRT-PCH-01-01 to MRT-PCH-01-50 and determined their efficiency on BPH nymph (3rd instar), at the concentration of $1X10^8$ conidia/ml with 4 replications under completely randomized design. The total of 4 isolates: MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 and MRT-PCH-01-48 were selected because of their highest efficiency caused 100% BPH mortality within 6 days after inoculation with the median lethal time (LT_{50}) at 3.38, 3.24, 3.31 and 3.12 days, respectively. The specificity of all four isolates on insects found in rice paddy field were evaluated using the same method as the efficiency test above but using

rice insects. The result revealed that the total of 3 insect species, *Recilia dorsalis* (Motschulsky), *Nephotettix* sp. and *Hieroglyphus banian* (Fabricius) were found infected, meanwhile others natural enemies and rice insect pests were not. The percent mortality of *R. dorsalis* infected by all four fungal isolates were 85.72, 100.00, 100.00 and 95.24 at 7 days after inoculation, respectively, whereas *Nephotettix* sp. was infected by only MRT-PCH-01-08 and caused 100% mortality at 7 days after inoculation. All four fungal isolates were grown very well in the temperature varied from 15 - 35 °C and the highest growth was found in the temperature at 30 °C. The persistence of all four fungal isolates was carried out by mixing each fungal spore with soil, placed in pot and put in rice paddy field. Soil samples collected from 4 sites in each pot every month, diluted to 10^{-1} - 10^{-6} CFU/ml and spread on PDA to examine fugal colonies. Total of 4 colonies from MRT-PCH-01-03 and 1 colony of MRT-PCH-01-48 were detected after 6 months.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาของปัญหา	1
	จุดมุ่งหมายของการศึกษา	3
	ขอบเขตของงานวิจัย	3
	ข้อตกลงเบื้องต้น	3
	สมมติฐานของการวิจัย	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล	5
	ลักษณะของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล	5
	การระบาดและทำลาย	5
	การป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล	8
	การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี	8
	การใช้เชื้อโรคในการควบคุมแมลงศัตรูพืช	9
	เชื้อรา *Metarhizium anisopliae*	10
	วงจรการเกิดโรค (infection cycle)	12
	ลักษณะการลงทำลาย	15
	การแยกเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง	16
	การจัดจำแนกเชื้อรา *M. anisopliae*	17
	การนำเชื้อรามาใช้ในการกำจัดศัตรูพืช	19
	ความปลอดภัย	19
	ลักษณะของเชื้อราที่มีศักยภาพในการควบคุมแมลง	20

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	21
	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย	21
	สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย	21
	ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	21
	สถานที่ทำการทดลอง	30
	ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย	30
4	**ผลการวิจัย**	31
	การสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ลงทำลาย	31
	การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล	32
	การแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์	33
	การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล	34
	การศึกษาความเฉพาะเจาะจงของเชื้อราเขียวต่อการควบคุมแมลงในนาข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ	37
	ทดสอบการก่อโรคของเชื้อราเขียวกับเพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักในระดับห้องปฏิบัติการ	40
	ทดสอบการก่อโรคของเชื้อราเขียวกับเพลี้ยจักจั่นเพลี้ยจักจั่นสีเขียวในระดับห้องปฏิบัติการ	40
	ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวที่อุณหภูมิต่าง ๆ	42
	ศึกษาระยะเวลาในการคงอยู่ของเชื้อราเขียวในสภาพแวดล้อม	47

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
5	**บทสรุป**	49
	สรุปผลการวิจัย	49
	อภิปรายผลการวิจัย	51
บรรณานุกรม		55
ประวัติผู้วิจัย		65

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเขียว ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และMRT-PCH-01-48 ลงทำลายในระยะเวลา 6 วัน หลังสัมผัสเชื้อรา..... 36

2 ระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (LT_{50}) เมื่อได้รับเชื้อรา ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT- PCH-01-48..... 37

3 การลงทำลายแมลงในนาข้าวของเชื้อราเขียว ทั้ง 4 ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 และเชื้อทางการค้า 2 ชนิด..... 38

4 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักและเพลี้ยจักจั่นสีเขียวหลังจากสัมผัสเชื้อราเขียวสายพันธุ์ทนร้อน 4 ไอโซเลท ในวันที่ 7 ในระดับห้องปฏิบัติการ..... 41

5 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวระหว่างแต่ละไอโซเลทกับช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ..... 43

6 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวระหว่างอุณหภูมิ 15 – 35 องศาเซลเซียส กับเชื้อราเขียวแต่ละไอโซเลท..... 44

7 ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีต่อเพลทของเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท ที่ตรวจพบจากตัวอย่างดินที่ทดสอบความคงทนเของเชื้อในสภาพธรรมชาติตั้งแต่เดือนที่ 1 - 6..... 47

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	ตัวเต็มวัยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล.....	6
2	วงจรชีวิตของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย.....	7
3	เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	11
4	เชื้อราแทงทะลุชั้นผิว (cuticle) เข้าช่องว่างลำตัวแมลง.....	13
5	ลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium*.....	18
6	การเพาะเลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล.....	22
7	การแยกเชื้อราเขียวจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล.....	23
8	สไลด์นับสปอร์ (haemacytometer).....	25
9	ต้นข้าวที่ถูกพ่นด้วยเชื้อราเขียว และปลดปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลลงไป.....	25
10	ขั้นตอนการเตรียมดิน และเชื้อราเขียวเพื่อทดสอบความคงทนในสภาพแวดล้อม.	29
11	ซากแพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเขียวลงทำลายจากจังหวัดพิจิตร.....	31
12	การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล.....	32
13	สต็อกเชื้อราเขียวจำนวน 50 ไอโซเลท เก็บในตู้ -20 °C.....	33
14	อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หลังได้รับเชื้อรา ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 ด้วยวิธีพ่นเชื้อราลงบนต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้น 10^8 conidia/ml. ในระยะเวลา 7 วัน หลังสัมผัสเชื้อรา.....	35
15	การเจริญของเชื้อราเขียวจำนวน 4 ไอโซเลท คือ MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ หลังการบ่มเชื้อ 10 วัน ในสภาพไร้แสง.....	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ หน้า

16 การเจริญของเชื้อราเขียวจำนวน 4 ไอโซเลท คือ MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ หลังการบ่มเชื้อ 10 วัน ในสภาพไร้แสง..... 46

17 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเขียวที่แยกจากดิน..... 48

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae) จัดว่าเป็นแมลงศัตรูข้าวที่มีความสำคัญที่สุดในเอเชีย สามารถทำลายข้าวได้หลายสายพันธุ์ โดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลดูดกินน้ำเลี้ยงทำให้ต้นข้าวมีอาการเหี่ยวและแห้งตาย (hopperburn) (Yang, et al., 2002, p. 39) นอกจากนี้ยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัส โรคเขียวเตี้ย ทำให้ต้นข้าวเตี้ย แคระแกร็น เป็นพุ่มแจ้แตกกอมาก ไม่ออกรวงหรือรวงลีบ และโรคใบหงิก ทำให้ข้าวต้นเตี้ย ปลายใบบิดเป็นเกลียวออกรวงช้าและให้รวงที่ไม่สมบูรณ์ เมล็ดลีบเป็นส่วนใหญ่ (Renganayaki, et al., 2002, p. 2112) ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง และไม่คุ้มค่าการลงทุน (สุวัฒน์ รวยอารีย์, 2544) ในช่วง 3 – 4 ปีที่ผ่านมาเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจัดเป็นแมลงศัตรูสำคัญในนาข้าวระบาดทำความเสียหายรุนแรงอย่างต่อเนื่อง ที่สำคัญคือในปี พ.ศ. 2553 ครอบคลุมพื้นที่ถึง 2 ล้าน 5 แสนไร่ และในปี พ.ศ. 2554 ครอบคลุมพื้นที่ 1 ล้าน 5 แสนไร่ เป็นต้น

การป้องกันความเสียหายจากการเข้าทำลายจำเป็นต้องรวดเร็ว ทันเวลา เนื่องจากผลกระทบต่อข้าวเกิดขึ้นถึง 2 ขั้นตอน คือ อาการไหม้จากการลงทำลายของเพลี้ย และหากข้าวรอดจากการเข้าทำลายในขั้นต้น แต่มักประสบความเสียหายจากเชื้อไวรัสทำให้ข้าวไม่สามารถออกรวงได้ การควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจึงมักใช้สารฆ่าแมลงเป็นหลัก เนื่องจากให้ผลรวดเร็ว และชัดเจน (สำนวน ฉิมพกา และวีรเทพ พงษ์ประเสริฐ, 2548, หน้า 77-94) แต่อย่างไรก็ตาม สารฆ่าแมลงทุกชนิดมีผลกระทบต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมเป็นอย่างมาก และเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้สมดุลธรรมชาติเสียหาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำลายศัตรูธรรมชาติที่สำคัญในระบบนิเวศของนาข้าว การควบคุมโดยเชื้อจุลินทรีย์เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถให้ผลในการควบคุมแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา ซึ่งโดยทั่วไปการเจริญและแพร่กระจายได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูงซึ่งรวมถึงเชื้อราที่ลงทำลายแมลงหลายชนิดด้วย

เนื่องจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนี้อาศัยดูดน้ำเลี้ยงอยู่บริเวณโคนต้นข้าว ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความชื้นสูง และร้อน จึงเหมาะกับการเจริญเติบโตของเชื้อรา ที่เป็นสาเหตุของโรคของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการใช้เชื้อราควบคุม

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ซึ่งการใช้เชื้อราในการควบคุมแมลงนั้นเป็นวิธีการที่ให้ผลชัดเจน ปลอดภัยต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมมาก

ในช่วงระยะเวลา 2 ทศวรรษที่ผ่านมา ภายหลังมีการค้นพบถึงอันตรายจากสารฆ่าแมลงทำให้เกิดการพัฒนาวิธีการควบคุมแมลงศัตรูพืชด้านอื่น ๆ อย่างกว้างขวาง รวมทั้งการศึกษาแนวทางการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมแมลงด้วย โดยเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เป็นเชื้อราที่ได้รับการศึกษาอย่างต่อเนื่องจนเป็นที่รู้จักกันดีในการใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช (Shi and Feng, 2004, pp. 165-166) มีการค้นพบชนิดย่อย หรือสายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อรา *M. anisopliae* มากมายกว่า 200 สายพันธุ์ ที่สามารถทำให้เกิดโรคกับแมลงได้ (Zimmermann, 1992, p. 113) โดยเชื้อราชนิดนี้เป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ง่ายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อราพื้นฐานทั่วไป เช่น potato dextrose agar (PDA) และพบทั่วไปในดิน (Valaderes-Inglis and Peberdy, 1997) แพร่กระจายได้โดยน้ำ ลม และแมลงพาหะ

มีรายงานการใช้ประโยชน์จากเชื้อรา *M. anisopliae* ในนาข้าวเพื่อควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว เพลี้ยจักจั่นสีเขียว หนอนห่อใบข้าว และแมลงดำหนามอย่างต่อเนื่อง โดยได้ผลการควบคุมในช่วงร้อยละ 30 – 90 (Bandara and Ahangama, 1994, p. 19; Pham, et al., 1994, p. 29) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อและสภาพแวดล้อมของพื้นที่นั้น ๆ และในประเทศไทยมีการสำรวจพบเชื้อรา *M. anisopliae* ลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่นหลายชนิดในนาข้าว (จริยา จันทร์ไพแสง และคณะ, 2529) และทำให้เกิดการขับเคลื่อนจากภาครัฐและหน่วยงานต่าง ๆ ส่งเสริมการใช้เชื้อรา *M. anisopliae* ในการควบคุมแมลงในนาข้าวอย่างกว้างขวาง แต่อย่างไรก็ตาม การใช้เชื้อรา *M. anisopliae* ในการควบคุมแมลงนั้น จำเป็นอย่างยิ่งต้องมีข้อมูลทางชีววิทยา สัณฐานวิทยา นิเวศวิทยา สรีรวิทยา ความเฉพาะเจาะจงแมลงอาศัย ระบาดวิทยา ระดับความรุนแรงของเชื้อ การเก็บรักษา เทคนิคการเพาะเชื้อด้าน ต่าง ๆ มากมาย รวมทั้งแนวทางการใช้ประโยชน์ที่ชัดเจนเหมาะสม ซึ่งข้อมูลต่าง ๆ เหล่านี้ยังมีการศึกษาวิจัยน้อยมาก ทำให้การใช้เชื้อราเขียวในสภาพธรรมชาติ หรือในนาข้าวให้ผลการควบคุมที่ไม่ชัดเจน หรือไม่ได้ผลเท่าที่ควร ที่สำคัญคือความเฉพาะเจาะจงของเชื้อกับชนิดของแมลง เนื่องจาก เชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงนั้นมักมีความจำเพาะกับชนิดของแมลงมาก และส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อที่อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าระดับชนิด คือ ระดับชนิดย่อย หรือสายพันธุ์ของเชื้อรานั้น ๆ ดังนั้นแม้มีการค้นพบเชื้อราชนิดดังกล่าวได้ แต่ยังมีความจำเป็นอย่างมากที่ต้องทำการศึกษาค้นหาลงไปในระดับของสายพันธุ์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงเป้าหมายนั้น ๆ และนำไปสู่กระบวนการพัฒนาสายพันธุ์ ให้สามารถใช้ประโยชน์

ในการควบคุมแมลงเป้าหมายได้อย่างแท้จริง คือมีประสิทธิภาพ ปลอดภัย และยั่งยืนในที่สุด (Keller, et al., 2003, pp. 307-319)

ผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในการค้นหาสายพันธุ์เชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีความเฉพาะเจาะจง และมีความรุนแรงสูงในการก่อโรคกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาข้าว ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เหมาะสม และยั่งยืน จึงได้จัดทำโครงการวิจัย คัดเลือกเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนี้ขึ้น

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อค้นหา และคัดเลือกเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อทดสอบความเฉพาะเจาะจงของเชื้อราเขียวที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลกับแมลงในนาข้าว และทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวกับแมลงศัตรูข้าวชนิดอื่นที่เชื้อราเขียวสามารถลงทำลายได้ในระดับห้องปฏิบัติการ
3. เพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวที่อุณหภูมิต่าง ๆ
4. เพื่อศึกษาระยะเวลาในการคงทนของเชื้อราเขียวในสภาพแวดล้อม

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ครอบคลุมตั้งแต่การค้นหาและเก็บรวบรวมเชื้อราเขียวที่ลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากนาข้าวในพื้นที่นาชลประทานในเขต ภาคเหนือตอนล่าง ทำการคัดแยกและทดสอบการก่อโรคของเชื้อราเขียวที่เก็บรวบรวมได้กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล คัดเลือกเชื้อราเขียวที่มีความรุนแรงสูงในการลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับแมลงในนาข้าว ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวกับแมลงศัตรูข้าวชนิดอื่นที่เชื้อราเขียวสามารถลงทำลายได้ ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวที่อุณหภูมิต่าง ๆ และระยะเวลาในการคงทนของเชื้อราเขียวในสภาพแวดล้อม

ข้อตกลงเบื้องต้น

งานวิจัยนี้ศึกษาเฉพาะเชื้อรา *M. anisopliae* ที่พบบนซากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในเขตพื้นที่นาชลประทานในภาคเหนือตอนล่างจำนวน 1 พื้นที่

สมมติฐานของการวิจัย

เชื้อราเขียวที่พบบนซากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาข้าวเป็นสาเหตุการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จากพื้นที่ที่ไม่เคยมีการใช้เชื้อราเขียว มีศักยภาพในการเข้าทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ มีความเฉพาะเจาะจงกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยชนิดอื่นในนาข้าว สามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิห้อง และสามารถมีชีวิตรอดในสภาพธรรมชาติได้ยาวนาน สามารถพัฒนาสู่การใช้ประโยชน์ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในอนาคตได้

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแมลงในอันดับ Hemiptera วงศ์ Delphacidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nilaparvata lugens* (Stål) เป็นแมลงศัตรูข้าวที่มีความสำคัญมาก สามารถลงทำลายข้าวได้หลายสายพันธุ์ โดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจะดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณโคนต้นข้าว และปล่อยเชื้อไวรัสลงสู่ต้นข้าวทำให้ข้าวเป็นโรค เช่น โรคเขียวเตี้ย ทำให้ต้นข้าวเตี้ย แคระแกรนแตกกอมาก โดยต้นข้าวที่เป็นโรคจะไม่ออกรวงหรือรวงลีบ เป็นต้น (Renganayaki, et al., 2002, p. 2112) ส่งผลทำให้ผลผลิตข้าวลดลง ไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน (สุวัฒน์ รวยอารีย์, 2544)

ลักษณะของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแมลงศัตรูข้าวประเภทปากดูด ตัวเต็มวัยมีลำตัวสีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลปนดำ มีรูปร่าง 2 ลักษณะ คือ ชนิดปีกยาว และชนิดปีกสั้น (ภาพ 1) ชนิดมีปีกยาวสามารถเคลื่อนย้ายและอพยพไปในระยะทางไกลได้ โดยอาศัยกระแสลมช่วย ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นกลุ่ม ที่กาบใบข้าว หรือเส้นกลางใบ โดยกลุ่มไข่เรียงแถวตามแนวตั้งฉากกับกาบใบข้าว บริเวณที่วางไข่มีรอยช้ำเป็นสีน้ำตาล ไข่มีลักษณะรูปกระสวยโค้งคล้ายกล้วยหอม มีสีขาวขุ่น ตัวอ่อนมี 5 วัย ระยะตัวอ่อนใช้เวลา 16 - 17 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมียชนิดปีกยาวมีขนาด 4 - 4.5 มิลลิเมตร วางไข่ประมาณ 100 ฟอง เพศผู้มีขนาด 3.5 - 4 มิลลิเมตร เพศเมียชนิดปีกสั้นวางไข่ประมาณ 300 ฟอง ตัวเต็มวัยมีชีวิตประมาณ 2 สัปดาห์ (ภาพ 2) ในหนึ่งฤดูปลูกข้าวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสามารถเพิ่มปริมาณได้ 2 - 3 ชั่วอายุ (Hill, 1996; Matteson, 2000, pp. 549-574)

การระบาดและทำลาย

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยทำลายข้าวโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์ท่อน้ำท่ออาหารบริเวณโคนต้นข้าว ระดับเหนือผิวน้ำ ทำให้ต้นข้าวมีอาการใบเหลืองแห้ง ลักษณะคล้ายถูกน้ำร้อนลวกแห้งตายเป็นหย่อม ๆ เรียกว่า อาการไหม้ (hopperburn) ถ้ารุนแรงมากต้นข้าวจะแห้งตาย โดยทั่วไปพบอาการไหม้ในระยะข้าวแตกกอถึงระยะออกรวง ซึ่งตรงกับช่วงชั่วอายุที่ 2 - 3 ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาข้าว นอกจากนี้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

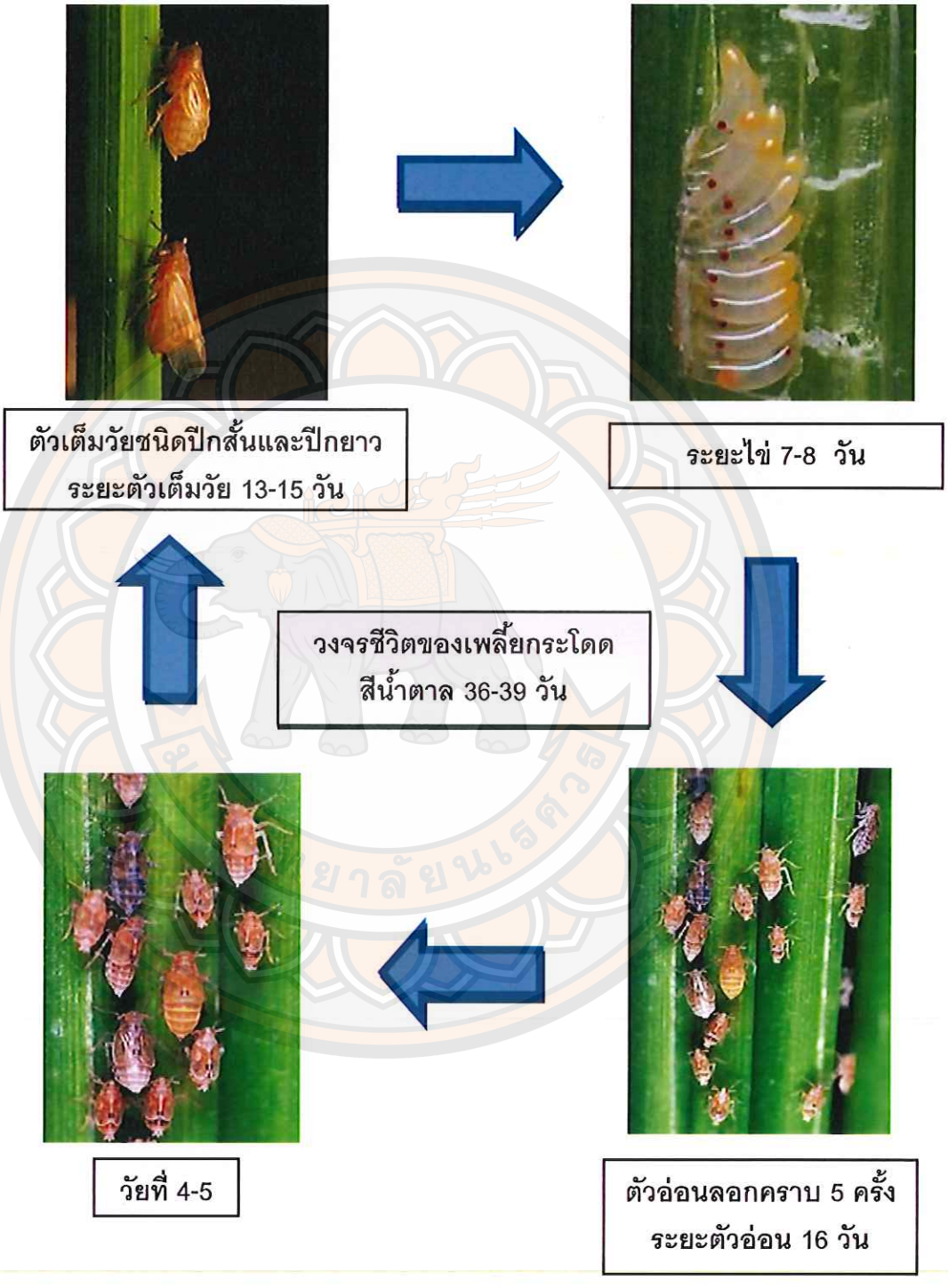
ยังเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสโรคใบหงิก หรือโรคจู๋ (rice ragged stunt) และโรคเขียวเตี้ย (grassy stunt) มาสู่ต้นข้าว ต้นข้าวที่มีอายุตั้งแต่ 15 – 45 วัน ถ้าได้รับเชื้อโรคจู๋จะแสดงอาการรุนแรง ส่วนต้นข้าวที่อายุเกิน 60 วัน ไปแล้ว ถ้าได้รับเชื้ออาการจะไม่รุนแรง ต้นข้าวที่ได้รับเชื้อจะมีอาการแคระแกร็น ต้นเตี้ย ใบสีเขียว แคบและสั้น ใบแก่ช้ากว่าปกติ ปลายใบบิด เป็นเกลียว และขอบใบแหว่ง (สุวัฒน์ รวยอารีย์, 2544)

a b

ภาพ 1 ตัวเต็มวัยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

a. ชนิดปีกยาว (macropterous adult)

b. ชนิดปีกสั้น (brachypterous adult)



ภาพ 2 วงจรชีวิตของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย

การป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

การป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีหลายวิธี ทั้งวิธีกล คือ ใช้วิธีการจัดการที่เป็นระบบตั้งแต่ การใช้พันธุ์ข้าวต้านทาน เช่น พิษณุโลก 2, กข29, กข31, สุพรรณบุรี 1, กข41 และ กข47 เป็นต้น การใช้เมล็ดพันธุ์ในอัตราที่แนะนำ คือ 15 – 20 กิโลกรัมต่อไร่ การควบคุมระดับน้ำในแปลงนาที่มีการระบาด การลดการปลูกข้าวนาปรัง และปลูกพืชอื่นทดแทน การใช้สารเคมีและการควบคุมโดยชีววิธี โดยเกษตรกรนิยมแก้ปัญหาโดยการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชซึ่งเป็นวิธีการที่ให้ผลในการควบคุมศัตรูพืชที่รวดเร็วและชัดเจน แต่ผลที่ได้รับนั้นเป็นการแก้ปัญหาในระยะสั้นเท่านั้น การใช้สารฆ่าแมลงที่มีลักษณะการเข้าทำลายได้กว้างนั้น ทำให้ศัตรูพืชที่กำลังระบาดอยู่ นอกจากได้รับผลกดดันให้สร้างความต้านทาน ต่อสารฆ่าแมลงแล้ว (กองกีฏและสัตววิทยา, 2544, หน้า 5-8) ยังทำให้เกิดปัญหาการกลับมาระบาดใหม่ (resurgence) ของศัตรูพืชหลักและศัตรูพืชรองชนิดอื่น ๆ ที่ไม่มีความสำคัญมาก่อน เนื่องจากศัตรูธรรมชาติที่ควบคุมศัตรูพืชเหล่านั้นได้รับผลกระทบจากการใช้สารฆ่าแมลงทำให้มีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วและไม่สามารถควบคุมศัตรูพืชเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Bhathal, et al., 1991, p. 381) นอกจากนี้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชยังก่อให้เกิดผลกระทบต่อทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค ทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น กรณีการตกค้างของสารพิษในผลผลิตและสิ่งแวดล้อม ทั้งในดิน น้ำ และอากาศ (กองวัตถุมีพิษการเกษตร, 2543, หน้า 29-38)

การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี

กองกีฏและสัตววิทยา (2544, หน้า 184) ให้รายละเอียดของการควบคุมโดยชีววิธีไว้ดังนี้ เป็นการใช้ประโยชน์จากตัวห้ำ (predators) ตัวเบียน (parasites หรือ parasitoids) ตลอดจนเชื้อโรค (pathogens) ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช วัชพืช และศัตรูพืชต่าง ๆ มิให้ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ ทั้งตัวห้ำ ตัวเบียน และเชื้อโรคเหล่านี้ สามารถเรียกรวมกันเป็น "ศัตรูธรรมชาติ" (natural enemies) ของแมลงศัตรูพืช วัชพืช และศัตรูอื่น ๆ ซึ่งถือได้ว่าเป็นทรัพยากรชีวภาพ (biological resources) ที่มีคุณค่าสูงมาก การควบคุมโดยชีววิธี ประกอบด้วย 5 วิธีการดังนี้คือ

1. การศึกษาขั้นพื้นฐาน (basic study or pure research) ประกอบด้วยการศึกษาลักษณะทางชีววิทยา นิเวศวิทยา อนุกรมวิธาน ฯลฯ ของศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ

2. การนำเข้าแมลงศัตรูธรรมชาติจากถิ่นอื่นมาปราบแมลงศัตรูพืชในท้องถิ่นที่เพิ่งมีการระบาดเกิดขึ้น

3. การเพิ่มปริมาณแมลงศัตรูธรรมชาติ การขยายพันธุ์แมลงศัตรูธรรมชาติ เพื่อเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนมากแล้วนำไปปล่อยในธรรมชาติ

4. การอนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติ คือ การช่วยให้ศัตรูธรรมชาติชนิดต่าง ๆ ดำรงอยู่ในธรรมชาติได้มากที่สุด และมีประสิทธิภาพดีที่สุด ในการช่วยทำลายแมลงศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชซึ่งมีวิธีการต่าง ๆ ศัตรูธรรมชาติที่มีบทบาทในการควบคุมประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ได้แก่ มวนเขียวดูดไข่ *Cyrtorhinus lividipennis* (Reuter) แมงมุมสุนัขป่า *Lycosa pseudoannulata* (Bosenberg & Strand) (วนิช ยาคล้าย และคณะ, 2540; สุวัฒน์ รวยอารีย์, 2544; สุวัฒน์ รวยอารีย์ และรจนา สุรการ, 2542, หน้า 108-113; จิรพงศ์ ใจรินทร์ และคณะ, 2544, หน้า 71-83)

5. การประเมินผล การประเมินประสิทธิภาพของแมลงศัตรูธรรมชาติมี 2 แบบ คือ

5.1 Natural enemy exclusion method (check method) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการทดลองมีหลายวิธีการ แต่ละขอบเขตและจุดประสงค์แตกต่างกัน โดยพิจารณาถึงธรรมชาติของพืช แมลงศัตรูพืช และแมลงศัตรูธรรมชาติที่เกี่ยวข้อง เป็นต้น

5.2 Life table technique การวิเคราะห์ตารางชีวิตเป็นวิธีการประเมินประสิทธิภาพหรือบทบาทของศัตรูธรรมชาติที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรโดยเฉลี่ยของแมลงศัตรูพืช วิธีการวิเคราะห์ตารางชีวิตในปัจจุบัน ใช้ได้กับศัตรูพืชที่มีชั่วอายุ (generation) ไม่คาบเกี่ยวกัน เป็นตารางชั่วอายุที่แสดงถึงสาเหตุของการตายของแมลงศัตรูพืชในทุก ๆ ระยะการเจริญเติบโตต่อเนื่องกัน ตั้งแต่ 8 ถึง 15 ชั่วอายุ หรือมากกว่านั้น การวิเคราะห์เช่นนี้แสดงให้เห็นถึงปัจจัยทุก ๆ ปัจจัยที่ทำให้เกิดการตายแต่ละแบบไม่ว่าจะเป็น density dependent mortality factor หรือ density independent mortality factor ซึ่งมีผลต่อประชากรแมลงศัตรูพืชในแต่ละช่วงเวลา

การใช้เชื้อโรคในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

แมลงศัตรูพืชต่าง ๆ โดยทั่วไปสามารถป่วยเป็นโรคได้เช่นเดียวกับสัตว์อื่น ๆ เชื้อจุลินทรีย์สำคัญที่เป็นสาเหตุโรคแมลงมีทั้งที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส ริคเคทเซีย โปรโตซัว ฯลฯ โดยเชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายของแมลงได้ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม และก่อให้เกิดโรคกับแมลง ทำให้แมลงป่วยและตายได้ในที่สุด (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2535, หน้า 22) จากปรากฏการณ์นี้จึงทำให้เกิดการค้นหาเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคแมลงอย่างกว้างขวาง หลายชนิดได้รับการค้นพบ คัดเลือก พัฒนา และนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย จนปัจจุบันถือว่าเป็นหนึ่งในเครื่องมือที่สำคัญสำหรับควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์ (Van Driesche and Bellow Jr., 1996)

การใช้เชื้อโรคควบคุมแมลงศัตรูพืชนั้น ได้มีการสำรวจและจำแนกเชื้อสาเหตุโรคแมลงศัตรูพืชหลายชนิดในประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง (จริยา จันทร์ไพแสง และคณะ, 2529; วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ และคณะ, 2553, หน้า 33) มีการศึกษา พัฒนาและนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจอย่างต่อเนื่อง ทั้งในส่วนที่เป็นเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย เป็นต้น (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2535, หน้า 5; Ignoffo, 1992, pp. 516-525)

เชื้อจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์ได้นำมาใช้เพื่อการควบคุมศัตรูพืช คือ เชื้อรา (fungi) โดยเชื้อราเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบมากเป็นอันดับที่สองรองจากเชื้อไวรัส และเป็นเชื้อที่ได้รับการพัฒนามาโดยตลอด (Poinar and Thomas, 1978, pp. 218; Evans, 1987, pp. 7-30; Burge, 1988; Kobayashi, 1951; Samson, et al., 1988, p. 187; TeBeest and Templeton, 1985, pp. 6-10) เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลงนั้นมีมากมายหลายกลุ่ม และกลุ่มที่ได้รับความนิยมและทำการศึกษากันอย่างแพร่หลาย คือ เชื้อราใน Class Deuteromycetes ซึ่งเรียกอีกชื่อหนึ่งได้ว่า imperfect fungi เนื่องจากเชื้อราในกลุ่มนี้มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และสร้างโคนิเดีย (conidia) เพื่อใช้ในการแพร่พันธุ์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544, หน้า 326-327) ไม่มีคลอโรฟิลล์ จึงไม่สามารถสังเคราะห์อาหารขึ้นมาเองได้ ต้องได้รับสารอาหารซึ่งเป็นสารอินทรีย์จากภายนอกโดยการดูดซึมสารอาหารเข้าไปในเซลล์จึงถูกจัดเป็นสิ่งมีชีวิตจำพวก Heterotrophic eukaryotic organism (วาสนา ฉัตรดำรง, 2544, หน้า 183)

เชื้อรา *Metarhizium anisopliae*

เชื้อราเขียว (green muscardine fungi) (ภาพ 3) ถูกค้นพบโดยชาวรัสเซียชื่อ Metchnikoff ในปี ค.ศ. 1879 โดยพบเชื้อรา *M. anisopliae* ทำให้เกิดโรคกับแมลงศัตรูข้าวสาลี (wheat cockchafer) เชื้อราในสกุล *Metarhizium* เป็นกลุ่มของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) (Bridge, et al., 1997, pp. 177-178; Milner, et al., 1998, p. 240; Iskandarov, et al., 2006, p. 72) จัดอยู่ใน Class Deuteromycetes (Hyphomycetes) สามารถแยกได้ 3 ชนิด ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของโคนิเดีย เช่น รูปร่าง ขนาด และสี เป็นต้น (Dent and Jenkins, 1998) โดยแต่ละชนิดมีความแปรผันทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มีความหลากหลายของสายพันธุ์แตกต่างกันตามถิ่นอาศัย เช่น *M. anisopliae*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. flavoviride*, *M. flavoviride* var. *minus* และ *M. album* เป็นต้น (Driver, et al., 2000, pp. 134-150; Pantou, et al., 2003, p. 159) เมื่อนำมา

ศึกษาโดยเทคนิคทาง PCR พบว่าความหลากหลายของสายพันธุ์ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงอาศัยมีมากน้อยแตกต่างกัน (Inglis, et al., 1999, pp. 51-52) อย่างไรก็ตาม การจำแนกในเบื้องต้นสามารถกระทำด้วยการทดสอบกับแมลงอาศัยได้ เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้มักมีความจำเพาะต่อแมลงอาศัยมาก เช่น สายพันธุ์ *M. anisopliae* ควบคุมปลวก (Milner, et al., 1998, pp. 244-247) และ *Beauveria bassiana*, *M. anisopliae* และ *Paecilomyces fumosoroseus* กับไข่ของ *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) (Shi and Feng, 2004, p. 165)

