การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ เพื่อพัฒนาสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

อารยา บุญศักดิ์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ เพื่อพัฒนาสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

อารยา บุญศักดิ์

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ เพื่อพัฒนาสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล"

ของ อารยา บุญศักดิ์

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไสว บูรณพานิชพันธุ์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณิกา อินต๊ะนนท์)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา หอมหวล)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุรี กระจายกลาง)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ จันทร์บาง)

อนุมัติ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ เพื่อพัฒนาสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ผู้วิจัย อารยา บุญศักดิ์

ประธานที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณิกา อินต๊ะนนท์

กรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภา หอมหวล

ประเภทสารนิพนธ์ วิทยานิพนธ์ ปร.ด. วิทยาศาสตร์การเกษตร, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2566

คำสำคัญ การควบคุมโดยชีววิธี, เพลี้ยกระโดนสีน้ำตาล, เชื้อราเมธาไรเซียม, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ, ข้าว

บทคัดย่อ

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stål)) จัดเป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญทางเศรษฐกิจในเอเชีย เชื้อราเมตาไรเซียมเป็นเชื้อราก่อโรคกับแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ดังนั้นจึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์และพัฒนาสารชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ1) ค้นหาเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าจาก 3 อำเภอในจังหวัดเพชรบูรณ์ คือ เขาค้อ หล่มเก่าและน้ำหนาว 2) คัดแยกและคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จัดจำแนกเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือก ทดสอบและคัดเลือกเชื้อราที่มีความทนทานต่อ อุณหภูมิสูงและสภาพความเป็นกรด-ด่างได้ดีที่สุด และ 3) พัฒนาเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นชีวภัณฑ์ต้นแบบ ผลการคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่า พบเชื้อรา *Metarhizium* spp. จำนวน 126 ไอโซเลต ใส่รหัส PB-01 - PB-126 โดยเชื้อราทุกไอโซเลตสามารถก่อโรคกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ได้ร้อยละ 26.7-100 ที่ 6 วัน หลังจากสัมผัสโคนิเดียของเชื้อ โดยพบเชื้อรา *Metarhizium* spp. เพียง 16 ไอโซเลตเท่านั้นที่ผ่านการคัดเลือกเนื่องจากสามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 100 ภายใน 6 วัน หลังสัมผัสโคนิเดียของเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร และมีระดับความรุนแรงของการก่อโรค (LT_{50}) ในช่วง 2.9-4.2 วัน เมื่อทำการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่คัดเลือกทั้ง 16 ไอโซเลต ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และโคนิเดีย ร่วมกับการเปรียบเทียบสายพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลตคือ *Metarhizium anisopliae* เมื่อทำการทดสอบความคงทนต่อสภาพอุณหภูมิสูงและความเป็นกรด-

ด่าง พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 2 ไอโซเลต คือ PB-02 และ PB-75 ที่สามารถคงความมีชีวิตได้ดีที่สุดที่ $3.8x10^4$ และ $3.9x10^4$ CFU/ml ตามลำดับ ภายใต้สภาพการเก็บรักษาในดินที่มีอุณหภูมิสูง 50 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน อัตราการงอกของโคนิเดียภายใต้ การเพาะเลี้ยงที่ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่ 16 ชั่วโมง พบว่าเชื้อราไอโซเลต PB-02 และ มีอัตราการงอกอยู่ในช่วงร้อยละ 16.67-57.57 และเชื้อไอโซเลต PB-75 อัตราการงอกอยู่ในช่วงร้อยละ 23.09-61.66 โดยมีขนาดการขยายตัวของโคโลนีในช่วง 4.25-6.74 และ 4.02-6.88 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่แยกได้จากอำเภอหล่มเก่าได้รับการคัดเลือกด้วยศักยภาพที่ทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียสและทนสภาพกรด-ด่างในช่วง pH 5-9 ได้ดีที่สุด เพื่อพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ต้นแบบ ด้วยการผสมโคนิเดียเชื้อรากับสารพา 5 ชนิด เก็บรักษาที่สภาพอุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส นาน 90 วัน ตรวจสอบความมีชีวิตร่วมกับการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ผลการทดสอบพบว่า โคนิเดีย *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่ผสมกับสารพา pumice: potassium humate สัดส่วน 90:10 มีจำนวนโคโลนีเจริญได้สูงที่สุด 1.33×10^2 CFU/ml และมีประสิทธิภาพในการก่อโรคกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงสุด ร้อยละ 85.08 ที่ 7 วัน หลังทำการพ่นเชื้อรา และมีค่า LT_{50} อยู่ที่ 2.47 วัน

Title SCREENING OF *METARHIZIUM* SPP. ISOLATES FROM FOREST SOILS IN PHETCHABUN PROVINCE FOR DEVELOPING OF BIOINSECTICIDES IN CONTROLLING BROWN PLANTHOPPER

Author Araya Bunsak

Advisor Assistant Professor Suphannika Intanon, Ph.D.

Co-Advisor Assistant Professor Wipa Homhaul, Ph.D.

Academic Paper Ph.D. Dissertation in Agricultural Science, Naresuan University, 2023

Keywords Biological control, Brown planthopper, Metarhizium spp., Phylogenetic analysis rice

ABSTRACT

Brown planthopper (BPH), *Nilaparvata lugens* (Stål), is an importantly economic insect pest of rice in Asia. The use of *Metarhizium* spp., entomopathogenic fungi, is one of the highly effective to control BPH. Therefore, the screening of *Metarhizium* spp. isolated from forest soils in Phetchabun province for developing of bioinsecticides in controlling brown planthopper were performed. The objectives of this research were 1) to search *Metarhizium* spp. from the forest soils in three districts of Phetchabun province, Thailand (Khao Kho, Lom Kao and Nam Nao), 2) to screen and select the highly potential *Metarhizium* spp. to control BPH, identifying species of the selected *Metarhizium* spp., and screening for high temperature and pH tolerance isolates, and 3) to develop a primary bioproduct of the highest potential *Metarhizium* spp. in controlling BPH. The total of 126 isolates of *Metarhizium* spp. were detected from the forest soils and coded as PB-01 to PB-126. All isolates infected the third nymphal instar of BPH with 26.7 to 100% mortality at 6 days after contacting fungal conidia; however, only were 16 isolates of those selected based on 100% mortality which concentration 10^8 conidia/ml with LT_{50} at 2.9-4.2 days. The species identification of 16 *Metarhizium* spp. isolates was performed using morphological data of colony and conidia together with molecular data of ITS region of 18S rDNA. The result revealed that all selected isolates of *Metarhizium* spp. were

belong to *Metarhizium anisopliae.* Then the determination and screening procedures under high temperature and wide range of pH were applied on those 16 isolates. Only two *M. anisopliae* isolates, PB-02 and PB-75, were highly significant to survive after preserved in organic soil at 50 °C for 21 days and the growth of their colony at $3.8x10^4$ and $3.9x10^4$ CFU/ml were detected. The germination rate of conidia of both isolates at pH 4, 5, 6. 7, 8 and 9 after 16 hours of incubation. The germination rates of PB-02 were 16.67-57.57% and PB-75 were 23.09-61.66%. Meanwhile, the expanding size of those colonies ranged from 4.25-6.74 and 4.02-6.88 cm, respectively. Finally, PB-75 isolate was selected for the primary bioproduct development because it held better performance on temperature and pH tolerance. The conidia of *M. anisopliae* isolate PB-75 from Lom Kao District was formulated with five carriers and preserved under 40 °C condition for 90 days and then survival of conidia and their efficiency to control BPH were determined. The result showed that the formulation of PB-75 conidia with carrier, pumice: potassium humate at the ratio 90:10, held the highest number of colonies at 1.33×10^2 CFU/ml and when applied on the third nymphal instar of BPH, the highest mortality of BPH at 85.08% was recorded at 7 days after application with LT_{50} at 2.47 days.

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจากหลาย ๆ ท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณิกา อินต๊ะนนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำในการศึกษาวิจัยอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง และความช่วยเหลือในเครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา หอมหวล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ รองศาสตราจารย์ ดร. ไสว บูรณพานิชพันธุ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุรี กระจายกลาง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและความช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบพระคุณคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่เป็นกำลังใจ ให้การสนับสนุนด้านเครื่องมืออุปกรณ์ต่าง ๆ และสถานที่ที่ใช้ในงานวิจัย

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา - มารดา และทุกคนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในด้านการเงิน ด้วยความรักและความเข้าใจตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางในการบริหารจัดการแมลงศัตรูข้าว รวมทั้งมีบทบาทต่อการลดการใช้สารเคมีให้เกิดขึ้นแก่เกษตรกร ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อมได้อย่างเหมาะสม และยั่งยืนต่อไป

อารยา บุญศักดิ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

ประกาศคุณูปการ ..... ช

สารบัญ ..... ซ

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

ขอบเขตของงานวิจัย 3

สมมติฐานของงานวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper) 4

การควบคุมโดยใช้ชีววิธี (Biological control) 5

เชื้อราทำลายแมลง 7

เชื้อรา *Metarhizium* spp. 8

สารพารูปแบบผงในการเก็บรักษาเชื้อรา *Metarhizium* spp. 12

จังหวัดเพชรบูรณ์ 13

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 15

การค้นหาเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากตัวอย่างดินป่า ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์.....15
การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล.....16
การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคนิเดีย.....18
การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ด้วยลักษณะทางชีวโมเลกุล จากสายพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA.....18
ทดสอบความคงทนของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ในดินที่อุณหภูมิสูง.....19
ทดสอบการเจริญของเชื้อราต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างในห้องปฏิบัติการ.....20
พัฒนาสารชีวภัณฑ์ชนิดผงจากเชื้อรา *Metarhizium* spp.....22
ทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. หลังเก็บในสภาพอุณหภูมิ 40°C จากการทดลองที่ 7 กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในเรือนทดลอง.....23
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....24
การค้นหาเชื้อรา *Metarhizium* sp. จากตัวอย่างดินป่าที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์.....24
1. สำรวจและรวบรวมตัวอย่างดิน.....24
2. ผลการคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากตัวอย่างดิน.....26
การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล.....29
การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคนิเดีย.....41
การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ด้วยลักษณะทางชีวโมเลกุลจากสายพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA.....43

ทดสอบความคงทนของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในดินที่อุณหภูมิสูง 46
ทดสอบการเจริญของเชื้อราต่อสภาพความเป็นกรดด่าง ในห้องปฏิบัติการ 52
พัฒนาสารชีวภัณฑ์เบื้องต้นชนิดผงจากเชื้อรา *Metarhizium* spp. 67
ทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน หรือ 3 เดือน กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในเรือนทดลอง.....69
บทที่ 5 บทสรุป.....72
สรุปผลการวิจัย.....72
อภิปรายผล 74
ข้อเสนอแนะ 81
บรรณานุกรม.....82
ประวัติผู้วิจัย 98

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน ตำแหน่งบนเส้นรุ้งเส้นแวงผิวโลก ความสูงจากระดับน้ำทะเล อุณหภูมิดิน และค่าความเป็นกรดด่างของดินอำเภอเขาค้อ อำเภอหล่มเก่า และอำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ 24

ตาราง 2 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินและจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่พบ 27

ตาราง 3 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 และ LT_{50} ที่ถูกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่แยกได้จากเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ลงทำลายที่ระยะเวลา 6 วันหลังสัมผัสเชื้อ 31

ตาราง 4 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 และ LT_{50} ที่ถูกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่แยกได้จากหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ลงทำลายที่ระยะเวลา 6 วันหลังสัมผัสเชื้อ 34

ตาราง 5 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 และ LT_{50} ที่ถูกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่แยกได้จากน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ลงทำลายที่ระยะเวลา 6 วันหลังสัมผัสเชื้อ 37

ตาราง 6 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และระยะเวลาที่เชื้อรา *Metarhizium* spp. ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 ที่ระยะเวลา 6 วันหลังสัมผัสเชื้อ.....38

ตาราง 7 ลักษณะโคโลนี และโคนิเดียของเชื้อ *Metarhizium* spp. ที่มีศักยภาพในการลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จำนวน 16 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของเชื้อ *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium album*, *Metarhizium majus* และ *Metarhizium granulomatis* เพื่อจัดกลุ่มและจำแนกชนิดของเชื้อรา 41

ตาราง 8 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต หลังบ่มเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 7 วัน.....48

ตาราง 9 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต หลังบ่อเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 14 วัน.....50

ตาราง 10 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต หลังบ่มเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 21 วัน.....51

ตาราง 11 อัตราการงอกของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 และ PB-75 ที่ระดับ pH ต่างกันหลังบ่มเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง.....54

ตาราง 12 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ที่ระดับ pH ต่างกันหลังบ่มเป็นระยะเวลา 1-12 วัน.....58

ตาราง 13 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่ระดับ pH ต่างกันหลังบ่มเป็นระยะเวลา 1-12 วัน.....63

ตาราง 14 จำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่เก็บรักษาในสารพา 5 สูตร ที่ระยะเวลา 30, 60 และ 90 วัน 68

ตาราง 15 อัตราการตายที่แท้จริงของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 หลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับ ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน หรือ 3 เดือน...70

ตาราง 16 ระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ตายร้อยละ 50 หลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน หรือ 3 เดือน.....71

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 แผนที่จังหวัดเพชรบูรณ์.....13

ภาพ 2 จุดเก็บตัวอย่างดินจังหวัดเพชรบูรณ์.....15

ภาพ 3 จุดเก็บตัวอย่างดินในอำเภอเขาค้อ อำเภอหล่มเก่า และอำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์.....26

ภาพ 4 โคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium* spp., ลักษณะของเชื้อราที่แยกจากดินบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (a), ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่เจริญบน อาหารเลี้ยงเชื้อ (b), ลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium* spp. (c).....29

ภาพ 5 เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ลงทำลาย, เส้นใยของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ขึ้นปกคลุมตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ตายตั้งแต่วันที่ 3 หลังสัมผัสเชื้อรา (a), โคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ขยายคลุมตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 4 หลังสัมผัสเชื้อรา (b).....29

ภาพ 6 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 (ร้อยละ) หลังสัมผัสเชื้อรา*Metarhizium* spp. จำนวน 16 ไอโซเลต ที่ระยะเวลา 0-6 วัน.....39

ภาพ 7 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทั้ง 16 ไอโซเลต โดยใช้ข้อมูลลักษณะของโคโลนี และโคนิเดียของเชื้อรา เปรียบเทียบกับลักษณะของโคโลนีและโคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (M anisop), *Metarhizium album* (M album), *Metarhizium majus* (M majus) และ *Metarhizium granulomatis* (M granul) เพื่อการจัดกลุ่มชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ทั้ง 16 ไอโซเลต.....43

ภาพ 8 แผนภูมิต้นไม้ (ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแท็กซ่า) ตามการจัดตำแหน่งของ 18S rDNA ของเชื้อ Metarhizium 16 ไอโซเลต และ *Metarhizium anisopliae* ที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิด โดยมีเชื้อรานอกกลุ่ม 2 ชนิด คือ *Metarhizium frigidum* HM055448.1 และ

Metarhizium minus HM055453.1 โดยการใช้วิธี bootstraps 1000 ซ้ำ ซึ่งได้จากการคำนวณระยะวิวัฒนาการด้วยเทคนิค P-distance โดยวิธีการของ Neighbor-Joining.....46

ภาพ 9 ลักษณะการงอกของโคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 และ PB-75; germinating conidium (gc), germ tube (gt), appressorium (aps), conidium (co).....53

ภาพ 10 การเปลี่ยนแปลงของอัตราการงอกของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) และ PB-75 (เส้นกราฟสีส้ม) ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4-9 หลังบ่มเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง 55

ภาพ 11 อัตราการเจริญของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่ระยะเวลา 1-12 วัน 59

ภาพ 12 อัตราการเจริญของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่ระยะเวลา 1-12 วัน 64

ภาพ 13 การเปลี่ยนแปลงของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) และ PB-75 (เส้นกราฟสีส้ม) ที่ระดับ pH 4-9 หลังบ่มเป็นระยะเวลา 12 วัน 65

ภาพ 14 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 และ PB-75 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงที่ระดับ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่ระยะเวลา 12 วันหลังการเพาะเชื้อ 66

ภาพ 15 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์ 5 ตำรับ ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน; ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่บ่มเชื้อในสารพา pumice (a); ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่บ่มเชื้อในสารพา kaolin (b); ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่บ่มเชื้อในสารพา diatomaceous earth (c); ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่บ่มเชื้อในสารพา pumice: potassium humate (90:10) (d); ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่บ่มเชื้อในสารพา kaolin: potassium humate (90:10) (e).....69

ภาพ 16 ลักษณะของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ที่ถูกเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับ ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน.....71

