อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานการวิจัย

ศักยภาพของเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมด้วงหมัดผัก *Phyllotreta* spp.(Coleoptera: Chrysomellidae) ในพื้นที่ปลูกผักกะหล่ำเขตภาคเหนือตอนล่าง

Potential of *Metarhizium anisopliae* to Control *Phyllotreta* spp. (Coleoptera: Chrysomellidae) in Crucifers in Lower Northern Thailand

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน - 4 พ.ย. 2558
เลขทะเบียน 16890430
เลขเรียกหนังสือ ว SB
333
ว826ศ
2549

นายวีรเทพ พงษ์ประเสริฐ และคณะ

เสนอ
มหาวิทยาลัยนเรศวร
กรกฎาคม 2549

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

1. ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ศักยภาพของเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมด้วงหมัดผัก *Phyllotreta* spp.(Coleoptera: Chrysomellidae) ในพื้นที่ปลูกผักกะหล่ำเขตภาคเหนือตอนล่าง

   (ภาษาอังกฤษ) Potential of *Metarhizium anisopliae* to control *Phyllotreta* spp.(Coleoptera: Chrysomellidae) in crucifers in lower northern Thailand

2. รายชื่อคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

   2.1 หัวหน้าโครงการวิจัย นายวีรเทพ พงษ์ประเสริฐ (Mr. Weerathep Pongprasert)
   ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์
   ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
   หมายเลข โทรศัพท์ 055261000 ต่อ 2704 โทรสาร 055261986
   E-mail weerathepp@yahoo.com

   2.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย นางสาววิภา หอมหวน (Miss Wipa Hormhuan)
   ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์
   ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

   นายไสว บูรณ์พานิชพันธุ์ (Mr. Sawai Buranapanichaphun)
   ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3. ได้รับอนุมัติจัดสรรงบประมาณประจำปี 2548 .จำนวนเงิน...254,000......บาท
4. ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสาขา เกษตรศาสตร์และชีววิทยา
5. เริ่มทำการวิจัยเมื่อ (เดือน,ปี) ตุลาคม 2547...ถึง (เดือน,ปี)...กันยายน 2548.........

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยศักยภาพของเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมด้วงหมัดผัก *Phyllotreta* spp.(Coleoptera: Chrysomellidae) ในพื้นที่ปลูกผักกะหล่ำเขตภาคเหนือตอนล่าง (Potential of *Metarhizium anisopliae* to control *Phyllotreta* spp.(Coleoptera: Chrysomellidae) in crucifers in lower northern Thailand) ประจำปี 2548 เป็นจำนวนเงิน 254,000 บาท และใคร่ขอขอบพระคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้ร่วมสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ ทำให้การวิจัยสำเร็จอย่างดียิ่ง

บทคัดย่อ

ด้วงหมัดผัก จัดเป็นแมลงศัตรูผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ลงทำลายพืชผักได้ตลอดทั้งปี การควบคุมกระทำได้ยากมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะตัวเต็มวัย ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้และปรับตัวให้มีความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้อย่างรวดเร็ว การใช้เชื้อราเขียวควบคุมแมลงเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ประโยชน์เนื่องจากเป็นเชื้อราที่พบลงทำลายด้วงหมัดผักโดยทั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่มีความชื้นสูง เช่น แปลงผัก นอกจากนี้ยังไม่เคยมีรายงานถึงการสร้างความต้านทานของแมลงจากการใช้เชื้อราเขียวในการควบคุมเลย อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราเขียวในการควบคุมด้วงหมัดผักในประเทศไทยมีการดำเนินการน้อยมาก ดังนั้นจึงทำการศึกษาถึงศักยภาพของเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมด้วงหมัดผัก *Phyllotreta* spp.(Coleoptera: Chrysomellidae) ขึ้น โดยทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างของเชื้อรา *M. anisopliae* ประชากรต่าง ๆ ที่ดำรงชีพในแหล่งปลูกผักตระกูลกะหล่ำ จากเขตพื้นที่ปลูกผักหลักในภาคเหนือตอนล่าง ทั้งในส่วนที่เป็นเชื้อที่กำลังลงทำลายด้วงหมัดผัก ตัวอย่างดินตามบริเวณชายป่าที่ติดกับพื้นที่ปลูกผัก และด้วงหมัดผักตัวเต็มวัยที่กำลังลงทำลายพืช ทำการเพาะเลี้ยง ศึกษาประสิทธิภาพและความรุนแรงของเชื้อ และคัดเลือกเชื้อราเขียวที่มีความเหมาะสม ภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการที่มีความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ

ตัวอย่างถูกเก็บรวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ครอบคลุมพื้นที่เป้าหมายทั้งหมด 190 จุด ประกอบด้วยตัวอย่างแมลงเป็นโรคเชื้อราเขียว 51 ตัวอย่าง ตัวอย่างดิน 190 ตัวอย่าง และแมลงมีชีวิตจากจุดเก็บ 183 แห่ง โดยเชื้อที่พบสามารถทำให้เกิดโรคซ้ำกับแมลงได้ 16, 10, และ19 ตัวอย่างตามลำดับ และได้ดำเนินการใส่รหัสของตัวอย่างเชื้อที่พบเป็นMN01-45 ทำการคัดเลือกเชื้อโดยใช้อัตราการตายของแมลงและระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายแมลง ด้วยเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^8 conidia/ml จากนั้นทำการคัดเลือกแบบต่อเนื่อง ด้วยค่าความเข้มข้นของเชื้อในรูปของสปอร์หรือโคนีเดียที่สามารถทำให้เกิดโรคและส่งผลให้แมลงตายลงร้อยละ 50 (LC_{50}) พบว่าเชื้อหมายเลขรหัส MN13, MN14, MN15 จากบริเวณชุมชนชาวเขา อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก มีศักยภาพมากที่สุดในการลงทำลายด้วงหมัดผัก โดย มีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.8, 0.5 และ 0.7 X 10^6 conidia/ ml ตามลำดับ

คำสำคัญ: เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* การควบคุมด้วงหมัดผัก *Phyllotreta* spp.(Coleoptera: Chrysomellidae) ผักตระกูลกะหล่ำ

Abstract

Flea beetle has been recognized as major pest of vegetable causing vast damage in crucifer crops through all the year. The adult beetle can move rapidly and adapt itself to resist many insecticides in the short period of time that make difficult to control. The green fungi (*Metarhizium anisopliae*) become the significant alternative to control this insect since it naturally infects and cause death of the beetle in the moist condition as vegetable field and insect resistant problem has never been recorded. However, the available information of this fungi in Thailand still be insufficient. Therefore, potential of *M. anisopliae* to control *Phyllotreta* spp.(Coleoptera: Chrysomellidae) in crucifers in lower northern Thailand was conducted by collecting infected insects, soil, and life insect to search for *M. anisopliae* from vegetable plantations in lower northern Thailand, culturing and screening their efficiency and virulence under laboratory condition at 50% humidity $25 \pm 0.5\ ^{\circ}c$.

Specimens were collected from 190 places covering the whole target areas composed of 51 infected insects, 190 soil specimens, and life insects from 183 places which provided sources of *M. anisopliae* 16, 10, and 9 populations. Entomopathogenic fungi were then coded as MN01-45 and screened by stepwise procedure based on mortality rate and time consumed to kill insect using fungi at concentration 10^{8} conidia/ml, and consequently, lethal concentration (LC_{50}). *M. anisopliae* population, MN13-15, from mountain tribe community at Tha Song Yang, Tak were found highest potential (LC_{50} = 0.8, 0.5 and 0.7 X 10^{6} conidia/ ml respectively) to control flea beetle.

Key word: *Metarhizium anisopliae*, *Phyllotreta* spp.(Coleoptera: Chrysomellidae), Flea beetle, Crucifers crops

สารบัญเรื่อง

เรื่อง หน้า

บทนำ 1
วัตถุประสงค์ของโครงการ 3
ระเบียบวิธีวิจัย 8
ผลการวิจัยและวิเคราะห์ผล 11
สรุปผล 37
เอกสารอ้างอิง 38

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญตาราง

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1	แหล่งเก็บตัวอย่าง จำนวนพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง และลักษณะของตัวอย่างของที่มาของเชื้อราเขียวที่ทำการเก็บรวบรวม	13
ตารางที่ 2	พื้นที่พบตัวอย่างแมลงที่เป็นโรค จำนวนแมลงที่พบ และจำนวนแมลงที่สามารถทำให้เกิดโรคซ้ำกับแมลงได้ภายใต้สภาพแวดล้อมห้องปฏิบัติการที่	21
ตารางที่ 3	แหล่งพื้นที่เก็บตัวอย่างดิน จำนวนตัวอย่างดิน จำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่พบ และที่สามารถทำให้เกิดโรคซ้ำได้ในแมลงทดสอบ	25
ตารางที่ 4	แหล่งเก็บตัวอย่าง จำนวนแมลงที่พบเป็นโรค และจำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่ทำให้เกิดโรคซ้ำในแมลงทดสอบ	28
ตารางที่ 5	แหล่งเก็บรวบรวมเชื้อราเขียว จำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่ผ่านการทดสอบศักยภาพการเกิดโรคซ้ำ และรหัสประชากร	29
ตารางที่ 6	ความรุนแรงของเชื้อ *M. anisopliae* ที่คัดเลือก ที่มีต่อ ด้วงหมัดผัก ในสภาพการทดสอบในห้องปฏิบัติการ	33
ตารางที่ 7	ระดับความรุนแรง (LC_{50}) ของเชื้อ *M. anisopliae* ที่ลงทำลายด้วงหมัดผัก	36

สารบัญภาพ

ภาพที่	เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 1	ตัวเต็มวัยด้วงหมัดผัก 2 ชนิด คือชนิดแถบลาย และชนิดดำ	1
ภาพที่ 2	แปลงผักคะน้าที่ถูด้วงหมัดผักลงทำลายขั้นรุนแรง	2
ภาพที่ 3	เชื้อรา *M. anisopliae* ลงทำลาย ด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย	5
ภาพที่ 4	ขอบเขตพื้นที่หลักในการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพื่อค้นหาเชื้อราเขียวควบคุมด้วงหมัดผัก	11
ภาพที่ 5	การปลูกผักแบบร่องจีน ที่พบได้ทั่วไปในเขตกรุงเทพฯ ราชบุรี ปทุมธานี สมุทรสาคร และนครปฐม	14
ภาพที่ 6	พื้นที่การเก็บตัวอย่างเชื้อราเขียวในแหล่งปลูกผักเขตภาคเหนือตอนล่างของตำบลบึงพระ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก	15
ภาพที่ 7	พื้นที่การเก็บตัวอย่างเชื้อราเขียวในแหล่งปลูกผักเขตภาคเหนือตอนล่าง ของตำบลทับเบิก อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์	16
ภาพที่ 8	การสำรวจและเก็บตัวอย่างด้วงหมัดผักที่เป็นโรคเชื้อราเขียวจากสภาพแปลงเกษตรกรในเขตอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร	18
ภาพที่ 9	แมลงที่โดนทำลายโดยเชื้อราเขียวในระยะเริ่มต้น มีเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราปกคลุมทั่วทั้งตัวแมลง	19
ภาพที่ 10	ลักษณะของพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างดินเพื่อตรวจสอบเชื้อราเขียว	22
ภาพที่ 11	การเกิดโคโลนีของเชื้อราเขียวและเชื้อราอื่น ๆ ที่ได้จากตัวอย่างดิน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	24
ภาพที่ 12	การเก็บรวบรวมด้วงหมัดผักจากแปลงผักเกษตรกร	27

บทนำ

ด้วงหมัดผักกาด (Leaf eating beetle หรือ Flea beetle) (*Phyllotreta* spp.(Coleoptera: Chrysomellidae)) (ภาพที่ 1) จัดเป็นแมลงศัตรูผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากโดยเฉพาะในแหล่งพื้นที่ปลูกผักเก่าต่าง ๆ (ชูวิทย์ และคณะ, 2543) เช่น บริเวณรอบกรุงเทพฯ นครปฐม กาญจนบุรี เชียงใหม่ พิษณุโลก และเพชรบูรณ์ เป็นต้น สำหรับพื้นที่ปลูกผักของจังหวัดในเขตภาคเหนือตอนล่างที่ประสบปัญหาการลงทำลายของแมลงชนิดนี้ ประกอบด้วยพื้นที่ปลูกผัก บริเวณอำเภอเมือง ของจังหวัดพิษณุโลก เพชรบูรณ์ และนครสวรรค์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาพที่ 1 แสดงตัวเต็มวัยด้วงหมัดผัก 2 ชนิด คือชนิดแถบลายซึ่งเป็นชนิดที่มีความสำคัญมาก ลงทำลายผักตระกูลกะหล่ำรุนแรงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงฤดูแล้ง หรือฝนทิ้งช่วง และชนิดดำที่พบได้โดยทั่วไป ในแปลงผักตระกูลกะหล่ำ แต่ไม่มีความสำคัญมากนัก