ภาพ 3 เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

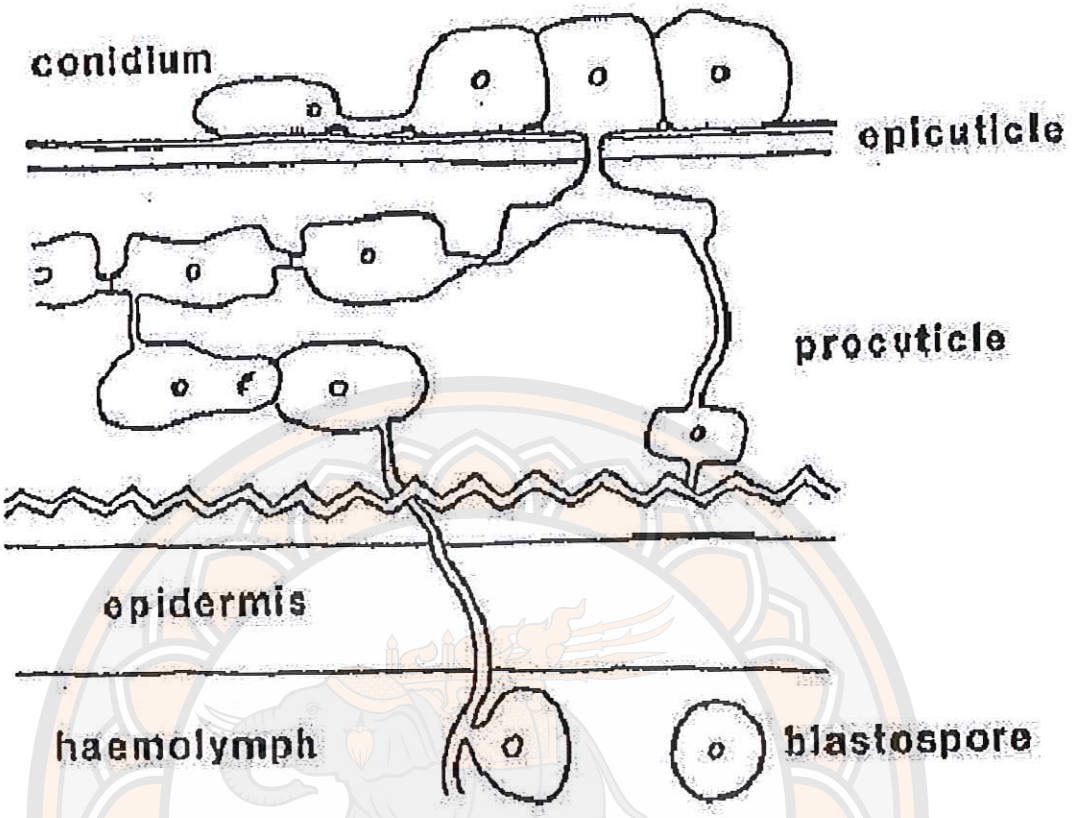
การตั้งชื่อและจัดหมวดหมู่ของเชื้อรา *M. anisopliae*

Superkingdom	Eukaryonta
Kingdom	Fungi (Myceteae)
Division	Eumycota (Amastigomycota)
Subdivision	Deuteromycotina
Class	Deuteromycetes (Hyphomycetes)
Subclass	Hyphomycetidae
Order	Moniliales
Family	Moniliaceae
Genus	*Metarhizium*
Specie	*anisopliae*
Scientific name	*Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin
Common name	Green muscardine fungus
Synonyms	*Oospora destructor* (Metschnikoff) *Entomophthora anisopliae* (Metschnikoff) *Penicillium anisopliae* (Metschnikoff) (Madelin, 1963, pp. 233-271)

วงจรการเกิดโรค (infection cycle)

1. วิธีการทำให้เกิดโรค

การเข้าทำลายแมลงของเชื้อราจะเข้าผ่านทางผนังลำตัว (integument) โดยจะเข้าไปในตัวแมลงด้วยกระบวนการทาง mechanical คือ แทงทะลุผ่านผนังลำตัวเข้าไป เช่น การงอก germ tube ของเชื้อราเข้าไปในตัวแมลง โดยการสร้างเอนไซม์ทำลายผนังลำตัวของแมลง เช่น เอนไซม์ proteinase, chitinase และแพร่กระจายไปตามเนื้อเยื่อของแมลง (ภาพ 4) แมลงที่มีผนังลำตัวหนาแข็งเชื้อราจะเข้าทำลายได้ลำบากทำให้เกิดโรคยาก แต่เชื้อราอาจเข้าไปในลำตัวแมลงโดยผ่านเข้าทางช่องเปิดต่าง ๆ เช่น ช่องเปิดของส่วนปาก เป็นต้น โดยเชื้อราจะไม่สามารถทำลายแมลงผ่านการกินได้เนื่องจากสปอร์ไม่สามารถงอกในกระเพาะของแมลงได้เหมือนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และเมื่อแมลงกินสปอร์ของเชื้อราเข้าไปก็จะถ่ายออกมาพร้อมกับมูล



ภาพ 4 เชื้อราแทงทะลุชั้นผิว (cuticle) เข้าช่องว่างลำตัวแมลง

ที่มา: Charnley, 1989, p. 106

1.1 ตำแหน่งของการติดเชื้อ ส่วนใหญ่ตำแหน่งการติดเชื้อแสดงให้เห็นได้จากจุดที่เชื้อราแทงทะลุเข้าไปในลำตัวแมลง ซึ่งจะเกิดรอยสีดำ (melanization) ตามบริเวณเนื้อเยื่อ membrane ระหว่างส่วนหัว (head capsule) และส่วนอก (thorax) หรือระหว่างข้อปล้องของรยางค์ต่าง ๆ แต่แมลงบางชนิดสามารถติดเชื้อได้ดีตรงส่วนปากต่อเชื้อ *M. anisopliae* (Ferron, 1981, pp. 465-482)

1.2 การงอกของเชื้อรา การงอกของสปอร์บนผิวหนังลำตัวแมลง ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศซึ่งเป็นปัจจัยหลัก โดยเฉพาะ อุณหภูมิ และความชื้น เชื้อราในสกุล *Metarhizium* โดยทั่วไปเจริญได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 15 – 25 องศาเซลเซียส (Kershaw, et al., 1999, pp. 219-222) สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดเมื่อได้รับแสงสว่างอย่างต่อเนื่อง 24 ชั่วโมงต่อวัน (Sideney, et al., 2001, pp. 614-616) ลักษณะของโคโลนีเมื่อแรกเริ่มมีสีขาวจนเมื่อเจริญเต็มที่เชื้อสร้างโคนิเดียสีเขียวกระจายอยู่โดยรอบ (Tanada and Kaya, 1993) โดยการงอกของสปอร์อาจจะเกิดจากสภาพอากาศ

ที่เหมาะสมเฉพาะที่ในส่วนชั้นผิวลำตัวแมลงเอง หรือสภาพแวดล้อมรอบ ๆ ตัวแมลง (Ferron, 1981, pp. 465-482) โดยการคายน้ำของพืชก็สามารถช่วยเพิ่มความชื้น และสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อดีขึ้น (Vidal, 2003, pp. 183-198)

1.3 การแทงทะลุผิวลำตัวแมลงของเส้นใย การแทงทะลุผิวลำตัวแมลงของเชื้อราเกี่ยวข้องกับขบวนการทางฟิสิกส์ และชีวเคมี โดยการสร้างเอ็นไซม์ ต่าง ๆ เข้ามาช่วย เชื้อราแมลงหลายชนิด สร้าง lipolytic enzymes สำหรับย่อยสลายไขมัน โดยเชื้อราจะสร้างเอ็นไซม์ lipase, protease และ chitinase เพื่อย่อยสลายไขมัน และโปรตีน และเอ็นไซม์ chitinase จะย่อยสลายไคตินต่อไปเป็น monoacetylated chitin residues (Briggs, 1975, pp. 95-110) นอกจากนี้ผิวแมลงยังประกอบไปด้วย polysaccharide จะถูกย่อยสลายลงให้ galactose และ glucose ซึ่งพลังงานมากมาย และกรดอะมิโนจะถูกปลดปล่อยออกมาเป็นประโยชน์แก่เชื้อรา นอกจากนี้ยังเปิดโอกาสให้เชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งไม่เป็นสาเหตุโรคของแมลงเข้าไปทางบาดแผลได้อีกด้วย

1.4 ความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อ และการลอกคราบ การติดเชื้อในขณะลอกคราบจะเกิดได้ดี เพราะผิวหนังของแมลงจะมีบาดแผลซึ่งเกิดจากการลอกคราบ เนื่องจากการเกาะติดของเส้นใยระหว่างคราบใหม่และเก่า และบาดแผลจากการลอกคราบนี้จะเป็นช่องทางให้เชื้อราเข้าสู่ลำตัวแมลงได้

2. **การพัฒนาของโรคที่เกิดจากเชื้อรา**

หลังจากเชื้อราผ่านเข้าไปลำตัวแมลงเชื้อราจะพัฒนาในช่องว่างลำตัวแมลง ซึ่งแมลงจะเกิดปฏิกิริยาต่อต้าน โดย plasmatocytes รอบ ๆ เส้นใยเชื้อราที่เข้าไปในตัวแมลง โดยแมลงจะสร้างเนื้อเยื่อเป็นเส้น และเป็นเม็ด ปิดล้อมเส้นใยเชื้อราไว้ ซึ่งเชื้อราประเภท true pathogen เช่น *Metarhizium* จะสร้างสารพิษออกมาย่อยสลายเนื้อเยื่อที่แมลงสร้างมาปิดล้อมไว้ได้

สารพิษ (Toxin) ของเชื้อรามีทั้งชนิดเป็นพิษโดยการฉีด (injection) และเป็นพิษโดยการกิน (per oral) ชนิดหลังมีแนวโน้มว่าจะสกัดใช้เป็นสารพิษฆ่าแมลงในอนาคตแต่ชนิดแรกใช้เพียงศึกษาเท่านั้น สารพิษจากเชื้อราของแมลงเท่าที่พบมี

Cordycepin จาก *Cordyceps militaris*

Aflatoxin จาก strain ของ *Aspergillus flavus*

Isarins และ Isarolids จาก *Isaria*

Beauvericin จาก *Beauveria bassiana*

Destruxin A และ B จาก *M. anisopliae*

โดยเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถแยกสารพิษได้หลายชนิด (Suzuki, et al., 1970, pp. 813-816; Suzuki and Tamura, 1972, pp. 896-898) เนื่องจากสารพิษสามารถฆ่าแมลงได้โดยการทำให้แมลงสร้างเนื้อเยื่อป้องกันเชื้อราได้น้อยลง ส่งผลให้เนื้อเยื่อต่าง ๆ เสียหายไปทำให้เกิดการสูญเสียน้ำ และของเหลวในร่างกาย นอกจากนี้ยังทำให้กระบวนการในการสื่อประสาทของแมลงถูกรบกวน และพบว่าการตอบสนองของเซลล์ และการใช้ออกซิเจน ของแมลงมีผลกับการพัฒนาของโรคที่เกิดจากเชื้อรา โดยแมลงจะทำการเผาผลาญออกซิเจนมากขึ้น (Sewify and Hashem, 2001, p. 533) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงพิษของสารดังกล่าวที่พบใน *B. bassiana* และ *M. anisopliae* ในสัตว์หรือมนุษย์

ลักษณะการลงทำลาย

สปอร์ของเชื้อราเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้โรคแพร่กระจาย การเข้าทำลายของเชื้อราผ่านทางระบบหายใจ และระบบทางเดินอาหารพบน้อยมาก (Müller-Kögler, 1965; Veen, 1966, pp. 254-256; Yendol and Paschke, 1965, pp. 414-422) ส่วนใหญ่จะเข้าทางผนังลำตัว การพัฒนาของเชื้อราในแมลงอาศัย infective unit ของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคแก่แมลง โดยทั่วไปมีทั้งชนิดเคลื่อนที่ได้ เช่น zoospore (Phycomycetes) และเคลื่อนที่ไม่ได้ เช่น conidium และ spore (entomophthorales และ higher fungi) และ ascospore บางชนิดขบวนการทำให้ติดเชื้ออาจแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้

1. ระยะประชิดกับผิวลำตัวแมลง (cuticle) เชื่อกันว่าแรงทางเคมี และแรงทางไฟฟ้าสถิตมีส่วนร่วมด้วย ปฏิกิริยาร่วม (interaction) ระหว่าง lipopylic compounds บนผิวของ spore และ lipids บนผิวลำตัวแมลงอาศัย อาจมีส่วนสำคัญในการงอกของ spore

2. ระยะรางอก โดยทั่วไป spore ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลงจะฟักตัวในสิ่งแวดล้อมทางจุลชีวะที่อุดมสมบูรณ์ เช่น ดิน เป็นต้น แม้ว่าความชื้นและอุณหภูมิจะพอเหมาะกับการงอก แต่ spore จะงอก หลังจากที่ได้ประชิดติดลำตัวแมลงอาจเป็นเพราะมีการกระตุ้นทางเคมี โดยสารบนผิวลำตัวแมลง และการกระตุ้นทางสรีระ ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการประชิดตัว หรืออาจเป็นเพราะการแยกทางสรีระออกจากจุลชีพ ซึ่งแข่งขันกันใช้สารอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ผิวลำตัวแมลงที่มีชีวิต หรือเพราะการประชิดผิวแมลงทำให้เชื้อราสร้างสารที่ทำให้การงอกดีขึ้นและกระตุ้นทำให้เกิดการงอกของ spore

3. ระยะแทงทะลุผิว โดยราจะงอก germ tube สั้น ๆ และใช้ germ tube หรือ infection pegs ที่ราสร้างขึ้นจาก spore แทงทะลุผิวหนังแมลงเข้าไปภายใน โดยมี appressoria (Madelin, et al., 1967, pp. 404-412) เป็นส่วนที่ช่วยยึดผิวลำตัวแมลงไว้ เข้าใจว่ามีแรงทางเคมีและฟิสิกส์เข้าเกี่ยวข้องในกระบวนการนี้ โดยทางเคมี เป็น enzyme ซึ่งมีส่วนสำคัญ ช่วยในการแทงทะลุผ่านผิวลำตัวแมลงที่ประกอบด้วยไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน โดยเฉพาะ chitin คาดว่ามี enzyme นานาชนิดที่จำเป็นในการแทงผิวลำตัวแมลงของ germ tube

4. ระยะการพัฒนาในตัวแมลงเมื่อเข้าไปในร่างกายของแมลงแล้วเชื้อราจะสร้าง mycelium เข้าไปตามทางเดินโลหิต และเข้าไปขยายจำนวนในเลือด โดย mycelium หักออกเป็นท่อนสั้น ๆ และเข้าทำลายอวัยวะต่าง ๆ เช่น fat body เป็นต้น

5. ระยะการผลิตสารพิษช่วงนี้เชื้อราจะมีการสร้างสารพิษ (toxic substance) หรือสารพิษที่มีผลต่อกระบวนการ metabolism (toxic metabolite)

6. ระยะการตายของแมลง ในช่วงระยะนี้แมลงที่ได้รับเชื้อจะกินอาหารได้น้อยลง เชื่องช้า เป็นอัมพาต และตายในที่สุด

7. ระยะการเจริญของ mycelium เชื้อราจะสร้าง mycelium เจริญไปบนช่องว่างในลำตัวแมลงจนแน่นเต็มลำตัวแมลง

8. ระยะเส้นใยแทงออกนอกตัวแมลง เมื่อเส้นใยเจริญในช่องว่างลำตัวแมลงจนเต็มแล้วจะพัฒนาเส้นใยแทงทะลุผ่านผนังลำตัวแมลงออกมาปกคลุมลำตัวแมลงจนทั่ว โดยเส้นใยช่วงแรกจะมีสีขาว แมลงที่ตายจะมีลักษณะคล้ายมัมมี่

9. ระยะสร้างสปอร์ เมื่อเส้นใยเจริญเต็มที่จะทำการสร้างสปอร์ที่มีสีเขียวลักษณะต่าง ๆ ตามชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* sp. เช่น *M. flavoviride* สปอร์จะมีสีเหลืองปนเทา หรือสีเขียวหรือสีเขียวมะกอก ส่วน *M. anisopliae* จะมีสีเขียวหลายเฉด เช่น สีเขียวปนน้ำตาลแดง หรือเขียวปนเหลือง เป็นต้น และเมื่อสร้างสปอร์เสร็จสมบูรณ์แล้วจะแพร่กระจายเชื้อราสู่แมลงตัวอื่น ๆ ต่อไป โดยทางลม ฝน และอื่น ๆ

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง

1. ตัวอย่างแมลงที่ยังสดใหม่ และมีสปอร์แล้ว สามารถแยกเชื้อได้โดยใช้แท่งแก้วสำหรับกระจายเชื้อ (glass spreader) หรือลูป (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้วไปแตะสปอร์บนตัวแมลงแล้วนำไป spread หรือ streak บนอาหารในจานเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) แล้วบ่มเชื้อไว้ที่ 25 - 28 °C