ภาพ 17 สรุปผลการศึกษาทั้งหมด.....74

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

การผลิตข้าวในปัจจุบันเน้นการผลิตเพื่อการค้าและการส่งออกเป็นหลัก โดยข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2566) รายงานว่าปี 2565 ประเทศไทยมีเนื้อที่เพาะปลูกข้าวนาปีและนาปรังรวมกันกว่า 72 ล้านไร่ และมีปริมาณผลผลิตรวมกันกว่า 32 ล้านตัน โดยมีอัตราส่วนการผลิตข้าวนาปรังคิดเป็นร้อยละ 23 ของปริมาณการผลิตข้าวนาปี ทำให้เกิดการพัฒนาระบบการปลูกข้าวของประเทศในทุกมิติเพื่อรองรับและตอบสนองให้ทันต่อความต้องการในทุกระดับ ทั้งในส่วนของระบบชลประทานที่สมบูรณ์ พันธุ์ข้าวที่หลากหลาย และการจัดการระบบปลูกและปัจจัยการผลิตในทุก ๆ ด้านด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัย ทำให้เกษตรกรในหลายพื้นที่สามารถปลูกข้าวต่อเนื่องได้ 2-4 ฤดูต่อปี ด้วยสภาพการปลูกที่เหลื่อมกันในแต่ละพื้นที่ทำให้มีผลผลิตข้าวออกสู่ตลาดได้ต่อเนื่องตลอดทั้งปี อย่างไรก็ตาม การปลูกข้าวในลักษณะดังกล่าวกลายเป็นปัจจัยสำคัญในส่วนของแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ ส่งเสริมต่อการคงอยู่และแพร่พันธุ์ของแมลงศัตรูชนิดต่าง ๆ จนถึงขั้นของการระบาดได้อย่างรวดเร็วเช่นกัน โดยแมลงศัตรูข้าวที่มักพบรายงานการระบาดรุนแรงในพื้นที่ปลูกข้าวต่อเนื่องและเป็นปัญหาต่อการจัดการมากที่สุด คือเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในปัจจุบันจัดเป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญที่สุดในเอเชีย สามารถทำลายข้าวได้หลายสายพันธุ์ (Yang et al., 2002) มีศักยภาพในการแพร่ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วโดยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพศเมียสามารถวางไข่ได้ครั้งละ 100-300 ฟองต่อตัว หลังจากฟักออกจากไข่เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทุกระยะจะดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณโคนต้นข้าวซึ่งมีสภาพร้อนชื้น ส่งผลให้ต้นข้าวไหม้ แห้งตายหรือได้รับเชื้อไวรัส เกิดอาการหงิกงอ ไม่สามารถออกรวงได้ สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกรอย่างมาก การควบคุมหรือป้องกันกำจัดโดยทั่วไปเกษตรกรนิยมใช้สารเคมีกำจัดแมลงเป็นหลัก โดยในปี พ.ศ. 2564 มีรายงานการนำเข้า สาร cypermethrin สูงกว่าหนึ่งล้านสองแสนกิโลกรัม รองลงมาเป็น สาร carbosulfan, abamectin และ profenofos ตามลำดับ เนื่องจากให้ผลรวดเร็ว ชัดเจน สะดวก (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2565) แต่วิธีการดังกล่าวนอกจากส่งผลให้แมลงสร้างความต้านทานแล้ว ยังส่งผลกระทบต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และระบบนิเวศต่าง ๆ ที่มีสายสัมพันธ์เชื่อมโยงต่อกันในรูปของโซ่อาหารที่เกี่ยวเนื่องกับความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ และสภาพแวดล้อมที่ซับซ้อนมาก โดยในท้ายที่สุด ผลกระทบเหล่านั้นได้กลายเป็นอันตรายที่สะท้อนกลับและมีผลต่อมนุษย์ในทุกระดับความสัมพันธ์อย่างต่อเนื่องยากต่อการหลีกเลี่ยง

ได้ และมีรายงานถึงผลกระทบและปัญหาดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดการตระหนักถึงพิษภัยต่อชีวิตและสุขภาพมากขึ้น และเป็นกลไกสำคัญที่ขับเคลื่อนระบบการผลิตพืชอาหาร และสัตว์ที่ปลอดสารพิษ หรือเกษตรอินทรีย์ ให้ขยายวงออกกว้างขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้เกษตรกรจำเป็นต้องหาวิธีการกำจัดแมลงศัตรูพืชทางเลือกที่ไม่ใช้สารเคมีรูปแบบต่าง ๆ เข้ามาทดแทน เช่น การใช้วิธีกล กับดักแมลง การใช้ ตัวห้ำ ตัวเบียน หรือการใช้เชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น

การใช้เชื้อราก่อโรคกับแมลงเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชเป็นวิธีการหนึ่งที่มีความสะดวก รวดเร็ว ปลอดภัย ให้ผลที่ชัดเจน หลายชนิดมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการใช้สารเคมี และสามารถดำรงชีวิตอยู่ในดินได้นาน และสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ง่าย โดยเชื้อราที่เป็นที่นิยมในการกำจัดแมลงศัตรูพืช คือ เชื้อรา *Metarhizium* spp. (Shi, & Feng, 2004) เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ทนทานต่อความร้อน และสภาพการเปลี่ยนแปลงที่รุนแรงของสภาพแวดล้อมได้ดี โดยในปัจจุบันมีการค้นพบเชื้อราไอโซเลตใหม่ ๆ อย่างต่อเนื่อง เพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เนื่องจากมีรายงานว่าเชื้อราในสกุลนี้สามารถลงทำลายแมลงศัตรูพืชหลากหลายชนิดในระดับที่ข้ามอันดับแมลงได้ดี (Bandara, & Ahangama, 1994; Pham et al., 1994) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาลงไปถึงความรุนแรงของเชื้อ พบว่าเชื้อราแต่ละไอโซเลต ต่างมีศักยภาพในการลงทำลายแมลงศัตรูพืชได้รุนแรงแตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลจากสภาพแวดล้อมของถิ่นที่พบเชื้อ และแมลงอาศัยส่งผลทำให้เกิดความหลากหลายภายในชนิดของเชื้อรานี้อย่างมาก (Hu, & St. Leger, 2002; Lacey et al., 2015; Roberts, & St. Leger, 2004; Zimmermann, 2007) โดยแหล่งที่มีความเหมาะสมต่อการค้นหาเชื้อมักเป็นแหล่งพื้นที่ที่มีการรบกวนโดยมนุษย์น้อย เช่น พื้นที่ป่าต่าง ๆ ที่มีกิจกรรมของโซ่อาหารซับซ้อน และมีกิจกรรมของผู้ย่อยสลายสูง เป็นต้น (Hernández-Domínguez et al., 2016)

จังหวัดเพชรบูรณ์มีภูมิประเทศที่เป็นทั้งพื้นที่ราบลุ่ม และเทือกเขาสูง มีสภาพภูมิอากาศแตกต่างกันมากในแต่ละฤดูกาล คือ อากาศร้อนมากในฤดูร้อน และหนาวจัดในฤดูหนาว มีพื้นที่ป่าอุดมสมบูรณ์ครอบคลุมพื้นที่เป็นบริเวณกว้าง หลายแห่งมีการรบกวนจากมนุษย์น้อย ส่งผลให้มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก อีกทั้งมีการสำรวจและศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ฆ่าแมลงน้อยมาก การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นทำการค้นหา คัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงในการลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ที่มีคุณสมบัติทนความร้อนและความเป็นกรด-ด่างได้ดี จากดินป่าในเขตพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ เนื่องจากสภาพแวดล้อมของนาข้าวโดยทั่วไปมีอุณหภูมิค่อนข้างสูง ในบางกรณีอาจสูงถึง 44 องศาเซลเซียส (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2550) และดินหรือน้ำมีช่วงความเป็นกรด-ด่าง ค่อนข้างสูง มีค่า pH 4.5-8.0 (กรมพัฒนาที่ดิน, 2562) เพื่อพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ทางเลือกให้เกษตรกรทดแทนสารฆ่าแมลงควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ที่ยั่งยืนต่อไปในอนาคต สามารถตอบโจทย์แนวทางการพัฒนาการเกษตรที่ต้องการลดการใช้สารเคมี และมุ่งเน้นการผลิตข้าวที่ปลอดภัยหรือข้าวอินทรีย์ ได้อย่างเหมาะสม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อค้นหาเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าในเขตจังหวัดเพชรบูรณ์

2. เพื่อคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างสูง

3. เพื่อพัฒนาสารชีวภัณฑ์ต้นแบบชนิดผงจากเชื้อรา *Metarhizium* spp. ควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ดำเนินการครอบคลุมการศึกษาตั้งแต่ การสำรวจ เก็บตัวอย่างเชื้อ *Metarhizium* spp. จากดินป่าดิบชื้นในพื้นที่อำเภอเขาค้อ อำเภอหล่มเก่า และอำเภอน้ำหนาว และคัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ทนต่อสภาพอุณหภูมิสูง และความเป็นกรด-ด่างได้ดี ในระดับห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง และพัฒนาชีวภัณฑ์ต้นแบบของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

สมมติฐานของงานวิจัย

เชื้อรา *Metarhizium* spp. สามารถแยกได้จากดินป่าดิบชื้นในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ และสามารถคัดแยกไอโซเลตที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถทนความเครียดจากอุณหภูมิสูงเกิน 40 องศาเซลเซียส และสภาพความเป็นกรด-ด่างได้ดีระหว่าง pH 4-9 เพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ต้นแบบที่ใช้ประโยชน์ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในอนาคตได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การดำเนินงานวิจัยเรื่อง การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์เพื่อพัฒนาสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล มีเอกสาร งานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper)

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* (Stål) (Hemiptera: Delphacidae) เป็นแมลงจำพวกปากดูด ตัวเต็มวัยมีลำตัวสีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลปนดำ มีรูปร่าง 2 ลักษณะ คือ ชนิดปีกยาว (macropterous form) และชนิดปีกสั้น (brachypterous form) ชนิดมีปีกยาวสามารถเคลื่อนย้ายและอพยพไปในระยะทางใกล้และไกล โดยอาศัยกระแสลมช่วย ตัวเต็มวัยเพศเมียชนิดปีกยาวมีขนาด 4-4.5 มิลลิเมตร ตัวเต็มวัยมีชีวิตประมาณ 2 สัปดาห์และยังเป็นพาหะนำเชื้อไวรัส สาเหตุของโรคใบหงิกทำให้ต้นข้าวแคระแกร็นไม่ออกรวงหรือรวงสั้น (Renganayaki et al., 2002)

วงจรชีวิตเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ ตัวเต็มวัยมีชีวิตประมาณ 2 สัปดาห์ ตัวเมียชนิดปีกยาวสามารถวางไข่ได้ 100 ฟอง และตัวเมียชนิดปีกสั้นสามารถวางไข่ได้ 300 ฟอง ในช่วงชีวิต 2 สัปดาห์ โดยตัวเมียจะวางไข่เป็นกลุ่มเรียงแถวที่เส้นกลางใบหรือกาบใบ กลุ่มละประมาณ 8-10 ฟอง ซึ่งมองเห็นเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลตรงบริเวณที่วางไข่ และไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนภายใน 7-8 วัน ตัวอ่อน ลอกคราบ 5 ครั้ง ภายในระยะเวลา 11-16 วัน เพื่อเป็นตัวเต็มวัย โดยทั่วไปแล้วเพศเมียมีอายุเฉลี่ยประมาณ 15 วัน ส่วนเพศผู้มีอายุเฉลี่ยประมาณ 13 วัน ตัวเต็มวัยชนิดปีกสั้นบินไม่ได้จะอาศัยอยู่ในแปลงนาดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวและขยายพันธุ์ ส่วนชนิดปีกยาวสามารถบินอพยพไปยังแปลงนาอื่นได้ (Hill, 1996; Matteson, 2000)

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยทำลายข้าวโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์ท่อน้ำท่ออาหาร บริเวณโคนต้นข้าวระดับเหนือผิวน้ำ ทำให้ต้นข้าวมีอาการใบเหลืองแห้งลักษณะคล้ายถูกน้ำร้อนลวก แห้งตายเป็นหย่อม ๆ เรียก“ อาการไหม้ (hopperburn)” โดยทั่วไปพบอาการไหม้ ในระยะข้าวแตกกอถึงระยะออกรวง ซึ่งตรงกับช่วงอายุขัย (generation) ที่ 2-3 ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาข้าว ในนาข้าวที่ขาดน้ำ ตัวอ่อนจะลงมาอยู่ที่บริเวณโคนกอข้าวหรือบนพื้นดินที่แฉะมีความชื้น นอกจากนี้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ยังเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสโรคใบหงิก (rice ragged

stunt) มาสู่ต้นข้าวทำให้ต้นข้าวมีอาการแคระแกร็น ต้นเตี้ยใบสีเขียวแคบ และสั้นใบแก่ช้ากว่าปกติ ปลายใบบิดเป็นเกลียว และขอบใบแหว่งวิ่น (สุวัฒน์ รวยอารีย์, 2544)

การแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และแมลงศัตรูพืชทุกชนิด เกิดจากการผลิตของเกษตรกรที่ส่งเสริมการแพร่กระจายของแมลงศัตรูพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม ไม่ว่าจะเป็นการใช้พันธุ์ข้าวอ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เช่น กข1, ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 2, ปทุมธานี 3, ขาวดอกมะลิ 105, ข้าวเจ้าหอมพิษณุโลก 1 เป็นต้น การปลูกข้าวแบบนาหว่านน้ำตม วิธีการนี้ทำให้ มีจำนวนต้นข้าวหนาแน่น เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากเกินไป ทำให้การเพิ่มจำนวนของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาข้าวมีแนวโน้มมากขึ้น เนื่องจากปุ๋ยไนโตรเจน ทำให้ใบข้าวเขียวหนาแน่น ต้นข้าวมีสภาพอวบน้ำ ดึงดูดความสนใจของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและแมลงศัตรูพืชอื่น ๆ ได้มาก นอกจากนี้การใช้สารฆ่าแมลงในช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสม ก็ทำให้เกิดความไม่สมดุลในธรรมชาติ เนื่องจากจำนวนแมลงศัตรูธรรมชาติลดลงไม่สามารถควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิต

ปกติในช่วงฤดูร้อนมักเริ่มพบการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในแถบภาคกลาง และภาคเหนือตอนล่าง สร้างความเสียหายกับผลผลิต โดยปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล คือสภาพอากาศร้อน อุณหภูมิสูง โดยเฉพาะในนาข้าวที่มีน้ำขังตลอดเวลาส่งผลทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสามารถเพิ่มจำนวนได้มาก ดังนั้นเกษตรกรจึงต้องทำการเตรียมป้องกันการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยวิธีต่าง ๆ หลากหลายวิธี ทั้งวิธีกล คือ การปลูกข้าวพันธุ์ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เช่น สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 2 สุพรรณบุรี 90 สุพรรณบุรี 60 ปทุมธานี 1 พิษณุโลก 2 ชัยนาท 1 และชัยนาท 2 เป็นต้น วิธีเขตกรรม โดยควรปลูกข้าวไม่เกิน 2 ครั้งต่อปี โดยปลูกข้าวพันธุ์เบาเก็บเกี่ยวเร็วก่อน เพื่อให้แปลงเว้นว่างจากการปลูกข้าว และการใช้สารเคมี สำรวจตรวจนับจำนวนเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตามโคนกอข้าว อย่างสม่ำเสมอ ไร่ละ 10 จุด จุดละ 10 ต้น (นาหว่าน) ถ้าเป็นนาดำไร่ละ 10 กอเมื่อพบเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 1 ตัวต่อต้น หรือ 10 ตัวต่อกอให้พิจารณาศัตรูธรรมชาติและสภาพแวดล้อมในนาก่อนตัดสินใจใช้สารเคมี เช่น ไดโนทีฟูเรน (dinotefuran) อิมิดาโคลพริด (imidacloprid) เป็นต้น ควรใช้สารเคมีให้ถูกต้องตามคำแนะนำและพ่นสารเคมีในจุดที่มีการระบาดเท่านั้นโดยพิจารณาถึงสมดุลของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

การควบคุมโดยใช้ชีววิธี (Biological control)

กองกีฏและสัตววิทยา (2544) กล่าวว่า การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี เป็นกรรมวิธีที่ใช้ประโยชน์จากศัตรูธรรมชาติ (natural enemies) ในการควบคุมศัตรูพืชโดยการนำแมลง หรือสัตว์อื่น ๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติมากำจัดศัตรูพืช ซึ่งเป็นวิธีการดั้งเดิม ใช้สิ่งที่มีอยู่ในธรรมชาติมาช่วยปราบศัตรูพืช เป็นการลดการใช้สารฆ่าแมลงที่เป็นอันตรายต่อ มนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม

(มูลนิธิโครงการหลวง, 2555) เพื่อรักษาระดับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ให้อยู่ในสภาพสมดุล โดยสิ่งมีชีวิตที่นิยมนำมากำจัดแมลงศัตรูพืช สามารถแยกตามประเภทได้ ดังนี้

1. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยการใช้แมลงศัตรูธรรมชาติ สามารถแยกประเภทได้ดังนี้