การระบาดมักพบรุนแรงมากในช่วงระหว่างฤดูหนาวต่อฤดูร้อน โดยสิ่งที่เกษตรกรสังเกตการเข้าทำลายได้ คือพบตัวเต็มวัยอาศัยบนใบพืชเป็นจำนวนมาก และหากมีการระบาดรุนแรงจะไม่สามารถสังเกตเห็นใบพืชได้เลย เนื่องจากตัวเต็มวัยอาศัยรวมกันเป็นกลุ่มใหญ่เกาะทำลายกัดกินใบพืชผักตระกูลกะหล่ำจนพรุน (ภาพที่ 2) โดยระยะสำคัญคือระยะกล้าของผักที่มีอายุตั้งแต่ ปลูก ถึง 1 เดือน หากแมลงลงทำลายเป็นจำนวนมากจะทำให้พืชตายได้ และพืชที่รอดนั้นก็มักพบว่าอยู่ในสภาพที่แคระแกรน เยื่อผักกระด้างหยาบ และมีร่องรอยของการกัดทำลายเป็นรูขนาดเล็กเป็นจำนวนมากไม่สามารถขายส่งตลาดได้ (ปิยรัตน์, 2530)

ภาพที่ 2 แสดงแปลงผักคะน้าที่ถูกด้วงหมัดผักลงทำลายขั้นรุนแรง

การป้องกันกำจัดทำได้ยากมาก และการใช้สารฆ่าแมลงเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้เลยในการควบคุมตัวเต็มวัยเหล่านี้ให้ได้ผล สารเคมีที่เกษตรกรนิยมใช้นั้น ได้แก่ เมทามิโดฟอส และโมโนโครโตฟอส เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542) อย่างไรก็ตามสารดังกล่าวได้ถูกยกเลิกแล้ว และผู้มีไว้ครอบครองหรือใช้ จะต้องมีความผิดตามกฎหมาย (กองวัตถุมีพิษการเกษตร, 2543) เกษตรกรจึงต้องใช้สารชนิดใหม่ ๆ เช่น โพรไทโอฟอส ฟิโปรนิล เป็นทางเลือก ซึ่งเป็นสารฆ่าแมลงที่มีพิษสูง และมีราคาแพงมาก (พิบูลย์, 2543) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากด้วงหมัดผักกาดนี้มีวงจรชีวิตในระยะตัวอ่อนอาศัยอยู่ในดินบริเวณโคนต้นผัก ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความชื้นสูง และร้อน เหมาะกับการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคของแมลงได้เป็นอย่างดี ประกอบกับไม่มีรายงานของแมลงศัตรูธรรมชาติของด้วงชนิดนี้เลย

ดังนั้นการนำเชื้อราที่ดำรงชีพในดินที่มีศักยภาพในการทำลายแมลงที่อาศัยในดิน ดังเช่น ตัวอ่อนของด้วงผักกาดนี้ได้ จึงน่าจะเป็นหนทางเลือกที่สำคัญสำหรับการควบคุมด้วงหมัดผักกาดโดยชีววิธีได้ การควบคุมแมลงนี้เป็นการควบคุมตั้งแต่ในระยะที่แมลงเป็นตัวอ่อน ไม่เปิดโอกาสให้เจริญเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งจะเป็นระยะที่มีศักยภาพในการแพร่พันธุ์ และมีความสามารถในการทำลายในระดับที่ควบคุมได้ยากกว่าได้ เนื่องจากแมลงสามารถเคลื่อนที่หลบหลีกพิษของสารได้ดีกว่าในระยะตัวอ่อน อีกทั้งการดำเนินการนี้เป็นการสนับสนุนการลดการใช้สารฆ่าแมลงซึ่งใช้ในการควบคุมตัวเต็มวัยของด้วงชนิดนี้ได้อีกหนทางหนึ่งด้วย

เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* เป็นเชื้อราจัดอยู่ใน Class Deuteromycetes สามารถทำให้เกิดโรคกับแมลงในหลายอันดับกว้างมากทั้ง Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera, และ Coleoptera โดยสังเกตแมลงที่เป็นโรคได้ง่าย เนื่องจากเชื้อราจะเจริญปกคลุมซากแมลงที่ตายและสร้างสปอร์สีเขียวเต็มตัวแมลง แพร่กระจายได้โดยน้ำ ลม แมลงพาหะ สามารถดำรงชีพในดินได้ และที่สำคัญคือสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อราหลายชนิด ในปัจจุบันได้มีการศึกษาและพยายามคัดแยกสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่พบและมีความเหมาะสมเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง (Siegfried et al., 2003)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ดำรงชีพในแหล่งปลูกผักตระกูลกะหล่ำ จากเขตพื้นที่ปลูกผักหลักในภาคเหนือตอนล่าง ในระดับห้องปฏิบัติการ
2. เพื่อทดสอบความสามารถ ความคงทน และประสิทธิภาพของเชื้อ *M. anisopliae* ที่พบในธรรมชาติในการควบคุมด้วงผักกาดในระดับห้องปฏิบัติการ โรงเลี้ยงแมลง และแปลงทดลอง
3. เพื่อพัฒนารูปแบบอย่างง่ายของการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อ *M. anisopliae* ในห้องปฏิบัติการและเป็นแนวทางการพัฒนาต่อในเชิงการค้า
4. เพื่อศึกษาการยอมรับของเกษตรกรในการใช้เชื้อ *M. anisopliae* ควบคุมด้วงผักกาดโดยชีววิธี

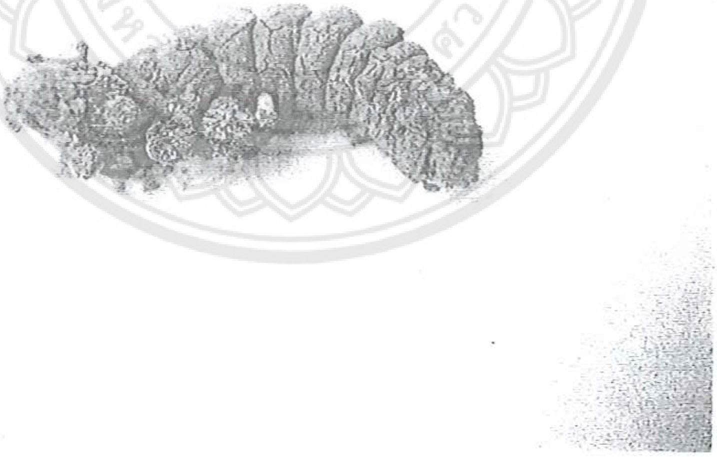
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีถิ่นดำรงชีพในแหล่งปลูกผักตระกูลกะหล่ำ ซึ่งเป็นที่อาศัยของด้วงหมัดผักกาด จากเขตพื้นที่ปลูกผักหลักในภาคเหนือตอนล่าง
2. สามารถคัดเลือกเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีศักยภาพ ในการควบคุมด้วงหมัดผักกาด โดยชีววิธี
3. สามารถพัฒนารูปแบบอย่างง่ายของการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณและรูปแบบการนำเชื้อ *M. anisopliae* ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมด้วงหมัดผักกาดได้อย่างเหมาะสมและเป็นที่ยอมรับจากเกษตรกร
4. พัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อ *M.anisopliae* ในเชิงการค้าเพื่อนำไปใช้ในพื้นที่การเกษตรอื่น ๆ ได้อย่างเหมาะสม

ตรวจเอกสาร

แมลงศัตรูพืชต่าง ๆ โดยทั่วไปสามารถป่วยเป็นโรคได้เช่นเดียวกับสัตว์อื่น ๆ เชื้อโรคที่สำคัญมีทั้งที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส ริคเคทเซีย โปรโตซัว ฯลฯ โดยเชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายของแมลงได้ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม และก่อให้เกิดโรคกับแมลง ทำให้แมลงป่วยและตายได้ในที่สุด (ทิพย์วดี, 2535) จากปรากฏการณ์นี้จึงทำให้เชื้อโรคหลายชนิดได้รับการพัฒนา คัดเลือก เพื่อนำมาใช้เป็นหนึ่งในเครื่องมือที่สำคัญสำหรับควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์ (Van Driesche and Bellow Jr., 1996) เชื้อจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์ได้นำมาใช้เพื่อการควบคุมศัตรูพืช คือ เชื้อรา และได้รับการพัฒนามาโดยตลอดจนกระทั่ง ในปัจจุบันได้มีการผลิตเป็นการค้าและใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น เชื้อ *Hirsutella thompsonii* ชื่อการค้าคือ Mycar และ *Verticillium lecanii* ภายใต้ชื่อการค้าว่า Vertalec นอกจากนั้นเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ถูกนำมาใช้เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้แก่ ไวรัส Nuclearpolyhedrosis Virus (NPV) มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชหลายชนิด โดยเฉพาะหนอนกระทู้หอม หนอนคืบกะหล่ำปลี แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* สามารถใช้ควบคุมหนอนใยผัก หนอนคืบกะหล่ำ ได้เช่นเดียวกับไวรัส NPV ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* และ *Heterorhabditis* sp. เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูธรรมชาติของแมลงหลายชนิดเช่นกัน ดังปรากฏอยู่ในรายงานการวิจัยและบทความต่าง ๆ มากมาย อาทิเช่น Evans (1987), Kobayashi (1951), Samson *et al.* (1988), TeBeest and Templeton (1985), และ Burge (1988)

สำหรับการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยเชื้อรานั้น ประเทศไทยมีการสำรวจและศึกษาพบเชื้อหลายชนิด แต่มักประสบปัญหาเรื่องข้อจำกัดในการนำมาใช้ประโยชน์ เนื่องจากเชื้อราส่วนใหญ่ต้องการความชื้นสูงและร้อน ประกอบกับการเลือกใช้วิธีการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยสารเคมี มีความสะดวกรวดเร็ว ให้ผลการควบคุมที่มีความชัดเจนมากกว่า ในเวลาอันสั้น ทำให้การพัฒนาการนำเชื้อรามาใช้ประโยชน์เป็นไปได้อย่างช้ามาก อย่างไรก็ตาม ปัจจุบัน ความกังวลใจในเรื่องสารพิษตกค้างในผลผลิต และสิ่งแวดล้อม รวมทั้งโครงการอาหารปลอดภัย ก่อให้เกิดแรงผลักดันให้มีการตระหนักถึงความปลอดภัยในผลผลิตทางการเกษตรต่าง ๆ รวมทั้งผักสดต่าง ๆ ด้วย และได้มีมาตรการต่าง ๆ เกิดขึ้นมากมาย เช่น การตรวจสอบสารพิษตกค้างในพืชผักเพื่อการบริโภค การยกเลิกและบังคับไม่ให้นำสารฆ่าแมลงบางชนิดมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ส่งผลให้มีการเสาะแสวงหาวิธีการทดแทนอื่น ๆ ให้เข้ามามีบทบาท เชื้อรา *M. anisopliae* เป็นหนึ่งในเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจและได้มีการทดสอบกับแมลงในดินหลายชนิด เช่น ด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย แมลงนูนหลวง เป็นต้น (ภาพที่ 3) ซึ่งให้ผลการควบคุมเป็นที่น่าพอใจอย่างยิ่ง (วิวัฒน์ et al., 2548)



ภาพที่ 3 เชื้อรา *M. anisopliae* ลงทำลาย ด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย (วิวัฒน์ et al., 2548)

ดังนั้นแนวคิดและกรอบของการดำเนินการในโครงการนี้จึงมุ่งเน้นในการคัดสรรเชื้อ *M. anisopliae* จากแหล่งธรรมชาติ เพื่อพัฒนาและนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุม ด้วงหมัด

ผักกาด ในแปลงพืชผักของเกษตรกรในเขตพื้นที่นำร่องของจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง รวมทั้งการพัฒนารูปแบบวิธีการใช้และการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณเชื้อในเชิงการค้าต่อไปในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

โครงการนี้ตั้งขอบเขตการดำเนินการครอบคลุมการศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ดำรงชีพในแหล่งปลูกผักตระกูลกะหล่ำ จากเขตพื้นที่ปลูกผักหลักในภาคเหนือตอนล่าง ทดสอบความสามารถ ความคงทน และประสิทธิภาพของเชื้อ *M. anisopliae* ที่พบในธรรมชาติเพื่อควบคุมด้วงผักกาดในระดับห้องปฏิบัติการ และในสวนผักของเกษตรกร รวมทั้งพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อ *M. anisopliae* ในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นแนวทางพัฒนาในเชิงการค้าต่อไป

ระยะเวลาทำการวิจัยและสถานที่ทำการสำรวจและเก็บข้อมูล

ระยะเวลาทำการวิจัยตั้งแต่เดือน ตุลาคม พ.ศ.2547 – กันยายน พ.ศ.2550 รวมเป็นระยะเวลา 3 ปี

สถานที่ทำการทดลองคือ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก

แผนการดำเนินการ

1. ศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ดำรงชีพในแหล่งปลูกผักตระกูลกะหล่ำ จากเขตพื้นที่ปลูกผักหลักในภาคเหนือตอนล่าง ในระดับห้องปฏิบัติการ (Lacay, 1997)
2. ทดสอบความสามารถ ความคงทน ประสิทธิภาพของเชื้อ *M. anisopliae* ที่พบในธรรมชาติในการควบคุมด้วงผักกาดในระดับห้องปฏิบัติการ โรงเลี้ยงแมลง และแปลงทดลอง
3. ศึกษาแนวทางในการนำเชื้อ *M. anisopliae* มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมด้วงผักกาดโดยชีววิธี ในสวนผักของเกษตรกร

4. พัฒนารูปแบบอย่างง่ายของการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อ *M. anisopliae* ในห้องปฏิบัติการ
5. ศึกษาการยอมรับของเกษตรกรในการใช้เชื้อ *M. anisopliae* ควบคุมด้วงผักกาดโดยชีววิธี
6. พัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อ *M. anisopliae* ในเชิงการค้า

