

การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม (green muscardine fungus);
Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin เพื่อป้องกันกำจัดตัวอ่อนของแมลงใน
อันดับด้วงและผีเสื้อ

Efficacy test of a green muscardine fungus, *Metarhizium anisopliae*
(Metsch) Sorokin to control larval stage of insect pests in order
Coleoptera and Lepidoptera

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ อิศเรศ เทียนทัต วิไลวรรณ เวชยันต์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมเพื่อป้องกันกำจัดตัวอ่อนของแมลงในอันดับ
ด้วงและผีเสื้อ ทำการวิจัยในช่วงในเดือนตุลาคม 2554 - กันยายน 2555 ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่ม
งานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรม
วิชาการเกษตร การดำเนินงานในปีงบประมาณ 2555 ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพราเขียวเมตาไรเซียม
จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการในการควบคุมด้วงหมัดผัก วางแผนการทดลองแบบ CRD
ประกอบด้วย 11 วิธีการ 4 ซ้ำ (1 ซ้ำ = ใช้ด้วง 20 ตัว/กล่อง) เตรียมกล่องเลี้ยงแมลงขนาด 7 x 10 ซม.
จำนวน 44 กล่อง ใส่ฟองน้ำและผักค่น้ำลงในแต่ละกล่อง เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียราเขียวไอ
โซเลท M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 และ M9 โดยปรับความเข้มข้นโคนิเดียให้เท่ากันทุก
ไอโซเลทที่ 1×10^9 โคนิเดีย/มล. พ่นเชื้อไอโซเลทละ 4 กล่อง (4 ซ้ำ) ส่วน control พ่นด้วยน้ำนิ่งฆ่า
เชื้อ ทำการทดสอบจำนวน 5 ครั้ง พบว่าราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M3 ทำให้ด้วงหมัดผักมี
เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวมากกว่าราเขียวไอโซเลทอื่น โดยการทดลองครั้งที่ 1 ด้วงหมัดผักติดเชื้อ
ราเขียวไอโซเลท M3 ที่ 66.25% ในขณะที่ติดเชื้อราเขียวไอโซเลทอื่นอยู่ระหว่าง 28.75 - 58.75%
การทดลองครั้งที่ 2 ด้วงหมัดผักติดเชื้อราเขียวไอโซเลท M3 ที่ 57.50% ในขณะที่ติดเชื้อราเขียวไอ
โซเลทอื่นอยู่ระหว่าง 17.50 - 38.75% การทดลองครั้งที่ 3 ด้วงหมัดผักติดเชื้อราเขียวไอโซเลท M3 ที่
65% ในขณะที่ติดเชื้อราเขียวไอโซเลทอื่นอยู่ระหว่าง 22.50 - 62.50% การทดลองครั้งที่ 4 ด้วงหมัด
ผักติดเชื้อราเขียวไอโซเลท M3 ที่ 61.25% ในขณะที่ติดเชื้อราเขียวไอโซเลทอื่นอยู่ระหว่าง 35 -
60% และการทดลองครั้งที่ 5 ด้วงหมัดผักติดเชื้อราเขียวไอโซเลท M3 ที่ 87.50% ในขณะที่ติดเชื้อ
ราเขียวไอโซเลทอื่นอยู่ระหว่าง 13.75 - 86.25% ดังนั้นในปีงบประมาณ 2556 จะได้เลือกราเขียวเมตา
ไรเซียมไอโซเลท M3 เพื่อใช้ขยายผลทดสอบในสภาพไร่ต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-02-03-02-55

คำนำ

ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจงานด้านการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพมากขึ้น วิธีการหนึ่งที่ได้รับความสะดวกคือการนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ซึ่งนอกจากมีความปลอดภัยต่อสุขภาพของตัวเกษตรกรผู้เข้าร่วมทั้งผู้บริโภคแล้ว ยังไม่ทำให้เกิดพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในสภาพแวดล้อม