2. ตัวอย่างแมลงที่ตายเนื่องจากเชื้อราแต่ยังไม่สร้างสปอร์ นำมาล้างทำความสะอาดผิวภายนอกตัวแมลงด้วย NaHCl (Clorox 10%) เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่ง 3 ครั้ง หลังจากนั้นซับด้วยกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มให้เชื้อเจริญที่ 25 – 28 °C หรืออาจทำได้อีกวิธีหนึ่งโดยนำตัวอย่างแมลงใส่ไว้ใน moist chamber 1 – 2 วัน เพื่อให้เชื้อราสร้างสปอร์ก่อน จึงแยกเชื้อตามข้อที่ 1

3. แมลงที่ตายมานานแล้ว ทำความสะอาดผิวแมลงด้วย Clorox 10% นาน 1 – 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่ง 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นใช้มีดผ่าตัด ผ่าแยกตัวแมลงออก ใช้เข็มเขี่ย เขี่ยเอาเนื้อเยื่อภายในตัวแมลง (ซึ่งความจริงแล้วจะถูกแทนที่ด้วยเส้นใยเต็มไปหมด) เมื่อเขี่ยเอาเนื้อเยื่อออกมาได้จึงนำไป streak บนอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อราหลาย ๆ ชนิด (อาหารควรใส่ antibiotic เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย) บ่มเชื้อไว้ที่ 25 - 28 °C

หลังจากแยกเชื้อไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วหมั่นตรวจดูโคโลนี (colony) ของเชื้อราทุกวัน ภายใน 2 – 4 วัน หรือมีขนาดของโคโลนีประมาณ 0.5 – 1 เซนติเมตร ถ้ามีลักษณะของโคโลนีแตกต่างกันหลายลักษณะ ทำการแยกเชื้อราอีกครั้ง (subculture) โดยแยกแต่ละลักษณะ นำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานใหม่ เพื่อให้ได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ เก็บบ่มที่อุณหภูมิ 25 – 28 °C เพื่อให้เจริญ และสร้างสปอร์

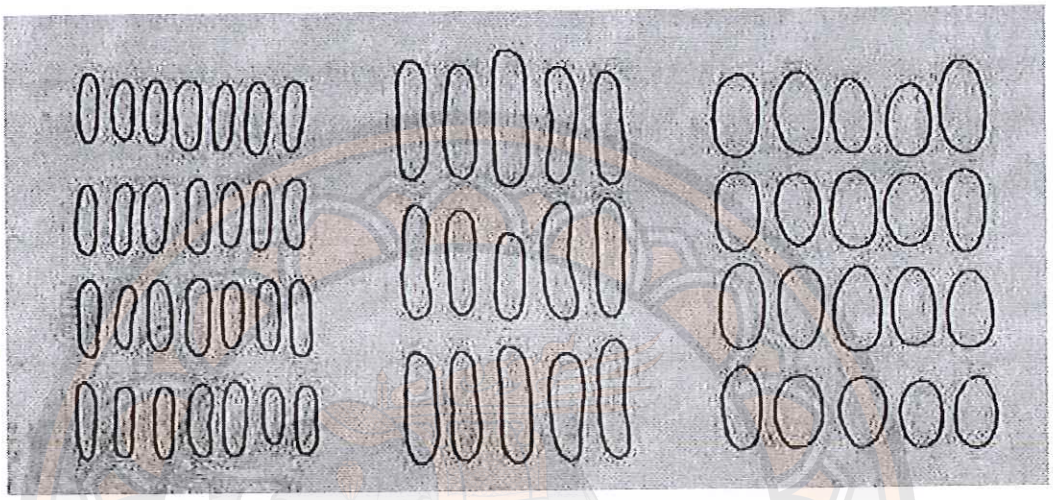
การจัดจำแนกเชื้อรา *M. anisopliae*

การจัดจำแนกชนิดเชื้อราสามารถทำได้จากตัวแมลงโดยตรง โดยเขี่ยเชื้อรามาทำ slide mounting ใน lactophenol หรือ lactic acid ด้วยน้ำยาย้อม หรือใช้เทคนิคต่าง ๆ เพื่อดูโครงสร้างของเชื้อรา แล้วเปรียบเทียบกับ key ของ genera ต่าง ๆ ที่ Samson (1981, pp. 94-106) ได้ทำขึ้นไว้ แม้ว่าจะค่อนข้างเก่า และเชื้อราบาง genera ซึ่ง species ยังไม่ได้พิสูจน์ว่าทำให้เกิดโรคกับแมลง เช่น *Penicillium* และ *Phoma* เป็นต้น แต่ key ส่วนใหญ่ยังใช้ได้ดี นอกจากนี้อาจเปรียบเทียบกับรายละเอียดของ key ส่วนตัวอย่างแมลงที่ยังไม่มีสปอร์ควรใส่ใน moist chamber ให้สร้างสปอร์ก่อน ตัวอย่างที่เก่าหรือแมลงตายนานแล้วอาจไม่เห็นโครงสร้างสปอร์ ต้องแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยผสม antibiotics ลงไป

เชื้อรา *M. anisopliae* var. *anisopliae* โคนิเดียรูปทรงกระบอกถึงรูปไข่ ส่วนกลางแคบเว้าเข้าเล็กน้อย ปลายทั้งสองข้างตัด โคโลนีมีสีเขียวหลายเฉด

เชื้อรา *M. anisopliae* var. *major* โคนิเดียมีขนาดยาว 10.0 - 14.0 μm

เชื้อรา *M. flavoviride* โคนิเดียรูปรี ปลายทั้งสองข้างมนกลม หรืออีกข้างหนึ่งค่อนข้างเป็นปลายตัด โคโลนีมีสีเหลืองปนเทา หรือสีเขียว หรือสีเขียวมะกอก (Rombach, et al., 1994, pp. 613-655; Humber, 1998, Tulloch, 1976, p. 409; Samson, 1981, pp. 98-99) (ภาพ 5)



ภาพ 5 ลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium*

a. *M. anisopliae* var. *anisopliae*

b. *M. anisopliae* var. *major*

c. *M. flavoviride*

การนำเชื้อรามาใช้ในการกำจัดศัตรูพืช

มีการศึกษาวิจัยมากมายเพื่อค้นหาแนวทางการใช้เชื้อรา *M. anisopliae* ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีอย่างแพร่หลาย (Zimmermann, 1992, pp. 113-128; Bidochka, et al., 2001, pp. 1335-1342) เช่น

การศึกษาวิจัยใช้เชื้อราเขียวเพื่อควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว เพลี้ยจักจั่นสีเขียว หนอนห่อใบข้าว และแมลงดำหนาม เป็นต้น ได้ผลในการป้องกันกำจัดแมลงประมาณ 30 - 90 % ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเชื้อ ชนิดของแมลงและสภาพแวดล้อม (Bandara and Ahangama, 1994, p. 19; Pham, et al., 1994, p. 29) โดยตามปกติเชื้อราเขียวจะเกิดโรคกับเพลี้ยกระโดดต่าง ๆ เพลี้ยจักจั่น แมลงหล่า และแมลงศัตรูข้าวอื่น ๆ ซึ่งเชื้อราชนิดนี้สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดด และเพลี้ยจักจั่นได้อย่างมากมาย (Aguda, et al., 1984, p. 20; Medrano, et al., 1984, pp. 15-16) ในประเทศไทยมีรายงานการใช้ประโยชน์จากเชื้อรา *M. anisopliae* ในนาข้าวเพื่อควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว เพลี้ยจักจั่นสีเขียว (จริยา จันทร์โพแสง และคณะ, 2529; เพชรหทัย ปฏิรูปานุสร และ อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ, 2550) โดยได้ผลการควบคุมได้ดี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อและสภาพแวดล้อมของพื้นที่นั้น ๆ นอกจากนี้ สุดาภรณ์ ใจชื่น (2544) พบว่าประสิทธิภาพและความรุนแรงของเชื้อรา *M. flavoviridae* BCC1380 *M. flavoviridae* BCC1707 *Metarhzium* sp. AP4358 และ *Metarhzium* sp. AP4359 ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล มีเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยต่างกันตามชนิดของเชื้อ และอัตราความเข้มข้นของสปอร์ เชื้อรา *M. anisopliae* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจและได้มีการทดสอบกับแมลงหลายชนิด เช่น ด้วงงวงมะพร้าว ด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย แมลงนูนหลวง (วิวัฒน์ เสือสะอาด และคณะ, 2548, หน้า 1-13; อาภรณ์ ปั้นทองคำ และคณะ, 2550) แมลงวันผลไม้ (นริศ ท้าวจันทร์ และ อนุชิต ชินาจริยวงศ์, 2551, หน้า 21-25) แมลงสิง (สมบัติ จุจาคม และคณะ, 2541, หน้า 198-209) หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย เป็นต้น ซึ่งให้ผลการควบคุมเป็นที่น่าพอใจอย่างยิ่ง ด้วยประสิทธิภาพของเชื้อดังกล่าวในการลงทำลายแมลง ทำให้เชื้อได้รับการคัดเลือก พัฒนา และนำไปใช้ในการควบคุมศัตรูพืชอย่างกว้างขวาง ต่อเนื่อง จนถือเป็นหนึ่งในเครื่องมือที่สำคัญสำหรับควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์ (Burge, 1988; Van Driesche and Bellows Jr., 1996)

ความปลอดภัย

ในปัจจุบันพบว่ามีการนำเชื้อราในสกุลนี้มาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีอย่างแพร่หลาย 2 ชนิด คือ *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* (Sideney, et al., 2001, pp. 613-616)

โดยเชื้อราสกุลนี้มีความปลอดภัยสูงเหมาะแก่การใช้ในการควบคุมศัตรูพืชเนื่องจากไม่พบการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย เช่น นก ปลา หนู หมู และกระต่าย ในพื้นที่ที่มีการใช้เชื้อ (Zimmermann, 1993, pp. 375-379) โดยมีการทำการทดสอบความปลอดภัยของเชื้อ *Metarhizium* ทั้ง 2 ชนิด และขึ้นทะเบียนเป็นสินค้าที่ใช้สำหรับควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เช่น ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา และบราซิล เป็นต้น (Butt, et al., 2001) และมีรายงานเกี่ยวกับความทนทานของเชื้อ *M. anisopliae* ในนามการค้า Biocare™ ว่าสามารถคงอยู่ในดินได้นานกว่า 3 ปี ส่วนปัญหาเกี่ยวกับปัจจัยทางกายภาพทั่วไป นอกจากอุณหภูมิและความชื้นแล้ว ปัจจัย เช่น ฝนและประเภทของดินนั้นแทบจะไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพเชื้อเลย (Milner, 2000, pp. 47-50)

ลักษณะของเชื้อราที่มีศักยภาพในการควบคุมแมลง (เพชรหทัย ปฏิรูปานุสร, 2547, หน้า 8)

1. มีความรุนแรงสูง (high virulence)
2. ติดเชื้อกับแมลงได้อย่างรวดเร็ว (rapid mode of action)
3. มีแมลงอาศัยกว้าง (a broad host range)
4. มีเสถียรภาพในอาหารเลี้ยงเชื้อและการเก็บรักษา (stability in culture and storage)
5. สามารถเลี้ยงขยายโดยวิธี submerged fermentation ได้
6. สามารถวัดปริมาณโดยวิธี bioassay ได้
7. มีความปลอดภัยต่อผู้ใช้ (safety to workers)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

1. กล่องพลาสติกเก็บตัวอย่างแมลงที่ถูกเชื้อราลงทำลาย
2. เข็มเขี่ยเชื้อปลายลูป
3. เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม
4. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. หลอดทดลอง
6. ช้อนตักสารแสตนเลส
7. กรงเลี้ยงแมลงขนาด 60x60x90 เซนติเมตร
8. แก้วพลาสติกใสขนาด 22 ออนซ์ พร้อมฝาปิด
9. ขวดเก็บตัวอย่างแมลง
10. ขวดเก็บสต๊อกเชื้อรา
11. ขวดพ่นสารสุญญากาศ
12. ถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 9x11 นิ้ว
13. บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar
2. NaHCl
3. 0.1% Tween 80
4. ampicillin

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ลงทำลาย

สำรวจ และเก็บรวบรวมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่พบเป็นโรคหรือถูกทำลายโดยเชื้อรา จากพื้นที่สำรวจตามนาชลประทาน ในเขตภาคเหนือตอนล่าง การดำเนินการประกอบด้วย

2 วิธีการ กรณีแรกเป็นการสำรวจในพื้นที่ที่มีการลงทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นจำนวนมาก ใช้การสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (simple random sampling) เก็บตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ ขนาดพื้นที่สุ่ม 1x1 เมตร กรณีที่สองเป็นการเก็บรวบรวมแบบเจาะจงซึ่งเกิดจากการพบเชื้อราที่ลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาของเกษตรกร ทั้งโดยบังเอิญและโดยการกำหนดพื้นที่สำรวจ

2. เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เก็บรวบรวมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากแปลงนาเกษตรกร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก คัดกรองเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลให้มีความบริสุทธิ์ (purified population) ปราศจากศัตรูธรรมชาติ และเชื้อโรคที่ติดต่อมากับแมลง ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนต้นข้าวพันธุ์ Taichung Native 1 (TN1) (Pathak, et al., 1982, pp. 194-195) ให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการทดสอบในขั้นต่อไป (ภาพ 6)

a b

ภาพ 6 การเพาะเลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

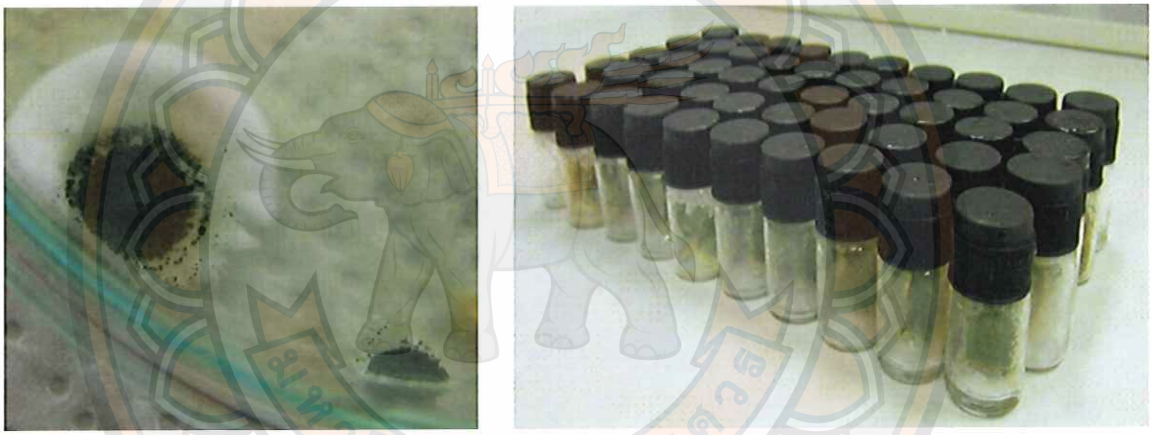
a. การปลูกข้าวเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

b. กรงเพาะเลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

3. การแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์

3.1 ใช้ลูป (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะสปอร์บนตัวแมลง นำไป streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (ช่วงอุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส)

3.2 ตรวจดูโคโลนีของเชื้อราทุกวันภายในช่วงเวลา 4 - 7 วัน และทำการคัดเลือกเชื้อรา และเก็บตัวอย่างเชื้อรา 50 ไอโซเลท ใส่รหัส รวมเป็นประชากรของเชื้อในแต่ละจุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง (ภาพ 7)



a b

ภาพ 7 การแยกเชื้อราเขียวจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

a. เชื้อราเขียวที่แยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

b. สต็อกเชื้อราเขียวที่แยกได้ 50 ไอโซเลท

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

4.1 ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราเขียวแต่ละไอโซเลทโดยเขี่ยเชื้อจาก stock เชื้อราเขียวที่เก็บรวบรวมได้จากกิจกรรมที่ 3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ฉาบผิวด้วย ampicillin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระดับอุณหภูมิห้อง จนได้โคนิเดียที่ฟูเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ (อายุ 7 วัน)

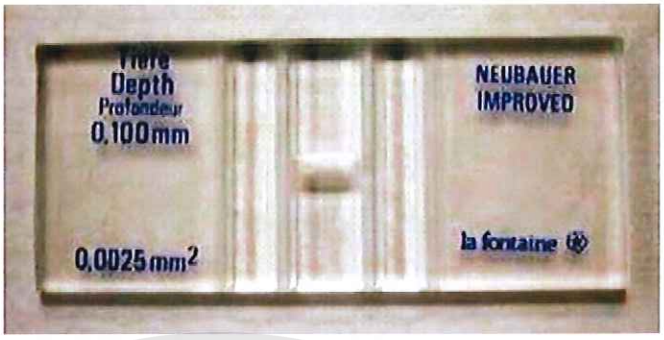
4.2 เทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 10 มิลลิลิตร และกวนโคนิเดียให้หลุดออกจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เทส่วนผสมที่ได้ลงในหลอดทดลอง