กิจกรรม	ต.ค.-ธ.ค. 2547	ม.ค.-ธ.ค. 2548	ม.ค.-ธ.ค. 2549	ม.ค.-ก.ย. 2550
ศึกษารวบรวมและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ดำรงชีพในแหล่งปลูกผัก	━	━	━	
ศึกษาประสิทธิภาพและทำการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา *M. anisopliae* ในขั้นต้น		━	━	
ศึกษาความสามารถ ความคงทน ประสิทธิภาพของเชื้อ *M. anisopliae*		━	━	
ศึกษาแนวทางในการนำเชื้อ *M. anisopliae* มาใช้ประโยชน์			━	━
พัฒนารูปแบบอย่างง่ายของการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณ			━	━
ศึกษาการยอมรับของเกษตรกรในการใช้เชื้อ *M. anisopliae*			━	━
รวบรวมข้อมูล จัดพิมพ์รายงานการวิจัย		━	━	━

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยนเรศวร โดยโครงการนี้มีแผนการดำเนินการทั้งหมด 3 ปี โดยในปีที่ 1 นี้เป็นการมุ่งดำเนินการเพื่อศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ดำรงชีพในแหล่งปลูกผักตระกูลกะหล่ำ จากเขตพื้นที่ปลูกผักหลักในภาคเหนือตอนล่าง โดยทำการสำรวจ รวบรวมเชื้อจากแหล่งปลูกผักหลักของภาคเหนือตอนล่าง ได้แก่ เขตจังหวัด ตาก พิษณุโลก อุตรดิตถ์ นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ ร่วมกับแหล่งปลูกผักเก่าเพื่อเป็นแหล่งเปรียบเทียบ ได้แก่ เชียงใหม่ เพชรบุรี

ปทุมธานี นครปฐม และสมุทรสาคร ในระดับห้องปฏิบัติการเป็นหลัก และทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมและเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อเป็นแหล่ง germplasm ของเชื้อ และ ข้อมูลสำหรับใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

ระเบียบวิธีวิจัย

1. สำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างของเชื้อรา *M. anisopliae* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ดำรงชีพในแหล่งปลูกผักตระกูลกะหล่ำ จากเขตพื้นที่ปลูกผักหลักในภาคเหนือตอนล่าง ทั้งในส่วนที่เป็นเชื้อที่กำลังลงทำลายด้วงหมัดผัก ตัวอย่างดินตามบริเวณชายป่าที่ติดกับพื้นที่ปลูกผัก และด้วงหมัดผักตัวเต็มวัยที่กำลังลงทำลายพืช
2. ในกรณีแรก เป็นเชื้อราที่พบบนแมลงซึ่งพบและเก็บรวบรวมจากจุดสำรวจแต่ละแห่ง ทำการบ่มแมลงที่เป็นโรค ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *M. anisopliae* ในสภาพภายใต้ความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ จนสปอร์ของเชื้อเป็นสีเขียวขึ้นปกคลุมตัวแมลง ทำการเขี่ยเชื้อจากตัวแมลงทุกตัวผสมในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100ml และนำมาเพาะเลี้ยง โดย streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (complete media) ซึ่งประกอบด้วย 0.001 g $FeSO_4$, 0.5 g KCl, 1.5 g KH_2PO_4, 0.5 g $MgSO_4.7H_2O$, 6 g $NaNO_3$, 0.001g $ZnSO_4$, 1.5 g hydrolyzed casein, 0.5 g yeast extract, 10 g glucose, 2 g peptone, 20 g agar and 1 Lt distilled water ที่ฉาบผิวด้วย ampicillin 500 mg/L บ่มในสภาพภายใต้ความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ จนกระทั่งเชื้อเจริญได้ดี จึงคัดเลือกเชื้อ และเก็บตัวอย่างเชื้อไม่น้อยกว่า 50 โคโลนี รวมเป็นประชากรของเชื้อในแต่ละจุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง และตรวจสอบการเกิดโรคในเบื้องต้น
3. กรณีที่สอง เป็นเชื้อราที่คัดแยกจากตัวอย่างดิน ที่เก็บจากพื้นที่ต่าง ๆ นำตัวอย่างดินจำนวน 10 g ใส่ลงใน Flask ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำกลั่นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 90 ml รอจนตกตะกอน แล้วจึงนำเอาสารละลายที่ได้มาเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} นำตัวอย่างสารละลายที่ทำการเจือจางแล้ว spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ (complete media) ที่ฉาบผิวด้วย ampicillin 500 mg/L โดยใช้ปริมาณสารละลาย 0.5 ml/plate จำนวนความเข้มข้นละ 2 plate เพาะเลี้ยงในสภาพภายใต้ความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ ตรวจผลที่ระยะเวลา 2, 3 และ 4 วัน คัดเลือกเชื้อ และเก็บตัวอย่างเชื้อไม่น้อยกว่า 50 โคโลนี รวมเป็นประชากรของเชื้อในแต่ละจุดที่ทำการเก็บตัวอย่าง และตรวจสอบการเกิดโรคในเบื้องต้น

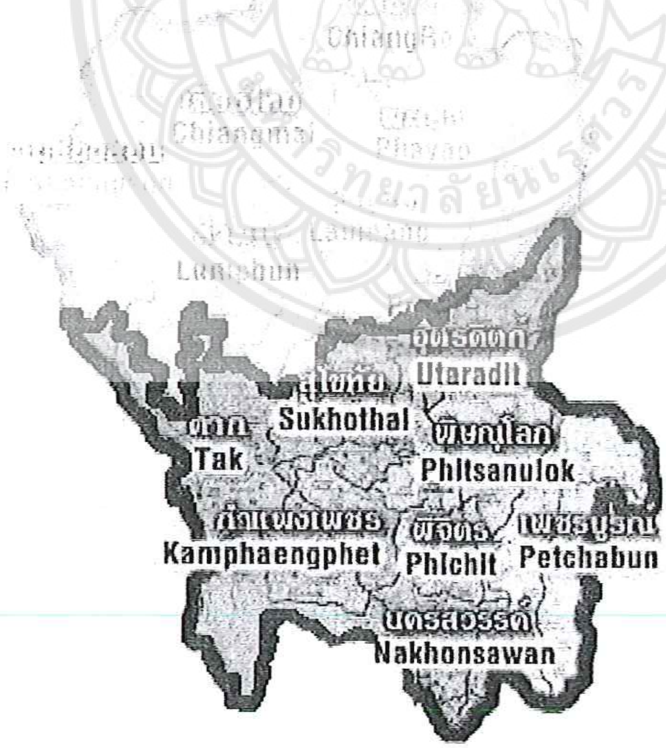
4. ส่วนกรณีที่สามนั้น ทำการเพาะเลี้ยงแมลงที่เก็บรวบรวมจากธรรมชาติ ในสภาพภายใต้ความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ ตรวจผลที่ระยะเวลา 2, 3 และ 4 วัน เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงที่เป็นโรค และดำเนินการในลักษณะเช่นเดียวกับ กรณีแรก
5. การตรวจสอบการเกิดโรคเบื้องต้นของเชื้อที่รวบรวมข้างต้น โดยตัดชิ้นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี conidia ของเชื้อ ถ่ายใส่อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่และทำการบ่มในสภาพภายใต้ความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ จนได้โคโลนีที่ฟูเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ เทน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 10ml และกวน conidia ให้หลุดออกจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ เทส่วนผสมที่ได้ลงในหลอดทดลอง ทำการตรวจวัดความเข้มข้นของ conidia โดย haemacytometer (Hausser, Horsham, PA, USA) และนำมาปรับความเข้มข้นโดยการละลายในน้ำกลั่นซึ่งผสมด้วย 0.1% tween80 (Sigma St. Louis, MO, USA) จนมีความเข้มข้นที่ 10^8 conidia/ml และนำมาทดสอบการเกิดโรคกับตัวเต็มวัยของด้วงหมัดที่เพิ่งออกจากระยะดักแด้เป็นเวลา 1 วัน จำนวน 30 ตัว โดยการฉีดพ่นลงบนตัวแมลง จากนั้นแมลงเหล่านี้ถูกเลี้ยงภายใต้ความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ บันทึกอัตราการตายของแมลงทุกวันจนครบ 15 วันหลังจากทำการพ่น รวบรวมแมลงที่เป็นโรคเชื้อราเขียว เขี่ยเชื้อที่พบจากแมลงแต่ละตัว streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่เกิดขึ้นจากแมลงที่เป็นโรคแต่ละตัวจำนวน 50 โคโลนี รวบรวมเป็นประชากรของเชื้อ บันทึกและให้รหัส เพื่อเก็บเป็นแหล่งพันธุกรรมต่อไป
6. การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนและการรักษาระดับการเกิดโรคกับด้วงหมัดผักในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการด้วยวิธีการสองแนวทาง คือ โดยใช้ด้วงหมัดผักที่มีต้นกำเนิด เก็บรวบรวมจากตำบลบึงพระ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ตั้งแต่ พ.ศ. 2546 ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนไว้ในห้องปฏิบัติการอย่างต่อเนื่องด้วยผักกวางตุ้งที่ทำการเปลี่ยนใหม่ทุก ๆ วัน ภายใต้อุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 75 ± 5% และมีช่วงแสง 12 ชั่วโมง และนำมาใช้เป็นแหล่งเพาะเชื้อเป็นระยะ ๆ โดยการพ่นเชื้อราลงบนแมลงและเก็บเชื้อราที่ลงทำลายแมลงอย่างต่อเนื่อง วิธีการที่สองคือ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ (complete media) ที่ภายใต้อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลาแต่ละช่วงคือ 15 วัน และมีการสับเปลี่ยนกับการเลี้ยงด้วยแมลงเป็นบางครั้งเพื่อรักษาระดับความรุนแรงของเชื้อ เพื่อใช้สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป และทำการคัดเลือกเชื้อให้คงความรุนแรงไว้ในทุกครั้งที่มีการเลี้ยงด้วยแมลง

7. ทดสอบความสามารถของเชื้อ *M. anisopliae* จากประชากรที่คัดเลือกแล้วข้างต้น ในการควบคุมด้วงผักกาดในระดับห้องปฏิบัติการ (Lacay, 1997) โดยนำconidia ของเชื้อที่เก็บจากอาหารเลี้ยงเชื้อ มาละลายในน้ำกลั่นซึ่งผสมด้วย 0.1% tween80 Sigma St. Louis, MO, USA) และนำมาทดสอบการเกิดโรคกับตัวเต็มวัยของด้วงหมัดที่เพิ่งออกจากระยะดักแด้เป็นเวลา 1 วัน จำนวน 10 ตัว โดยจุ่มแมลงลงในสารละลายของเชื้อที่มีความเข้มข้น 10^8 conidia/ml เป็นเวลา 6 วินาที สิ่งควบคุมคือสารละลายที่ใช้โดยไม่มี conidia ทำจำนวน 6 ซ้ำ จากนั้นแมลงเหล่านี้ถูกเลี้ยงบันทึกอัตราการตายของแมลงทุกวันจนครบ 15 วันหลังจากทำการให้สิ่งทดลอง คัดเลือกเชื้อที่สามารถทำให้แมลงตายได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ50 และใช้ระยะเวลาในการทำให้แมลงตายเกินกว่าร้อยละ 50 สั้นที่สุด (LT_{50})
8. นำเชื้อ *M. anisopliae* จากประชากรที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 7 ข้างต้น ใส่รหัส และนำมาศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมโดยทำการทดสอบที่ระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^5, $0.5x10^6$, 10^6, $.0.5X10^7$, 10^7, $0.5X10^8$, 10^8 conidia/ml สิ่งควบคุมคือสารละลายที่ใช้โดยไม่มีconidia ผสม ทำจำนวน 6 ซ้ำ หลังจากนั้นแมลงถูกเลี้ยงภายใต้ความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ บันทึกอัตราการตายของแมลงทุกวันจนครบ 15 วันหลังจากทำการให้สิ่งทดลอง
9. วิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้ analysis of variance และมีการ transform ข้อมูลหากจำเป็น การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยใช้ Duncan's multiple comparison test หรือวิธีการอื่นที่จำเป็น LC_{50} คำนวณโดยอาศัย probit analysis (SAS Institute Inc. 1989)
10. สรุปผลและจัดทำรายงาน ของการศึกษาในปีที่ 1 และจัดเก็บเชื้อในรูปของการแช่แข็งที่ระดับอุณหภูมิ -80 °ซ และแบบแห้งบนกระดาษกรอง รวมทั้งทำการถ่ายเชื้อไว้ทั้งในรูปของอาหารเทียมและแมลงสด เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป ซึ่งเป็นการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล และการศึกษาความคงทนของเชื้อในสภาพธรรมชาติ

ผลการวิจัยและวิเคราะห์ผล

การเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราเขียว

ในช่วงเวลาตั้งแต่ตุลาคม 2547เป็นต้นมา คณะผู้วิจัยได้ทำการเก็บรวบรวมเชื้อราเขียวจากแหล่งต่าง ๆ ครอบคลุมพื้นที่เป้าหมายทั้งหมด ในเขตพื้นที่ปลูกผักของภาคเหนือตอนล่าง (ภาพที่ 4) โดยมีเขตภาคเหนือตอนบน และภาคกลาง เป็นแหล่งเปรียบเทียบ รวมเป็นพื้นที่ทั้งหมด 29 อำเภอ ใน 15 จังหวัด ครอบคลุมพื้นที่ทั้งที่เป็นพื้นที่ปลูกผักเก่า พื้นที่ปลูกผักใหม่ และพื้นที่ปลูกผักแบบเลื่อนลอยซึ่งมักครอบคลุมอาณาบริเวณรวมพื้นที่ป่าในบางส่วน รวมทั้งหมด 190 แห่ง (ตารางที่ 1)