ราเขียวเมตาไรเซียม (*Metarhizium anisopliae*) (Metsch) Sorokin เป็นจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อยู่ใน Phylum: Ascomycota เชื่อว่าในกลุ่มนี้มักจะเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรครา “muscadine” ในแมลง โดยใน *M. anisopliae* มีการเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า “green muscadine” พบแพร่กระจายได้ทั่วไป สามารถใช้ควบคุมแมลงในกลุ่ม Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera, Hemiptera และ Hymenoptera (Lezama-Gutiérrez และคณะ 2000; Kershaw และคณะ 1999; Rosa และคณะ 2000)

ในเมืองไทยมีการศึกษาการนำเชื้อราเขียวมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชมากมาย จากรายงานผลงานค้นคว้าวิจัยตั้งแต่ปี 2525 -2539 โดยมีวัลย์ ปันยารชุน กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา ได้ทำการศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราดังกล่าวกับแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ พบว่าสามารถนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดได้แก่ ตัวงแรมมะพร้าว; *Oryctes rhinoceros*, มอดเจาะผลกาแฟ; *Hypothenemus hampei*, มวนโกโก้; *Helopeltis* spp. เป็นต้น การดำเนินงานที่ผ่านมาได้เก็บรวบรวมเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จากแหล่งต่างๆ จำนวนทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท และได้นำมาทดสอบประสิทธิภาพเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีความเหมาะสม งานวิจัยของเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 - กันยายน 2553 ได้ทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพพราเขียวเมตาไรเซียม *Metarhizium anisopliae* ในห้องปฏิบัติการ โดยเน้นการควบคุมแมลงศัตรูมะพร้าว ได้แก่ หนอนด้วงแรมมะพร้าว, หนอนแมลงดำหนาม และหนอนหัวดำมะพร้าว ซึ่งผลการทดสอบ ทำให้ได้ไอโซเลทเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมแมลงศัตรูมะพร้าวดังกล่าว ในปี 2554 ได้มีการขยายผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวกับหนอนด้วงแรมมะพร้าว ในแหล่งปลูกมะพร้าว 2 พื้นที่คือ ต.สามเรือน อ. เมืองราชบุรี จ.ราชบุรี และ ต.โรงหีบ อ. บางคนที จ. สมุทรสงคราม โดยทำการทดสอบ 3 ครั้ง ผลการทดสอบพบว่าการใช้เชื้อราเขียวอัตรา 200 กรัม/ถังซีเมนต์ (ความจุ 0.25 ลูกบาศก์เมตร) มีความเหมาะสมในการใช้ นอกจากจะประหยัดเชื้อแล้ว ยังเป็นการลดการใช้เชื้อราเขียวเกินความจำเป็น และยังสามารถลดต้นทุนค่าใช้จ่ายและแรงงานในการผลิตเชื้ออีกด้วย

การดำเนินงานในปี 2555 - 2556 จะได้นำเชื้อราเขียวในห้องปฏิบัติการทั้ง 10 ไอโซเลทมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอื่นๆ โดยในปี 2555 จะทำการทดสอบประสิทธิภาพพราเขียวทั้ง 10 ไอโซเลทกับตัวงแรมด้วง เพื่อให้ทราบประสิทธิภาพเชื้อในการควบคุมตัวงแรมด้วง และจะคัดเลือกเชื้อราเขียวที่มีประสิทธิภาพดีเพื่อนำไปขยายผลทดสอบต่อในสภาพไร่ วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อ

ทดสอบประสิทธิภาพไอโซเลทราเซียวเมตาไรเซียม (*Metarhizium anisopliae*) ที่มีใน
ห้องปฏิบัติการ จำนวน 10 ไอโซเลท ในการควบคุมด้วงหมัดผัก; *Phyllotreta sinuata* (Stephens)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ราเซียวเมตาไรเซียม *M. anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 และ M9
2. แมลงศัตรูพืชในกลุ่มด้วง และหนอนผีเสื้อศัตรูพืช ได้แก่ ด้วงหมัดผัก
3. ข้าวโพดบดหยาบ
4. Potato Dextrose Broth (PDB)
5. กล้องเลี้ยงแมลง
6. ที่ดูดสปอร์ (Micropipet)
7. เครื่องนับสปอร์ (Hemocytometer)
8. ตู้เขี่ยเชื้อ
9. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
10. กล้องจุลทรรศน์
11. ปีกเกอร์ ขนาด 250, 500, 1000 มล.
12. กระจกตวง ขนาด 250, 500, 1000 มล.
13. พลาสติก ขนาด 250, 500 มล.
14. กล้องเลี้ยงแมลง