1.1 แมลงห้ำ (predatory insects) คือ แมลงชนิดที่กินแมลงต่าง ๆ ในธรรมชาติเป็นอาหารลักษณะที่เป็นความจำเพาะของตัวห้ำ มักมีขนาดใหญ่กว่า หรือมีความเร็ว ความแข็งแรงกว่าเหยื่อ ชอบกินแมลงหรือตัวอ่อนแมลงเป็นอาหาร สามารถกินเหยื่อได้หลายชนิด มักไม่ทำลายหรือกินพืชเป็นอาหาร ลักษณะการกิน และการล่าเหยื่อของแมลงตัวห้ำมีทั้งประเภทที่กิน เหยื่อทั้งตัวด้วยการแยกเหยื่อเป็นชิ้น ๆ แล้วค่อยกัดกินเหยื่อ เช่น แมลงปอ และชนิดที่ใช้ปาก แทงดูดกินของเหลวในตัวเหยื่อ เช่น มวนเพชฌฆาต บางชนิดถือเป็นแมลงตัวห้ำตั้งแต่เป็นตัวอ่อน เช่น ด้วงดิน แต่บางชนิดเป็นตัวห้ำเฉพาะในช่วงการเป็นตัวอ่อน เมื่อตัวเต็มวัยจะกินอาหารชนิดอื่น เช่น แมลงวันดอกไม้ ตัวอย่างแมลงห้ำที่เป็นศัตรูของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ได้แก่ มวนเขียวดูดไข่ *Cyrtorhinus lividipennis* (Reuter) ด้วงเต่าสีส้ม *Micraspis discolor* (Fabricius) เป็นต้น (จิรพงศ์ ใจรินทร์ และคณะ, 2544; วนิช ยาคล้าย และคณะ, 2540; สุวัฒน์ รวยอารีย์ และรจนา สุรการ, 2542; สุวัฒน์ รวยอารีย์, 2544)

1.2 แมลงเบียน (parasitic insect) คือ แมลงที่พัฒนาการเจริญเติบโตระยะไข่ ระยะตัวหนอนในแมลงอาศัย (host) 1 ตัว และอาจจะเข้าดักแด้ภายใน หรือภายนอกแมลงอาศัย ตัวเต็มวัยกินน้ำหวานจากดอกไม้เป็นอาหาร ลักษณะที่เป็นความจำเพาะของตัวเบียน คือ จะอาศัยกินอยู่ภายนอกหรือภายในตัวแมลงอาศัยตลอดวงจร ตัวเบียนจะมีขนาดเล็กกว่าแมลงอาศัยมาก ส่วนใหญ่แมลงอาศัยหนึ่งตัวจะมีตัวเบียนอาศัยอยู่มากกว่า 1 ตัว ตัวเบียนจะค่อย ๆ ดูดกินอาหารจากแมลงอาศัยอย่างช้า ๆ และทำให้แมลงอาศัยตายเมื่อตัวเบียนเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

แมลงเบียนเมื่อเบียนแมลงด้วยกันเอง จะแตกต่างจากแมลงตัวเบียน ที่เบียนสัตว์ชนิดอื่น คือทำให้แมลงที่เป็นแมลงอาศัยตายในที่สุด แต่ตัวเบียนสัตว์ชนิดอื่น เช่น หมัด หรือ เหา จะแค่ดูดเลือดและแร่ธาตุ อาหาร มีผลเสียต่อร่างกาย ก่อให้เกิดอันตรายบ้างแต่ไม่ถึงกับตาย ความสัมพันธ์ระหว่างแมลงตัวเบียน และแมลงศัตรูพืชนั้นค่อนข้างเฉพาะเจาะจง โดยบางชนิดทำลายไข่ของเหยื่อ บางชนิดทำลายตัวอ่อนหรือดักแด้ แมลงตัวเบียนเป็นตัวเบียนระยะตัวอ่อน เมื่ออยู่ในระยะตัวเต็มวัยจะหากินเป็นอิสระ ตัวเบียนบางชนิดอาศัยในตัวแมลงและเจริญเติบโตโดยใช้น้ำเลี้ยงในตัวแมลงเป็นอาหาร แต่บางชนิดก็อาศัยอยู่ภายนอกและทำลายผิวหนังของเหยื่อเพื่อดูดกินน้ำเลี้ยงจากภายใน

2. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ เชื้อโรค (pathogens) คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่และเจริญเติบโตบนสัตว์หรือแมลงอาศัย ทำให้สัตว์หรือแมลงอาศัยนั้นเป็นโรคและตายในที่สุด การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช แบ่งออกได้ ดังนี้

2.1 การใช้เชื้อไวรัสควบคุมศัตรูพืช (viral biopesticide) เชื้อไวรัสที่นำมาใช้ ควบคุมแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ เชื้อไวรัส ชนิด *Nucleopolyhedrovirus* หรือที่ เรียกย่อว่า NPV เป็นไวรัสที่มีความเฉพาะเจาะจงสูงมากทำลายเฉพาะแมลงเป้าหมาย เช่น เชื้อ ไวรัส NPV กำจัดหนอนกระทู้หอม ก็จะทำลายเฉพาะหนอนกระทู้หอม เชื้อไวรัส NPV ของหนอนเจาะสมอฝ้าย ก็จะทำลายเฉพาะหนอนเจาะสมอฝ้าย ไม่ทำลายแมลงชนิดอื่น จึงปลอดภัยต่อแมลงศัตรูธรรมชาติชนิดอื่น ๆ ข้อดีของเชื้อไวรัส NPV คือ สามารถเพิ่มจำนวนใน แมลงที่มันทำลายได้เป็นจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว และทำให้แมลงตายได้ สามารถแพร่ระบาดออกไป หรือถ่ายทอดไปกับแม่ผีเสื้อโดยติดไปกับไข่จนเกิดการระบาดในรุ่นลูกเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม และที่สำคัญคือ ไวรัส NPV สามารถสร้างผลึกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส เอาไว้ทำให้อยู่คงทนในสภาพแวดล้อมตัวแมลงได้ดี

2.2 การใช้แบคทีเรียควบคุมศัตรูพืช (bacterial biopesticide) แบคทีเรีย ที่นำมาช่วยในการควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยทำให้แมลงเป็นโรค ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด โดยชนิดที่นิยมใช้ทางการเกษตร คือ เชื้อ BT หรือ *Bacillus thuringiensis* มีหลายชนิด ใช้ป้องกันกำจัดหนอนศัตรูพืช เช่น หนอนกระทู้ต่าง ๆ หนอนใยผัก หนอนเจาะฝักและลำต้น ด้วงหมัดผัก เป็นต้น

2.3 การใช้เชื้อราควบคุมศัตรูพืช (fungal biopesticide) ในการควบคุมโรคและแมลงโดยใช้เชื้อรานั้น ในต่างประเทศมีการใช้กันอย่างมากมายหลายชนิด ซึ่งชนิดที่นิยมใช้ ได้แก่

2.3.1 การใช้เชื้อรา *Metarhizium* spp. ควบคุมด้วงหนวดยาว ด้วงแรดมะพร้าว ด้วงหมัดผัก หนอนศัตรูพืช ตั๊กแตน ปลวก หนอนทราย และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

2.3.2 การใช้เชื้อ *Paecilomyces* spp. ควบคุมเพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว และไส้เดือนฝอยรากปม

2.3.3 การใช้เชื้อ *Nomuraea* spp. ควบคุมหนอนผักกาด

เชื้อราทำลายแมลง

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถก่อโรคกับแมลงได้มีทั้งที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส ริคเคทเซีย โปรโตซัว ฯลฯ (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2535) เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดได้รับการพัฒนา คัดเลือก และนำมาใช้เป็นหนึ่งในเครื่องมือที่สำคัญสำหรับควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี (Van Driesche, & Bellow, Jr., 1996) มีทั้ง เชื้อรา เชื้อไวรัส และแบคทีเรีย ในปัจจุบันได้มีการผลิตเป็นการค้าและใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น เชื้อ *Hirsutella thompsonii* ชื่อการค้าคือ Mycar, *Verticillium lecanii* ภายใต้ชื่อการค้าว่า Vertalec, ไวรัส *Nucleopolyhedrovirus* (NPV), *Bacillus thuringiensis*, ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* และ *Heterorhabditis* sp. ดังปรากฏอยู่ในรายงานการวิจัยและบทความต่าง ๆ มากมาย อาทิ เช่น Burge (1988), Evans (1987), Kobayashi (1951) และ TeBeest, & Templeton (1985)

เชื้อราจัดเป็นเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่มีรูปร่างแตกต่างกันและมีลักษณะแตกต่างจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ คือ มีผนังเซลล์ที่ประกอบไปด้วย โพลีแซคคาไรด์และไคติน มีโครงสร้างที่เป็นเส้นใย ส่วนใหญ่ขยายพันธุ์ด้วยการสร้างสปอร์ อาศัยอยู่ในดิน ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (วินันท์ดา หิมะนาน และคณะ, 2552) เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่นิยมใช้ทางการเกษตร มีเชื้อรามากกว่า 400 ชนิด เป็นกลุ่มเชื้อราที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแมลง เช่น ตั๊กแตน เป็นต้น

กลไกการเข้าทำลายแมลงของเชื้อรา จะเข้าสู่ร่างกายของแมลงได้ทางรูเปิดต่าง ๆ เช่น ปาก ทวาร รูหายใจ โดยเชื้อราจะสร้างเอ็นไซม์ เช่น ไคติเนส โปรติเอส เป็นต้น ย่อยสลายผนังลำตัวแมลง และส่งเส้นใยแทงทะลุผนังลำตัวเข้าไป และเจริญภายในลำตัวแมลงได้โดยตรง นอกจากนี้เชื้อราหลายชนิดสามารถสร้างสารพิษ (toxin) ได้ เช่น เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* สร้างสารพิษ destruxins และ cytochalasin C เชื้อรา *Beauveria bassiana* สร้างสารพิษ bassianin, beauvericin, bassianolide, beauverolide และ tenellin เป็นต้น โดยสารพิษเหล่านี้มีฤทธิ์ทำลายเนื้อเยื่อและระบบต่าง ๆ ทำให้แมลงตายได้ เชื้อราสามารถก่อโรคกับแมลงได้ดีและรวดเร็วเมื่อแมลงอ่อนแอ และได้สัมผัสโดยตรงกับเชื้อราที่มีความรุนแรง ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิ และความชื้นที่พอเหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อรานั้น ๆ ทั้งภายในและภายนอกลำตัวแมลง

เชื้อรา *Metarhizium* spp.

เชื้อรา *Metarhizium* spp. หรือจากเดิมที่รู้จักกันในชื่อ *Entomophthora anisopliae* หรือ green muscardine เป็นเชื้อราที่มีสกุล (genus) ขนาดใหญ่ อาศัยอยู่ในดินแพร่กระจายอย่างกว้างขวางทั่วไป โดยในปี ค.ศ. 1879 ได้เริ่มมีการนำเชื้อ *Metarhizium* spp. ไปใช้เพื่อควบคุมแมลงเป็นครั้งแรก โดย Elie Metschnikoff ใช้เชื้อรานี้ในการควบคุมด้วง และได้มีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารชีวินทรีย์ฆ่าแมลงจากเชื้อราที่สามารถใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูซึ่งมีประสิทธิภาพสูง ปัจจุบันมีการค้นพบเชื้อรา *Metarhizium* spp. มากกว่า 200 ชนิด เช่น *M. anisopliae*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. flavoviride*, *M. flavoviride* var. *minus*, *M. album, M. pingshaense* และ *M. pemphigi* เป็นต้น (Driver et al., 2000; Pantou et al., 2003; Nishi, & Sato, 2017) ซึ่งค้นพบจากแมลง 17 วงศ์ และเห็บ ไร ต่าง ๆ (Roberts, & St. Leger, 2004; Zimmermann, 2007) ที่สำคัญเชื้อรา *Metarhizium* spp. มีคุณสมบัติเป็นราเอนโดไฟต์ อาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบรากพืช (rhizosphere) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยกักเก็บธาตุอาหารให้แก่พืช และสามารถช่วยกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีได้อีกด้วย (กนกกาญจน์ ตลึงผล, และนริศ ท้าวจันทร์, 2559 Bidochka et al., 2001; Hu, & St Lager, 2002; Nishi et al., 2011; Wyrebek et al., 2011; Zimmermann, 1993)

เชื้อรา *Metarhizium* spp. เป็นเชื้อราที่สร้างเส้นใยแบบที่มีผนังกั้น และมีการสืบพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศเท่านั้น คือการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งเรียกว่า โคนิเดีย แต่ยังไม่พบวงจรชีวิตของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จึงจัดเป็นกลุ่ม imperfect fungi เชื้อราสกุลนี้สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเส้นใยเจริญเติบโตเต็มที่จึงสร้างโคนิเดียจากก้านชูสปอร์ ซึ่งก้านชูสปอร์แตกเป็นแขนงอยู่กันค่อนข้างแน่นคล้ายกับ synnema (เส้นในที่รวมตัวกันแน่นและตั้งตรง) มีโครงสร้างที่ใช้ในการสร้างสปอร์ (phialida) อยู่เป็นกลุ่มเรียงตัวคล้ายกับเชิงเทียน มีความยาว 6 ถึง 15 ไมโครเมตร ส่วนของโคนิเดียมีการเรียงตัวต่อกันเป็นสาย โดยโคนิเดียที่อายุน้อยจะติดอยู่กับก้านชูสปอร์ และโคนิเดียที่สร้างขึ้นจะอัดแน่นอยู่ ซึ่งโคนิเดียมีรูปร่างทรงกระบอก (cylindrical shape) มีเซลล์เดียว ผิวเรียบ เรียงกันเป็นลูกโซ่ เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่สปอร์จะมีความยาว 4-10 ไมโครเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-4 ไมโครเมตร บางไอโซเลตอาจมีลักษณะสปอร์คอดตรงกลางเล็กน้อย โดยในระยะแรกเชื้อเริ่มสร้างเส้นใยสีขาวปนเหลืองและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง สีเหลืองปนน้ำตาล สีเหลืองปนเขียว สีเขียวปนน้ำตาล หรือสีเขียวปนเหลือง ตามลำดับ (Humber, 1998; Rombach et al., 1994; Samson, 1981; Tulloch, 1976)

กลไกการเข้าทำลายแมลงของเชื้อรา *Metarhizium* spp. เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม (อุณหภูมิระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 96) เชื้อราจะเข้าทำลายแมลงโดยสปอร์จะงอกเป็นเส้นใย (germ tube) บริเวณผนังลำตัวแมลง ซึ่งสปอร์จะพัฒนาเป็นโครงสร้างยึดเกาะ (appressorium) ที่มีสารเมือกปกคลุมทำให้ยึดเกาะแมลงได้ดี และต่อมา germ tube จะแทงทะลุผนังของลำตัวแมลง โดยอาศัยแรงทางกายภาพ (physical force) และกระบวนการทางชีวเคมี (เอนไซม์ย่อยผนังลำตัว) แรงที่ส่งให้เส้นใยแทงเข้าผนังลำตัวของแมลงอยู่ที่ส่วนปลายนี้ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด เช่น protease, metalloprotease, dipeptidylpeptidase, carboxypeptidase, chitinase, lipase, esterase และ aminopeptidase มาเกี่ยวข้อง เพื่อช่วยในการย่อยผนังลำตัวของแมลง ทำให้ง่ายต่อการที่เชื้อราจะแทงผ่านผนังลำตัวเข้าไป โดยแบ่งระยะการเข้าทำลายแมลงเป็น 9 ระยะ ดังนี้

1. ระยะประชิดกับผิวลำตัวแมลง (cuticle) ระยะนี้เชื้อราจะใช้แรงทางเคมี และแรงทางไฟฟ้าสถิตทำปฏิกิริยาร่วม (interaction) ระหว่าง lipophilic compounds บนผิวของ spore และ lipids บนผิวลำตัวแมลงอาศัย

2. ระยะการงอก spore โดย spore จะงอก หลังจากที่ได้ประชิดติดลำตัวแมลงเนื่องจากเกิดการกระตุ้นทางเคมี โดยสารบนผิวลำตัวแมลง และการกระตุ้นทางสรีระ ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการประชิดตัว เพราะการประชิดผิวแมลงทำให้เชื้อราสร้างสารที่ทำให้การงอกดีขึ้น และกระตุ้นทำให้เกิดการงอกของ spore