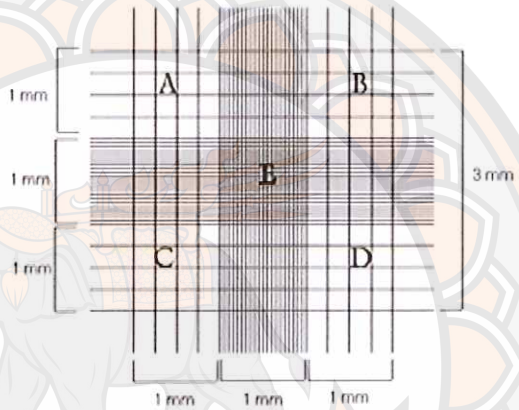
4.3 ตรวจวัดความเข้มข้นของโคนิเดีย โดย haemacytometer (ภาพ 8) (Hausser, Horsham, PA, USA) และนำมาปรับความเข้มข้นโดยการละลายในน้ำกลั่นซึ่งผสมด้วย 0.1% Tween 80 (Sigma St. Louis, MO, USA) จนมีความเข้มข้นที่ 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

4.4 ทดสอบการเกิดโรคกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4 ซ้ำ สิ่งทดลองคือ เชื้อราทั้ง 50 ไอโซเลท ใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลระยะที่ 3 จำนวน 30 ตัวต่อหน่วยทดลอง

4.5 พ่นเชื้อราเขียวลงบนต้นข้าวทดสอบ คือ TN1 เป็นระยะเวลา 15 นาที ปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเลี้ยงภายใต้ความชื้น 75% ที่ระดับอุณหภูมิห้อง บันทึกอัตราการตายของเพลี้ยทุกวันจนครบ 15 วันหลังจากทำการพ่น (ภาพ 9)

4.6 ปรับค่าอัตราการตายด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925) นำผลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's new multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P = 0.05$) และประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแต่ละโคโลนี โดยใช้ผลการคำนวณ Probit analysis จากระยะเวลาที่เชื้อทำให้เพลี้ยตายร้อยละ 50 (LT_{50})





ภาพ 8 สไลด์นับสปอร์ (haemacytometer)

ภาพ 9 ต้นข้าวที่ถูกพ่นด้วยเชื้อราเขียว และปลดปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลลงไป

5. การศึกษาความเฉพาะเจาะจงของเชื้อราเขียวต่อการควบคุมแมลงในนาข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ

5.1 เตรียมเชื้อราเขียวที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่คัดเลือกได้จากผลการทดลองที่ 4 และเชื้อราทางการค้า 2 ชนิด คือ *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* โดยตัดชิ้นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคนีเดียของเชื้อ ถ่ายใส่อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่และทำการบ่มเชื้อ ที่ระดับอุณหภูมิห้อง จนได้โคนิเดียที่ฟูเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ (อายุ 7 วัน) เทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 10 มิลลิลิตร และกวนโคนีเดีย ให้หลุดออกจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เทส่วนผสมที่ได้ลงในหลอดทดลอง ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของโคนีเดีย โดย haemacytometer (Hausser, Horsham, PA, USA) และนำมาปรับความเข้มข้นโดยการละลายในน้ำกลั่นซึ่งผสมด้วย 0.1% Tween 80 (Sigma St. Louis, MO, USA) จนมีความเข้มข้นที่ 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร

5.2 ดำเนินการเก็บรวบรวมแมลงในนาข้าวชนิดต่าง ๆ ในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยนำมาคัดกรองแมลงในนาข้าวที่อ่อนแอ และเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของแมลงในนาข้าวในห้องปฏิบัติการ ให้มีจำนวนเพียงพอในการทดสอบ

5.3 ตรวจสอบการเกิดโรคของเชื้อราเขียวที่คัดเลือกแล้ว กับแมลงในนาข้าว โดยพ่นลงบนตัวแมลง ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงแมลงภายใต้ความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิห้อง บันทึกการตายของแมลงทุกวันจนครบ 7 วันหลังจากทำการพ่น รวบรวมเชื้อราเขียวที่มีความจำเพาะกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แมลงศัตรูข้าวอื่น ๆ เพื่อศึกษาศักยภาพกับเชื้อราเขียวในขั้นตอนต่อไป

6. ทดสอบการก่อโรคของเชื้อราเขียวกับแมลงศัตรูข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ

6.1 เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงศัตรูข้าวชนิดอื่นที่ถูกเชื้อราเขียวลงทำลายจากกิจกรรมที่ 5 ในระดับห้องปฏิบัติการ (Lacey, 1997)

6.2 เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราเขียว ที่ได้จากการศึกษาในข้อที่ 5 โดยเขี่ยเชื้อจาก stock เชื้อราเขียวที่เก็บรวบรวมได้จากกิจกรรมที่ 5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ฉาบผิวด้วย ampicillin 500 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มเชื้อที่ระดับอุณหภูมิห้อง จนได้โคนิเดียที่ฟูเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ (อายุ 7 วัน)

6.3 เทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 10 มิลลิลิตร และกวนโคนีเดียให้หลุดออกจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เทส่วนผสมที่ได้ลงในหลอดทดลอง

6.4 ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของโคนีเดีย โดย haemacytometer (Hausser, Horsham, PA, USA) และนำมาปรับความเข้มข้นโดยการละลายในน้ำกลั่นซึ่งผสมด้วย 0.1% Tween 80 (Sigma St. Louis, MO, USA) จนมีความเข้มข้นที่ 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร

6.5 ดำเนินการทดสอบการเกิดโรคกับแมลงศัตรูข้าวจากกิจกรรมที่ 5 ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 4 ซ้ำ สิ่งทดลองคือ เชื้อราที่คัดเลือก กับแมลงศัตรูข้าว ระยะที่ 3 จำนวน 30 ตัวต่อหน่วยทดลอง

6.6 พ่นเชื้อราเขียวที่ระดับความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร ลงบนต้นข้าวทดสอบพันธุ์ไทซุงเนทีฟ (TN1) อายุ 3 สัปดาห์ปล่อยแมลงศัตรูข้าวจากกิจกรรมที่ 5 ระยะที่ 3 ลงทำลายเพาะเลี้ยง ภายใต้ความชื้น 75% ที่ระดับอุณหภูมิห้อง บันทึกอัตราการตายของเพลี้ยทุกวันจนครบ 7 วันหลังจากทำการพ่น

6.7 ปรับค่าอัตราการตายด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925) นำผลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's new multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P = 0.05$) และประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแต่ละโคโลนี โดยใช้ผลการคำนวณ probit analysis จากระยะเวลาที่เชื้อทำให้เพลี้ยตายร้อยละ 50 (LT_{50})

6.8 เก็บโคโลนีเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกไว้ในรูปของการแช่แข็งที่ระดับอุณหภูมิ -20 และ -80 °C เพื่อใช้ในการศึกษาศักยภาพของเชื้อ การจำแนกไอโซเลทของเชื้อในระดับที่มีความละเอียดสูงเช่นด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล และการขยายเชื้อเพื่อการใช้ประโยชน์

7. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวที่อุณหภูมิต่าง ๆ

7.1 เพาะเลี้ยงเชื้อราเขียวที่คัดเลือกได้จากกิจกรรมที่ 4 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่ระดับอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

7.2 ใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร นำไปวางคว่ำหน้าลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อในตู้ที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส

7.3 บันทึกผลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกวันจนครบ 10 วัน (ทำการทดลอง 4 จาน/ไอโซเลท) พร้อมทั้งจดบันทึกข้อมูลลักษณะของเชื้อ คือ สีของโคโลนี, รูปร่างลักษณะของโคโลนี, การเกิดหยดน้ำบนโคโลนี และการสร้าง synnemata

7.4 ทำการทดลองในทำนองเดียวกันกับ ข้อ 7.1 - 7.3 โดยเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 10, 15, 20, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส

8. ศึกษาระยะเวลาในการคงอยู่ของเชื้อราเขียวในสภาพแวดล้อม

8.1 เพาะเลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้จากผลการทดลองที่ 4 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่ระดับอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

8.2 เก็บรวบรวมดินนาใส่ถุงพลาสติกทนร้อน ปริมาณ 1,000 กรัมต่อถุง จำนวน 5 ถุง ต่อการทดสอบเชื้อ 1 ไอโซเลท

8.3 นึ่งฆ่าเชื้อดินนาภายใต้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8.4 เตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ความเข้มข้นที่ 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 มิลลิลิตร ผสมกับดินนาที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 1,000 กรัม โดยพัฒนาเทคนิคจาก Baek and Kenerley (1998)

8.5 นำดินที่คลุกผสมกับเชื้อราแล้วไปวางไว้ในสภาพธรรมชาติ (ภาพ 10)

8.6 ตรวจสอบปริมาณเชื้อรา ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 เดือน ตามลำดับ

8.7 ตรวจสอบปริมาณเชื้อรา โดยเก็บตัวอย่างดินที่ทำการคลุกกับเชื้อราแล้วไอโซเลทละ 4 จุด จำนวน 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ผสมกับน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้ดินกระจายตัวรอจนดินตกตะกอน ดูดสารละลายที่ได้ไปเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-6} CFU ต่อมิลลิลิตร นำตัวอย่างสารละลายที่ทำการเจือจางแล้ว spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ฉาบผิวด้วย ampicillin 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณสารละลาย 0.1 มิลลิลิตรต่อเพลท จำนวนความเข้มข้นละ 2 เพลท เพาะเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลที่ระยะเวลา 3, 5 และ 7 วัน บันทึกจำนวนโคโลนีของเชื้อ

a

b

c

d

ภาพ 10 ขั้นตอนการเตรียมดิน และเชื้อราเขียวเพื่อทดสอบความคงทนในสภาพแวดล้อม

a. นึ่งฆ่าเชื้อในดิน

b. เตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราเขียวที่ความเข้มข้นที่ 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

c. ถ่ายสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราเขียวลงดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

d. นำดินที่ผสมเชื้อราเขียววางในสภาพธรรมชาติ

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

มีนาคม พ.ศ. 2555 – ตุลาคม พ.ศ. 2557

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ลงทำลาย

ผลการค้นหาซากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราลงทำลาย ดำเนินการ 2 วิธีการ กรณีแรกเป็นการสำรวจในพื้นที่ที่มีการลงทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นจำนวนมาก ใช้การสุ่มตัวอย่างแบบง่าย (simple random sampling) เก็บตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ ขนาดพื้นที่สุ่ม 1x1 เมตร ไม่พบเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเขียวลงทำลาย กรณีที่สองเป็นการเก็บรวบรวมแบบเจาะจงซึ่งเกิดจากการพบเชื้อราที่ลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาของเกษตรกรทั้งโดยบังเอิญและโดยการกำหนดพื้นที่สำรวจ พบซากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลถูกเชื้อราเขียวลงทำลายจากพื้นที่จังหวัดพิจิตรจำนวน 1 ตัว ในช่วงเดือนเมษายน 2555 ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 (ภาพ 11)

ภาพ 11 ซากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเขียวลงทำลายจากจังหวัดพิจิตร

การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ผลการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพกรงเลี้ยงแมลงขนาด 60x60x90 เซนติเมตร จำนวน 10 กรง พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้อย่างน้อยกรงละ 10,000 ตัว และสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ตลอดทั้งปีจึงมีจำนวนเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพียงพอต่อการทดสอบ (ภาพ 12)

ภาพ 12 การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

การแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์

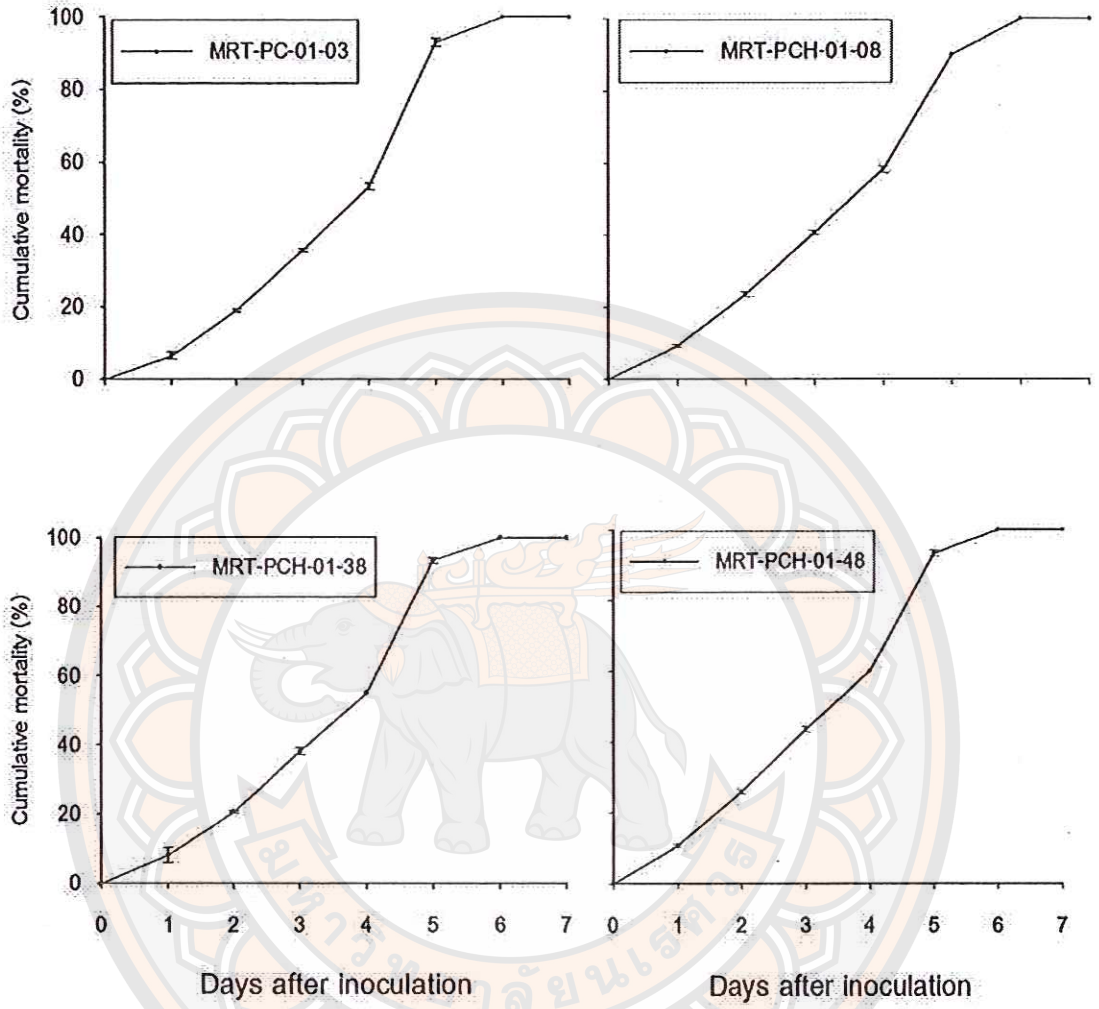
ทำการจัดจำแนกเชื้อรา 50 ไอโซเลท ใส่รหัสแต่ละไอโซเลท ตั้งแต่ MRT-PCH-01-01 ถึง MRT–PCH-01-50 และจัดเก็บเป็นตัวอย่างเชื้อราเพื่อใช้ทดสอบต่อไป (ภาพ 13)

ภาพ 13 สต็อกเชื้อราเขียวจำนวน 50 ไอโซเลท เก็บในตู้ -20 °C

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวทั้ง 50 ไอโซเลท คือ MRT-PCH-01-01 ถึง MRT–PCH-01-50 กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลระยะที่ 3 ในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อราเขียว เพียง 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีอัตราการตายร้อยละ 100 ภายใน 6 วัน หลังสัมผัสเชื้อราเขียว โดยหลังจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสัมผัสเชื้อราเขียวมีผลทำให้เกิดอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 มีลักษณะเป็นแบบ sigmoid curve ทั้ง 4 ไอโซเลท (ภาพ 14) โดยในวันที่ 1 หลังจากสัมผัสเชื้อพบว่าเชื้อรา ไอโซเลท MRT-PCH-01-48 สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายมากที่สุด มีอัตราการตายร้อยละ 10.68±0.42 รองลงมาคือไอโซเลท MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-03 มีอัตราการตายร้อยละ 9.24±0.40, 8.20±2.18 และ 6.48±0.97 ตามลำดับ และผลที่เกิดขึ้นในวันที่ 2, 3 และ 4 มีทิศทางการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันกับที่พบในวันที่ 1 แต่ในวันที่ 5 หลังสัมผัสเชื้อราพบว่า MRT-PCH-01-38, MRT-PCH-01-48 และ MRT-PCH-01-03 มีอัตราตายสูงถึงร้อยละ 93.32±0.89, 93.32±0.89 และ 93.04±1.12 ตามลำดับ และ ไอโซเลท MRT-PCH-01-08 พบอัตราการตายต่ำสุดที่ร้อยละ 90.00±0.00 เท่านั้น ในขณะที่วันที่ 6 หลังสัมผัสเชื้อราพบว่าทุกไอโซเลทให้ผลอัตราการตายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสูงสุดเท่ากันคือร้อยละ 100 (ตาราง 1)

เมื่อทำการวิเคราะห์ ระยะเวลาที่เชื้อราทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (LT_{50}) พบว่าเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 รวดเร็วที่สุดคือไอโซเลท MRT-PCH-01-48 ใช้ระยะเวลา 3.12 วัน รองลงมาคือไอโซเลท MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-03 มีค่า (LT_{50}) คือ 3.24, 3.31 และ 3.38 วัน ตามลำดับ (ตาราง 2)



ภาพ 14 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หลังได้รับเชื้อรา ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และMRT-PCH-01-48 ด้วยวิธีพ่นเชื้อราลงบนต้นข้าวที่ระดับความเข้มข้น 10^8 conidia/ml. ในระยะเวลา 7 วัน หลังสัมผัสเชื้อรา