วิธีการ

1. เลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราเซียวเมตาไรเซียม

เลี้ยงขยายราเซียวเมตาไรเซียมจำนวน 10 ไอโซเลทในห้องปฏิบัติการ โดยเริ่มต้นจากการเลี้ยงในอาหารเหลว (PDB) ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเซียวประมาณ 1 X 1 ซม. ถ่ายใส่ลงในพลาสติกอาหารเหลว (PDB) นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180/นาที เป็นเวลานาน 4 วัน ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้ออื่นด้วยกล้องจุลทรรศน์ก่อนจะนำมาเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณบนข้าวโพดบดหยาบ โดยเตรียมเมล็ดข้าวโพดบดหยาบ 200 กรัม เติมน้ำ 200 มิลลิลิตร ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้เย็น แล้วจึงถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ในอัตรา 2 มล./ถุง คลุกให้เชื้อ กระจายทั่วอาหาร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 3 °ซ.) เป็นเวลานาน 14 วัน ราเซียวเมตาไรเซียมจะเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียจนเต็มถุง จึงนำเชื้อที่ได้ไปทดสอบกับแมลงศัตรูพืชต่อไป

2. ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมกับดั่งหมัดผัก

ล้างโคนิเดียโดยนำราเขียวอายุ 14 วัน เติมน้ำผสม tween ปริมาตร 100 มิลลิลิตร/ถุง เขย่าให้โคนิเดียหลุด แล้วปรับกำลังโคนิเดียให้เท่ากันทุกไอโซเลทที่ 1×10^9 โคนิเดีย/มล. เตรียมกล่องเลี้ยงแมลงขนาด 7×10 ซม. จำนวน 44 กล่อง ใส่ฟองน้ำและผักคะน้าลงในกล่อง พรมน้ำให้มีความชื้น แบ่งกล่องเลี้ยงแมลงตามการทดลอง โดยแบ่งเป็น 11 กรรมวิธี 4 ซ้ำ (1 ซ้ำ = ดั่ง 20 ตัว/กล่อง) เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียราเขียวไอโซเลท M0 - M9 โดยปรับความเข้มข้นโคนิเดียให้เท่ากันทุกไอโซเลทที่ 1×10^9 โคนิเดีย/มล. ฟันเชื้อไอโซเลทละ 4 กล่อง (4 ซ้ำ) ส่วน control ฟันด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้อปล่อยดั่งหมัดผักลงไปกล่องละ 20 ตัว ปิดฝากล่องให้สนิทเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเกิดโรคของแมลงที่ใช้ทดสอบพร้อมจดบันทึกข้อมูล

การบันทึกข้อมูล

- เก็บข้อมูลโดยสังเกตอาการและการเกิดโรคของแมลงที่ใช้ทดสอบ จดบันทึกระยะเวลาที่ทำให้เกิดโรคของเชื้อราเขียวแต่ละไอโซเลทที่ใช้ทดสอบ รวมทั้งจดบันทึกความผิดปกติทั้งหมดที่เกิดขึ้นระหว่างทำการทดลอง
- วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ IRRISTAT