ChiangRai
เชียงใหม่
Chiangmai
Phayao
Lamphun
อุตรดิตถ์
Utaradit
สุโขทัย
Sukhothai
ตาก
Tak
พิษณุโลก
Phitsanulok
กำแพงเพชร
Kamphaengphet
พิจิตร
Phichit
เพชรบูรณ์
Petchabun
นครสวรรค์
Nakhonsawan

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาพที่ 4 แสดงขอบเขตพื้นที่หลักในการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพื่อค้นหาเชื้อราเขียวควบคุมด้วงหมัดผัก

โดยลักษณะการปลูกผักของเกษตรกร ส่วนใหญ่ปลูกในลักษณะบนพื้นราบ มีการยกร่องบ้างในบางพื้นที่ มีเพียงในเขตกรุงเทพฯ ราชบุรี ปทุมธานี สมุทรสาคร และนครปฐมเท่านั้นที่มีการปลูกผักแบบการยกร่องจีน (ภาพที่ 5) จังหวัดที่เก็บตัวอย่างมากที่สุดคือจังหวัดเพชรบูรณ์ และตาก มีจำนวนทั้งหมดแห่งละ 55 ตัวอย่าง ซึ่งจังหวัดทั้งสองเป็นจังหวัดที่มีความหลากหลายของสภาพภูมิประเทศของแหล่งปลูกผักมากที่สุดของภาคเหนือตอนล่าง ประกอบด้วยพื้นที่ปลูกผักในที่ราบที่มีการปลูกผักหมุนเวียนตลอดทั้งปี และพื้นที่ปลูกผักบนพื้นที่เขาสูงที่มีการปลูกผักเฉพาะบางช่วงฤดูเช่น ฤดูร้อนและฤดูหนาวเท่านั้น โดยพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ปลูกผักใหม่ มีประวัติการใช้สารปราบศัตรูพืชน้อยมาก และไม่ประสบปัญหาการดื้อต่อสารฆ่าแมลงในระดับรุนแรง ในขณะที่พื้นที่ปลูกผักในจังหวัดอื่น ๆ มักเป็นพื้นที่ปลูกผักบนพื้นที่ราบ ซึ่งประกอบด้วยพื้นที่ปลูกผักเก่าและพื้นที่ปลูกผักใหม่หลากหลายแตกต่างไปตามสภาพของแต่ละจังหวัด พื้นที่ปลูกผักเก่ามักเป็นพื้นที่ที่มีการปลูกผักหมุนเวียนตลอดทั้งปี มีประวัติการใช้สารฆ่าแมลงยาวนาน และประสบปัญหาการดื้อต่อสารฆ่าแมลงในระดับรุนแรง เช่นพื้นที่ปลูกผักในจังหวัดพิษณุโลก และนครสวรรค์ (ภาพที่ 6) ส่วนพื้นที่ที่เหลืออื่น ๆ มักเป็นพื้นที่ปลูกผักใหม่ ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอาชีพของเกษตรกร จากเดิมที่ทำนาข้าวเพียงอย่างเดียว และเกษตรกรมักประสบปัญหาราคาข้าวไม่แน่นอน จึงหันมาประกอบอาชีพอื่น ๆ เพิ่มขึ้นโดยการจัดสรรพื้นที่นาบางส่วนปลูกผัก อย่างเป็นล่ำเป็นสัน หรือ ปลูกผักในช่วงฤดูหนาว สลับกับการทำนาในช่วงฤดูฝนเป็นต้น ซึ่งพบได้ทั่วไปในพื้นที่ปลูกผักของจังหวัดอุตรดิตถ์ ตาก เพชรบูรณ์ และสุโขทัย (ภาพที่ 7) พื้นที่ปลูกผักในลักษณะนี้มักประสบปัญหาศัตรูพืชไม่รุนแรงมาก มีการใช้สารฆ่าแมลงบ้าง และบางส่วนมีการพัฒนารูปแบบการควบคุมแบบเกษตรอินทรีย์ด้วย เช่น ในพื้นที่จังหวัดพิจิตร สุโขทัย และอุตรดิตถ์ เป็นต้น (วีรเทพ, 2548)

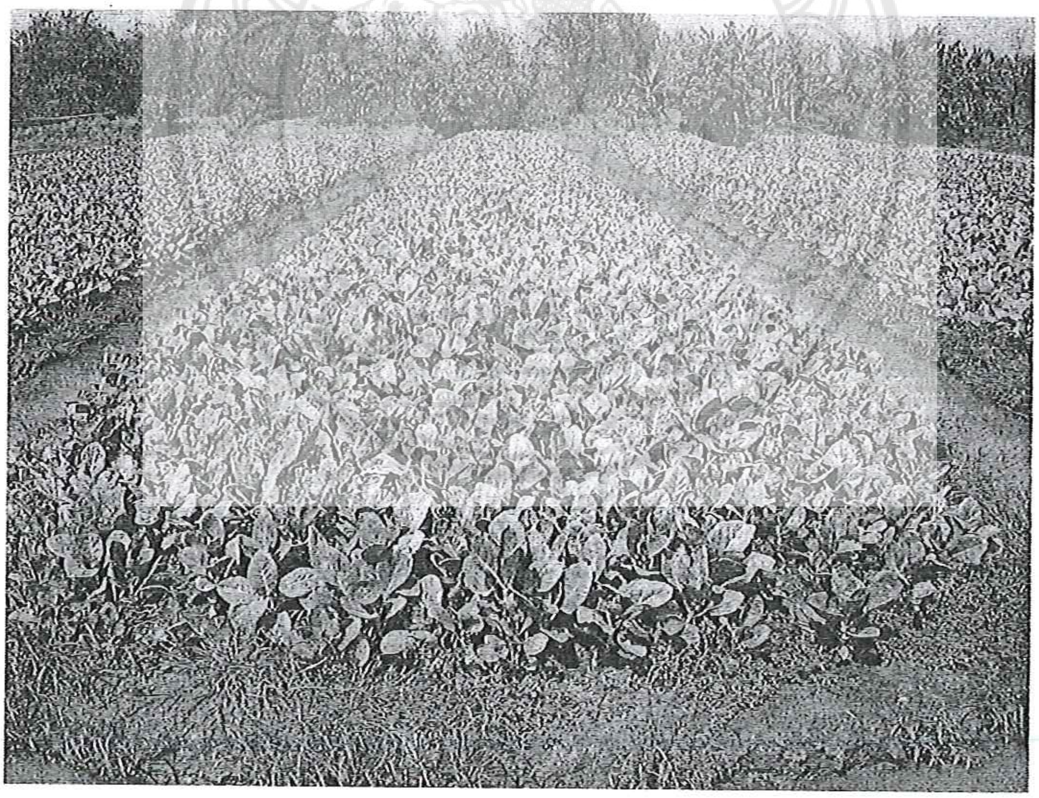
ตารางที่ 1 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง จำนวนพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่าง และลักษณะของตัวอย่างของที่มาของเชื้อราเขียวที่ทำการเก็บรวบรวม

จังหวัด	แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่าง (อำเภอ)	จำนวนพื้นที่หรือจุดเก็บตัวอย่าง (แห่ง)	รวมพื้นที่เก็บตัวอย่างในแต่ละจังหวัด	ลักษณะของตัวอย่างที่เก็บ
กำแพงเพชร	เมือง	2	7	bc
	คลองลาน	5		abc
ตาก	เมือง	10	55	abc
	บ้านตาก	10		abc
	ท่าสองยาง	15		abc
	พบพระ	15		abc
	แม่สอด	5		abc
นครสวรรค์	เมือง	10	10	bc
พิษณุโลก	เมือง	10	15	bc
	บางระกำ	5		bc
เพชรบูรณ์	เมือง	5	55	bc
	หล่มสัก	10		bc
	หล่มเก่า	30		abc
	เขาค้อ	10		bc
พิจิตร	เมือง	1	3	b
	ตะพานหิน	2		bc
สุโขทัย	เมือง	2	6	b
	ศรีสำโรง	2		b
	สวรรคโลก	2		b
อุตรดิตถ์	เมือง	2	15	bc
	น้ำปาด	5		abc
	พิชัย	8		bc
กรุงเทพ	หนองแขม	2	2	bc

ตารางที่ 1 (ต่อ)

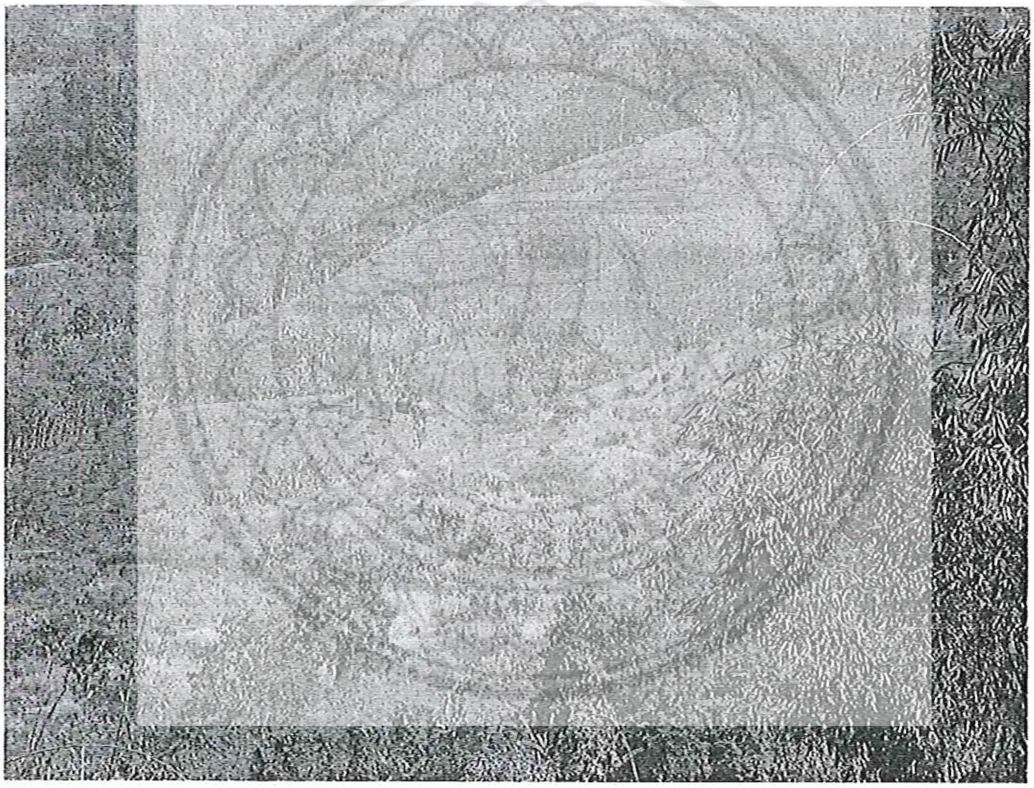
จังหวัด	แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่าง (อำเภอ)	จำนวนพื้นที่หรือจุดเก็บตัวอย่าง (แห่ง)	รวมพื้นที่เก็บตัวอย่างในแต่ละจังหวัด	ลักษณะของตัวอย่างที่เก็บ
นครปฐม	เมือง	4	4	bc
สมุทรสาคร	บ้านแพ้ว	3	3	bc
ราชบุรี	ดำเนินสะดวก	3	3	bc
เพชรบุรี	ท่ายาง	5	5	bc
กาญจนบุรี	ท่าม่วง	2	2	bc
เชียงใหม่	สะเมิง	5	5	abc
รวม	29	190	190	

หมายเหตุ ลักษณะของตัวอย่าง a แมลงที่เป็นโรค b ตัวอย่างดิน c ด้วงตัวเต็มวัย



ภาพที่ 5 แสดงการปลูกผักแบบร่องจีน ที่พบได้ทั่วไปในเขตกรุงเทพฯ ราชบุรี ปทุมธานี สมุทรสาคร และนครปฐม

ภาพที่ 6 แสดงพื้นที่การเก็บตัวอย่างเชื้อราเขียวในแหล่งปลูกผักเขตภาคเหนือตอนล่างของ ตำบลบึงพระ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเป็นพื้นที่ปลูกผักแบบพื้นราบ มีการปลูกผักหมุนเวียนทั้งปี