3. ระยะแทงทะลุผิว โดยเชื้อราจะงอก germ tube สั้น ๆ และใช้ germ tube หรือ infection pegs ที่เชื้อราสร้างขึ้นจาก spore แทงทะลุผิวหนังแมลงเข้าไปภายใน โดยมี appressoria (Madelin et al., 1967) เป็นส่วนที่ช่วยยึดผิวลำตัวแมลงไว้ เข้าใจว่ามีแรงทางเคมีและฟิสิกส์เข้าเกี่ยวข้องในกระบวนการนี้ โดยทางเคมี เป็น เอนไซม์ ซึ่งมีส่วนสำคัญ ช่วยในการแทงทะลุผ่านผิวลำตัวแมลงที่ประกอบด้วยไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน โดยเฉพาะ chitin คาดว่ามีเอนไซม์หลายชนิดที่จำเป็นในการแทงผิวลำตัวแมลงของ germ tube เช่น เอนไซม์ย่อยผนังลำตัวแมลง (cuticle-degrading enzyme) ที่เชื้อ *Metarhizium* spp. สร้างขึ้น ทั้งจากการเพาะเลี้ยงและระหว่างกระบวนการเข้าทำลายแมลง โดยเอนไซม์ย่อยสลายเหล่านี้มีทั้งการทำงานร่วมกัน และบางเอนไซม์ทำงานคล้ายกัน แต่ละเอนไซม์ดังกล่าวถูกควบคุมการผลิตโดยยีน (gene) ต่างชนิดกัน ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น subtilisin-like proteinase, Pr1 metalloprotease, trysin, aminopeptidase, dipeptidylpeptidase และ chitinase นอกจากนี้ยังพบว่า pH มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ย่อยผนังลำตัวของเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยค่าที่เหมาะสม คือ pH เท่ากับ 3 เหมาะสมต่อเอนไซม์ aspartylprotease เอนไซม์ chitinase มีค่า pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5 ในขณะที่ aminopeptidase มีค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 7 และ metalloprotease มีค่า pH ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 6-8 เมื่อเชื้อราทำลายแมลง เช่น *M. anisopliae* เข้าทำลายแมลง จะมีการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายผนังลำตัวอย่างรวดเร็วและอย่างต่อเนื่อง โดยมีกิจกรรมแรกของเอนไซม์ปรากฏขึ้นภายในเวลาน้อยกว่า 24 ชั่วโมง คือ เอนไซม์ protease จากนั้นเอนไซม์ chitinase จึงจะมีการผลิตตามมา

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 ในช่วงระยะนี้แมลงที่ได้รับเชื้อราจะเริ่มเบื่ออาหาร อัตราการกินลดลง เคลื่อนไหวช้า เป็นอัมพาต และตายในที่สุด

7. ระยะการเจริญของ mycelium เชื้อราจะสร้าง mycelium เจริญไปบนช่องว่างในลำตัวแมลงจนแน่นเต็มลำตัวแมลง

8. ระยะเส้นใยแทงออกนอกตัวแมลง เมื่อเส้นใยเจริญในช่องว่างลำตัวแมลงจนเต็มแล้วจะพัฒนาเส้นใยแทงทะลุผ่านผนังลำตัวแมลงออกมาปกคลุมลำตัวแมลง โดยเส้นใยช่วงแรกจะมีสีขาว แมลงที่ตายจะมีลักษณะคล้ายมัมมี่

9. ระยะสร้างสปอร์ เมื่อเส้นใยเจริญเต็มที่จะทำการสร้างสปอร์ที่มีสีเขียวลักษณะต่าง ๆ ตามชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. สปอร์อาจจะมีสีเหลืองปนเทา สีเขียว สีเขียวมะกอก สีเขียว

ปนน้ำตาลแดง หรือเขียวปนเหลือง ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรานั้น ๆ และแพร่กระจายเชื้อราสู่แมลงตัวอื่น ๆ ต่อไป โดยทางลม ฝน และอื่น ๆ โดยทั่วไปจะผ่านเข้าที่ลำตัวแมลงทางรูหายใจและรูที่เป็นอวัยวะรับความรู้สึก

เชื้อรา *Metarhizium* spp. สามารถอยู่ได้ในที่แห้ง อุณหภูมิไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส (Ignoffo et al., 1992) แต่ระยะเวลาในการทำลายจะเร็วหรือช้า ขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม โดยขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา ความแข็งแรง หรือภูมิต้านทานของแมลง โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา มีดังนี้

1. ปริมาณน้ำฝน ปริมาณน้ำฝนส่งผลกระทบต่อการกระจายตัวของเชื้อรา แต่แทบจะไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพเชื้อราเลย (Milner, 2000)

2. Water activity ที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อราอยู่ระหว่าง 0.98-0.99 โดยค่า water activity ต่ำสุด (minimum aw) ที่เชื้อราเจริญได้ คือ 0.62

3. อุณหภูมิ ที่เชื้อราสามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 10-30°C หากอุณหภูมิสูงกว่า 30°C จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการพัฒนาของเชื้อราได้ (Ignoffo et al., 1992)

4. ค่า pH เชื้อรา *M. anisopliae* สามารถเจริญเติบโตได้ดี และสร้างโคนิเดียได้สูง ที่ pH ระหว่าง 4-5 (Chandra Teja, & Rahman, 2017)

5. ความต้องการออกซิเจน เชื้อราทำลายแมลงมีความต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญจึงพบราที่บริเวณผิวหน้าของอาหาร

6. สารอาหาร เชื้อราใช้อาหารได้หลายชนิด ทั้งโปรตีน (protein) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ไขมัน (lipid) ทั้งที่มีโครงสร้างอย่างง่าย และที่มีโครงสร้างซับซ้อน เพราะเชื้อราสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ (enzyme) ได้หลายชนิด เช่น อะไมเลส (amylase) โปรตีเอส (protease) ลิเพส (lipase) โดยเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถเจริญเติบโต และสร้างโคนิเดียได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud's dextrose agar (SDA) โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA มีส่วนประกอบของ dextrose, peptone และ agar (Lal et al., 2010)

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการเชื้อรา *Metarhizium* spp. มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช กันอย่างแพร่หลายไม่ว่าจะเป็น การศึกษาศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยพบว่าเชื้อรา *Metarhizium* spp. สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ ตั้งแต่ ร้อยละ 79.00-100 (สุดาภรณ์ ใจชื่น, 2544; อารยา บุญศักดิ์ และคณะ, 2558) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ในการควบคุมหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย ยุงรำคาญ หนอนกระทู้หอม เพลี้ยอ่อนผัก หนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง (*Galleria mellonella*) หนอนกระทู้ผัก มอด *Curculio elephas* หนอนห่อใบข้าว (*Cnaphalocrocis medinalis* Guenee) โดยเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่ค้นพบจากแหล่งต่าง ๆ มีความสมารถใน

การลงทำลายแมลงแตกต่างกันตั้งแต่ ร้อยละ 33.33-100 ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมที่ส่งผลต่อการผลิตสาร destruxin และความอ่อนแอของแมลงศัตรูพืชที่ทำการศึกษานั้น ๆ (กนกกาญจน์ ตลึงผล, และนริศ ท้าวจันทร์, 2557; วิวัฒน์ เสือสะอาด และคณะ, 2551; อัญชลี นาทอง และคณะ, 2553; Amiri-Besheli et al., 2000; Asan et al., 2017; Han et al., 2014; Kirubakaran *et al*., 2018; Roberts, & St. Leger, 2004)

สารพารูปแบบผงในการเก็บรักษาเชื้อรา *Metarhizium* spp.

สารพา หมายถึง สารที่ใช้เป็นตัวนำ ไม่ว่าจะเป็นของเหลวหรือของแข็ง ไม่มีรสชาติ ใช้เป็นวัตถุเจือปนสำหรับผสมให้เจือจาง หรือ ห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ (active ingredient) ต่าง ๆ ในการเก็บรักษาเชื้อรานั้น นิยมเก็บรักษาในรูปแบบแห้ง เนื่องจากสะดวกต่อการใช้งาน โดยสารพาที่พบนำมาใช้ในการเก็บรักษาเชื้อรา *Metarhizium* spp. ได้แก่ ดินอินทรียวัตถุ ทราย ดินสอพอง ดินขาว ซังข้าวโพด แป้งสาลี ดินเบา ภูไมท์ เป็นต้น โดยสารพาบางชนิดสามารถเก็บรักษาเชื้อรา *Metarhizium* spp. ได้ยาวนานถึง 3-6 เดือน และเชื้อยังคงประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ถึง 80-100% หลังการเก็บรักษา (นวลศิริ สีบุญมี และคณะ, 2560; Daoust et al., 1982; Sharififard et al., 2014) ในงานวิจัยครั้งนี้มีความสนใจที่จะศึกษาการใช้ ภูไมท์ ดินขาว (kaolin) และดินเบา (diatomaceous earth) ในการเก็บรักษาเชื้อรา เนื่องจากสารพาทั้ง 3 ชนิดนี้มีลักษณะเป็นรูพรุน สามารถดูดซับความชื้นได้สูงถึง 70-80% และมีองค์ประกอบหลักที่สำคัญ คือ ซิลิกา จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาศึกษาเพื่อใช้ในการเก็บรักษาเชื้อราต่อไป (นพวรรณ นิลสุวรรณ, และนริสา จันทร์เรือง, 2558; Subramanyam, & Roesli, 2000)

จังหวัดเพชรบูรณ์

จังหวัดเพชรบูรณ์มีตำแหน่งทางอุตุนิยมวิทยาในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย มีแนวเขตติดต่อระหว่างภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ประมาณเส้นรุ้งที่ 16 องศาเหนือ กับเส้นแวง 101 องศาตะวันออก ส่วนที่กว้างที่สุดวัดจากทิศตะวันออกถึงทิศตะวันตกยาว 55 กิโลเมตร ส่วนที่ยาวที่สุดวัดจากทิศเหนือถึงทิศใต้ยาว 296 กิโลเมตร อยู่ห่างจากกรุงเทพมหานคร 346 กิโลเมตร (ภาพ 1)

ภาพ 1 แผนที่จังหวัดเพชรบูรณ์

ภูมิประเทศจังหวัดเพชรบูรณ์มีพื้นที่ประมาณ 12,668.416 ตารางกิโลเมตร หรือประมาณ 7,917,760 ไร่ สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 114 เมตร มีพื้นที่ใหญ่เป็นอันดับที่ 9 ของประเทศ ลักษณะทางกายภาพของจังหวัดเพชรบูรณ์นั้นเป็นพื้นที่ราบลุ่มแบบท้องกระทะ ประกอบด้วยเนินเขา ป่า และที่ราบเป็นตอน ๆ สลับกันไป พื้นที่มีลักษณะลาดชันจากเหนือลงไปใต้ ตอนเหนือมีทิวเขาสูง ตอนกลางเป็นพื้นที่ราบและมีเทือกเขาขนาบกันไปทั้งสองข้างมีลักษณะเป็นรูปเกือกม้า มีแม่น้ำป่าสักเป็นแม่น้ำสายสำคัญโดยไหลจากจังหวัดเลย เพชรบูรณ์ ผ่านไปสู่แม่น้ำเจ้าพระยา ที่ไหลผ่านจังหวัดต่าง ๆ หลายจังหวัดในภาคกลาง จึงส่งผลพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ มีความอุดมสมบูรณ์ เป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติ มากมาย ทั้งป่าไม่ชนิดต่าง ๆ และพื้นที่การเกษตร มีสภาพดินอุดมสมบูรณ์ที่เหมาะแก่การเพาะปลูกพืชทำการเกษตรต่าง ๆ ได้หลากหลายมาก

ปัจจุบันความกังวลใจในเรื่องสารพิษตกค้างในผลผลิต และสิ่งแวดล้อม เนื่องจากประเทศไทยมีปริมาณการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชอยู่อันดับที่ 6 ของโลกในปี 2564 เมื่อวัดจากการใช้สารเคมีต่อพื้นที่เกษตรกรรม (ไทยแพน, 2564) โดยมีปริมาณการนำเข้าสารกำจัดแมลงกว่า 29 ล้านกิโลกรัม (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2565) รวมทั้งโครงการอาหารปลอดภัย และเกษตรอินทรีย์ ก่อให้เกิดแรงผลักดันให้มีการตระหนักถึงความปลอดภัยในผลผลิตทางการเกษตรต่าง ๆ รวมถึงข้าวด้วย และได้มีมาตรการต่าง ๆ เกิดขึ้นมากมาย เช่น การตรวจสอบสารพิษตกค้างในพืชเพื่อการส่งออก และเพื่อการบริโภค การยกเลิกและบังคับไม่ให้นำสารฆ่าแมลงบางชนิดมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ส่งผลให้มีการเสาะแสวงหาวิธีการทดแทนอื่น ๆ ให้เข้ามามีบทบาท และเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นหนึ่งในการค้นหา ค้นคว้า วิจัยและพัฒนา คือเชื้อรา *Metarhizium* spp. สำหรับในประเทศไทยนั้นมีศักยภาพสูงมากในการค้นหาเชื้อชนิดใหม่ ๆ ที่มีความทนต่อสภาวะที่กดดันตั้งแต่สภาพอุณหภูมิสูง ตลอดจนสามารถเจริญได้ดีในช่วง pH ที่มีความเป็นกรด และด่าง เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในอนาคต ทั้งนี้เพราะประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อนชื้น มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก มีป่าอุดมสมบูรณ์ที่มีการรบกวนน้อย อีกทั้งมีการสำรวจและศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ฆ่าแมลงน้อยมากโดยเฉพาะพื้นที่ป่า อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ซึ่งเป็นพื้นที่เขตสู้รบมานาน และหลายพื้นที่ยังมีความอุดมสมบูรณ์ทางทรัพยากรธรรมชาติมาก

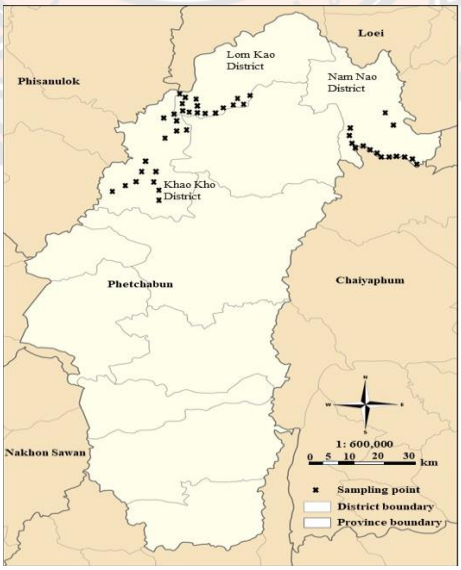
ดังนั้นแนวคิดและกรอบของการดำเนินการวิจัยนี้เป็นการดำเนินการที่มุ่งเน้นในการค้นหา คัดเลือก คัดสรรเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่า และทดสอบศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และรองรับการพัฒนาสู่การใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลศัตรูข้าวชนิดต่าง ๆ ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การค้นหาเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากตัวอย่างดินป่า ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์

1. ทำการเก็บตัวอย่างดิน 15 จุด จากพื้นที่ป่าดิบชื้นในจังหวัดเพชรบูรณ์ ประเทศไทย ครอบคลุม: 1) อำเภอเขาค้อ (16°35'42"N 100°56'04"E) 2) อำเภอหล่มเก่า (16°54'20"N 101°05'19"E) และ 3) อำเภอน้ำหนาว (16°43'48"N 101°33'39"E) (ภาพ 2) มีอุณหภูมิเฉลี่ยที่ 22องศาเซลเซียส ตลอดปี และมีปริมาณน้ำฝนที่ 1.425 มิลลิเมตร/ปี ในแต่ละจุดทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจำนวน 5 จุดย่อย ๆ ละ 1 ตัวอย่าง โดยมีระยะห่างระหว่างจุดย่อย 2 เมตร ทำการเก็บตัวอย่างจากดินลึก 5 เซนติเมตร จุดละ 100 กรัม นำตัวอย่างดินทั้ง 5 จุดมาผสมให้เข้ากันในถุงพลาสติกที่บรรจุดินตัวอย่างจำนวน 500 กรัม นับเป็นตัวแทนของพื้นที่สุ่มตัวอย่าง 1 ตัวอย่างเก็บตัวอย่างดินอำเภอละ 15 ตัวอย่าง บันทึกวันที่ และตำแหน่งพิกัดในการสุ่มเก็บตัวอย่าง และนำถุงตัวอย่างดินเก็บใส่ในกล่องโฟมที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสขนส่งกลับไปยังห้องปฏิบัติการ (Inglis et al., 2012) จากนั้นทำการบด และร่อนตัวอย่างดินผ่านตะแกรงขนาด 149 µm และเก็บตัวอย่างดินที่ร่อนได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อดำเนินการต่อไป



ภาพ 2 จุดเก็บตัวอย่างดินจังหวัดเพชรบูรณ์

2. แยกเชื้อจากดิน โดยวิธีการ soil dilution plate technique

2.1 เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)

2.2 ชั่งอย่างตัวอย่างดินปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในขวด schott (250 มิลลิลิตร) ที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าผสมกันเป็นเวลา 30 นาที โดยใช้เครื่องปั่นเขย่า (vortex) เพื่อให้ได้สารแขวนลอยที่เป็นเนื้อเดียวกัน และทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เพื่อให้ดินตกตะกอน

2.3 ทำการเจือจางสารสะลายดินครั้งละ 10 เท่า โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายดินปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ 1 ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาณ 9 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจาง 10^{-1}–10^{-5} เท่า

2.4 ทำการปิเปตสารละลายตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่มี CTC ที่มี chloramphenicol 0.5 กรัม/ลิตร (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), thiabendazole 0.001 กรัม/ลิตร (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), cycloheximide 0.25 g/L (Sigma Aldrich,
St. Louis, MO, USA) streak สารแขวนลอยให้ทั่วหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ (Goette, & Inglis, 1997)

2.5 ตรวจสอบและคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ในเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สี และลักษณะรูปร่างของโคโลนีตามข้อมูลจาก Humber (2005) และ Tulloch (1976) จากนั้นทำการตรวจสอบยืนยันภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (40X) จากรูปร่างและโครงสร้างของสายโคนิเดีย, เส้นใย และ โคนิเดีย (Gilman, 1957; Humber, 2005; Rombach et al., 1987; Tulloch, 1976)

2.6 ทำการเก็บโคนิเดียจากไอโซเลตที่ผ่านการคัดแยกและมีแนวโน้มเป็นเชื้อรา *Metarhizium* spp. และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ด้วยการใช้วิธี streak โคนิเดียที่เก็บจากแต่ละไอโซเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ใส่รหัสโคโลนี และเก็บ stock เชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองต่อไป

การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

1. เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

1.1 เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้รับจาก 2 แหล่ง คือจากความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก และจากการเก็บรวบรวมจากแปลงนาข้าวจังหวัดพิษณุโลกและผ่านการคัดเลือกให้ปราศจากโรค และแมลงปนเปื้อน

1.2 นำมาเลี้ยงบนต้นข้าวพันธุ์ไทชุงเนทีฟ 1 (TN1) อายุ 60 วัน จำนวน 5 กระถาง วางในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 0.6 x 0.6 x 1.0 เมตร (กว้าง x ยาว x สูง) ในโรงเรือน ณ ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 70 และช่วงแสง 12 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลอย่างต่อเนื่องในระบบการเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนต้นข้าวซึ่งเป็นแหล่งอาหารเป็นระยะ เพื่อรักษาจำนวนเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลให้คงอยู่ในระดับที่เพียงพอต่อการทดสอบ

2. ทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

2.1 เตรียมโคนิเดียแขวนลอยเชื้อราที่คัดแยกได้ โดยเทสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ฆ่าเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อราเจริญเต็มจานเพาะเชื้อ และคนโคนิเดียให้หลุดออกจากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจวัดความเข้มข้นของโคนิเดีย โดย haemacytometer และนำมาปรับความเข้มข้น โดยการละลายในสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จนมีความเข้มข้นที่ $1x10^8$ โคนิเดีย/มิลลิลิตร (Sevim et al., 2010)

2.2 ทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยใช้ต้นข้าวพันธุ์ TN1 และใส่ในกรงเลี้ยงแมลง (ขนาด 0.3 x 0.3 x 1.0 เมตร) จำนวน 1 กรง/ต่อหน่วยทดลอง

2.3 ทำการพ่นโคนิเดียแขวนลอยของเชื้อราความเข้มข้นที่ 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ลงบนต้นข้าวปริมาณ 3 มิลลิลิตรต่อหน่วยทดลอง ปล่อยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 จำนวน 20 ตัวต่อหน่วนทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely Randomized Design: CRD) ประกอบไปด้วย เชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่แยกได้ตามข้อ 1 โดยมีมาตรฐานเปรียบเทียบ คือ น้ำกลั่น บันทึกข้อมูลอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยใช้วิธีการนับจำนวนตัวที่ไม่ขยับเมื่อแมลงสัมผัสการเคลื่อนไหวของผู้ทดสอบได้ในทุกวัน จนครบ 7 วัน

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ คำนวณหาอัตราการตายที่แท้จริงของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริง} = \frac{(\%\text{การตายชุดทดลอง} - \%\text{การตายชุดควบคุม})}{\%\text{การตายชุดควบคุม}} \times 100$$

2.5 วิเคราะห์อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อราเมตาไรเซียมลงทำลายในแต่ละวันด้วย analysis of variance เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมโดยใช้ Duncan's new multiple range test และประเมินประสิทธิภาพของเชื้อแต่ละโคโลนี โดยใช้การ

คำนวณระยะเวลาที่สั้นที่สุดที่เชื้อราทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (LT_{50}) ด้วย probit analysis โดยใช้ SPSS 26 for Windows

2.6 คัดเลือกเชื้อราที่แยกได้ที่มีประสิทธิภาพในการลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสูงสุดร้อยละ 100 และค่า LT_{50} ที่สั้นที่สุด นำไปจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคนิเดียและการลำดับการเรียงตัวของนิวคลิโอไทด์เบสของ ITS ของ 18S rDNA โดยวิธีทางชีวโมเลกุลผ่านปฏิกิริยาลูกโซ่เพิ่มชิ้นส่วนสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction (PCR)) และปฏิกิริยา sequencing เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อราไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือก

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคนิเดีย

1. เพาะเลี้ยงเชื้อราเมตาไรเซียมไอโซเลตคัดแยกได้จากตัวอย่างดินป่า จังหวัดเพชรบูรณ์ และผ่านการคัดเลือกด้วยคุณสมบัติข้างต้นในข้อ 2.2.6 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มที่ระดับอุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน

2. ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี (รูปร่างและสีของโคโลนี) และโคนิเดีย (ขนาดและรูปร่าง) บันทึกผล เปรียบเทียบข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยากับคู่มือและข้อมูลการจัดจำแนกของ Humber (2005), Rombach et al. (1987) และ Tulloch (1976) เป็นต้น

3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสถิติด้วย cluster analysis และสร้างรูปแบบความสัมพันธ์ด้วย dendrogram โดยมีข้อมูลสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Bridge et al., 1993), *Metarhizium album* (Anderson, & Trueman, 2000; Driver et. al., 2000), *Metarhizium majus* (Anderson, & Trueman, 2000; Bischoff et al., 2009; Nishi et al., 2011) และ *Metarhizium granulomatis* (Schmidt et al., 2017) สำหรับอ้างอิงเปรียบเทียบ

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ด้วยลักษณะทางชีวโมเลกุล จากสายพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA

1. ทำการส่งเชื้อราจากข้อ 3 ไปยังบริษัท Microgen Asia (อินชอน ประเทศเกาหลี) เพื่อวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของนิวคลิโอไทด์ของสารพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (forward: TCCGTAGGTGAACCTTGCGG) and ITS4 (reverse: TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990)

2. ตรวจสอบความถูกต้องและคุณภาพของลำดับนิวคลิโอไทด์เบสกับสัญญานของรหัสพันธุกรรมที่อ่านด้วยเครื่อง ABI ทั้งสองเส้น forward strain และ reverse strain โดยใช้โปรแกรม BIOEDIT v. 7.2.5 (http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html) (Hall, 1999)

3. วิเคราะห์จำแนกสายพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA เปรียบเทียบกับสายพันธุกรรมของเชื้อราเมตาไรเซียม ใน Genbank จาก the National Center for Biotechnology Information, NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) ด้วย BLAST (basic local alignment search tool, NCBI), (Altschul et al., 1990) คัดเลือกสายพันธุกรรมของเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีความใกล้เคียงจากฐานข้อมูลของ Genbank ทำการ alignment รหัสพันธุกรรมที่ได้กับสายพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA ของเชื้อราเมตาไรเซียมที่ผ่านการคัดเลือก ด้วยโปรแกรม CLASTALX (Thompson et al., 1997)

4. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ phylogenetic analysis ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ neighbor-joining โดยยืนยันระดับความสัมพันธ์ของแต่ละชนิด ด้วยวิธีการ Bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA 11 software (http://www.megasoftware.net/)

5. เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และค้นหาเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีความใกล้เคียง และวิเคราะห์เทียบเคียงข้อมูลคุณลักษณะของเชื้อที่มีแนวโน้มต่อการตายของแมลง

6. ทำการเก็บรักษาโคโลนีของเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกที่ระดับอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดลองต่อไป

ทดสอบความคงทนของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ในดินที่อุณหภูมิสูง

1. เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่ผ่านการคัดเลือกและจัดจำแนกแล้วข้างต้นบนอาหาร potato dextrose agar; (PDA) ภายในอุณหภูมิห้อง 28±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 7-14 วัน

2. นำดินบรรจุถุงกระดาษ ปริมาณถุงละ 100 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที (Bugeme et al., 2008; Sun et al., 2003)

3. เตรียมโคนิเดียแขวนลอยของเชื้อราในสารละลายน้ำของ Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตรวจวัดความเข้มข้นของโคนิเดียด้วย haemacytometer และปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร

4. นำโคนิเดียแขวนลอยที่ได้มาผสมดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในถุงกระดาษสีน้ำตาล ขนาด 12 x 19 x 4 เซนติเมตร ในอัตราส่วน 2 มิลลิลิตร/ดิน 100 กรัม นำดินไปบ่มที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส (มนัสนิตย์, 2562) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

5. บันทึกผลการทดลองที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดิน 1 กรัม จากหน่วยทดลอง ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางถึง 10^{-3} เท่า

6. ในการตรวจสอบและบันทึกผลความคงทนของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่เก็บรักษาไว้ในดินที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 7 วัน ประเมินจากจำนวนโคโลนีที่เจริญจานเพาะเชื้อเป็นเกณฑ์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดิน 1 กรัมจากหน่วยทดลอง ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางถึง 10^{-3} เท่า ผสมสารแขวนลอยดินด้วยเครื่องปั่น (vortex) นาน 1 นาที ดูดสารแขวนลอยดินที่ระดับ 10^{-3} ของแต่ละตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำการ spread plate และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2-3 วัน

7. นับจำนวนโคโลนีของเชื้อในแต่ละช่วงอุณหภูมิที่ และคำนวณปริมาณเชื้อราจากดินเป็นหน่วย CFU/ml

8. ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 5.6-5.7 แต่ที่ระยะเวลา 14 และ 21 วันตามลำดับ

9. วิเคราะห์ผลความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย วิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ระดับความเชื่อมั่น 95% คัดเลือกไอโซเลตเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่ทนทานต่อสภาพอุณภูมิสูงได้ดีที่สุดเพื่อศึกษาคุณสมบัติในการทนทานต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างต่อไป

ทดสอบการเจริญของเชื้อราต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างในห้องปฏิบัติการ

ในการศึกษาส่วนนี้ประกอบด้วย 2 ส่วนคือศึกษาอัตราการงอกของโคนิเดีย ที่ 16 ชั่วโมง และศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อที่ 12 วันภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อราที่มีสภาพความเป็นกรด-ด่างในระดับต่าง ๆ 6 ระดับคือ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

โดยก่อนการทดสอบ ทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลตเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกข้างต้น ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน เก็บโคนิเดียไอโซเลตเชื้อราใส่ในสารละลาย สารละลาย Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในขวดขนาด 30 มิลลิลิตร ปั่น (vortex) สารแขวนลอยที่ 700 rpm นาน 3 นาที (Tumuhaise et al., 2018) ตรวจนับจำนวนโคนิเดียด้วย haemacytometer และปรับความเข้มข้นสารแขวนลอยที่ 10^{8} โคนิเดีย/มิลลิลิตร

1. ส่วนที่ 1 ศึกษาอัตราการงอกของโคนิเดีย ที่ 16 ชั่วโมง

1.1 นำสารแขวนลอยไอโซเลตเชื้อราที่เตรียมไว้ข้างต้นจำนวน 0.1 มิลลิลิตร spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่ปรับระดับความเป็นกรด-ด่าง ในระดับต่าง ๆ ทั้ง 6 ระดับ ด้วย hydrochloric acid (HCL) 0.1 N และ sodium hydroxide (NaOH) 0.1 N จำนวน 6 ระดับ คือ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 (มนัสนิตย์, 2562) ทำ 4 ซ้ำ เพาะเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

1.2 บันทึกผลอัตราการงอกของเชื้อราเมื่อบ่มได้ครบระยะเวลา 16 ชั่วโมง โดย spread บนผิวอาหารด้วยสาร formaldehyde (0.5%) ปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเชื้อ เพื่อยับยั้งการงอกของโคนิเดีย นำกระจกปิดสไลด์ปลอดเชื้อสุ่มวางลงบนจานเพาะเชื้อ สุ่มนับจำนวนโคนิเดียทั้งที่มีการงอก และไม่งอก จำนวน 100 โคนิเดีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า (Onsongo et al., 2019)

1.3 วิเคราะห์ผลความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance, ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย วิธี Duncan's new multiple range test. (DMRT) ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. ส่วนที่ 2 ศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อที่ 12 วันภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อราที่มีสภาพความเป็นกรด-ด่างในระดับต่าง ๆ 6 ระดับ คือ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

2.1 นำสารแขวนลอยไอโซเลตเชื้อราที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร spread บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน หรือจนเชื้อราเจริญฟูเต็มจานเพาะเชื้อ

2.2 ตัดชิ้นส่วนของโคนิเดียของเชื้อราที่เจริญบนจานเพาะเชื้อด้วย อุปกรณ์เจาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางทาบลงบนบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ปรับระดับความเป็นกรด-ด่าง ในระดับต่าง ๆ ทั้ง 6 ระดับ ด้วย hydrochloric acid (HCL) 0.1 N และ Sodium hydroxide (NaOH) 0.1 N จำนวน 6 ระดับ คือ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 (มนัสนิตย์ บุญตัด, 2562) ทำ 4 ซ้ำ เพาะเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน

2.3 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราที่มีเส้นใยเจริญขยายออกทุกวันจนครบ 12 วัน บันทึกผล (Onsongo et al., 2019)

2.4 วิเคราะห์ผลความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธี analysis of variance, ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย วิธี Duncan's new multiple range test. (DMRT) ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.5 คัดเลือกไอโซเลตเชื้อราที่มีความทนทานต่อกรด-ด่างได้ดีเพื่อพัฒนาเป็นสูตรผสมต่อไป

พัฒนาสารชีวภัณฑ์ชนิดผงจากเชื้อรา *Metarhizium* spp.

1. เตรียมเชื้อรา *Metarhizium* spp.

1.1 เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่ผ่านการคัดเลือก จาก ข้อ 6 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ระดับอุณหภูมิห้อง จนเชื้อเจริญสร้างโคนิเดียเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

1.2 เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร

2. เตรียมสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้นด้วยการผสมสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อรา *Metarhizium* spp. กับสารพาชนิดต่าง ๆ คือ ผง pumice, ผง kaolin, ผง diatomaceous earth, ผงผสมของ pumice: potassium humate สัดส่วนร้อยละ 90:10 โดยน้ำหนัก และ ผงผสมของ kaolin: potassium humate สัดส่วนร้อยละ 90:10 โดยน้ำหนัก (นพวรรณ นิลสุวรรณ, และนริสา จันทร์เรือง, 2558; เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และคณะ, 2551; Daoust et al., 1982)

สารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับ ได้แก่

ตำรับที่ 1 สารผสมโคนิเดียแขวนลอยของเชื้อรา *Metarhizium* spp. กับ pumice

ตำรับที่ 2 สารผสมโคนิเดียแขวนลอยของเชื้อรา *Metarhizium* spp. กับ kaolin

ตำรับที่ 3 สารผสมโคนิเดียแขวนลอยของเชื้อรา *Metarhizium* spp. กับ diatomaceous earth

ตำรับที่ 4 สารผสมโคนิเดียแขวนลอยของเชื้อรา *Metarhizium* spp. กับ pumice+potassium humate

ตำรับที่ 5 สารผสมโคนิเดียแขวนลอยของเชื้อรา *Metarhizium* spp. กับ kaolin+potassium humate

โดยส่วนผสมประกอบด้วยสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมกับสารพาที่เตรียมไว้ ปริมาณ 500 กรัม ปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมบรรจุในถุงกระดาษ ขนาด 13 x 8 x 18 เซนติเมตร ทำ 5 ชุด (Baek, & Kenerley, 1998)

3. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ทำ 5 ซ้ำ สิ่งทดลองคือ สารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับ

4. ทำการบ่มสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น ภายใต้แสงไฟหลอดฟลูออเรสเซนต์ ตลอด 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 วัน เขย่าอีกครั้ง เพื่อให้โคนิเดียของเชื้อราเจริญได้ทั่วถึง

5. เก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน

6. ตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อโดยวิธี dilution plate technique ทุกเดือนหลังการบ่มเชื้อ เป็นเวลา 3 เดือน เพื่อทดสอบความมีชีวิตในสารพาในระยะเวลาต่าง ๆ

7. วิเคราะห์ผลด้วย analysis of variance เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยใช้ Duncan's new multiple range test ระดับความเชื่อมั่น 95%

ทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. หลังเก็บในสภาพอุณหภูมิ 40°C จากการทดลองที่ 7 กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในเรือนทดลอง

1. เพาะเลี้ยงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 บนต้นข้าวพันธุ์ TN1 อายุ 3 สัปดาห์ ในกรงเลี้ยงแมลง ในเรือนทดลอง จำนวน 30 ตัวต่อหน่วยทดลอง

2. วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อค (RCB) สิ่งทดลองคือ สารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับข้างต้น ที่ผ่านการเก็บในสภาพอุณหภูมิ 40°C จากการทดลองที่ 4 เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยผสมสารพากับน้ำในอัตรา 0.25 กรัมต่อน้ำ 50 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ 6 ควบคุมโดยการพ่นน้ำเปล่า ทำการทดลองทำ 3 ซ้ำ

3. พ่นสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้นในแต่ละตำรับตาม ข้อที่ 8.2 ลงบนต้นข้าวทดสอบ

4. บันทึกอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทุกวันจนครบ 7 วันหลังจากทำการพ่น ปรับค่าอัตราการตายด้วย Abbott's formula

5. วิเคราะห์ผลด้วย analysis of variance เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยใช้ Duncan's new multiple range test ระดับความเชื่อมั่น 95% และประเมินประสิทธิภาพของแต่ละตำรับ และหาระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (LT_{50}) โดยใช้ผลการคำนวน probit analysis

6. คัดเลือกตำรับสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้นที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาต่อยอดในลำดับต่อไป

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การค้นหาเชื้อรา *Metarhizium* sp. จากตัวอย่างดินป่าที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์

1. สำรวจและรวบรวมตัวอย่างดิน

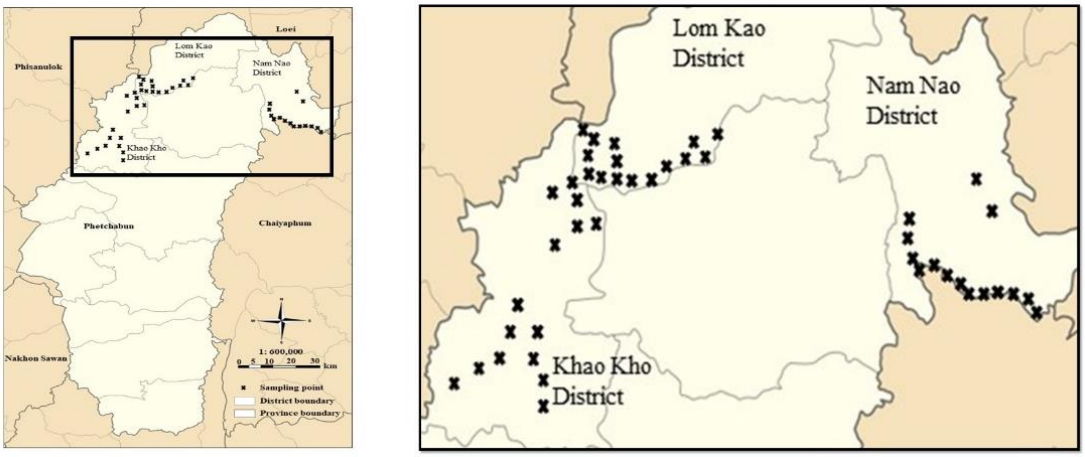
การค้นหาเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าใน อำเภอเขาค้อ อำเภอหล่มเก่า และอำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่อำเภอเขาค้อ อำเภอหล่มเก่า และอำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ จำนวน 15 ตัวอย่าง ในแต่ละอำเภอ รวมทั้งสิ้น 45 ตัวอย่าง โดยได้รายงานพิกัดพื้นที่สุ่มเก็บตัวอย่าง ความสูงของพื้นที่จากระดับน้ำทะเล อุณหภูมิดิน และค่าความเป็นกรด-ด่างของดิน ในตาราง 1 และภาพ 3

ตาราง 1 พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน ตำแหน่งบนเส้นรุ้งเส้นแวงผิวโลก ความสูงจากระดับน้ำทะเล อุณหภูมิดิน และค่าความเป็นกรดด่างของดินอำเภอเขาค้อ อำเภอหล่มเก่า และอำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์

พื้นที่เก็บดิน (อำเภอ)	จุดที่เก็บ	อุณหภูมิ	pH	ความสูงจากระดับน้ำทะเล	ตำแหน่งบนเส้นรุ้งเส้นแวงผิวโลก
เขาค้อ	1	27	6.4	689	16°37'38"N 100°56'21"E
	2	27	7	692	16°37'39"N 100°56'20"E
	3	27	6.4	723	16°37'37"N 100°56'13"E
	4	28	7	675	16°37'46"N 100°56'15"E
	5	27	6.8	671	16°37'47"N 100°56'14"E
	6	26	7	670	16°37'47"N 100°56'12"E
	7	26	6.8	759	16°34'23"N 100°53'22"E
	8	27	7	750	16°34'34"N 100°53'12"E
	9	28	7	739	16°34'41"N 100°53'04"E
	10	27	7.2	719	16°34'49"N 100°53'01"E
	11	28	7	724	16°35'13"N 100°52'33"E
	12	28	7	730	16°35'39"N 100°52'38"E
	13	27	6.5	746	16°34'59"N 100°52'17"E

พื้นที่เก็บดิน (อำเภอ)	จุดที่เก็บ	อุณหภูมิ	pH	ความสูงจากระดับน้ำทะเล	ตำแหน่งบนเส้นรุ้งเส้นแวงผิวโลก
	14	28	7.3	760	16°35'03"N 100°52'03"E
	15	28	7	869	16°35'01"N 100°51'24"E
หล่มเก่า	1	29	7	565	16°52'47"N 101°07'49"E
	2	26	7	711	16°53'03"N 101°07'28"E
	3	26	6.7	788	16°53'08"N 101°07'21"E
	4	26	6.7	881	16°53'04"N 101°07'10"E
	5	26	6.8	941	16°53'07"N 101°07'05"E
	6	25	7	1221	16°52'36"N 101°06'29"E
	7	25	6.5	1277	16°52'49"N 101°06'20"E
	8	25	7	1313	16°52'43"N 101°06'12"E
	9	24	7	1408	16°52'50"N 101°06'08"E
	10	24	7	1707	16°53'37"N 101°05'45"E
	11	24	7	1693	16°53'46"N 101°05'24"E
	12	24	7	1726	16°53'52"N 101°05'06"E
	13	24	7.1	1718	16°53'01"N 101°05'00"E
	14	24	7.2	1667	16°54'14"N 101°04'50"E
	15	24	7	1653	16°54'14"N 101°04'31"E
น้ำหนาว	1	26	7	897	16°43'44"N 101°33'44"E
	2	26	7	880	16°43'45"N 101°34'00"E
	3	26	7	888	16°43'39"N 101°34'11"E
	4	26	7	865	16°43'09"N 101°35'20"E
	5	26	7.1	882	16°42'30"N 101°36'08"E
	6	26	7	858	16°42'15"N 101°36'28"E
	7	26	7	843	16°42'03"N 101°37'03"E
	8	26	7	731	16°42'11"N 101°39'13"E
	9	26	7	694	16°42'11"N 101°39'40"E
	10	26	6.9	752	16°42'11"N 101°40'21"E
	11	26	7.1	715	16°40'24"N 101°41'51"E

พื้นที่เก็บดิน (อำเภอ)	จุดที่เก็บ	อุณหภูมิ	pH	ความสูงจากระดับน้ำทะเล	ตำแหน่งบนเส้นรุ้งเส้นแวงผิวโลก
	12	26	7	328	16°39'26"N 101°42'58"E
	13	26	7	306	16°39'10"N 101°43'40"E
	14	26	6.9	922	16°57'53"N 101°31'58"E
	15	26	7	876	16°57'27"N 101°31'45"E



ภาพ 3 จุดเก็บตัวอย่างดินในอำเภอเขาค้อ อำเภอหล่มเก่า และอำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์

2. ผลการคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากตัวอย่างดิน

เมื่อทำการคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบเชื้อราทั้งหมดรวม 126 ไอโซเลตจากทุกพื้นที่ กระจายไปตามสภาพของแหล่งเก็บตัวอย่างดิน (ตาราง 2)

ตัวอย่างดินจากอำเภอเขาค้อ พบโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากตัวอย่างดินทั้งหมด 14 ตัวอย่างจากทั้งหมด 15 ตัวอย่าง โดยพบโคโลนีของเชื้อรารวมทั้งหมด จำนวน 52 ไอโซเลต ทำการใส่รหัส PB-01 - PB-52

ตัวอย่างดินจากอำเภอหล่มเก่า พบโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากตัวอย่างดินทุกตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่าง โดยพบโคโลนีของเชื้อรารวมทั้งหมด จำนวน 48 ไอโซเลต ทำการใส่รหัส PB-53-PB-100

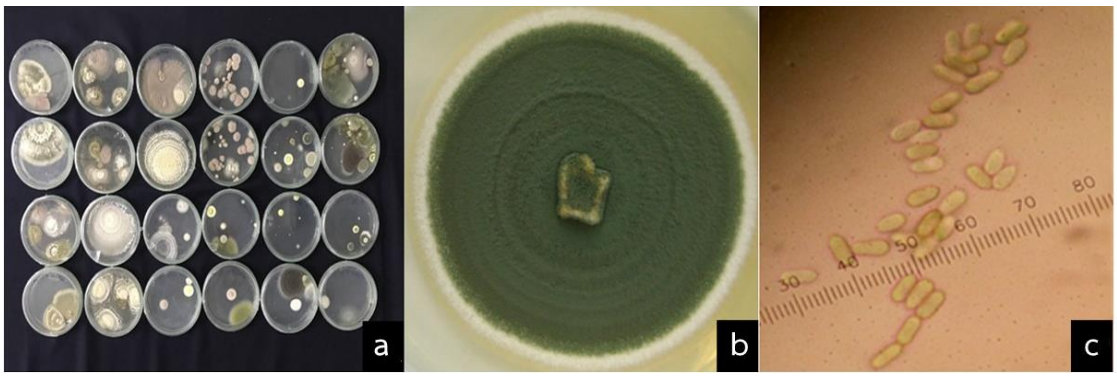
ตัวอย่างดินจากอำเภอน้ำหนาว พบโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากตัวอย่างดิน 13 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 15 ตัวอย่าง โดยพบโคโลนีของเชื้อรารวมทั้งหมด จำนวน 26 ไอโซเลต ทำการใส่รหัส PB-101-PB-126

ตาราง 2 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินและจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่พบ

พื้นที่เก็บดิน (อำเภอ)	จุดที่เก็บ	จำนวนเชื้อรา *Metarhizium* spp. (ไอโซเลต)	รหัส
เขาค้อ	1	8	PB-01 – PB-08
	2	2	PB-09 – PB-10
	3	13	PB-11 – PB-23
	4	2	PB-24 – PB-25
	5	5	PB-26 – PB-30
	6	2	PB-31 – PB-32
	7	5	PB-33 – PB-37
	8	4	PB-38 – PB-41
	9	2	PB-42 – PB-43
	10	1	PB-44
	11	4	PB-45 – PB-48
	12	2	PB-49 – PB-50
	13	1	PB-51
	14	0	-
	15	1	PB-52
หล่มเก่า	1	3	PB-53 - PB-55
	2	1	PB-56
	3	3	PB-57 - PB-59
	4	8	PB-60 - PB-67
	5	4	PB-68 - PB-71
	6	1	PB-72
	7	9	PB-73 - PB-81
	8	4	PB-82 - PB-85
	9	3	PB-86 - PB-88
	10	3	PB-89 - PB-91
	11	2	PB-92- PB-93

พื้นที่เก็บดิน (อำเภอ)	จุดที่เก็บ	จำนวนเชื้อรา *Metarhizium* spp. (ไอโซเลต)	รหัส
	12	2	PB-94 - PB-95
	13	1	PB-96
	14	1	PB-97
	15	3	PB-98 - PB-100
น้ำหนาว	1	1	PB-101
	2	4	PB-102 - PB-105
	3	4	PB-106 - PB-109
	4	1	PB-110
	5	1	PB-111
	6	1	PB-112
	7	1	PB-113
	8	3	PB-114 - PB-116
	9	1	PB-117
	10	3	PB-118 - PB-120
	11	0	-
	12	0	-
	13	1	PB-121
	14	3	PB-122- PB-124
	15	2	PB-125 - PB-126
รวม		126	

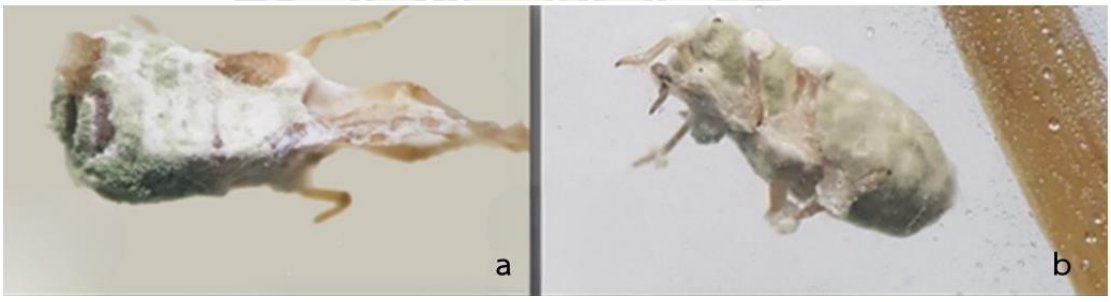
เชื้อราที่พบแต่ละไอโซเลตนั้นมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก โดยโคโลนีมีรูปร่างกลม สีเขียวเข้มขอบขาว สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และไม่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะการเจริญของเชื้อราเริ่มจากการสร้างเส้นใยสีขาว มีผนังกั้นเป็นปล้อง โคนิเดียมีสีเขียวเข้ม รูปร่างทรงกระบอก มีขนาดความยาววัดได้ อยู่ในช่วง 5-7 µm (ภาพ 4)



ภาพ 4 โคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium* spp., ลักษณะของเชื้อราที่แยกจากดินบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (a), ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่เจริญบน อาหารเลี้ยงเชื้อ (b), ลักษณะโคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium* spp. (c)

การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ผลการทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ ที่คัดแยกได้จากพื้นที่ต่าง ๆ กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 พบว่า เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลส่วนใหญ่ที่ตายเริ่มแสดงอาการผิดปกติคือหยุดกินอาหาร ไม่เคลื่อนไหว ผนังลำตัวปล้องท้องบริเวณทวารหนักเริ่มเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นในช่วงตั้งแต่ 72 ชั่วโมงหลังสัมผัสเชื้อ และเริ่มพบเส้นใยและโคนิเดียขึ้นเป็นหย่อมเล็กบนตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ตายตั้งแต่วันที่ 3 หลังสัมผัสเชื้อรา และขยายคลุมตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 4 หลังสัมผัสเชื้อรา (ภาพ 5)



ภาพ 5 เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ถูกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ลงทำลาย, เส้นใยของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ขึ้นปกคลุมตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ตายตั้งแต่วันที่ 3 หลังสัมผัสเชื้อรา (a), โคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ขยายคลุมตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 4 หลังสัมผัสเชื้อรา (b)

ผลการทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่จำแนกได้จากพื้นที่ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ จำนวนทั้งหมด 52 ไอโซเลตในการลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบว่าที่ 1 วันหลังจากสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเริ่มแสดงอาการผิดปกติ เริ่มต้นจากหยุดกินอาหาร ไม่เคลื่อนไหว ผนังลำตัวปล้องท้องบริเวณทวารหนักเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นและตาย โดยพบอัตราการตายเฉลี่ยที่ร้อยละ 3.3-20.0 จำนวน 42 ไอโซเลต โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-42 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 20 (ตาราง 3)

ที่ 2 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 3.3-30.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-39 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 30

ที่ 3 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีเส้นใย และโคนิเดียปรากฏขึ้นเป็นหย่อมเล็ก ๆ บนลำตัว และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 10.0-43.3 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-39 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 43.3

ที่ 4 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบเส้นใย และโคนิเดียขึ้นคลุมตัวว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 13.3-70.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-34 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 70.0

ที่ 5 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบเส้นใย และโคนิเดียขึ้นคลุมตัวว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 13.3-93.3 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-28 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 93.3

ที่ 6 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบเส้นใย และโคนิเดียขึ้นคลุมตัวว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 26.7-100.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยมี 7 ไอโซเลต คือ PB-01, PB-02, PB-10, PB-19, PB-28, PB-47 และ PB-51 มีสามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 100.0

ด้านระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (LT_{50}) พบว่าเชื้อรา *Metarhizium* spp. สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 ที่ระยะเวลาระหว่าง 3.1-8.2 วัน โดยเชื้อราไอโซเลต PB-02 สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 สั้นที่สุด คือ 3.1 วัน เชื้อราไอโซเลต PB-22 มีระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 นานที่สุด คือ 8.2 วัน

ตาราง 3 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 และ LT_{50} ที่ถูกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่แยกได้จากเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ลงทำลายที่ระยะเวลา 6 วันหลังสัมผัสเชื้อ