เวลาและสถานที่

: เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2555

: ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพราเขียวเมตาไรเซียมจำนวน 10 ไอโซเลท กับดั่งหมัดผักในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงขยายราเขียวเมตาไรเซียมบนข้าวโพดบดหยาบประมาณ 14 วัน จากนั้นล้างโคนิเดีย และปรับความเข้มข้นสารแขวนลอยโคนิเดีย = 1×10^9 โคนิเดีย/มล. ก่อนนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับราเขียวเมตาไรเซียมทั้ง 10 ไอโซเลท โดยทำการทดสอบจำนวน 5 ครั้ง พบว่าราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M3 ทำให้ดั่งหมัดผักมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมมากกว่าราเขียวไอโซเลทอื่น โดยการทดลองครั้งที่ 1 ดั่งหมัดผักติดเชื้อราเขียวไอโซเลท M3 ที่ 66.25% ในขณะที่ติดเชื้อราเขียวไอโซเลทอื่นอยู่ระหว่าง 28.75 - 58.75% การทดลองครั้งที่ 2 ดั่งหมัดผักติดเชื้อราเขียวไอโซเลท M3 ที่ 57.50% ในขณะที่ติดเชื้อราเขียวไอโซเลทอื่นอยู่ระหว่าง 17.50 - 38.75% การทดลองครั้งที่ 3 ดั่งหมัดผักติดเชื้อราเขียวไอโซเลท M3 ที่ 65% ในขณะที่ติดเชื้อราเขียวไอโซเลทอื่นอยู่ระหว่าง 22.50 - 62.50% การทดลองครั้งที่ 4 ดั่งหมัดผักติดเชื้อราเขียวไอโซเลท M3 ที่ 61.25% ในขณะที่ติดเชื้อราเขียวไอโซเลทอื่นอยู่ระหว่าง 35 - 60% และการทดลองครั้ง

ที่ 5 ตัวงหมัดฝักติดเชื้อราเขียวไอโซเลท M3 ที่ 87.50% ในขณะที่ติดเชื้อราเขียวไอโซเลทอื่นอยู่ระหว่าง 13.75 – 86.25% จากผลการทดลองพบว่าราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M3 มีความน่าสนใจในการใช้ควบคุมตัวงหมัดฝัก ดังนั้นในปีงบประมาณ 2556 จะได้นำราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลทนี้ไปทดสอบในแปลงปลูกฝักในสภาพไร่ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการทดสอบประสิทธิภาพราเขียวเมตาไรเซียมจำนวน 10 ไอโซเลท ในห้องปฏิบัติการกับตัวงหมัดฝัก โดยทำการทดสอบจำนวน 5 ครั้ง พบว่าราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M3 มีแนวโน้มที่ดีในการใช้ควบคุมตัวงหมัดฝัก เนื่องจากทำให้ตัวงหมัดฝักติดเชื้อได้มากกว่าราเขียวไอโซเลทอื่น จึงเป็นที่น่าสนใจในการเลือกราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M3 ไปขยายผลทดสอบในสภาพไร่ต่อไปในปีงบประมาณ 2556

เอกสารอ้างอิง

Kershaw, M.J., E.R. Moorhouse, R. Bateman, S.E. Reynolds and A.K. Charnley. 1999.

The role of destruxins in pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. J. Invertebr. Pathol. 74: 213-223.

Lezama-Gutiérrez, R., A. Trujillo-De la Luz, J. Molina-Ochoa, O. Rebolledo-Dominguez, A.R. Pescador, M. López-Edwards and M. Aluja. 2000. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): Laboratory and Field Trials. J. Econ. Entomol. 93: 1080-1084.

Rosa, W. DE LA, R. Alatorre, J.F. Barrera and C. Toriello. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. J. Econ. Entomol. 93: 1409-1414.

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพพาราเซตามอลโรเซียมทั้ง 10 ไอโซเลท ในการควบคุมด้วงหมัดผักใน
ห้องปฏิบัติการ

ไอโซเลท	จำนวนด้วง (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเซียมของด้วงหมัดผัก				
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5
M0	80	38.75	17.50	32.50	60	56.25
M1	80	28.75	30	43.75	38.75	62.50
M2	80	40	21.25	53.75	50	48.75
M3	80	66.25	57.50	65	61.25	87.50
M4	80	58.75	30	50	50	46.25
M5	80	52.50	25	43.75	43.75	51.25
M6	80	53.75	23.75	50	35	13.75
M7	80	38.75	27.50	22.5	47.50	30.00
M8	80	40	38.75	62.50	48.75	86.25
M9	80	30	18.75	62.50	51.25	55.00
Control = น้ำนิ่งฆ่า เชื้อ	80	0	0	0	0	0