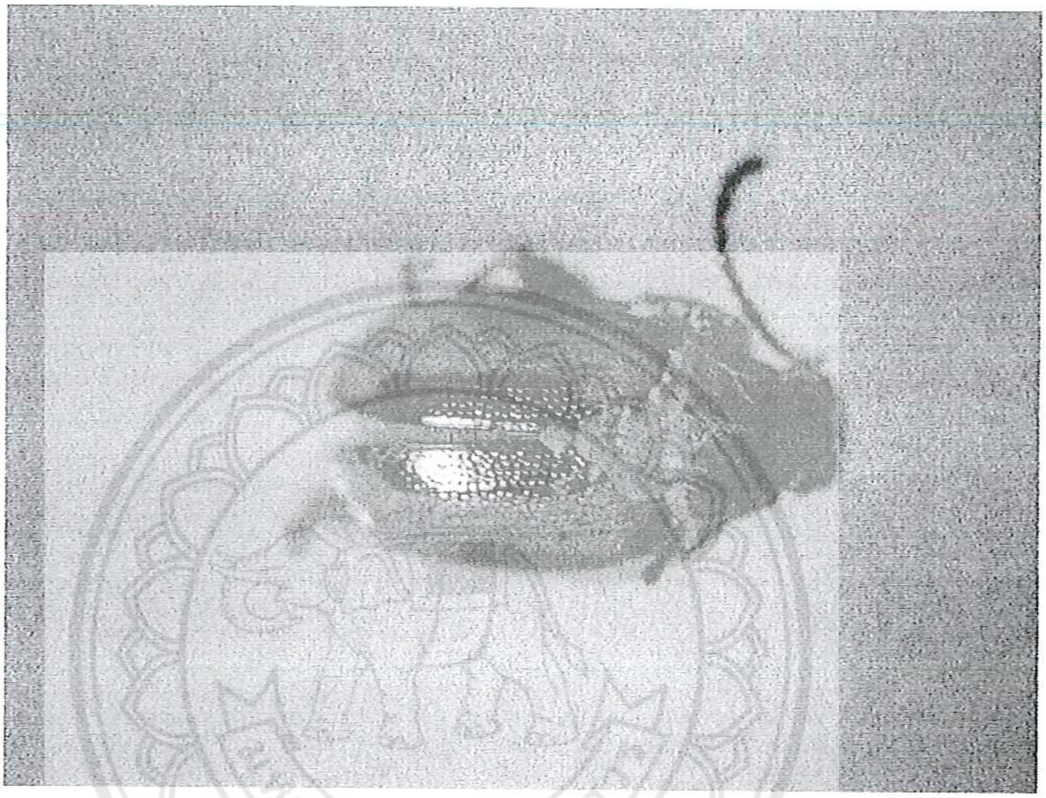
ภาพที่ 7 แสดงพื้นที่การเก็บตัวอย่างเชื้อราเขียวในแหล่งปลูกผักเขตภาคเหนือตอนล่าง ของ ตำบลทับเบิก อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งเป็นการปลูกผักบนพื้นที่สูง และมีการปลูกเฉพาะในช่วงฤดูฝนและต้นหนาวเท่านั้น

ลักษณะของตัวอย่างที่ทำการเก็บรวบรวมในแต่ละพื้นที่

เชื้อราเขียวที่เก็บรวบรวมจากด้วงหมัดผักที่ถูกทำลายโดยเชื้อราเขียว

ตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้จากพื้นที่ต่าง ๆ นั้นมีรูปแบบที่แตกต่างไปตามสภาพของแหล่งที่ทำการเก็บ (ภาพที่ 8) ในกรณีแรกเป็นแมลงที่โดนเชื้อราเขียวลงทำลาย โดยสภาพของแมลงที่พบคือซากแมลงที่ตายแล้วและที่มีสปอร์ของเชื้อราเขียวขึ้นปกคลุมฟูทั้งตัว หรือบางส่วน และมักพบในบริเวณใบหรือก้านใบในที่ที่มีความอับชื้น เช่น ตามซอกใบ หรือใบชั้นล่าง ๆ เป็นต้น (ภาพที่9) พื้นที่เก็บตัวอย่างที่พบแมลงที่เป็นโรคเชื้อราเขียว มีจำนวน 14 แห่ง ประกอบด้วย จังหวัดตาก พบในพื้นที่ปลูกผัก มากที่สุดถึง 5 อำเภอ คือ อำเภอเมือง อำเภอบ้านตาก อำเภอท่าสองยาง อำเภอพบพระ อำเภอแม่สอด จังหวัดเพชรบูรณ์ พบในพื้นที่ปลูกผัก รองลงมาคือ 4 อำเภอ คือ อำเภอเมือง อำเภอหล่มสัก อำเภอหล่มเก่า อำเภอเขาค้อ จังหวัดกำแพงเพชร จังหวัดอุตรดิตถ์ จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดเชียงใหม่ พบในพื้นที่ปลูกผัก เพียงจังหวัดละ 1 อำเภอ คือ อำเภอคลองลาน อำเภอน้ำปาด อำเภอท่ายาง อำเภอท่าม่วง และอำเภอสะเมิง ตามลำดับ สภาพพื้นที่ที่พบตัวอย่างแมลงที่เป็นโรคส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ปลูกผักบนที่สูง มีร่มเงาไม้สมบูรณ์ มีอากาศเย็น และความชื้นสูง และมักมีอาณาบริเวณติดกับชายป่า ลำธาร หรืออ่างเก็บน้ำ เป็นต้น

ภาพที่ 8 แสดงการสำรวจและเก็บตัวอย่างด้วงหมัดผักที่เป็นโรคเชื้อราเขียวจากสภาพแปลงเกษตรกรในเขตอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร



ภาพที่ 9 แสดงแมลงที่โดนทำลายโดยเชื้อราเขียวในระยะเริ่มต้น มีเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา ปกคลุมทั่วทั้งตัวแมลง

จำนวนของแมลงที่พบเป็นโรคทั้งหมดมี 51 ตัวอย่าง โดยมีจำนวนแตกต่างไปตามสภาพพื้นที่ พื้นที่ที่พบจำนวนแมลงที่เป็นโรคสูงสุด คือ อำเภอสะเมิงจังหวัดเชียงใหม่ ในขณะที่เขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างพบมากที่สุดในเขตพื้นที่ อำเภอบ้านตาก จังหวัดตาก และ อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ มีจำนวน 6 ตัวอย่าง รองลงมาคือ อำเภอเมือง จังหวัดตาก มีจำนวน 5 ตัวอย่าง ตามด้วย อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก อำเภอน้ำปาด จังหวัดอุตรดิตถ์ อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี มีจำนวน 4 ตัวอย่าง พื้นที่ที่พบในจำนวนน้อยที่สุดคือ อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี มีจำนวนเพียง 1 ตัวอย่าง

อย่างไรก็ตาม ในจำนวนเชื้อราเขียวที่พบบนแมลงที่เป็นโรคทั้งหมด 51 ตัวอย่าง เหล่านี้ มีเชื้อราจากเพียง 16 ตัวอย่างเท่านั้นที่สามารถทำให้เกิดโรคซ้ำกับแมลงได้ ด้วยการพ่นเชื้อที่ความเข้มข้น 10^8 conidia/ml ลงบนแมลงและพืชในภาชนะเพาะเลี้ยง และเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมที่กำหนด โดยตัวอย่างเชื้อราเขียวจากอำเภอหล่มเก่าสามารถทำให้เกิดโรคซ้ำกับแมลงได้สูงสุดคือ เชื้อราจากแมลงจำนวน 4 ตัวอย่าง และพบว่าเชื้อราที่พบในหลายตัวอย่างแมลง ไม่สามารถทำให้เกิดโรคซ้ำกับแมลงได้ เช่น อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก อำเภอเมือง อำเภอหล่มสัก อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี และเป็นที่น่าสังเกตว่า แม้ในบางพื้นที่สามารถพบแมลงที่เป็นโรคเป็นจำนวนมากก็ตาม แต่กลับพบว่าเชื้อที่พบเหล่านั้นส่วนใหญ่ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคซ้ำได้ เช่น เชื้อจากตัวอย่างที่เก็บจาก อำเภอแม่สอด จังหวัดตาก และอำเภอท่าม่วงจังหวัดกาญจนบุรี เป็นต้น (ตารางที่ 2) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุของการเกิดโรคได้หลายสาเหตุ เช่น ประการแรก เชื้อเหล่านั้นเป็นเชื้อที่เข้าทำลายหลังจากแมลงตายแล้ว (secondary infection) ซึ่งเป็นการตายที่เกิดจากสาเหตุอื่น เนื่องจากเชื้อราเขียวนั้นสามารถเป็นได้ทั้งเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค (insect disease) และเชื้อที่ลงทำลายซากแมลงที่ตายแล้ว (saprophytic fungi) (ทิพย์วดี, 2535) ประการที่สอง อาจเกิดจากความแตกต่างในส่วนของความรุนแรงของเชื้อที่แตกต่างไปตามสภาพแวดล้อม รวมทั้งความแข็งแรงของแมลงที่นำมาทดสอบซึ่งอาจมีความแข็งแรงแตกต่างกันได้ (Culliney and Grace, 2000) ประการที่สาม สภาพแวดล้อมในการทำให้เกิดโรคซ้ำในห้องปฏิบัติการมุ่งเน้นเฉพาะที่สภาพแวดล้อมภายใต้ความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ เท่านั้น ซึ่งในสภาพความเป็นจริงเชื้ออาจมีความแข็งแรง แต่ต้องอยู่ในสภาพแวดล้อมในรูปแบบอื่น ๆ ก็ได้ ทั้งนี้เชื้อราเขียวมีความหลากหลายในเรื่องสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเจริญในช่วงของอุณหภูมิที่กว้างมาก ตั้งแต่ 15-35 °ซ (Staples and Milner, 2000) อย่างไรก็ตาม เชื้อที่ไม่ผ่านการทดสอบ ยังคงเป็นเชื้อที่น่าสนใจและถูกเก็บไว้เพื่อการทดสอบในสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 2 แสดงพื้นที่พบตัวอย่างแมลงที่เป็นโรค จำนวนแมลงที่พบ และจำนวนแมลงที่สามารถทำให้เกิดโรคซ้ำกับแมลงได้ภายใต้สภาพแวดล้อมห้องปฏิบัติการที่ความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 $^{\circ}$ซ

จังหวัด	แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่าง (อำเภอ)	จำนวนแมลงที่พบเป็นโรค	จำนวนแหล่งเก็บตัวอย่างที่พบเชื้อราที่ทำให้แมลงเกิดเป็นโรคซ้ำ
กำแพงเพชร	คลองลาน	3	1
ตาก	เมือง	5	3
	บ้านตาก	6	1
	ท่าสองยาง	2	2
	พบพระ	2	2
	แม่สอด	4	0
เพชรบูรณ์	เมือง	2	0
	หล่มสัก	2	0
	หล่มเก่า	6	4
	เขาค้อ	3	0
อุตรดิตถ์	น้ำปาด	4	1
เพชรบุรี	ท่ายาง	1	0
กาญจนบุรี	ท่าม่วง	4	0
เชียงใหม่	สะเมิง	7	2
รวม	14	51	16

มหาวิทยาลัยนเรศวร

การเก็บตัวอย่างดินเพื่อค้นหาเชื้อราเขียว

กรณีที่ 2 เป็นการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่บริเวณพื้นที่ปลูกผัก โดยทำการเก็บตัวอย่างจาก บริเวณขอบแปลง หรือพื้นที่ชายป่า แหล่งน้ำ ที่ร่มชื้น ที่อยู่ติดกับพื้นที่ปลูกผัก (ภาพที่ 10) เนื่องจากการเก็บตัวอย่างดินนี้เป็นการเก็บดินเพื่อนำมาค้นหาและเสาะหาเชื้อราเขียวที่อยู่ในดินซึ่งอาจอยู่ในรูปของสปอร์ หรือเส้นใยของเชื้อ ทั้งนี้เพราะเชื้อราเขียวมีความสามารถดำรงชีพในดินได้ระยะเวลาหนึ่ง (Siegfried et al., 2003) จึงทำการเก็บตัวอย่างดินจากทุกพื้นที่ที่ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

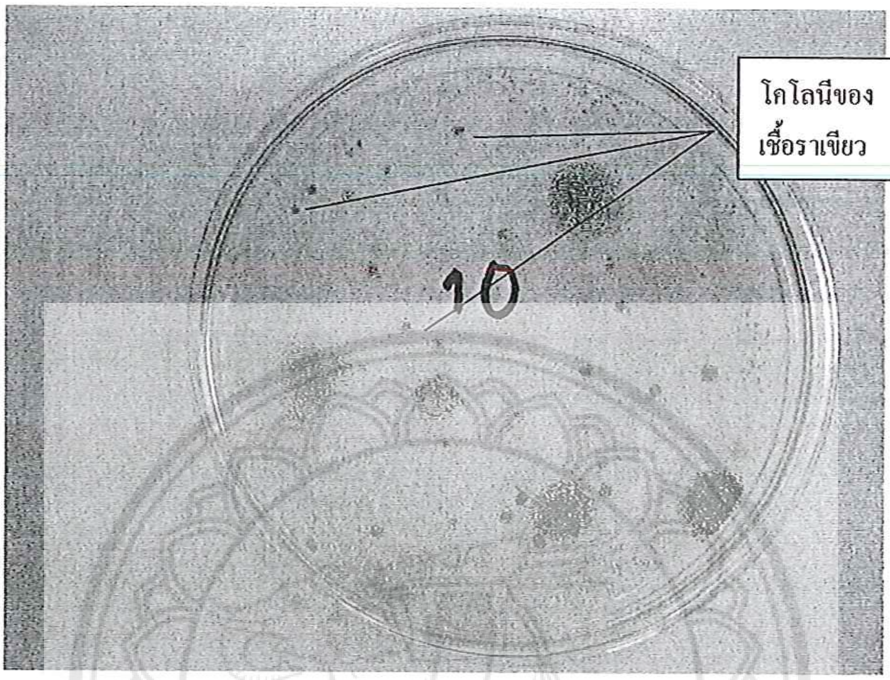
ภาพที่ 10 แสดงลักษณะของพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างดินเพื่อตรวจสอบเชื้อราเขียว

จากจำนวนตัวอย่างดินที่เก็บรวบรวมจากจุดเก็บตัวอย่างในพื้นที่ของจังหวัดต่าง ๆ จำนวน 190 จุด เมื่อนำมาตรวจสอบโดยเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีจุดเก็บตัวอย่างที่ปรากฏโคโลนีของเชื้อราเขียวจำนวน 91 จุด โดยจังหวัดที่มีจำนวนจุดเก็บตัวอย่างดินที่ปรากฏโคโลนีของเชื้อมากที่สุด คือ จังหวัดตากพบทั้งหมด 43 จุด รองลงมาคือ จังหวัดเพชรบูรณ์พบทั้งหมด 30 จุด และจังหวัดในเขตภาคเหนือตอนล่างที่ตัวอย่างดินจากจุดเก็บไม่