ตาราง 1 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเขียว ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 ลงทำลายในระยะเวลา 6 วัน หลังสัมผัสเชื้อรา

ไอโซเลท	อัตราการตายสะสม±ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย/วัน					
	1	2	3	4	5	6
MRT-PCH-01-03	6.48±0.97^{b}	19.03±0.48^{c}	35.70±0.52^{c}	53.33±0.88^{b}	93.04±1.12^{a}	100.00±0.00^{a}
MRT-PCH-01-08	9.24±0.40^{ab}	23.67±0.70^{b}	40.83±0.90^{b}	58.33±0.88^{a}	90.00±0.00^{b}	100.00±0.00^{a}
MRT-PCH-01-38	8.20±2.18^{ab}	20.56±0.35^{c}	38.10±1.01^{c}	55.00±0.00^{b}	93.32±0.89^{a}	100.00±0.00^{a}
MRT-PCH-01-48	10.68±0.42^{a}	25.89±0.55^{a}	43.63±0.72^{a}	60.00±0.00^{a}	93.32±0.89^{a}	100.00±0.00^{a}

* ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (^{a,b,c}) ในคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตาราง 2 ระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (LT_{50}) เมื่อได้รับเชื้อรา ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และMRT- PCH-01-48

ไอโซเลท	LT_{50}±SE(days)
MRT-PCH-01-03	3.38±0.05
MRT-PCH-01-08	3.24±0.04
MRT-PCH-01-38	3.31±0.05
MRT-PCH-01-48	3.12±0.05

การศึกษาความเฉพาะเจาะจงของเชื้อราเขียวต่อการควบคุมแมลงในนาข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของเชื้อราเขียว 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 กับแมลงในนาข้าวชนิดต่าง ๆ ในเขตภาคเหนือตอนล่าง ในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาพบว่า เชื้อราเขียว ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถลงทำลายแมลงศัตรูข้าวได้หลายชนิด คือ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และตั๊กแตนหนวดสั้น (ตาราง 3) และไม่พบศัตรูธรรมชาติถูกเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทลงทำลาย เมื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อราทางการค้า พบว่าเชื้อราทางการค้าทั้ง 2 ชนิด คือ เมธาไรเซียม (*M. anisopliae*) และ *M. flavoviride* ไม่พบลงทำลายแมลงในนาข้าวทั้งแมลงศัตรูข้าว และแมลงศัตรูธรรมชาติ

ตาราง 3 การลงทำลายแมลงในนาข้าวของเชื้อราเขียว ทั้ง 4 ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 และเชื้อทางการค้า 2 ชนิด

แมลงในนาข้าว	ไอโซเลทเชื้อราที่ลงทำลายแมลง					
	03	08	38	48	*M. anisopliae*™	*M. flavoviride*™
Dicladispa armigera (Olivier)	-	-	-	-	-	-
Orseolia oryzae (Wood-Mason)	-	-	-	-	-	-
Leptocorisa oratorius (Fabricius)	-	-	-	-	-	-
Nilaparvata lugens (Stål)	√	√	√	√	-	-
Scotinophara coarctata (Fabricius)	-	-	-	-	-	-
Recilia dorsalis (Motschulsky)	√	√	√	√	-	-
Cofana spectra (Distant)	-	-	-	-	-	-
Nephotettix nigropictus (Stål)	-	√	-	-	-	-
Spodoptera mauritia (Boisduval)	-	-	-	-	-	-
Scirpophaga incertulas (Walker)	-	-	-	-	-	-
Chilo polychrysus (Meyrick)	-	-	-	-	-	-
Nymphula depunctalis (Guenee)	-	-	-	-	-	-
Cnaphalocrocis medinalis (Guenee)	-	-	-	-	-	-
Locusta migrotoria manilensis (Meyen)	-	-	-	-	-	-
Oxya japonica japonica (Thunberg)	-	-	-	-	-	-
Stenchaetothrips biformis (Bagnall)	-	-	-	-	-	-
Aiolopus sp.	√	√	-	-	-	-
Ophionea ishii ishii (Habu)	-	-	-	-	-	-
Coccinella transversalis Fabricius	-	-	-	-	-	-
Micraspis discolor (Fabricius)	-	-	-	-	-	-
Paederus fuscipes Curtis		-	-	-	-	-
Ochthera brevitibialis (de Meijere)	-	-	-	-	-	-
Cyrtorhinus lividipennis (Reuter)	-	-	-	-	-	-
Tytthus chinensis (Stål)	-	-	-	-	-	-
Polytoxus sp.	-	-	-	-	-	-

* เครื่องหมาย (-) คือ ไม่พบเชื้อราลงทำลาย

ตาราง 3 (ต่อ)

แมลงในนาข้าว	ไอโซเลทเชื้อราที่ลงทำลายแมลง					
	03	08	38	48	*M. anisopliae*™	*M. flavoviride*™
Odontoponera transversa (Smith)	-	-	-	-	-	-
Agriocnemis femina femina (Brauer)	-	-	-	-	-	-
Agriocnemis pygmaea (Rambur)	-	-	-	-	-	-
Elattoneura caesia (Hagen)	-	-	-	-	-	-
Conocephalus longipennis (de Haan)	-	-	-	-	-	-
Metioche vittaticolis (Stål)	-	-	-	-	-	-
Medetera sp.	-	-	-	-	-	-
Syntormon sp.	-	-	-	-	-	-
Pipunculus sp.	-	-	-	-	-	-
Argyrophylax nigrotibialis (Baranov)	-	-	-	-	-	-
Bracon sp.	-	-	-	-	-	-
Apanteles sp.	-	-	-	-	-	-
Copidosomopsis sp.	-	-	-	-	-	-
Xanthopimpla flavolineata (Cameron)	-	-	-	-	-	-
Temeluca philippinnensis Ashmead	-	-	-	-	-	-
Pardosa pseudoannulata (Boesenberg and Strand)	-	-	-	-	-	-
Oxyopes lineatus (Latreille)	-	-	-	-	-	-
Tetragnatha javana (Thorell)	-	-	-	-	-	-
Tetragnatha maxillosa Thorell	-	-	-	-	-	-
Tetragnatha nitens Audouin	-	-	-	-	-	-
Araneus inustus (L.Koch)	-	-	-	-	-	-

* เครื่องหมาย (-) คือ ไม่พบเชื้อราลงทำลาย

ทดสอบการก่อโรคของเชื้อราเขียวกับเพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบความเฉพาะเจาะจงพบว่าเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท คือ MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 สามารถลงทำลายกับเพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักได้ เมื่อนำเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท ทดสอบศักยภาพกับเพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก พบว่าเชื้อราเขียวไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 สามารถทำให้เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักมีอัตราการตายร้อยละ 100 ภายใน 7 วัน โดยมีอัตราการตายในวันที่ 7 คือ 85.71, 100.00, 100.00 และ 95.24 ตามลำดับ โดยเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถทำให้เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักตายร้อยละ 50 ภายใน 4.37, 4.78, 3.61 และ 3.99 วันตามลำดับ (ตาราง 4)

ทดสอบการก่อโรคของเชื้อราเขียวกับเพลี้ยจักจั่นเพลี้ยจักจั่นสีเขียวในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบความเฉพาะเจาะจงพบว่าเชื้อราเขียวไอโซเลท MRT-PCH-01-08 สามารถลงทำลายเพลี้ยจักจั่นสีเขียวได้ เมื่อทดสอบศักยภาพกับเพลี้ยจักจั่นสีเขียว พบว่า เชื้อราเขียวไอโซเลท MRT-PCH-01-08 สามารถทำให้เพลี้ยจักจั่นสีเขียวตายร้อยละ 100 ภายในระยะเวลา 7 วัน โดยเชื้อราสามารถทำให้เพลี้ยจักจั่นสีเขียวตายร้อยละ 50 ภายในระยะเวลา 4.32 วัน (ตาราง 4)

ตาราง 4 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักและเพลี้ยจักจั่นสีเขียวหลังจากสัมผัสเชื้อราเขียว 4 ไอโซเลท ในวันที่ 7 ในระดับห้องปฏิบัติการ

ชนิดของแมลง	เชื้อราเขียว	ร้อยละการตาย ± SE	LT_{50} ± SE (day)
เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก	MRT-PCH-01-03	85.71±0.0[b]	4.37±0.03
	MRT-PCH-01-08	100.00±0.0[a]	4.78±0.08
	MRT-PCH-01-38	100.00±0.0[a]	3.61±0.05
	MRT-PCH-01-48	95.24±0.3[a]	3.99±0.04
เพลี้ยจักจั่นสีเขียว	MRT-PCH-01-08	100.00±0.0[a]	4.32±0.05

*ตัวอักษรที่แตกต่างกัน ([a,b]) ในคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวที่อุณหภูมิต่าง ๆ

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว จำนวน 4 ไอโซเลท คือ MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ระดับอุณหภูมิ 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ มีค่าเท่ากับ 4, 4.1, 4.1 และ 4.15 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % ของช่วงอุณหภูมิที่ 15 – 35 องศาเซลเซียส ในวันที่ 10 ของการบ่มเชื้อในสภาวะไร้แสง (ตาราง 5) แต่เมื่อเปรียบระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวกับอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวแต่ละไอโซเลทมีการเจริญเติบโตในแต่ละช่วงอุณหภูมิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตาราง 6) การสร้างสปอร์ของเชื้อราเขียว มีการสร้างที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของทั้ง 4 ไอโซเลท ส่วนช่วงอุณหภูมิอื่นยังไม่มีการสร้างสปอร์ในวันที่ 10 ของการบ่มเชื้อ ส่วนช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 40 องศาเซลเซียสขึ้นไปเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่สามารถเจริญได้เลย ในส่วนของสีโคโลนีพบว่าในวันที่ 10 ของการบ่มเชื้อ ของช่วงอุณหภูมิ 20 – 30 องศาเซลเซียส ของทุกไอโซเลท มีลักษณะเส้นใยเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลือง และช่วงอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เริ่มสร้างสปอร์สีเขียวจากช่วงกลางโคโลนีขยายออกไป โดยสีของสปอร์มีลักษณะเป็นสีเขียวอ่อนไล่ระดับไปเป็นสีเขียวเข้ม (ภาพ 15) รูปร่างลักษณะของโคโลนี ทุกไอโซเลทมีลักษณะเจริญขยายเป็นวงกลม แต่ช่วงอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ลักษณะโคโลนีมีการบิดเบี้ยว มีการขยายออกเพียงเล็กน้อย (ภาพ 16) การเกิดหยดน้ำบนโคโลนี ไม่มีการเกิดหยดน้ำบนโคโลนีของทุกไอโซเลท และไม่มีการสร้าง synnemata ในทุกไอโซเลท

ตาราง 5 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวระหว่างแต่ละไอโซเลทกับช่วงอุณหภูมิต่าง ๆ

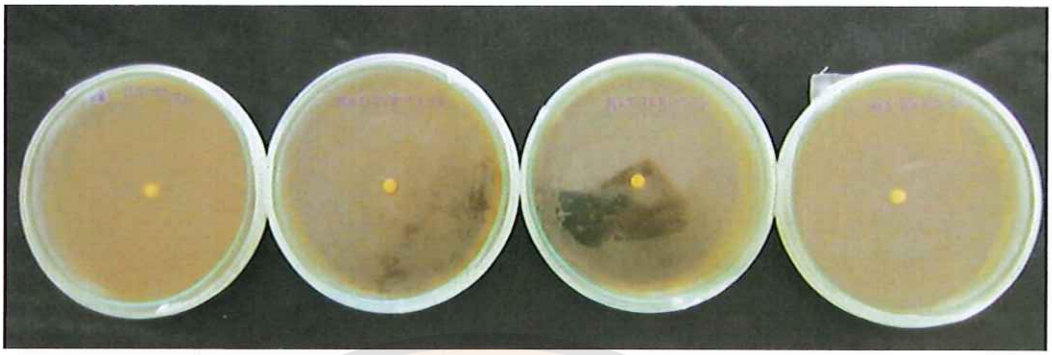
ไอโซเลท	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)/อุณหภูมิ (°C)				
	15	20	25	30	35
MRT-PCH-01-03	1.20^{ns}	3.22^{ns}	3.07^{ns}	4.00^{ns}	1.72^{ns}
MRT-PCH-01-08	1.90^{ns}	3.06^{ns}	3.65^{ns}	4.10^{ns}	1.75^{ns}
MRT-PCH-01-38	2.38^{ns}	3.48^{ns}	3.60^{ns}	4.10^{ns}	1.80^{ns}
MRT-PCH-01-48	2.25^{ns}	3.42^{ns}	3.30^{ns}	4.15^{ns}	1.67^{ns}

*ns= ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในคอลัมภ์เดียวกัน

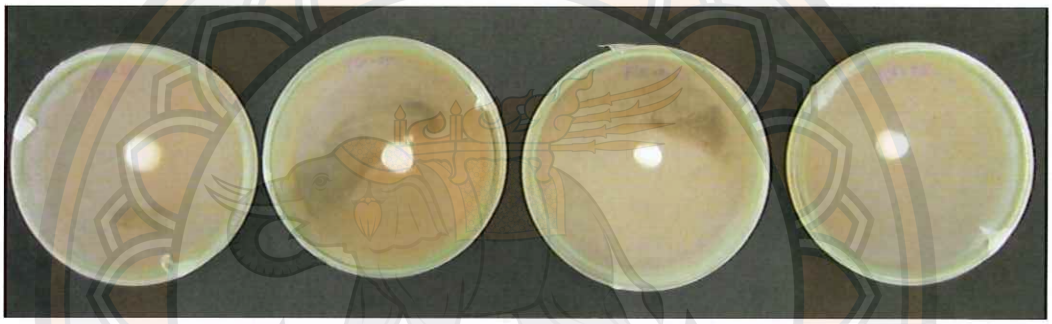
ตาราง 6 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวระหว่างอุณหภูมิ 15 – 35 องศาเซลเซียส กับเชื้อราเขียวแต่ละไอโซเลท

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)/ไอโซเลท			
	MRT-PCH-01-03	MRT-PCH-01-08	MRT-PCH-01-38	MRT-PCH-01-48
15	1.20^{e}	1.90^{d}	2.38^{c}	2.25^{c}
20	3.22^{b}	3.06^{c}	3.48^{b}	3.42^{b}
25	3.07^{c}	3.65^{b}	3.60^{b}	3.30^{b}
30	4.00^{a}	4.10^{a}	4.10^{a}	4.15^{a}
35	1.72^{d}	1.75^{d}	1.80^{d}	1.67^{d}

*ตัวอักษรที่ต่างกัน (^{a,b,c,d,e}) ในคอลัมภ์เดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)



a



b

c

ภาพ 15 การเจริญของเชื้อราเขียวจำนวน 4 ไอโซเลท คือ MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ หลังการบ่มเชื้อ 10 วัน ในสภาพไร้แสง

a. อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

b. อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

c. อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

a

b

c

ภาพ 16 การเจริญของเชื้อราเขียวจำนวน 4 ไอโซเลท คือ MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ หลังการบ่มเชื้อ 10 วัน ในสภาพไร้แสง

a. อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

b. อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

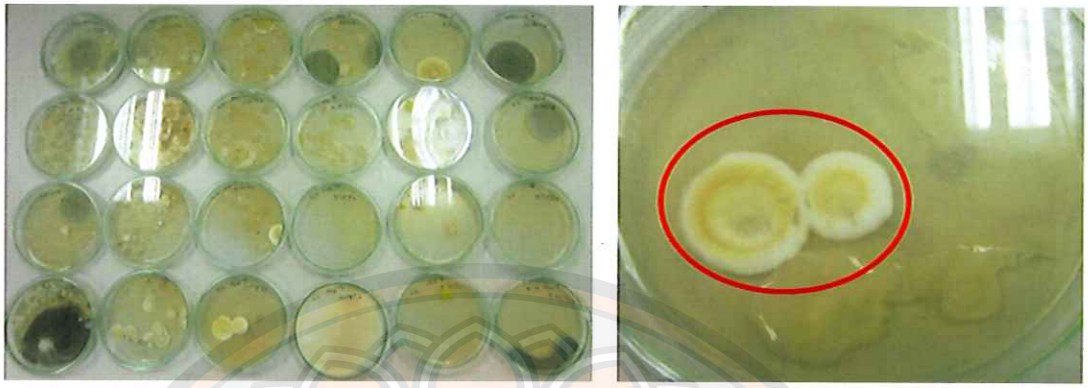
c. อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ศึกษาระยะเวลาในการคงอยู่ของเชื้อราเขียวในสภาพแวดล้อม .