ไอโซเลต	การตายสะสม[1] (%)						LT_{50}
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	(Days)
PB-01	6.7abc	16.7ab	23.3abc	40.0abcdef	86.7ab	100.0a	3.7
PB-02	16.7ab	30.0a	43.3a	60.0ab	90.0a	100.0a	3.1
PB-03	10.0abc	20.0ab	30.0abc	43.3abcdef	66.7abcdef	96.7a	3.9
PB-04	13.3abc	23.3ab	36.7abc	43.3abcdef	66.7abcdef	90.0a	3.9
PB-05	6.7abc	16.7ab	30.0abc	36.7bcdef	66.7abcdef	96.7a	4.0
PB-06	10.0abc	23.3ab	30.0abc	43.3abcdef	76.7abcd	90.0a	3.8
PB-07	0.0c	6.7ab	16.7abc	26.7cdef	53.3bcdefgh	86.7a	4.7
PB-08	3.3bc	13.3ab	13.3bc	23.3cdef	60.0abcdefg	93.3a	4.5
PB-09	0.0c	6.7ab	10.0c	23.3cdef	60.0abcdefg	83.3a	4.7
PB-10	6.7acb	16.7ab	30.0abc	43.3abcdef	76.7abcd	100.0a	3.8
PB-11	3.3abc	6.7ab	13.3bc	20.0def	23.3hi	33.3b	7.3
PB-12	6.7abc	16.7ab	23.3abc	26.7cdef	33.3fghi	33.3b	6.7
PB-13	10.0acb	10.0ab	16.7abc	23.3cdef	30.0ghi	36.7b	7.1
PB-14	16.7ab	26.7ab	36.7abc	43.3abcdef	46.7cdefghi	46.7b	5.3
PB-15	6.7abc	20.0ab	23.3abc	36.7bcdef	43.3defghi	46.7b	5.6
PB-16	6.7abc	10.0ab	16.7abc	36.7bcdef	80.0abc	96.7a	4.0
PB-17	3.3bc	10.0ab	20.0abc	23.3cdef	30.0ghi	36.7b	6.7
PB-18	6.7abc	6.7ab	13.3bc	20.0def	26.7ghi	36.7b	7.1
PB-19	6.7abc	16.7ab	33.3abc	46.7abcde	73.3abcde	100.0a	3.7
PB-20	0.0c	6.7ab	10.0c	16.7ef	23.3hi	33.3b	7.1
PB-21	3.3bc	13.3ab	13.3bc	16.7ef	30.0ghi	33.3b	7.2
PB-22	6.7abc	10.0ab	10.0c	13.3f	13.3i	36.7b	8.2

ไอโซเลต	การตายสะสม[1] (%)						LT_{50}
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	(Days)
PB-23	3.3bc	10.0ab	13.3bc	16.7ef	16.7i	50.0b	6.7
PB-24	3.3bc	10.0ab	10.0c	16.7ef	23.3hi	46.7b	6.6
PB-25	3.3bc	6.7ab	13.3bc	16.7ef	23.3hi	50.0b	6.4
PB-26	3.3bc	10.0ab	10.0c	20.0def	33.3fghi	50.0b	6.1
PB-27	3.3bc	10.0ab	10.0c	16.7ef	30.0ghi	50.0b	6.2
PB-28	16.7ab	23.3ab	36.7abc	53.3abc	93.3a	100.0a	3.2
PB-29	3.3bc	3.3b	10.0c	13.3f	20.0hi	50.0b	6.5
PB-30	3.3bc	10.0ab	16.7abc	20.0def	26.7ghi	50.0b	6.3
PB-31	0.0c	10.0ab	13.3bc	20.0def	23.3hi	33.3b	7.2
PB-32	3.3bc	6.7ab	10.0c	16.7ef	20.0hi	43.3b	6.8
PB-33	10.0abc	20.0ab	36.7abc	60.0ab	86.7ab	93.3a	3.4
PB-34	6.7abc	23.3ab	40.0ab	70.0a	80.0abc	96.7a	3.4
PB-35	0.0c	6.7ab	10.0c	13.3f	16.7i	40.0b	6.9
PB-36	6.7abc	13.3ab	23.3abc	33.3bcdef	40.0efghi	46.7b	5.8
PB-37	10.0abc	10.0ab	20.0abc	30.0bcdef	40.0efghi	43.3b	6.1
PB-38	16.7ab	26.7ab	33.3abc	40.0abcdef	43.3defghi	46.7b	5.5
PB-39	3.3bc	30.0a	43.3a	50.0abcd	46.7cdefghi	46.7b	5.0
PB-40	0.0c	3.3b	13.3bc	20.0def	23.3hi	43.3b	6.4
PB-41	6.7abc	26.7ab	33.3bc	40.0abcdef	46.7cdefghi	46.7b	5.4
PB-42	20.0a	26.7ab	36.7abc	43.3abcdef	43.3defghi	46.7b	5.4
PB-43	0.0c	6.7ab	20.0abc	30.0bcdef	43.3defghi	46.7b	5.6
PB-44	0.0c	3.3b	10.0c	13.3f	20.0hi	26.7b	7.6
PB-45	3.3bc	20.0ab	30.0abc	36.7bcdef	43.3defghi	46.7b	5.5
PB-46	3.3bc	16.7ab	23.3abc	33.3bcdef	36.7fghi	46.7b	5.8
PB-47	6.7abc	20.0ab	30.0abc	43.3abcdef	80.0abc	100.0a	3.7
PB-48	3.3bc	6.7ab	10.0c	26.7cdef	33.3fghi	43.3b	6.2
PB-49	0.0c	13.3ab	16.7abc	23.3cdef	32.0ghi	33.3b	6.8
PB-50	13.3abc	26.7ab	30.0abc	36.7bcdef	40.0efghi	43.3b	5.9
PB-51	10.0abc	16.7ab	20.0abc	36.7bcdef	66.7abcdef	100.0a	4.0
PB-52	0.0c	3.3b	13.3bc	20.0def	30.0ghi	46.7b	6.1

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's new multiple range test, $p<0.05$)

ผลการทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่จำแนกได้จากพื้นที่ อำเภอหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ จำนวนทั้งหมด 48 ไอโซเลตในการลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบว่า ที่ 1 วันหลังจากสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเริ่มแสดงอาการผิดปกติเริ่มต้นจากหยุดกินอาหาร ไม่เคลื่อนไหว ผนังลำตัวปล้องท้องบริเวณทวารหนักเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น และตาย โดยพบอัตราการตายเฉลี่ยที่ร้อยละ 3.3-16.7 จำนวน 45 ไอโซเลต โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-54, PB-71 และ PB-76 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 16.7 (ตาราง 4)

ที่ 2 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 3.3-29.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-75 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 29

ที่ 3 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีเส้นใย และโคนิเดียปรากฏขึ้นเป็นหย่อมเล็ก ๆ บนลำตัว และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 10.0-51.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-75 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 51.0

ที่ 4 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบเส้นใย และโคนิเดียขึ้นคลุมตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 16.7-68.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-34 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 68.0

ที่ 5 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบเส้นใย และโคนิเดียขึ้นคลุมตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 23.3-96.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-75 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 96.0

ที่ 6 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบเส้นใย และโคนิเดียขึ้นคลุมตัวว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 36.7-100.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยมี 4 ไอโซเลต

คือ PB-71, PB-75, PB-76 และ PB-95 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 100.0

ในส่วนของระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (LT_{50}) พบว่าเชื้อรา *Metarhizium* spp. สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 ที่ระยะเวลาระหว่าง 2.9-7.1 วัน โดยเชื้อราไอโซเลต PB-75 สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 สั้นที่สุด คือ 2.9 วัน เชื้อราไอโซเลต PB-73 มีระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 นานที่สุด คือ 7.1 วัน

ตาราง 4 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 และ LT_{50} ที่ถูกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่แยกได้จากหล่มเก่า จังหวัดเพชรบูรณ์ลงทำลายที่ระยะเวลา 6 วันหลังสัมผัสเชื้อ

ไอโซเลต	การตายสะสม[1] (%)						LT_{50}
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	(Days)
PB-53	6.7[ns]	16.7 [ns]	23.3bcde	30.0cde	36.7de	43.3b	6.1
PB-54	16.7	26.7	30.0abcde	33.3bcde	43.3de	46.7b	5.8
PB-55	0.0	6.7	10.0e	23.3de	30.0e	50.0b	6.0
PB-56	3.3	10.0	23.3bcde	30.0cde	36.7de	43.3b	6.0
PB-57	10.0	20.0	26.7abcde	33.3bcde	36.7de	46.7b	5.9
PB-58	6.7	20.0	26.7abcde	33.3bcde	33.3e	33.3b	6.8
PB-59	3.3	6.7	20.0cde	30.0cde	36.7de	43.3b	6.0
PB-60	0.0	10.0	26.7abcde	30.0cde	40.0de	50.0b	5.6
PB-61	10.0	16.7	26.7abcde	33.3bcde	40.0de	50.0b	5.7
PB-62	13.3	23.3	36.7abcd	40.0bcde	46.7cde	50.0b	5.2
PB-63	6.7	16.7	30.0abcde	36.7bcde	40.0de	50.0b	5.5
PB-64	0.0	20.0	30.0abcde	36.7bcde	43.3de	50.0b	5.4
PB-65	6.7	6.7	20.0cde	30.0cde	43.3de	50.0b	5.6
PB-66	3.3	13.3	30.0abcde	40.0bcde	43.3de	50.0b	5.4
PB-67	3.3	10.0	20.0cde	36.7bcde	46.7cde	50.0b	5.4
PB-68	6.7	13.3	16.7de	26.7cde	33.3	43.3b	6.4
PB-69	6.7	10.0	26.7abcde	33.3bcde	40.0de	43.3b	5.9
PB-70	6.7	16.7	23.3bcde	33.3bcde	40.0de	43.3b	5.9
PB-71	16.7	23.3	46.7ab	60.0ab	86.7ab	100.0a	3.2
PB-72	0.0	6.7	16.7de	26.7cde	36.7de	50.0b	5.7
PB-73	3.3	6.7	10.0e	16.7e	23.3e	36.7b	7.1

ไอโซเลต	การตายสะสม[1] (%)						LT_{50}
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	(Days)
PB-74	13.3	20.0	23.3bcde	30.0cde	40.0de	46.7b	5.9
PB-75	15.0	29.0	51.0a	68.0a	96.0a	100.0a	2.9
PB-76	16.7	26.7	30.0abcde	46.7abcd	80.0abc	100.0a	3.5
PB-77	3.3	20.0	26.7abcde	30.0cde	36.7de	43.3b	6.0
PB-78	6.7	16.7	23.3bcde	33.3bcde	43.3de	46.7b	5.7
PB-79	3.3	6.7	13.3de	26.7cde	33.3e	36.7b	6.5
PB-80	3.3	13.3	26.7abcde	33.3bcde	43.3de	46.7b	5.6
PB-81	13.3	20.0	26.7abcde	36.7bcde	40.0de	46.7b	5.8
PB-82	6.7	10.0	20.0cde	23.3de	30.0e	40.0b	6.7
PB-83	10.0	16.7	23.3bcde	33.3bcde	40.0de	46.7b	5.8
PB-84	6.7	23.3	30.0abcde	36.7bcde	40.0de	46.7b	5.6
PB-85	3.3	20.0	26.7abcde	33.3bcde	40.0de	46.7b	5.7
PB-86	6.7	13.3	16.7de	26.7cde	33.3e	50.0b	6.0
PB-87	13.3	20.0	33.3abcde	43.3abcde	46.7cde	50.0b	5.2
PB-88	0.0	10.0	23.3bcde	30.0cde	33.3e	50.0b	5.7
PB-89	13.3	26.7	43.3abc	50.0abcd	70.0abcd	96.7a	3.5
PB-90	3.3	10.0	20.0cde	26.7cde	36.7de	46.7b	5.9
PB-91	6.7	6.7	16.7de	23.3de	26.7e	40.0b	6.8
PB-92	0.0	6.7	10.0e	23.3de	26.7e	36.7b	6.6
PB-93	10.0	20.0	30.0abcde	36.7bcde	43.3de	50.0b	5.5
PB-94	6.7	13.3	23.3bcde	30.0cde	56.7bcde	83.3a	4.5
PB-95	0.0	3.3	23.3bcde	53.3abc	80.0abc	100.0a	3.9
PB-96	6.7	16.7	30.0abcde	40.0bcde	43.3de	43.3b	5.6
PB-97	10.0	16.7	26.7abcde	30.0cde	36.7de	46.7b	6.0
PB-98	3.3	13.3	36.7abcd	43.3abcde	43.3de	43.3b	5.5
PB-99	10.0	20.0	33.3abcde	40.0bcde	40.0de	43.3b	5.7
PB-100	6.7	16.7	26.7abcde	36.7bcde	36.7de	43.3b	5.9

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's new multiple range test, $p<0.05$)

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ผลการทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่จำแนกได้จากพื้นที่อำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ จำนวนทั้งหมด 26 ไอโซเลตในการลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบว่าที่ 1 วันหลังจากสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเริ่มแสดงอาการผิดปกติเริ่มต้นจากหยุดกินอาหาร ไม่เคลื่อนไหว ผนังลำตัวปล้องท้องบริเวณทวารหนักเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น และตาย โดยพบอัตราการตายเฉลี่ยที่ร้อยละ 3.3-16.7 จำนวน 23 ไอโซเลต โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-123 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 16.7 (ตาราง 5)

ที่ 2 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยตั้งแต่ร้อยละ 6.7-26.7 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-123 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 26.7 ในขณะที่เชื้อราไอโซเลต PB-115 ยังไม่พบการลงทำลายเชื้อราโดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล คือ ร้อยละ 0.0

ที่ 3 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีเส้นใยและโคนิเดียปรากฏขึ้นเป็นหย่อมเล็ก ๆ บนลำตัว และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 10.0-36.7 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-103 และ PB-123 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 36.7 ในขณะที่เชื้อราไอโซเลต PB-102 มีอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลน้อยที่สุด คือ ร้อยละ 10.0

ที่ 4 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบเส้นใย และโคนิเดียขึ้นคลุมตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 20.0-56.7 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-117 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 56.7 ในขณะที่เชื้อราไอโซเลต PB-102 และ PB-105 มีอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลน้อยที่สุด คือ ร้อยละ 20.0

ที่ 5 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบเส้นใย และโคนิเดียขึ้นคลุมตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 23.3-93.3 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-117 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 93.3 ในขณะที่เชื้อราไอโซเลต PB-102 มีอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลน้อยที่สุด คือ ร้อยละ 23.3

ที่ 6 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบเส้นใย และโคนิเดียขึ้นคลุมตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 33.3-100.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ย

กระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยมี 5 ไอโซเลต คือ PB-101, PB-114, PB-117, PB-123 และ PB-125 มีสามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 100.0 ในขณะที่เชื้อราไอโซเลต PB-102 มีอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลน้อยที่สุด คือ ร้อยละ 33.3

ส่วนระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (LT_{50}) พบว่าเชื้อรา *Metarhizium* spp. สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 ที่ระยะเวลาระหว่าง 3.4-7.5 วัน โดยเชื้อราไอโซเลต PB-117 และ PB-123 สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 สั้นที่สุด คือ 3.4 วัน และเชื้อราไอโซเลต PB-102 มีระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 นานที่สุด คือ 7.5 วัน

ตาราง 5 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 และ LT_{50} ที่ถูกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่แยกได้จากน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ลงทำลายที่ระยะเวลา 6 วันหลังสัมผัสเชื้อ

ไอโซเลต	การตายสะสม[1](%)						LT_{50}
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	(Days)
PB-101	13.3[ns]	20.0abc	26.7ab	43.3abc	80.0ab	100.0a	3.6
PB-102	6.7	6.7cd	10.0b	20.0d	23.3f	33.3b	7.5
PB-103	10.0	30.0a	36.7a	46.7ab	53.3cde	93.3a	3.9
PB-104	3.3	10.0cd	16.7ab	23.3cd	26.7f	40.0b	6.7
PB-105	6.7	6.7cd	13.3b	20.0d	30.0ef	36.7b	6.9
PB-106	3.3	10.0cd	30.0ab	36.7abcd	40.0def	56.7b	5.3
PB-107	3.3	10.0cd	20.0ab	26.7bcd	40.0def	43.3b	5.9
PB-108	10.0	20.0abc	30.0ab	36.7abcd	33.3def	40.0b	6.3
PB-109	0.0	6.7cd	20.0ab	33.3bcd	43.3def	46.7b	5.6
PB-110	6.7	13.3bcd	26.7ab	33.3bcd	40.0def	43.3b	5.9
PB-111	6.7	16.7abc	23.3ab	33.3bcd	33.3def	33.3b	6.8
PB-112	3.3	10.0cd	30.0ab	40.0abcd	43.3def	43.3b	5.6
PB-113	6.7	20.0abc	26.7ab	30.0bcd	40.0def	50.0b	5.7
PB-114	6.7	16.7abc	26.7ab	36.7abcd	70.0abc	100.0a	3.9
PB-115	0.0	0.0d	13.3b	23.3cd	33.3def	46.7b	5.9
PB-116	0.0	6.7cd	16.7ab	23.3cd	30.0ef	50.0b	5.9
PB-117	16.7	16.7abc	30.0ab	56.7a	93.3a	100.0a	3.3