ปรากฏเชื้อราเขียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อเลย ได้แก่ จังหวัดพิจิตร จังหวัดสุโขทัย และนครสวรรค์ ส่วนตัวอย่างดินจากจังหวัดอ้างอิงนั้น จังหวัดที่พบโคโลนีของเชื้อจากตัวอย่างดิน ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดเชียงใหม่ และเป็นที่น่าสังเกตว่า จังหวัดอ้างอิงที่ไม่พบโคโลนีของเชื้อราเขียวจากตัวอย่างดินได้แก่ กรุงเทพฯ นครปฐม สมุทรสาคร และราชบุรี นั้น การเจริญของเชื้อราอื่น ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นไปได้ช้ามากเช่นกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในพื้นที่ดังกล่าวมีการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดควบคุมเชื้อราได้หลายชนิด (broad spectrum) บ่อยครั้งมาก ซึ่งมักมีการฉีดพ่นทุก ๆ 3-5 วัน เพื่อป้องกันกำจัดเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผัก เช่นใบไหม้ ใบจุด โรคเน่าคอดิน และอื่น ๆ ซึ่งมักมีการระบาดรุนแรง และยากแก่การแก้ไขเมื่อพบการระบาดของโรคแล้ว การป้องกันจึงเป็นวิธีการที่กระทำกันเป็นพื้นฐานของการปลูกผัก ทำให้มีการตกค้างของสารป้องกันกำจัดในพื้นที่ปลูกผักในปริมาณที่สามารถส่งผลต่อเชื้อราชนิดอื่น ๆ รวมทั้งเชื้อราเขียวอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

ในแต่ละจุดเก็บตัวอย่างที่ปรากฏโคโลนีของเชื้อราเขียว จำนวนโคโลนีของเชื้อราเขียวมีความแตกต่างไปตามแหล่งที่มาและความเข้มข้นของสารละลายดินที่นำมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจำนวนโคโรนีกระจายตั้งแต่ 3-38 โคโลนีต่อจานเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 11) อย่างไรก็ตาม เชื้อแต่ละโคโลนีที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อถูกนำมารวมกัน และเพาะเลี้ยง เพื่อเป็น stock ของเชื้อราเขียวโดยถือว่าเชื้อราเขียวจากแต่ละจุดคือ ประชากรของเชื้อราเขียว ณ จุดเก็บตัวอย่างนั้น ๆ

มหาวิทยาลัยนเรศวร



ภาพที่ 11 แสดงการเกิดโคโลนีของเชื้อราเขียวและเชื้อราอื่น ๆ ที่ได้จากตัวอย่างดิน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

มหาวิทยาลัยนเรศวร

เมื่อนำประชากรของเชื้อราเขียวที่เก็บรวมรวมได้เหล่านี้ไปทดสอบการเกิดโรคซ้ำกับด้วงหมัดผัก พบว่ามีเพียง 10 ประชากรเท่านั้นที่สามารถทำให้เกิดโรคซ้ำในด้วงหมัดผักได้ด้วยการพ่นเชื้อที่ความเข้มข้น 10^8 conidia/ml ลงบนแมลงและพืชในภาชนะเพาะเลี้ยง และเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมที่กำหนด ประชากรของเชื้อเหล่านี้มีแหล่งที่มาจากจุดเก็บตัวอย่างจาก จังหวัดเพชรบูรณ์ ตาก กำแพงเพชร และพิษณุโลก โดยมีจำนวน ที่พบ 5, 3, 1, และ 1 ประชากร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งจากแหล่งที่มาของประชากรของเชื้อราเขียวที่เก็บรวบรวมได้จากตัวอย่างดินเหล่านี้ทั้งหมดเก็บรวบรวมจากสภาพแปลงผักที่อยู่ใกล้ป่าหรือชายป่า มีความชื้นสูง มีสภาพอากาศเย็น และมักเป็นที่บนภูเขาสูง และเมื่อพิจารณาร่วมกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมจากด้วงหมัดที่เป็นโรคในกรณีแรกข้างต้น เป็นการยืนยันถึงสภาพแวดล้อมที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราเขียวมากที่สุดคือ สภาพอากาศเย็นชื้น และอยู่ใกล้ชายป่า หรือแหล่งน้ำ

16890430
- 4 พ.ย. 2558
สำนักหอสมุด
SB
333
ธ826ร
2549

ตารางที่ 3 แสดงแหล่งพื้นที่เก็บตัวอย่างดิน จำนวนตัวอย่างดิน จำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่พบ และที่สามารถทำให้เกิดโรคซ้ำได้ในแมลงทดสอบ

จังหวัด	แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่าง (อำเภอ)	จำนวนพื้นที่เก็บตัวอย่างดิน (แห่ง)	จำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่พบจากตัวอย่างดินที่เก็บจากแหล่งเก็บตัวอย่าง	จำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่ทำให้แมลงเกิดเป็นโรคซ้ำ
กำแพงเพชร	คลองลาน	5	5	1
	เมือง	2	0	0
ตาก	เมือง	10	10	1
	บ้านตาก	10	8	0
	ท่าสองยาง	15	12	2
	พบพระ	15	10	0
	แม่สอด	5	3	0
นครสวรรค์	เมือง	10	0	0
พิษณุโลก	เมือง	10	2	1
	บางระกำ	5	0	0
เพชรบูรณ์	เมือง	5	1	0
	หล่มสัก	10	5	0
	หล่มเก่า	30	18	3
	เขาค้อ	10	6	2
พิจิตร	ตะพานหิน	2	0	0
	เมือง	1	0	0
สุโขทัย	เมือง	2	0	0
	ศรีสำโรง	2	0	0
	สวรรคโลก	2	0	0
อุตรดิตถ์	เมือง	2	0	0
	น้ำปาด	5	3	0
	พิชัย	8	0	0
กรุงเทพ	หนองแขม	2	0	0
นครปฐม	เมือง	4	0	0
สมุทรสาคร	บ้านแพ้ว	3	0	0

ตารางที่ 3 (ต่อ)

จังหวัด	แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่าง (อำเภอ)	จำนวนพื้นที่เก็บตัวอย่างดิน (แห่ง)	จำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่พบจากตัวอย่างดินที่เก็บจากแหล่งเก็บตัวอย่าง	จำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่ทำให้แมลงเกิดเป็นโรคซ้ำ
ราชบุรี	ดำเนินสะดวก	3	0	0
เพชรบุรี	ท่ายาง	5	1	0
กาญจนบุรี	ท่าม่วง	2	2	0
เชียงใหม่	สะเมิง	5	5	0
รวม		190	91	10

การเก็บตัวอย่างด้วงหมัดผักจากแปลงผักเพื่อค้นหาเชื้อราเขียว

กรณีที่ 3 เป็นการเก็บตัวอย่างด้วงหมัดผักจากพื้นที่ปลูกผัก (ภาพที่ 12) และนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่สภาพความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ ซึ่งเป็นสภาพที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราเขียว พบว่ามีแมลงจำนวน 88 ตัว แสดงอาการติดโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราเขียว โดยจำนวนของแมลงที่เป็นโรคมีความแตกต่างไปตามสภาพของแหล่งที่เก็บรวบรวม อย่างไรก็ตาม พบแมลงที่เป็นโรคในทุกเขตจังหวัดภาคเหนือตอนล่าง และจังหวัดที่พบแมลงที่เป็นโรคสูงสุด 3 อันดับแรกคือ จังหวัดตาก เพชรบูรณ์ และอุตรดิตถ์ มีจำนวนที่พบ 24, 17, และ 15 ตัวตามลำดับ ส่วนแหล่งจังหวัดเปรียบเทียบพบแมลงที่เป็นโรคในจังหวัดเชียงใหม่ และกาญจนบุรีเท่านั้น ส่วนจังหวัดกรุงเทพฯ นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี และเพชรบุรี ไม่พบแมลงที่เป็นโรคภายใต้สภาพแวดล้อมที่กำหนดในห้องปฏิบัติการได้

ภาพที่ 12 แสดงการเก็บรวบรวมด้วงหมัดผักจากแปลงผักเกษตรกร

เมื่อเพาะเชื้อราเขียวที่พบจากแต่ละตัวอย่างและนำมาทดสอบการเกิดโรคซ้ำกับด้วงหมัดผักทดสอบ ด้วยการพ่นเชื้อที่ความเข้มข้น 10^8 conidia/ml ลงบนแมลงและพืชในภาชนะเพาะเลี้ยง และเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมที่กำหนด พบว่ามีเชื้อราเขียวที่สามารถทำให้เกิดโรคกับแมลงได้เพียง 19 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างจากจังหวัด ตาก เพชรบูรณ์ พิษณุโลก นครสวรรค์ พิจิตร และอุตรดิตถ์ จำนวน 4, 4, 3, 2, 1, และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับและเป็นตัวอย่างจากจังหวัดเปรียบเทียบ 2 จังหวัดคือ กาญจนบุรี และเชียงใหม่ จำนวน 2 ตัวอย่างเท่ากัน โดยพื้นที่หรือจุดเก็บตัวอย่างที่พบเชื้อราเขียวมีความสอดคล้องกับแหล่งของเชื้อราที่พบใน 2 กรณีแรกข้างต้นเช่นกัน

ตารางที่ 4 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่าง จำนวนแมลงที่พบเป็นโรค และจำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่ทำให้เกิดโรคซ้ำในแมลงทดสอบ

จังหวัด	แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่าง (อำเภอ)	จำนวนพื้นที่เก็บตัวอย่าง (แห่ง)	จำนวนแมลงที่พบเป็นโรคจากแมลงที่นำมาเลี้ยงในสภาพความชื้นสูงที่อุณหภูมิ 25 °ซ	จำนวนแหล่งเก็บตัวอย่างที่พบเชื้อราที่ทำให้แมลงเกิดเป็นโรคซ้ำ
กำแพงเพชร	คลองลาน	5	5	0
	เมือง	2	0	0
ตาก	เมือง	10	7	2
	บ้านตาก	10	4	2
	ท่าสองยาง	15	8	0
	พบพระ	15	3	0
	แม่สอด	5	2	0
นครสวรรค์	เมือง	10	5	2
พิษณุโลก	เมือง	10	4	2
	บางระกำ	5	3	1
เพชรบูรณ์	เมือง	5	6	2
	หล่มสัก	10	2	1
	หล่มเก่า	30	5	1
	เขาค้อ	10	4	0
พิจิตร	ตะพานหิน	2	3	1
อุตรดิตถ์	เมือง	2	5	0
	น้ำปาด	5	4	0
	พิชัย	8	6	1
กรุงเทพ	หนองแขม	2	0	0
นครปฐม	เมือง	4	0	0
สมุทรสาคร	บ้านแพ้ว	3	0	0
ราชบุรี	ดำเนินสะดวก	3	0	0
เพชรบุรี	ท่ายาง	5	0	0
กาญจนบุรี	ท่าม่วง	2	4	2
เชียงใหม่	สะเมิง	5	8	2
รวม		183	88	19

การให้รหัสประชากรของเชื้อราเขียวที่มีศักยภาพในการก่อโรคให้กับด้วงหมัดผัก

ประชากรของเชื้อราเขียวที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ โดยวิธีการเก็บตัวอย่างทั้ง 3 รูปแบบ และผ่านการทดสอบการก่อให้เกิดโรคซ้ำได้ในด้วงหมัดผัก ภายใต้สภาพแวดล้อมที่กำหนดของห้องปฏิบัติการ นำมาเรียงตามสภาพของพื้นที่แหล่งเก็บตัวอย่างและวิธีการ เพื่อใส่รหัสของประชากรดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงแหล่งเก็บรวบรวมเชื้อราเขียว จำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่ผ่านการทดสอบศักยภาพการเกิดโรคซ้ำ และรหัสประชากร

จังหวัด	แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่าง (อำเภอ)	จำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่ได้จากแมลงเป็นโรค	จำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่ได้จากตัวอย่างดิน	จำนวนประชากรของเชื้อราเขียวที่ได้จากแมลงปกติ	รวมทั้งหมด	**รหัสประชากร**
กำแพงเพชร	คลองลาน	1	1	0	2	MN 01-02
ตาก	เมือง	3	1	2	6	MN03-08
	บ้านตาก	1	0	2	3	MN09-11
	ท่าสองยาง	2	2	0	4	MN12-15
	พบพระ	2	0	0	2	MN16-17
นครสวรรค์	เมือง	0	0	2	2	MN18-19
พิษณุโลก	เมือง	0	1	2	3	MN20-22
	บางระกำ	0	0	1	1	MN23
เพชรบูรณ์	เมือง	0	0	2	2	MN24-25
	หล่มสัก	0	0	1	1	MN26
	หล่มเก่า	4	3	1	8	MN27-34
	เขาค้อ	0	2	0	2	MN35-36
พิจิตร	ตะพานหิน	0	0	1	1	MN37
อุตรดิตถ์	น้ำปาด	1	0	0	1	MN38
	พิชัย	0	0	1	1	MN39
กาญจนบุรี	ท่าม่วง	0	0	2	2	MN40-41
เชียงใหม่	สะเมิง	2	0	2	4	MN42-45