จากการศึกษาความคงอยู่ของเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท เป็นระยะเวลา 6 เดือน คือ ช่วงเดือน พฤษภาคม – ตุลาคม พ.ศ. 2557 พบว่าในเดือนที่ 6 มีเชื้อราเขียวเพียง 2 ไอโซเลท ที่ยังมีโคโลนีของเชื้อขึ้นอยู่ คือ ไอโซเลท MRT-PCH-01-03 และ MRT-PCH-01-48 มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 4 และ 1 โคโลนี ตามลำดับ โดยในแต่ละเดือนไอโซเลท MRT-PCH-01-03 มีจำนวนโคโลนี ลดลงทุกเดือนยกเว้นเดือนที่ 2 และ เดือนที่ 4 ที่มีจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้น แต่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้จนถึงเดือนที่ 6 โดยมีจำนวนโคโลนีตั้งแต่เดือนที่ 1 – 6 คือ 10.87, 23.25, 15.25, 5.25, 3.75 และ 4 โคโลนี ตามลำดับ ไอโซเลท MRT-PCH-01-08 มีจำนวนโคโลนีลดลงทุกเดือน จนถึงเดือนที่ 5 มีจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้น โดยมีจำนวนโคโลนีตั้งแต่เดือนที่ 1 – 5 คือ 31.25, 18.00, 10.75, 1.50 และ 2.00 โคโลนี ตามลำดับ ไอโซเลท MRT-PCH-01-38 มีจำนวนโคโลนีลดลงทุกเดือนยกเว้นในเดือนที่ 2 มีจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้นโดยมีจำนวนโคโลนีตั้งแต่เดือนที่ 1 – 5 คือ 29.87, 30.25, 6.50, 6.50 และ 4.25 โคโลนี ตามลำดับ และ ไอโซเลท MRT-PCH-01-48 มีจำนวนโคโลนีลดลงทุกเดือนจนถึงเดือนที่ 6 ยกเว้นเดือนที่ 2 เช่นกันที่มีจำนวนโคโลนีเพิ่มขึ้นจากเดือนที่ 1 โดยมีจำนวนโคโลนี คือ 6.75, 8.50, 6.00, 2.00, 2.00 และ 1 โคโลนี ตามลำดับ (ตาราง 7 และภาพ 17)

ตาราง 7 ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีต่อเพลทของเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท ที่ตรวจพบจากตัวอย่างดินที่ทดสอบความคงทนเชื้อในสภาพธรรมชาติตั้งแต่เดือนที่ 1 - 6

ไอโซเลท	เฉลี่ยจำนวนโคโลนีต่อเพลทในแต่ละเดือน					
	1	2	3	4	5	6
MRT-PCH-01-03	10.87	23.25	15.25	5.25	3.75	4
MRT-PCH-01-08	31.25	18.00	10.75	1.50	2.00	0
MRT-PCH-01-38	29.87	30.25	6.50	6.50	4.25	0
MRT-PCH-01-48	6.75	8.50	6.00	2.00	2.00	1



ภาพ 17 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเขียวที่แยกจากดิน

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ลงทำลาย

พบซากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลถูกเชื้อราเขียวลงทำลายจากพื้นที่จังหวัดพิจิตรจำนวน 1 ตัว แยกเชื้อราเขียวได้ 50 ไอโซเลท ใส่รหัสแต่ละไอโซเลท ตั้งแต่ MRT-PCH-01-01 ถึง MRT–PCH-01-50 และจัดเก็บเป็นตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20°C และสามารถเพาะเลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้อย่างน้อยกรงละ 10,000 ตัว จำนวน 10 กรง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

พบเชื้อราเขียว 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีอัตราการตายร้อยละ 100 ภายใน 6 วัน หลังสัมผัสเชื้อราเขียว และไอโซเลทที่สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 รวดเร็วที่สุดคือไอโซเลท MRT-PCH-01-48 ใช้ระยะเวลา 3.12 วัน รองลงมาคือไอโซเลท MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-03 มีค่า (LT_{50}) คือ 3.24, 3.31 และ 3.38 วัน ตามลำดับ

การศึกษาความเฉพาะเจาะจงของเชื้อราเขียวต่อการควบคุมแมลงในนาข้าวในระดับห้องปฏิบัติการ

เชื้อราเขียว ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถลงทำลายแมลงศัตรูข้าวได้หลายชนิด คือ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และตั๊กแตนหนวดสั้น ไม่พบเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทลงทำลายแมลงศัตรูธรรมชาติ

เชื้อราเขียวไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 สามารถทำให้เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักมีอัตราการตายร้อยละ 100 ภายใน 7 วัน โดยมีอัตราการตายในวันที่ 7 คือ 85.71, 100.00, 100.00 และ 95.24 ตามลำดับ และสามารถทำให้เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักตายร้อยละ 50 พบว่า เชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถทำให้เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักตายร้อยละ 50 ภายใน 4.37, 4.78, 3.61 และ 3.99 วันตามลำดับ

เชื้อราเขียวไอโซเลท MRT-PCH-01-08 สามารถทำให้เพลี้ยจักจั่นสีเขียวตายร้อยละ 100 ภายในระยะเวลา 7 วัน และสามารถทำให้เพลี้ยจักจั่นสีเขียวตายร้อยละ 50 ภายในระยะเวลา 4.32 วัน

ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียวที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ในวันที่ 10 หลังการบ่มเชื้อในสภาพไร้แสง เชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ มีค่าเท่ากับ 4, 4.1, 4.1 และ 4.15 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % ของช่วงอุณหภูมิที่ 15 – 35 องศาเซลเซียส ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการสร้างสปอร์ทุกไอโซเลท ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 40 องศาเซลเซียสขึ้นไปเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่สามารถเจริญได้เลย ในส่วนของสีโคโลนีพบว่าในวันที่ 10 หลังการบ่มเชื้อในสภาพไร้แสง ของช่วงอุณหภูมิ 20 – 35 องศาเซลเซียส ของทุกไอโซเลท มีลักษณะเส้นใยเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลือง รูปร่างลักษณะของโคโลนี ทุกไอโซเลทมีลักษณะเจริญขยายเป็นวงกลม แต่ช่วงอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ลักษณะโคโลนีมีการบิดเบี้ยว มีการขยายออกเพียงเล็กน้อย ไม่มีการเกิดหยดน้ำบนโคโลนี และไม่มีการสร้าง synnemata ของทุกไอโซเลท

ศึกษาระยะเวลาในการคงอยู่ของเชื้อราเขียวในสภาพแวดล้อม

เชื้อราไอโซเลท MRT-PCH-01-03 และ MRT-PCH-01-48 สามารถเจริญได้ในเดือนที่ 6 โดยมีจำนวนโคโลนีเฉลี่ย คือ 4 และ 1 โคโลนี ตามลำดับ ส่วนเชื้อราไอโซเลท MRT-PCH-01-08 และ MRT-PCH-01-38 สามารถเจริญได้ถึงเดือนที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

การใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลง เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถลดปริมาณแมลงศัตรูพืชได้ และยังไม่มีพิษตกค้างในผลผลิต ไม่ก่อให้เกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อม ไม่ทำให้แมลงสร้างความต้านทานได้ง่าย สามารถใช้กำจัดแมลงที่มีวงจรชีวิตอยู่ในดินหรือใกล้พื้นดินได้ ใช้กำจัดแมลงปากดูดที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นใช้ไม่ได้ผล มีความปลอดภัยต่อศัตรูธรรมชาติหรือแมลงที่มีประโยชน์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ร่วมกับการจัดการวิธีอื่นได้ โดยไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช สัตว์ชนิดต่าง ๆ รวมถึงมนุษย์ ซึ่งการค้นหาซากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเขียวลงทำลายนั้น เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการค้นหาศัตรูธรรมชาติที่ปลอดภัยนำมาทดสอบศักยภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลซึ่งเป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญมาก โดยการใช้เชื้อราเขียวมีความสะดวกสามารถผลิตเพิ่มปริมาณได้ง่าย จากการค้นหาเชื้อราเขียวที่ลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลพบซากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจำนวน 1 ตัวถูกเชื้อราเขียวลงทำลาย แยกเชื้อราเขียวได้ 50 ไอโซเลท และทดสอบศักยภาพของเชื้อราทั้ง 50 ไอโซเลทกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบเชื้อราเขียวที่ผ่านการคัดเลือกทั้งหมด 4 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท MRT-PCH-01-03, MRT-PCH-01-08, MRT-PCH-01-38 และ MRT-PCH-01-48 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ สอดคล้องกับผลการวิจัยของ อรุณี จันทรสนิท และนฤมล ศุภวนานุสรณ์ (2537; Bandara and Ahangama 1994) โดยความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ 10^8 โคนิเดีย /มิลลิลิตร สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Pham, et al. (1994) ที่พบว่าเมื่อใช้เชื้อราเขียวที่ความเข้มข้น 10^6 - 10^8 โคนิเดีย /มิลลิลิตร สามารถป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดี เชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถฆ่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายได้อย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน และให้ผลชัดเจนคือเพลี้ยตายทั้งหมดภายใน 6 วันหลังจากสัมผัสเชื้อรา โดยมีระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายสะสมที่ร้อยละ 50 ในช่วง 3.12 - 3.38 วัน รวดเร็วกว่าเชื้อราเขียวโดยทั่วไปที่มักพบว่ามีค่า LT_{50} อยู่ที่ 9 ถึง 10 วัน (Geng and Zhang, 2004, p. 89)

การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในระบบนิเวศเกษตรที่ความหลากหลายทางชีวภาพสูง เช่นนาข้าวนั้น ควรมีการศึกษาถึงผลกระทบต่อแมลงชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ในนาข้าวเพิ่มเติมเพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความเหมาะสมสามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริงและยั่งยืน (Burge, 1988) จากผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงพบว่าเชื้อราเขียว ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถลงทำลายแมลงศัตรูข้าวได้หลายชนิด คือ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และตั๊กแตนหนวดสั้น ไม่พบการลงทำลายแมลงศัตรูข้าวอื่น ๆ เช่น หนอนห่อใบ หนอนม้วนใบ แมลงหล่า แมลงสิง หนอนหน้าแมว แมลงบั่ว รวมทั้งศัตรูธรรมชาติ

อื่น ๆ เช่น ด้วงเต่าตัวห้ำ แมลงปอ แมลงวันตัวห้ำ และแมงมุม สอดคล้องกับงานวิจัยของ เพชรหทัย ปฏิรูปานุสร และ อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ (2550) ที่พบว่าเชื้อราเขียวจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล สามารถทำให้เกิดโรคกับเพลี้ยจักจั่นสีเขียวตัวเต็มวัยได้ ทำให้แมลงเป็นโรคถึงร้อยละ 66.2 เช่นเดียวกับการศึกษาวิจัยของ Bandara and Ahangama (1994; Pham, et al., 1994) ที่พบว่าเชื้อราเขียวที่ควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล มีความจำเพาะต่อกลุ่มของเพลี้ย เช่น เพลี้ยกระโดดหลังขาว และเพลี้ยจักจั่นสีเขียว เป็นต้น และให้ผลในการควบคุมที่ร้อยละ 30 - 90 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเชื้อ และสภาพแวดล้อม โดยทั่วไป เชื้อราเขียวมีคุณสมบัติที่เป็นได้ทั้งเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค (insect disease) และเชื้อที่ลงทำลายซากแมลงที่ตายแล้ว (saprophytic fungi) (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2535) เชื้อที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกับแมลงส่วนใหญ่มีเหยื่อหลากหลายทั้งแมลงและอาร์โธพอดอื่น ๆ เช่น เห็บ และหมัด เป็นต้น แต่บางสายพันธุ์มีความเฉพาะเจาะจง ในการลงทำลายเหยื่ออาศัยเพียงไม่กี่ชนิดที่ใกล้เคียงกันเท่านั้น (มยุรี ดอแม็ง, 2548) ดังนั้นจากเชื้อราเขียวที่สำรวจพบ มีแนวโน้มของศักยภาพในการลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่นในนาข้าวได้ โดยความเฉพาะเจาะจงเกิดจากเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้นเพื่อเจาะทะลุผนังลำตัวของแมลงเข้าไปภายในร่างกายแมลงเป็นสำคัญ (Valaderes-Inglis and Peberdy, 1997) มีผลทำให้ระยะเวลาที่เชื้อสามารถทำให้แมลงตายมีความแปรปรวนแตกต่างกันตามระดับความรุนแรงของเชื้อราเขียว จากผลการวิจัยดังกล่าวทำให้การนำเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทสู่การใช้ประโยชน์นั้นสามารถครอบคลุมแมลงศัตรูข้าวในกลุ่มเพลี้ยต่าง ๆ ได้แต่หากจำเป็นต้องควบคุมแมลงศัตรูข้าวในกลุ่มอื่น ๆ เช่น หนอนผีเสื้อ แมลงสิง แมลงหล่า หนอนกอ ฯลฯ จำเป็นต้องมีการผสมกับเชื้อราเขียวสายพันธุ์อื่น ๆ ที่สามารถลงทำลายแมลงศัตรูข้าวกลุ่มอื่น ๆ เหล่านั้นร่วมด้วย เพื่อให้ผลการควบคุมที่ครอบคลุมศัตรูข้าวได้อย่างเหมาะสม อย่างไรก็ตาม การที่เชื้อราเขียวทางการค้าทั้ง 2 ชนิด ไม่สามารถลงทำลายแมลงในนาข้าวนั้นอาจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ต้นกำเนิดของเชื้อราทางการค้าทั้ง 2 ชนิด ไม่ได้ถูกค้นพบจากแมลงที่มีความสัมพันธ์กับแมลงในนาข้าว ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีความสำคัญในการใช้ เนื่องจากเชื้อราเขียวเป็นเชื้อราที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแมลงอาศัยมาก (Shi and Feng, 2004, p. 165; Milner, et al., 1998, pp. 244-247) ดังนั้นผู้ผลิต และผู้ขายควรแนะนำเกษตรกรให้ชัดเจนในการนำไปใช้ นอกจากนี้การเก็บรักษาให้เชื้อราเขียวเพื่อให้สามารถคงประสิทธิภาพไม่เสียสภาพก่อนนำไปใช้ มีส่วนสำคัญมากเช่นกัน แม้มีการระบุวันหมดอายุของเชื้อที่ภาชนะบรรจุ แต่ด้วยการเก็บรักษาที่ไม่ถูกต้องอาจทำให้เชื้อหมดสภาพเร็วขึ้นได้

การทดสอบศักยภาพของเชื้อราเขียวกับเพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก และเพลี้ยจักจั่นสีเขียว พบว่าเชื้อราเขียวสามารถลงทำลายแมลงทั้ง 2 ชนิด ได้ภายใน 7 วัน สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Aguda, et al. (1984; Medrano, et al., 1984) ที่พบว่าเชื้อราเขียว สามารถทำลายเพลี้ยกระโดด และเพลี้ยจักจั่นได้อย่างมากมาย ซึ่งโดยส่วนใหญ่ กลุ่มแมลงจำพวกปากดูด เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียว เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก แมลงสิง และแมลงหล่า มีความปลอดภัยต่อเชื้อที่เข้าทางปาก แต่เชื้อราสามารถทำลายได้ทางผิวแมลงโดยตรงจึงสามารถนำมาใช้ในการควบคุมแมลงกลุ่มนี้ได้ ดังนั้นเชื้อราเขียวสายทั้ง 4 ไอโซเลท มีแนวโน้มที่สามารถใช้ในป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่นปีกลายหยักและเพลี้ยจักจั่นสีเขียวได้ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ (จริยา จันทร์ไพแสง และคณะ, 2529; อรุณี จันทรสนิท และนฤมล ศุภวนานุสรณ์, 2537; เพชรหทัย ปฏิรูปานุสร และ อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ, 2550) ที่พบว่าเชื้อราเขียวสามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดด และเพลี้ยจักจั่นได้หลายชนิด และมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในจัดการเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาข้าวได้ (Bandara and Ahangama, 1994, p. 19; Geng and Zhang, 2004, pp. 89-97; Heinrichs and Miller, 1991)

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา 4 ไอโซเลท โดยศึกษาในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 10 – 45 องศาเซลเซียส เนื่องจากค้นพบเชื้อราในช่วงอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งถือว่าเป็นอุณหภูมิที่สูงมากสำหรับการเจริญของเชื้อ จากการศึกษาพบว่าช่วงอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด สำหรับเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท เนื่องจากสามารถสร้างเส้นใยขยายออกได้ดีที่สุด และเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 15 – 35 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ihara, et al. (2003) พบว่าเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลท HF 293 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แต่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และการทดลองของ Ghayadi and Abdollahi (2013) ที่พบว่าเชื้อราเขียวสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ 27 – 35 องศาเซลเซียส ภายใต้ช่วงแสงที่เหมาะสม แต่ไม่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ดังนั้นจากการทดสอบช่วงอุณหภูมิที่เชื้อราเขียวสามารถเจริญได้ในช่วง 15 – 35 องศาเซลเซียส จึงถือเป็นช่วงอุณหภูมิที่ปกติที่เชื้อราเขียวทั่วไปสามารถเจริญได้ อย่างไรก็ตามการที่เชื้อราเขียวสามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิสูงได้นั้นอาจขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความชื้นสัมพัทธ์ การได้รับแสงที่เพียงพอ เป็นต้น (Arthurs and Thomas, 2001, p. 61) ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีความจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อราเขียว ดังนั้นในการนำเชื้อราเขียวไปใช้ควรใช้ในช่วงเวลาที่เหมาะสม ทั้งในด้านสภาพอากาศ อุณหภูมิ รวมถึงความชื้นสัมพัทธ์ที่เพียงพอจะส่งผลให้การใช้เชื้อราเขียวในการป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีประสิทธิภาพมากขึ้น

การทดสอบความคงอยู่ของเชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท ในสภาพธรรมชาติเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่ามีเชื้อราเขียวพียง 2 ไอโซเลทที่สามารถมีชีวิตรอดได้ เนื่องจากช่วงที่ดำเนินการทดสอบนั้นเป็นช่วงฤดูร้อนถึงฤดูฝน คือตั้งแต่ช่วงเดือน พฤษภาคม – ตุลาคม 2557 สภาพอากาศในช่วงเดือนดังกล่าวมีทั้งร้อนสลับกับฝนตก ทำให้ดินที่ผสมเชื้อรามีทั้งสภาวะ แห้งแล้ง ดินแตกระแหง และมีน้ำท่วมขังเมื่อมีฝนตก รวมทั้งบริเวณที่วางดินทดสอบเป็นบริเวณพื้นที่ทำนาทำให้ดินทดสอบผ่านการไถพรวนเพื่อทำนา ทำให้เชื้อราไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ในสภาพแวดล้อมที่กดดันมากเกินไป แตกต่างจากงานวิจัยของ Denny (2005) ที่พบว่าเมื่อนำเชื้อราเขียวที่เพาะเลี้ยงในเปลือกไม้ผสมถ่านหินใส่ไว้บริเวณรากพืชทำให้เชื้อราเขียวสามารถมีชีวิตรอดได้เป็นระยะเวลานานถึง 342 วัน แต่จากงานวิจัยพบว่าเชื้อราเขียวสามารถมีชีวิตรอด และยังคงมีปริมาณมากขึ้นในเดือนที่ 2 เกือบทุกไอโซเลท และหลังจากเดือนที่ 3 เป็นต้นไปปริมาณของเชื้อราทุกไอโซเลทลดลงทุกเดือนจนถึงเดือนที่ 6 ทำให้สามารถคาดการณ์ได้ว่าเกษตรกรที่ใช้เชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลควรมีการเพิ่มปริมาณเชื้อราเขียวลงในนาข้าวทุก ๆ 2 เดือน เพื่อให้มีปริมาณของเชื้อราเขียวมากเพียงพอต่อการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หรือหากเกิดการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเกิดขึ้นเกษตรกรควรพ่นเชื้อราเชียวทุก ๆ 6 – 7 วัน เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่เชื้อราเขียวทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้เร็วที่สุด

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กองกีฏและสัตววิทยา. (2544). **การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน.** เอกสารวิชาการ. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กองวัตถุมีพิษการเกษตร. (2543). การห้ามประกอบกิจการและห้ามใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตร. **ข่าวสารวัตถุมีพิษ**, 27(3), 29-38.

จริยา จันทร์ไพแสง, ทิพย์วดี อรรถธรรม และวาลุลี โรจนวงศ์. (2529). **การสำรวจโรคเชื้อราของเพลี้ยจั๊กจั่นบางชนิดที่เป็นศัตรูสำคัญทางเศรษฐกิจ.** กรุงเทพฯ: คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิรพงศ์ ใจรินทร์, กิจติพงษ์ เพ็งรัตน์, สมาน คำมา, ธวัทชัย พรหมรักษา และสงวน เทียงดีฤทธิ์. (2544). การสำรวจแมลงศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูข้าว ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง. **วารสารวิชาการเกษตร**, 19(1), 71-83.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. (2535). **โรควิทยาของแมลง.** กรุงเทพฯ. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2544). **จุลชีววิทยาทั่วไป.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นริศ ท้าวจันทร์ และอนุชิต ชินาจริยวงศ์. (2551). ประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae). **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**, 39(3), 21-25.

เพชรหทัย ปฏิรูปานุสร และอัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ. (2550). ประสิทธิภาพของเชื้อราทำลายแมลงต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่นสีเขียว. **รายงานการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2550.** กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, กรมการข้าว.

เพชรหทัย ปฏิรูปานุสร. (2547). **บทบาทของเชื้อราทำลายแมลงในการควบคุมแมลงศัตรูพืช.** พิษณุโลก: ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก, สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 2.

มยุรี ดอแม็ง. (2548). **เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง.** สืบค้นเมื่อ 29 มกราคม 2558, จาก http://yalor.yru. ac.th/~dolah/notes/4032603-2-48/NEWS/News_404652068.doc.

วนิช ยาคล้าย, ปรีชา วังศิลาบัตรม, สุวัฒน์ รวยอารีย์, เฉลิม สินธุเสก และเฉลิมวงศ์ ถิระวัฒน์. (2540). **สำรวจการใช้สารฆ่าแมลงและป้องกันกำจัดศัตรูข้าว**. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

วาสนา ฉัตรดำรง. (2544). **ราวิทยาเบื้องต้น**. พิษณุโลก: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร.

วิวัฒน์ เสือสะอาดม, พิมพรรณ สมมาตย์, ศิติภา นักขัตระ, วิมลมาศ โอสถเสน และอาภรณ์ ปั้นทองคำ. (2548). การเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* และการนำไปใช้ควบคุมหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *Dorysthenes buqueti* Guerin (Coleoptera: Cerambycidae) ในสภาพไร่. ใน **การประชุมวิชาการประจำปี 2548 ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์** (หน้า 1-13). กาญจนบุรี: โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว รีสอร์ท.

วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ, ชุมพณ กันทะ, วิภา หอมหวล, สิริรัตน์ แสนยงค์, วณิชญา ฉิมนาค และวีรยุทธ สร้อยนาค. (2553). การบริหารโครงการและดำเนินโครงการวิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ: การควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธีของศูนย์ภาคเหนือตอนล่าง. **รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์**. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

สมบัติ จุจาคม, ภมร ปัตตาวะตัง, นลินี เจียงวรรธนะ และเพชรหทัย ปฏิรูปนุสร. (2541). **การควบคุมแมลงสิงโดยเชื้อราขาว *Beauveria bassiana* และเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae***. ใน **เอกสารการสัมมนาทางวิชาการ เรื่องการพัฒนาข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ครั้งที่ 9** (หน้า 198-209). พิษณุโลก: กรมวิชาการเกษตร.

สำนวน ฉิมพกา และวีรเทพ พงษ์ประเสริฐ. (2548). ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูข้าวของเกษตรกร อำเภอตะพานหิน จังหวัดพิจิตร. **วารสารเกษตรนเรศวร**, 8(1), 77-94.

สุดาภรณ์ ใจชื่น. (2544). **การควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* Stål) ในข้าวโดยชีววิธีด้วย *Metarhizium* spp.** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุวัฒน์ รวยอารีย์ และรจนา สุรการ. (2542). ระบบการปลูกข้าวกับการพยากรณ์การระบาดของแมลงศัตรูข้าวโดยใช้ข้อมูลแมลงจากกับดักแสงไฟ. **วารสารกีฏและสัตววิทยา**, 21(2), 108-113.

สุวัฒน์ รวยอารีย์. (2544). **เรียนรู้การจัดการแมลงศัตรูข้าวโดยวิธีผสมผสาน**. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

อรุณี จันทรสนิท และนฤมล ศุภวนานุสรณ์. (2537). การใช้เชื้อราในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลศัตรูข้าว. ใน **รายงานผลงานวิชาการประจำปี 2537** (หน้า 95-106). กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อาภรณ์ ปั้นทองคำ, ปวีณา บูชาเทียน และวิวัฒน์ เสือสะอาด. (2550). การใช้เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *Dorysthenes buqueti* Guerin (Coleoptera: Cerambycidae). ใน **รายงานผลงานวิจัย การประชุมวิชาการประจำปี 2550**. กรุงเทพฯ: ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ.

Abbott, W. S. (1925). Method for computing the effectiveness of an insecticide. Economic Entomology, 18, 256-267.

Aguda, R. M., Litsinger, J. A. and Roberts, D. W. (1984). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* on brown planthopper (BPH), whitebacked planthopper (WBPH) and green leafhopper (GLH). International Rice Research Newsletter, 9(6), 20.

Arthurs, S. and Thomas, M. B. (2001). Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. Journal of Invertebrate Pathology, 78, 59-65.

Baek, J. M. and Kenerley, C. M. (1998). Detection and enumeration of a genetically modified fungus in soil environments by quantitative competitive polymerase chain reaction. FEMS Microbiology Ecology, 25(4), 419-428.

Bandara, J. M. and Ahangama, D. (1994). *Metarhizium* sp.: a new biocontrol agent for brown planthopper management in rice fields. International Rice Research Newsletter, 19(4), 19.

Bhathal, J. S., Dhillon, G. S. and Dhaliwal, G. S. (1991). Insecticide-induced resurgences in insect pests of agricultural crops. Indian Journal of Entomology, 53(3), 381-392.

Bidochka, M. J., Kamp, A. M., Lavender, T. M., Dekoning, J. and De Croos, J. N. A (2001). Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species. Applied and Environmental Microbiology, 67, 1335-1342.

Bridge, P. D., Prior, C., Sogbohan, J., Lomer, C. M., Carey, M. and Buddie, A. (1997). Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. Biodiversity and Conservation, 6, 177-189.

Briggs, J. D. (Ed.). (1975). Biological regulation of vectors: the saprophytic and aerobic bacteria and fungi: a conference report. Washington: US Department at Health, Education and Welfare.

Burge, M. N. (1988). Fungi in biological control systems. Manchester: Manchester University Press, U.K.

Butt, T. M., Jackson, C. W. and Magan, N. (2001). Introduction: fungal biological control agents: progress, problems and potential, In Butt, T. M., Jackson, C. W. and Magan, N. (Eds.), Fungi as biocontrol agents (pp. 1–22). Walllingford: CABI Publishing.

Charnley, A. K. (1989). Mechanisms of fungal pathogenicity in insect, In Wipps, J. M. and Lumsden R. D. (Eds). The biotechonology of fungi for improving plant growth (pp. 85-123). Cambridge: University Press.

Denny, J. B. (2005). Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: implications for pest management. Biological Control, 32, 155-163.

Dent, D. and Jenkins, N. E. (1998). Safety, specificity and distribution of fungal isolates. Walllingford: CABI Publishing.

Driver, F., Milner, R. J. and Trueman, J. W. H. (2000). A taxanomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. Mycological Research, 104, 134-150.

Evans, H. C. (1987). Fungal pathogens of some subtropical and tropical weeds and possibilities for biological control. Biological News and Information, 8(1), 7-30.

Ferron, P. (1981). Pest control by *Beauveria* and *Metarhizium*. In Burges H. D. (Ed.) Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980 (pp. 465-482). London: Academic Press.

Geng, B. W. and Zhang, R. J. (2004). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridu* to the developmental stages of brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål) and *Sogatella furcifera* (Horvath). Entomologia Sinica, 11(2), 89-97.

Ghayadi, S. and Abdollahi, M. (2013). Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae), isolated from suppressive soils of the boyer-ahmad region, iran, against j2s of *Heterodera avenae*. Plant Protection Research, 53(2), 165-171.

Heinrichs, E. A. and Miller, T. A. (1991). Rice insects: management strategies. New York: Springer-Verlag.

Hill, D. S. (1996). The economic importance of insects. London: Chapman & Hall.

Humber, R. A. (1998). Entomopathogenic fungal identification. Retrieved April 4, 2015, from http://www.ppru.cornell.edu/mycology/Insect_mycology.html.

Ignoffo, C. (1992). Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Florida Entomologist, 75, 516-525.

Ihara, F., Sato, T. and Toyama, M. (2003). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* to the chestnut weevil larvae under laboratory and field conditions. Applied Entomology and Zoology, 38, 461-456.

Inglis, P. W., Magalhães, B. P. and Valadares-Ingilis, M. C. (1999). Genetic variability in *Metarhizium flavoviride* revealed by telomeric fingerprinting. FEMS Microbiology Letters, 179, 49-52.

Iskandarov, U. S., Guzalova, A. G. and Davranov, K. D. (2006). Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Applied Biochemistry and Microbiology, 42, 72-76.

Keller, S., Kessler, P. and Schweizer, C. (2003). Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. BioContorl, 48, 307-319.

Kershaw, M. J., Moorhouse, E. R., Bateman, R., Reynolds, S. E. and Charnley, A. K. (1999). The role of destruxins in the pathogenicity of three species of insect. Journal of Invertebrate Pathology, 74(3), 213-223.

Kobayashi, Y. (1951). The genus *Cordyceps* and its allies. Science Reports of the Tokyo Bunrika Daigaku, 84, 53-260.

Lacey, L. A. (1997). Manual of techniques in insect pathology. New York: Academic Press.

Madelin, M. F. (1963). Disease caused by hyphomycetous fungi. In Steinhaus, E. A. (Ed.). Insect pathology, an advanced treatise (Vol. 2, pp. 233-271). New York: Academic Press.

Madelin, M. F., Robinson, R. K. and Williams, R. J. (1967). Appressorium like structures insect parasitizing Deuteromycetes. Journal of Invertebrate Pathology, 9, 404-412.

Matteson, P. C. (2000). Insect pest management in tropical Asian irrigated rice. Annual Review of Entomology, 45, 549-574.

Medrano, F., Heinrichs, E. A. and Aguda, R. M. (1984). Control of *Metarhizium anisopliae* in brown planthopper (BPH) rearing. International Rice Research Newsletter, 9(3), 15-16.

Milner, R. J. (2000). Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. Biocontrol News and Information, 21(2), 47-50.

Milner, R. J., Staples, J. A. and Lutton, G. G. (1998). The selection of an isolate of the Hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. Biological Control, 11, 240-247.

Müller-Kögler, E. (1965). Pilzk.rankheiten bei Insekten. Anwendung zur biologischen Schadlingsbekampfung an Grandlagen der Insektenmykolgie. Berlin: Pual Parey.

Pantou, M. P., Mavridou, A. and Typas, M. A. (2003). IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. Fungal Genetics and Biology, 38, 159-174.

Pathak, P. K., Saxena, R. C. and Heinrichs, E. A.. (1982). Para film sachet for measuring honeydew excretion by *Nilaparvata lugens* on rice. Journal of Economic Entomology, 75, 194-195.

Pham, T. T., Nguyen T. B., Dong T. and Tran, T. T. (1994). Effects of *Beauveria bassiana* Vuill. and *Metarhizium anisopliae* Sorokin on brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) in Vietnam. International Rice Research Newsletter, 19(3), 29.

Poinar, G. O.,and Thomas, G. M. (1978). Diagnotic manual for the identification of insect pathogens. New York: Plenum Press.

Renganayaki, K., Fritz, A. K., Sadasivam, S., Pammi, S., Harrington, S. E. and McCouch, S. R. (2002). Mapping and progress toward map-based cloning of brown planthopper biotype-4 resistance from *Oryza officinalis* into cultivated rice, *O. sativa*. Crop Science, (42), 2112-2117.

Rombach, M. C., Roberts, D. W. and Aguda, R. M. (1994). Pathogens of rice insects. In Heinrichs, E. A. (Ed.), Biology and management of rice Insects (pp. 613-655). New Delhi: Wiley Eastern.

Samson, R. A. (1981). Identification: entomopathogenic Deuteromycetes. In Burges, H. D. (Ed.). Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980 (pp. 94-106). New York: Academic Press.

Samson, R. A., Evan, H. C. and Latge, J. P. (1988). Atlas of entomopathogenic fungi. Berlin: Springer-Verlag.

Sewify, G. and Hashem, M. Y. (2001). Effect of the entomopathogenic fungus *Meterhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin on cellular defence response and oxygen uptake of the wax moth Galleria melonella L.(Lep., Pyralidae). Journal of Applied Entomology, 125, 533.

Shi, W. B. and Feng, M. G. (2004). Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. Biological Control, 30, 165-173.

Sideney, B. O., Miniuk, C. M., de Barros, N. M. and Azevedo, J. L. (2001). Growth and sporulation of *Metarhizium flavoviride* var. *flavoviride* on culture media and lighting regimes. Agricultural Science, 58(3), 613-616.

Suzuki, A. and Tamura, S. (1972). Isolation and structure of proto destruxin from *Metarhizium anisopliae*. Agricultural and Biological Chemistry, 36, 896-898.

Suzuki, A., Taguch, H, and Tamura, S. (1970). Isolation and structure elucidation of three new insecticidal cyclodepsipeptides, destruxins C and D and desmethyldestruxin B, produced by *Metarhizium anisopliae*. Agricultural and Biological Chemistry, 34, 813-816.

Tanada, Y. and Kaya, H. K. (1993). Insect pathology. New York: Academic Press.

TeBeest, D. O. and Templeton, G. E. (1985). Mycoherbicides: Progress in the biological control of weeds. Plant Disease, 69, 6-10.

Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. Transaction of the British Mycological Society, 66, 407-411.

Valaderes-Inglis, M. C. and Peberdy, J. F. (1997). Location of chitinolytic enzymes in protoplast and whole cell of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Mycological Research, 101(2), 1393-1396.

Van Driesche, R. G. and Bellows, Jr., S. T. (1996). Biological Control. New York: Chapman & Hall.

Veen, K. H. (1966). Oral infection of second - instar nymphs of *Schistocerca gregaria* by *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology, 8, 254-256.

Vidal, C. (2003). Effect of air humidity on the infection potential of hyphomycetous fungi as mycoinsecticides for *Trialeurodes vaporariorum*. Biocontrol Science and Technology, 13, 183-198.

Yang, H., Ren, X., Weng, Q., Zhu, L. and He, G. (2002). Molecular mapping and genetic analysis of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene. Hereditas, 136, 39-43.

Yendol, W. G. and Paschke, J. D. (1965). Pathology of an Entomophthora infection in the Eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar). Journal of Invertebrate Pathology, 7, 414-422.

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. Pesticide Science, 37, 375-379.