การทดสอบความสามารถของเชื้อ *M. anisopliae*

การทดสอบความสามารถของประชากรเชื้อ *M. anisopliae* ในการทำให้แมลงตาย หรืออีกนัยหนึ่งคือ การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ สามารถทดสอบได้ใน 2 ลักษณะ คือ อัตราการตาย (%mortality) และ ระยะเวลาที่เชื้อทำให้แมลงเป็นโรคตาย ซึ่งนิยมวัดในลักษณะของระยะเวลาที่เชื้อทำให้แมลงตายได้ร้อยละ 50 (LT_{50}) (Jones et al., 1996;Rath et al., 1995; Sun et al., 2003)

อัตราการตายของด้วงหมัดผักที่เกิดจากประชากรของเชื้อราเขียวที่คัดเลือกแล้วจากการทดสอบการควบคุมด้วงผักกาดในระดับห้องปฏิบัติการจำนวน 45 ประชากร MN01-MN45) โดยทำการจุ่มแมลงลงในสารละลายของเชื้อจากประชากรต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้น 10^8 conidia/ml เป็นเวลา 6 วินาที และเพาะเลี้ยงแมลงภายใต้สภาพแวดล้อมที่ความชื้น 50% ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ เป็นเวลา 15 วัน จึงทำการตรวจผล โดยพิจารณาจากซากของแมลงที่ตายต้องปรากฏเส้นใยหรือสปอร์ของเชื้อราเขียวบนตัวแมลง พบว่า เชื้อราเขียวจากทุกประชากรที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นต้นมาแล้วสามารถทำให้เกิดโรคกับแมลงได้ทุกประชากร อย่างไรก็ตามความรุนแรงของเชื้อมีระดับแตกต่างกันอย่างชัดเจน และจากการเปรียบเทียบอัตราการตายเฉลี่ย โดย DMRT พบว่าสามารถจำแนกประชากรได้เป็น 4 กลุ่มตามระดับความรุนแรงของเชื้อ คือกลุ่มที่มีความรุนแรงของเชื้อสูง มีอัตราการตายของแมลงตั้งแต่ ร้อยละ 75.5-97.5 มีจำนวนถึง 27 ประชากร ได้แก่ ประชากร MN01-MN17, MN31-MN34, MN36, MN38, MN42-MN45 ระดับปานกลาง มีอัตราการตายของแมลงตั้งแต่ ร้อยละ 42-65 มีจำนวน 12 ประชากร ได้แก่ ประชากร MN18-19, MN25-30, MN35, MN39-41 ระดับต่ำ มีอัตราการตายของแมลงตั้งแต่ ร้อยละ 32-37.5 มีจำนวนประชากร 3 ประชากร ได้แก่ประชากร MN21, MN24, MN37และระดับต่ำมากมีอัตราการตายของแมลงตั้งแต่ ร้อยละ 10-22 มีจำนวน 3 ประชากร ได้แก่ ประชากร MN20 MN22-23 โดยหากพิจารณาอัตราการตายของแมลงที่มีสาเหตุจากเชื้อราเขียว ที่ 50% พบว่ามีประชากรจำนวนถึง 37 ประชากร คิดเป็นร้อยละ 82 ของประชากรทั้งหมดที่คัดเลือก (ตารางที่ 6)

ส่วนการศึกษาถึงระยะเวลาที่เชื้อทำให้แมลงตายนั้น ในกรณีนี้ดำเนินการเช่นเดียวกับกรณีแรก แต่นับจำนวนวันที่เชื้อราเขียวจากแต่ละประชากรทำให้แมลงตายได้ถึงร้อยละ 50 (LT_{50}) และแมลงที่ตายต้องมีเส้นใยหรือสปอร์ของเชื้อปรากฏบนซากของแมลงเท่านั้น ผลการศึกษาและจัดจำแนกกลุ่มโดยใช้สถิติ DMRT พบว่า ค่า LT_{50} สามารถช่วยในการจัดกลุ่มประชากรของเชื้อราเขียวได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มรวดเร็วมาก สามารถทำให้แมลงตายได้ร้อยละ 50 ภายใน 6-7 วันหลังได้รับเชื้อ ประกอบด้วยประชากรจำนวน 5 ประชากร ได้แก่ MN04 MN07, MN14-15, และMN33 กลุ่มรวดเร็วปานกลาง สามารถทำให้แมลงตายได้ร้อยละ 50

ภายใน 7.5-9.5 วันหลังได้รับเชื้อ ประกอบด้วยประชากรจำนวน 10 ประชากร ได้แก่ ประชากร MN01-02, MN05-06, MN11-13, MN32, MN34, และMN42 และกลุ่มไม่รวดเร็ว สามารถทำให้แมลงตายได้ร้อยละ 50 ภายใน 10-11.5 วันหลังได้รับเชื้อ ประกอบด้วย ประชากรจำนวน 10 ประชากร ได้แก่ MN03, MN08, MN09, MN16, MN36, MN38, MN43, และMN44 กลุ่มช้ามากสามารถทำให้แมลงตายได้ถึงร้อยละ 50 แต่ต้องใช้เวลาเกินกว่า 12 วัน หลังได้รับเชื้อ ประกอบด้วยประชากรจำนวน 10 ประชากร ได้แก่ MN17, MN31, MN41, และMN45 (ตารางที่ 6)

ในการใช้เชื้อราควบคุมแมลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราเขียว นอกจากมีข้อที่ต้องพิจารณาในส่วนของเชื้อ แมลง และสภาพแวดล้อมที่สำคัญคือ ความชื้นและอุณหภูมิแล้ว ระยะเวลาที่ทำให้แมลงตายก็มีความสำคัญมากเช่นกัน โดยเมื่อเชื้อราเจริญส่งเส้นใยแทงทะลุผนังลำตัวของแมลงเข้าไปเจริญอยู่ภายในนั้น แมลงจะมีอาการป่วย หยุดกินอาหาร แม้ยังมีการเคลื่อนไหวบ้าง แต่ไม่สามารถกัดกินหรือก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชได้ซึ่งระยะแสดงผลนี้อาจใช้เวลาสั้นมากเพียง 1-2 วันเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามเป็นการยากมากในการพิจารณาอาการป่วยของแมลงในระยะนี้และจำแนกได้ว่าเป็นอาการที่เกิดจากเชื้อราที่เข้าทำลาย ไม่ใช่จากสาเหตุอื่น ๆ ดังนั้นการตรวจสอบการตายของแมลงว่ามีสาเหตุจากเชื้อรานั้นจำเป็นอย่างยิ่งต้องพิจารณาจากเส้นใยและสปอร์ที่ขึ้นปกคลุมแมลงเท่านั้น ทำให้ต้องใช้เวลารอคอยการแสดงผลในระยะเวลาหนึ่งซึ่งโดยทั่วไปอยู่ในช่วงตั้งแต่ 6 วันขึ้นไป เชื้อที่มีศักยภาพควรเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติในการเข้าทำลายแมลงได้ดี ให้อัตราการตายที่สูง และใช้เวลาสั้น (ทิพย์วดี, 2535; Glare and Milner, 1991; Ignoffo ,1992) ในกรณีความสามารถของเชื้อราเขียวที่ผ่านการคัดเลือกในการเกิดโรคกับด้วงหมัดผักข้างต้น เมื่อพิจารณาจากผลของอัตราการตายจากกลุ่มที่มีความรุนแรงของเชื้อสูงร่วมกับระยะเวลาที่ทำให้ด้วงตายร้อยละ 50 ในระดับรวดเร็วกับระดับปานกลาง พบว่า กลุ่มประชากรเชื้อราเขียวที่ให้ผลสอดคล้องกับหลักการดังกล่าวมีจำนวนทั้งสิ้น 16 ประชากร คือ MN01 และ MN02 จากอำเภอคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร MN04, MN05, MN06, และMN0 7 จากบริเวณปลูกผักชาวมูเซอ อำเภอเมือง จังหวัดตาก MN10 และ MN11 จากบริเวณชุมชนชาวเขา อำเภอบ้านตาก จังหวัดตาก MN12, MN13, MN14, และMN15 จากบริเวณชุมชนชาวเขา อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก MN32, MN33, และMN34 จากบริเวณชุมชนชาวเขา ทับเบิก อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ และ MN42 จากพื้นที่บริเวณชุมชนชาวเขา อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับศึกษาในรายละเอียดและคัดเลือกในระดับต่อไป โดยกลุ่มที่มีความสำคัญมากเป็นพิเศษคือกลุ่มที่มีผลของอัตราการตายจากกลุ่มที่มีความรุนแรงของเชื้อสูงร่วมกับระยะเวลาที่ทำให้ด้วงตายร้อยละ 50 ในระดับรวดเร็ว ประกอบด้วยประชากรจาก MN04 และ MN07 จากบริเวณปลูกผักชาวมูเซอ อำเภอเมือง จังหวัดตาก MN14 และ MN15 จากบริเวณชุมชนชาวเขา อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก และ MN33 จากบริเวณชุมชนชาวเขา ทับเบิก อำเภอหล่มเก่า

จังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งเป็นประชากรของเชื้อราเขียวที่มีแหล่งเก็บรวบรวมจากเขตพื้นที่ของภาคเหนือตอนล่างทั้งหมด โดยในที่นี้พิจารณา ประชากร MN42 จากพื้นที่บริเวณชุมชนชาวเขา อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งเป็นประชากรจากนอกเขตภาคเหนือตอนล่างที่ให้ผลดีที่สุดเป็นประชากรเปรียบเทียบ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงพื้นที่ที่พบประชากรเชื้อราที่ได้มีความสามารถในการเข้าทำลายด้วงหมัดผักเหล่านี้ พบว่าส่วนใหญ่เป็นพื้นที่การเกษตรที่ตั้งอยู่ใกล้พื้นที่ป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ เป็นพื้นที่เขาสูง มีประวัติการพ่นสารเคมีควบคุมศัตรูพืชผักน้อยทั้งสิ้น และเป็นพื้นที่ที่มีสภาพแวดล้อมทั้งอุณหภูมิ ความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราเขียว ประกอบกับปัญหาเรื่องเชื้อราโรคพืชมีพบน้อยดังนั้นการพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในกลุ่มที่ทำลายเชื้อราได้มากชนิด (broad spectrum fungicides) ไม่รุนแรงมาก ทำให้กิจกรรมของเชื้อราเขียวเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องในธรรมชาติ มากกว่าที่พบในเขตพื้นที่ปลูกผักเก่าทั้งหลาย

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตารางที่ 6 ความรุนแรงของเชื้อ *M. anisopliae* ที่คัดเลือก ที่มีต่อ ด้วงหมัดผัก ในสภาพการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ภายใต้ความชื้น 50% ที่ระดับอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ

รหัสประชากร	อัตราการตาย (%)	จำนวนวันที่แมลงตายเกินกว่า 50%
MN 01	85.0^{a}	8.0^{ab}
MN 02	77.5^{a}	9.5^{ab}
MN 03	75.5^{a}	10.0^{b}
MN 04	92.0^{a}	7.0^{a}
MN 05	90.5^{a}	8.0^{ab}
MN 06	92.5^{a}	8.5^{ab}
MN 07	85.5^{a}	7.0^{a}
MN 08	92.0^{a}	10.5^{b}
MN 09	95.5^{a}	11.0^{b}
MN 10	97.0^{a}	9.0^{ab}
MN 11	95.5^{a}	7.5^{ab}
MN 12	90.5^{a}	7.5^{ab}
MN 13	95.5^{a}	8.0^{ab}
MN 14	95.5^{a}	6.5^{a}
MN 15	95.0^{a}	6.0^{a}
MN 16	90.2^{a}	11.0^{b}
MN 17	82.0^{a}	12.0^{c}
MN 18	55.5^{b}	-
MN 19	62.0^{b}	-
MN 20	22.0^{d}	-
MN 21	35.0^{c}	-
MN 22	17.5^{d}	-
MN 23	10.0^{d}	-
MN 24	37.5^{c}	-
MN 25	42.0^{b}	-
MN 26	60.5^{b}	-
MN 27	57.0^{b}	-
MN 28	60.5^{b}	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รหัสประชากร	อัตราการตาย (%)	จำนวนวันที่แมลงตายเกินกว่า 50%
MN 29	50.5^{b}	-
MN 30	47.0^{b}	-
MN 31	87.0^{a}	13.0^{c}
MN 32	90.5^{a}	8.5^{ab}
MN 33	97.5^{a}	7.0^{ab}
MN 34	95.5^{a}	7.5^{ab}
MN 35	50.5^{b}	-
MN 36	80.5^{a}	10.5^{b}
MN 37	32.0^{c}	-
MN 38	87.0^{a}	10.0^{b}
MN 39	50.5^{b}	-
MN 40	60.0^{b}	-
MN 41	65.0^{b}	13.0^{c}
MN 42	87.0^{a}	8.0^{ab}
MN 43	85.5^{a}	11.5^{b}
MN 44	90.5^{a}	10.5^{b}
MN 45	87.5^{a}	12.0^{c}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงระดับที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p value < 0.05)

การศึกษาระดับความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมที่สามารถทำให้แมลงตาย

การศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมที่สามารถทำให้แมลงตายนั้นมักนิยมใช้การพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของเชื้อในรูปของสปอร์หรือโคนีเดียที่สามารถทำให้เกิดโรคและส่งผลให้แมลงตายลงร้อยละ 50 (LC_{50}) (ทิพย์วดี, 2535; Glare and Milner, 1991; Ignoffo ,1992) ซึ่งเป็นข้อมูลที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพหรือความรุนแรงของเชื้อราได้ โดยความรุนแรงของเชื้อแปรผกผันกับความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ทดสอบ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ประชากรของเชื้อราเขียวที่ได้รับการคัดเลือกแล้วข้างต้นจากทุกเขตจำนวน 16 ประชากร สามารถลงทำลายแมลงได้เป็นอย่างดี โดยมีค่า LC_{50} อยู่ในช่วงตั้งแต่ 4.2-0.5 X 10^{6} conidia/ ml โดยประชากรเชื้อราเขียวที่มีค่า LC_{50} ต่ำกว่าประชากรเปรียบเทียบซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 1.2 X 10^{6} conidia/ ml มีจำนวน 3 ประชากร ประกอบด้วย MN13, MN14, และ

MN15 จากบริเวณชุมชนชาวเขา อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก มีค่า LC_{50} เท่ากับ 0.8, 0.5 และ 0.7 X 10^{6} conidia/ ml ตามลำดับ กลุ่มประชากรที่มีค่า LC_{50} สูงกว่าประชากรเปรียบเทียบแต่ไม่เกิน 2 X 10^{6} conidia/ ml มีจำนวน 9 ประชากร โดยมีค่า LC50 อยู่ในช่วง 1.3-1.9 X 10^{6} conidia/ ml ประกอบด้วย MN04-07 จากบริเวณปลูกผักชาวมูเซอ อำเภอเมือง จังหวัดตาก MN10-11 จากบริเวณชุมชนชาวเขา อำเภอบ้านตาก จังหวัดตาก MN32-34 จากบริเวณชุมชนชาวเขา ทับเบิก อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ ส่วนกลุ่มประชากรที่มีค่า LC50 เกิน 2 X 10^{6} conidia/ ml มีจำนวน 3 ประชากร ประกอบด้วย MN01-02 จากอำเภอคลองลาน จังหวัดกำแพงเพชร และ MN12 จากบริเวณชุมชนชาวเขา อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก

เมื่อพิจารณาข้อมูล LC_{50} ร่วมกับกลุ่มประชากรที่มีผลของอัตราการตายจากกลุ่มที่มีความรุนแรงของเชื้อสูงร่วมกับระยะเวลาที่ทำให้ด้วงตายร้อยละ 50 ในระดับรวดเร็ว ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับการจัดอันดับให้ความสำคัญมากเป็นพิเศษข้างต้น พบว่า มีเพียง 2 ประชากรจากกลุ่มดังกล่าวคือ MN14 และMN15 จากบริเวณชุมชนชาวเขา อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก เท่านั้น ที่ให้ผลการควบคุมสอดคล้องกับค่า LC_{50} ที่มีค่าต่ำที่สุดของกลุ่มซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงอยู่ในระดับสูง และควรเป็นกลุ่มที่มีศักยภาพมากที่สุดในการนำไปพัฒนาและศึกษาในระดับรายละเอียดต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม ผลในส่วนของการศึกษา LC_{50} ของประชากรเชื้อราเขียวที่คัดเลือกสรรแล้วในครั้งนี้ แม้ผลส่วนใหญ่มีความชัดเจนสอดคล้องกับผลการศึกษาถึงความสามารถของเชื้อในการทำลายแมลงในขั้นต้น แต่ข้อมูลบางส่วนยังมีความแปรปรวนบ้าง ตัวอย่างเช่น ประชากร MN04 และ MN07 จากบริเวณปลูกผักชาวมูเซอ อำเภอเมือง จังหวัดตาก MN33 จากบริเวณชุมชนชาวเขา ทับเบิก อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความรุนแรงของเชื้อสูงร่วมกับระยะเวลาที่ทำให้ด้วงตายร้อยละ 50 ในระดับรวดเร็ว แต่กลับให้ผลของค่า LC_{50} ในระดับปานกลางอยู่ในช่วงของ 1.4-1.8 X 10^{6} conidia/ml เท่านั้น ในขณะที่ MN13 จากบริเวณชุมชนชาวเขา อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่น่าสนใจกลับให้ผลของค่า LC_{50} ในระดับดีมาก เท่านั้น

ตารางที่ 7 ระดับความรุนแรงของเชื้อ *M. anisopliae* ที่ลงทำลายด้วงหมัดผัก พิจารณาจาก LC_{50} โดยอาศัยข้อมูลการทดสอบด้วยเชื้อที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ 7 ระดับ

ประชากร	LC_{50} ($X10^6$ conidia/ ml)
MN 01	3.6
MN 02	4.2
MN 04	1.7
MN 05	1.5
MN 06	1.9
MN 07	1.8
MN 10	1.5
MN 11	1.7
MN 12	2.3
MN 13	0.8
MN 14	0.5
MN 15	0.7
MN 32	1.6
MN 33	1.4
MN 34	1.3
MN 42	1.2

ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิต ความแปรปรวนเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นได้เสมอ โดยปัจจัยที่มีผลต่อความแปรปรวนก่อให้เกิดความหลากหลายขึ้นนี้ก็คือปัจจัยภายในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ และปัจจัยจากสภาพแวดล้อม เช่นความชื้น อุณหภูมิ แสง ฯลฯ ซึ่งในกรณีของ สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แมลง และเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ปัจจัยของสภาพแวดล้อมที่มีบทบาทสำคัญต่อการดำรงชีพอาจครอบคลุมจำกัดอยู่ในพื้นที่เล็ก ๆ ที่เรียกว่า microclimate เท่านั้น โดยแต่ละพื้นที่ย่อยเล็ก ๆ เหล่านี้มักมีสภาพแวดล้อมที่จำเพาะ หลากหลาย กระจายอยู่ทั่วไปอาจมีสภาพที่แตกต่างอย่างสิ้นเชิงกับสภาพแวดล้อมโดยรวมได้ ดังนั้นเชื้อที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยนเรศวร

นั้นเป็นการเก็บจากจุดเก็บเล็ก ๆ ที่สุ่มจากพื้นที่ทั้งหมด ซึ่งแม้ว่าจุดเก็บอาจมีตำแหน่งใกล้เคียงกัน แต่อาจมีความแตกต่างกันในส่วนของสภาพแวดล้อมของการดำรงชีพอย่างสิ้นเชิงในลักษณะของ microclimate ได้ เชื้อราเขียวเป็นตัวอย่างหนึ่งที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากในเรื่องสภาพของการดำรงชีพ สามารถพบสายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อในสภาพอุณหภูมิตั้งแต่ 10-35 °ซ และความชื้นสัมพัทธ์ตั้งแต่ 50-100% (Miekiewski et al., 1994; Vidal et al., 1997) แต่เนื่องจาก ในการศึกษาครั้งนี้ มุ่งเน้นเฉพาะเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีและมีประสิทธิภาพในสภาพที่มีอุณหภูมิ 25 ± 0.5 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50 ± 5% เท่านั้น ทำให้เชื้อราที่ดำรงชีพในสภาพแวดล้อมอื่น ๆ ไม่ได้รับการคัดเลือก อย่างไรก็ตาม เพื่อให้เกิดความเหมาะสม คณะผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกประชากรทั้งหมดที่มีค่า LC_{50} ต่ำกว่า 2 X 10^{6} conidia/ml สำหรับนำไปศึกษาในรายละเอียดและคัดแยกสายพันธุ์ ต่อไปในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาศักยภาพของเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมด้วงหมัดผัก *Phyllotreta* spp.(Coleoptera: Chrysomellidae) ในพื้นที่ปลูกผักกะหล่ำเขตภาคเหนือตอนล่าง ในครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างในรูปของตัวอย่างแมลงที่เป็นโรค ตัวอย่างดิน ตัวอย่างแมลงที่ปกติ จากพื้นที่ปลูกผักต่าง ๆ ทั่วเขตภาคเหนือตอนล่างและพื้นที่ปลูกผักหลักในเขตภาคเหนือและภาคกลางเพื่อเป็นแหล่งเปรียบเทียบ จำนวน 190 แห่ง และทำการคัดเลือกเชื้อในเบื้องต้น ได้เชื้อราเขียว *Metarhizium amisopliae* จำนวน 45 ประชากร และทำการคัดเลือกจนได้ประชากรที่มีศักยภาพในการทำลายด้วงหมัดผัก ด้วยการศึกษาระดับความรุนแรงของเชื้อจนสามารถคัดสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อนำไปศึกษาในระดับต่อไปได้ทั้งสิ้น 16 ประชากร โดยในจำนวนนี้ 2 ประชากรที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ของจังหวัดตากมีประสิทธิภาพสูงสุด และมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาต่อไปสำหรับใช้ในการควบคุมด้วงหมัดผักโดยชีววิธีในอนาคต อย่างไรก็ตาม จำเป็นอย่างยิ่งต้องมีการทดสอบในเรื่องต่างๆ เช่น ระดับของอุณหภูมิ และความชื้นที่เหมาะสมของแต่ละสายพันธุ์ การจำแนกด้วยข้อมูลทางชีวโมเลกุล การทดสอบความคงทนของเชื้อ และประสิทธิภาพของเชื้อในสภาพแปลง ฯลฯ ซึ่งจะดำเนินการต่อไปในระยะอันใกล้นี้

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2542. การปลูกกะหล่ำปลี. คำแนะนำที่ 165. กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.

กองวัตถุมีพิษการเกษตร. 2543. การห้ามประกอบกิจการและห้ามใช้วัตถุอันตรายทาง การเกษตร. ข่าวสารวัตถุมีพิษ 27(3): 29-38.

ชูวิทย์ ศุขปราการ, พิมลพร นันทะ, ปิยรัตน์ เขียนมีสุข, ไพศาล รัตนเสถียร, นงพร กิจบำรุง, สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น, สัจจะ ประสงค์ทรัพย์, กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, จักรพงศ์ พิริยพล, ศรีสุดา โท้ทอง, ลัดดาวัลย์ อินทรสังข์, อุทัย เกตุนุติ, อัจฉรา ตันติโชดก, วัชรี สมสุข, เสริมศิริ คงแสงดาว, จุมพล สาระนาค, อรพรรณ วิเศษสังข์, พนิดา ไชยยันต์บูรณ์, จินตนา ภู่มงกุฎชัย, ธีรพล อุ่นจิตต์วรรธนะ, สุปราณี อิ่มพิทักษ์, จรัส กิจบำรุง, พินิจ เกตุทอง, และประหยัด ยุพิน. 2543. การป้องกันกำจัดศัตรู กะหล่ำปลีโดยวิธีผสมผสาน. ในรายงานผลการดำเนินงานการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานครั้งที่ 3 โรงแรมโนโวเทล ริมแพ รีสอร์ท จังหวัดระยอง 29-31 สิงหาคม 2543. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535. โรควิทยาของแมลง. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.205 หน้า.

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข, อนันต์ วัฒนธัญกรรม, สถิตย์ ปฐมรัตน์, วินัย รัชตปกรณ์ชัย, จารี เกียรติ์สุพิมล และเสรี ทองมาก. 2530. ศึกษาการควบคุมแมลงแบบผสมผสาน. รายงานผลการค้นคว้าวิจัย, กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

พิบูลย์ มณีประกรณ์. 2543. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชผักของเกษตรกรผู้ปลูกผักในเขตอำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, (เกษตรศาสตร์), บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Burge, M. N. 1988. Fungi in biological Control Systems. Manchester Press, Manchester, U.K.

Culliney, T. W., and J. K. Grace. 2000. Prospects for the biological control of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae), with special reference to *Coptotermes formosanus*. Bull. Entomol. Res. 90: 9-21.

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 p.

Glare, T. R., and R. J. Milner. 1991. Ecology of entomopathogenic fungi, pp. 547-612. In D. K. Arora, L. Ajello, and K. G. Mukerji [eds.], Handbook of applied mycology, vol.2. Humans, animals and insects. Mercel Dekker, New York.

Ignoffo, C. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. Fla. Entomol. 75: 516-525.

Jones, W. J., J. K. Grace, and M. Tamashiro. 1996. Virulance of seven isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Coptoterrmes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Environ. Entomol. 25: 481-487.

Kobayashi, Y. 1951. The genus *Cordyceps* and its allies. Science Reports of the Tokyo Bunrika Daigaku. Section B 84: 53-260 p.

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

Mietkiewski, R., C. Tkaczuk, M. Zurek, L. P. S. Vander Geest. 1994. Temperature requirement of four entomopathogenic fungi. Acta Mycologica 29: 109-120.

Rath, A. C., T. B. Worledge, T. B. Koen, and B. A. Rowe. 1995. Long-term field efficacy of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* against subterranean scarab, *Adoryphorus couloni*. Biocontrol Sci. Technol. 5: 439-451.

Samson, R. A., H. C. Evan, and J. P. Latge. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, The Natherlands.

Siegfried, K., K. Philip, and S. Christian. 2003.Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. Biocontorl 48: 307-319.

Staples, J. A., and R. J. Milner. 2000. A laboratory evaluation of repellency of *Metarhizium anisopliae* conidia to *Coptotermes lacteus* (Isoptera: Rhinotermitidae). Sociobiology 36:133-148.

Sun, J.,J. R. Fuxa, and G. Henderrson. 2003. Effects of virulence, sporulation, an temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. J. Invertebr. Pathol. 84: 38-46.

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

Van Driesche, R. G., and S. T., Bellow Jr. 1996. Biological Control. Chapman&Hall, New York.

Vidal, C., J. Fargues, L.A. Lacey, R. Assis, M. McClelland, B. W. S. Sobral. 1997. Genetic variability of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates revealed by molecular markers. Journal of Invertebrate Pathology 70: 18-26.

มหาวิทยาลัยนเรศวร