ไอโซเลต	การตายสะสม[1](%)						LT_{50}
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	(Days)
PB-118	6.7	10.0cd	23.3ab	36.7abcd	56.7bcd	96.7a	4.2
PB-119	10.0	13.3bcd	20.0ab	26.7bcd	33.3def	40.0b	6.6
PB-120	3.3	10.0cd	13.3b	20.0d	30.0ef	43.3b	6.5
PB-121	6.7	16.7abc	30.0ab	40.0abcd	56.7bcd	90.0a	4.2
PB-122	6.7	13.3bcd	20.0ab	23.3cd	33.3def	46.7b	6.2
PB-123	16.7	26.7ab	36.7a	43.3abc	83.3a	100.0a	3.4
PB-124	6.7	20.0abc	26.7ab	30.7bcd	37.7def	43.3b	6.1
PB-125	6.7	13.3bcd	16.7ab	33.3bcd	56.7bcd	100.0a	4.2
PB-126	6.7	10.0cd	21.7ab	25.3bcd	33.3def	46.7b	6.2

[1] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's new multiple range test, $p<0.05$)

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากผลการทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. จำนวน 126 ไอโซเลต ที่แยกได้จากพื้นที่อำเภอเขาค้อ อำเภอหล่มเก่า และอำเภอน้ำหนาว พบว่ามีเชื้อรา จำนวน 16 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต PB-01, PB-02, PB-10, PB-19, PB-28, PB-47, PB-51, PB-71, PB-75, PB-76, PB-95, PB-101, PB-114, PB-117, PB-123 และPB-125 มีศักยภาพทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 100 ได้ภายในระยะเวลา 6 วัน โดยเชื้อราทุกไอโซเลตทำให้มีอัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลร้อยละ 50 อยู่ระหว่าง 2.9-4.2 วัน (ตาราง 6 และภาพ 6)

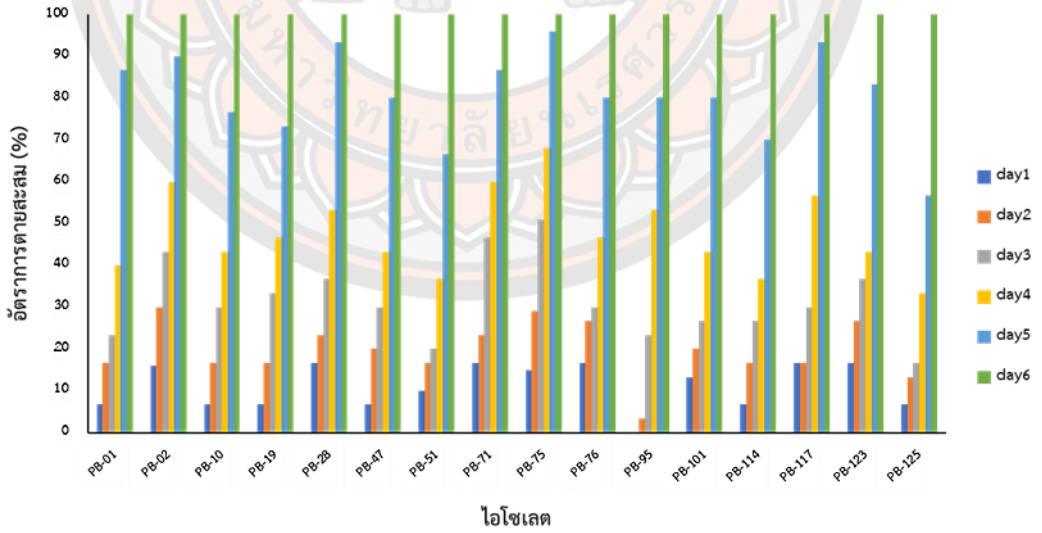
ตาราง 6 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และระยะเวลาที่เชื้อรา *Metarhizium* spp. ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 ที่ระยะเวลา 6 วันหลังสัมผัสเชื้อ

ไอโซเลต	การตายสะสม[1](%)						LT_{50}
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	(Days)
PB-01	6.7ab	16.7ab	23.3de	40.0bcd	86.7ab	100.0[ns]	3.7
PB-02	16.7a	30.0a	43.3abc	60.0ab	90.0ab	100.0	3.1
PB-10	6.7ab	16.7ab	30.0bcde	43.3bcd	76.7ab	100.0	3.8
PB-19	6.7ab	16.7ab	33.3abcde	46.7bcd	73.3ab	100.0	3.7

ไอโซเลต	การตายสะสม[1](%)						LT_{50}
PB-28	16.7a	23.3ab	36.7abcd	53.3abcd	93.3a	100.0	3.2
PB-47	6.7ab	20.0ab	30.0bcde	43.3bcd	80.0ab	100.0	3.7
PB-51	10.0ab	16.7ab	20.0de	36.7cd	66.7ab	100.0	4.0
PB-71	16.7a	23.3ab	46.7ab	60.0ab	86.7ab	100.0	3.2
PB-75	15.0ab	29.0a	51.0a	68.0a	96.0a	100.0	2.9
PB-76	16.7a	26.7a	30.0bcde	46.7bcd	80.0ab	100.0	3.5
PB-95	0.0b	3.3b	23.3de	53.3abcd	80.0ab	100.0	3.9
PB-101	13.3ab	20.0ab	26.7cde	43.3bcd	80.0ab	100.0	3.6
PB-114	6.7ab	16.7ab	26.7cde	36.7cd	70.0ab	100.0	3.9
PB-117	16.7a	16.7ab	30.0bcde	56.7abc	93.3a	100.0	3.3
PB-123	16.7a	26.7a	36.7abcd	43.3bcd	83.3ab	100.0	3.4
PB-125	6.7ab	13.3ab	16.7e	33.3d	56.7b	100.0	4.2

[1] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's new multiple range test, $p<0.05$)

ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



ภาพ 6 อัตราการตายสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 (ร้อยละ) หลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. จำนวน 16 ไอโซเลต ที่ระยะเวลา 0-6 วัน

เมื่อนำอัตราการสะสมของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่สัมผัสเชื้อราทั้ง 16 ไอโซเลตมาเปรียบเทียบกัน พบว่า ที่ 1 วันหลังจากสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีอัตราการตายเฉลี่ยที่ร้อยละ 0.0-16.7 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p>0.05$)

ที่ 2 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลตทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้นเฉลี่ยตั้งแต่ร้อยละ 3.2-29.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-75 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 29.0 ในขณะที่เชื้อราไอโซเลต PB-95 มีอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลน้อยที่สุด คือ ร้อยละ 3.3

ที่ 3 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. ทุกไอโซเลตลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 16.7-60.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-75 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 60.0 ในขณะที่เชื้อราไอโซเลต PB-125 มีอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลน้อยที่สุด คือ ร้อยละ 16.7

ที่ 4 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 33.3-68.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-75 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 68.0 ในขณะที่เชื้อราไอโซเลต PB-125 มีอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลน้อยที่สุด คือ ร้อยละ 33.3

ที่ 5 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. พบว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีอัตราการตายสะสมเฉลี่ยที่ร้อยละ 56.7-96.0 โดยอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยเชื้อราไอโซเลต PB-28 และ PB-75 สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงที่สุด คือ ร้อยละ 93.3 และ 96.0 ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อราไอโซเลต PB-125 มีอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลน้อยที่สุด คือ ร้อยละ 26.7

ที่ 6 วันหลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium* spp. ทุกไอโซเลตลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ร้อยละ 100 โดยพบว่าเชื้อราไอโซเลต PB-75 มีระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (LT_{50}) สั้นที่สุด คือ 2.9 วัน และเชื้อราไอโซเลต PB-125 มีระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 นานที่สุด คือ 4.2 วัน

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคนิเดีย

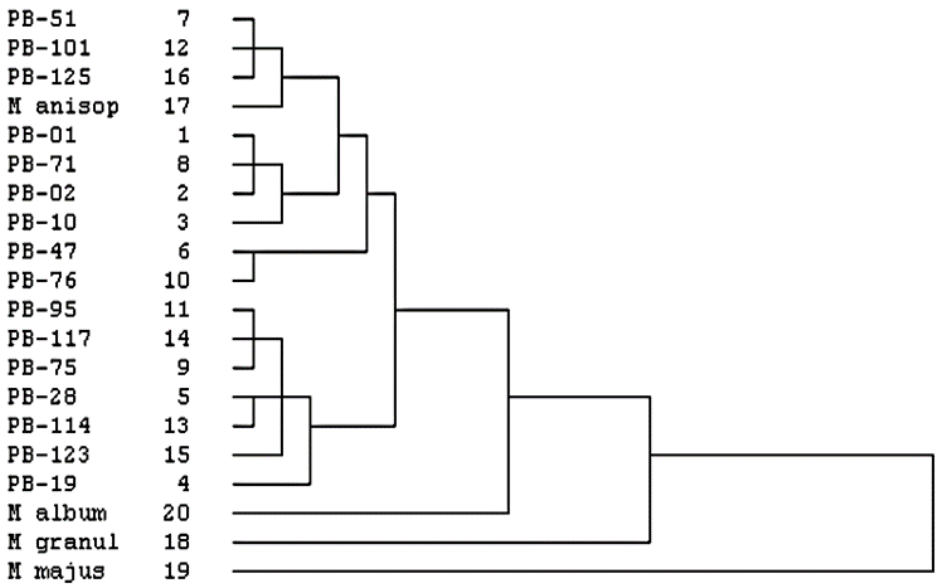
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 16 ไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือกจากคุณสมบัติการก่อโรคโดยสามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ตาย 100% และมีระดับความรุนแรงของการก่อโรคที่ LT_{50} อยู่ในช่วง 2.9-4.2 วัน พบว่า โคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium* spp.ทุกไอโซเลตมีลักษณะกลม สีเขียวขี้ม้าเข้มหรือเขียวโอลีฟ ขอบโคโลนีมีสีขาว ส่วนโคนิเดียมีรูปทรงกระบอกปลายมน คล้ายแคปซูล ขนาดของความยาว อยู่ในช่วง 5.0-8.9 µm และความกว้างอยู่ในช่วง 2.0-4.6 µm โดยเชื้อรา *M. album, M. majus และ M. granulomatis* มีสีโคโลนีเป็น สีน้ำตาลซีด สีเขียวโอลีฟ และสีเทาน้ำตาล ตามลำดับ ส่วนโคนิเดียมีรูปทรงรี ทรงกระบอกปลายมน คล้ายแคปซูล และเป็นลักษณะคล้ายวงรี ในส่วนของขนาดของความยาว อยู่ในช่วง 4.0-6.0, 8.4-15.1 และ 3.3-3.8 µm และความกว้างของโคนิเดียอยู่ในช่วง 1.5-2.5, 2.4-4.7 และ 1.2-1.6 µm ตามลำดับ (ตาราง 7)

ตาราง 7 ลักษณะโคโลนี และโคนิเดียของเชื้อ *Metarhizium* spp. ที่มีศักยภาพในการลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จำนวน 16 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับลักษณะโคโลนีและโคนิเดียของเชื้อ *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium album*, *Metarhizium majus* และ *Metarhizium granulomatis* เพื่อจัดกลุ่มและจำแนกชนิดของเชื้อรา

ไอโซเลต	สัณฐานวิทยาของโคโลนี		สัณฐานวิทยาของโคนิเดีย		LT50 (Days)
	รูปร่าง	สี	ขนาด	รูปร่าง	
PB-01	circle	dark green	5.7(5.3-7.1) x 3.1(2.5-4.0)	cylindrical	3.7
PB-02	circle	dark green	6.0(5.5-7.0) x 3.0(2.6-3.4)	cylindrical	3.1
PB-10	circle	dark green	5.5(5.0-6.9) x 4.0(3.6-4.5)	Cylindrical	3.8
PB-19	circle	olivaceous green	7.1(6.4-7.9) x 3.5(3.1-4.6)	cylindrical	3.7
PB-28	circle	olivaceous green	6.5(6.0-7.1) x 3.2(2.9-4.0)	cylindrical	3.2
PB-47	circle	dark green	7.0(6.5–8.9) x 4.3(4.0–4.5)	cylindrical	3.7
PB-51	circle	dark green	6.7(6.2-8.4) x 3.1(2.5-4.2)	cylindrical	4.0
PB-71	circle	dark green	5.6(5.0-6.1) x 3.0(2.4-3.9)	cylindrical	3.2

ไอโซเลต	สัณฐานวิทยาของโคโลนี		สัณฐานวิทยาของโคนิเดีย		LT50 (Days)
	รูปร่าง	สี	ขนาด	รูปร่าง	
PB-75	circle	olivaceous green	5.7(5.0-6.0) x 3.1(2.4-4.0)	cylindrical	2.9
PB-76	circle	dark green	7.1(6.5-8.1) x 4.0(2.9-4.6)	cylindrical	3.5
PB-95	circle	olivaceous green	5.8(5.1-6.5) x 2.9(2.3-3.2)	cylindrical	3.9
PB-101	circle	dark green	6.7(6.3-7.1) x 3.1(2.7-4.1)	cylindrical	3.6
PB-114	circle	olivaceous green	6.4(5.5-6.7) x 2.8(2.0-3.9)	cylindrical	3.9
PB-117	circle	olivaceous green	5.8(5.0-7.1) x 2.7(2.0-3.2)	cylindrical	3.3
PB-123	circle	olivaceous green	6.5(5.8-7.5) x 2.2(2.4-2.6)	cylindrical	3.4
PB-125	circle	dark green	6.5(6.0-7.5) x 3.5(2.9-3.9)	cylindrical	4.2
M. anisopliae	circle	dark green	6.5(4.5-8.4) x 2.4(1.6-3.2)	cylindrical	
M. granulomatis	circle	brown-gray	3.6(3.3-3.8) x 1.4(1.2-1.6)	oval	
M. majus	circle	olivaceous green	11.8(8.4-15.1) x 3.6(2.4-4.7)	cylindrical	
M. album	circle	pale brown	5.0(4.0-6.0) x 2.0(1.5-2.5)	ellipsoid	

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่ม ด้วย hierarchical cluster analysis ด้วยวิธี within group-linkage ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตเปรียบเทียบร่วมกับ *M. anisopliae*, *M. album*, *M. majus* และ *M. granulomatis* พบว่า เชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตถูกจัดรวมเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ร่วมกับ *M. anisopliae* อ้างอิง และแยกตัวออกจาก *M. album*, *M. majus* และ *M. granulomatis* อย่างชัดเจน ภายในกลุ่มสามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกประกอบด้วยไอโซเลต PB-51, PB-101, PB-125, PB-01, PB-71, PB-02, PB-10, PB-47 และ PB-76 ร่วมกับ *M. anisopliae* อ้างอิง กลุ่มที่สองประกอบด้วยไอโซเลต PB-95, PB-117, PB-75, PB-28, PB-114, PB-123 และ PB-19 ซึ่งถูกจัดจำแนกเป็น *M. anisopliae* ในกรณีนี้ทำให้เชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตในส่วนของ ingroup นี้มีแนวโน้มจัดเป็น เชื้อรา *M. anisopliae* ได้มากที่สุด (ภาพ 7)



ภาพ 7 เดนโดรแกรมความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทั้ง 16 ไอโซเลต โดยใช้ข้อมูลลักษณะของโคโลนี และโคนิเดียของเชื้อรา เปรียบเทียบกับลักษณะของโคโลนีและโคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (M anisop), *Metarhizium album* (M album), *Metarhizium majus* (M majus) และ *Metarhizium granulomatis* (M granul) เพื่อการจัดกลุ่มชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ทั้ง 16 ไอโซเลต

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ด้วยลักษณะทางชีวโมเลกุลจากสายพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA

เมื่อนำชิ้นส่วนพันธุกรรมของเชื้อราเมตไรเซียมทั้ง 16 ไอโซเลตมาตรวจสอบชนิดของเชื้อรา พบว่าชิ้นส่วนพันธุกรรมครอบคลุมบางส่วนของ 18S ribosomal RNA gene ต่อเนื่องกับ internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2 และยาวต่อเนื่องครอบคลุมบางส่วนของ 28S ribosomal RNA gene จำนวนนิวคลิโอไทด์ทั้งหมดที่อ่านได้ชัดเจน 527 หน่วย

วิเคราะห์จำแนกสายพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA ของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่ผ่านการคัดเลือกเปรียบเทียบกับสายพันธุกรรมของเชื้อราเมตาไรเซียม ใน Genbank

ผลการเทียบเคียงลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมนิวคลิโอไทด์ของ18S rDNA ของเชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 16 ไอโซเลตกับข้อมูลในฐานข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าเชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 16 ไอโซเลต มีลำดับสารพันธุกรรมตรงกับ เชื้อราเมตาไรเซียมชนิด

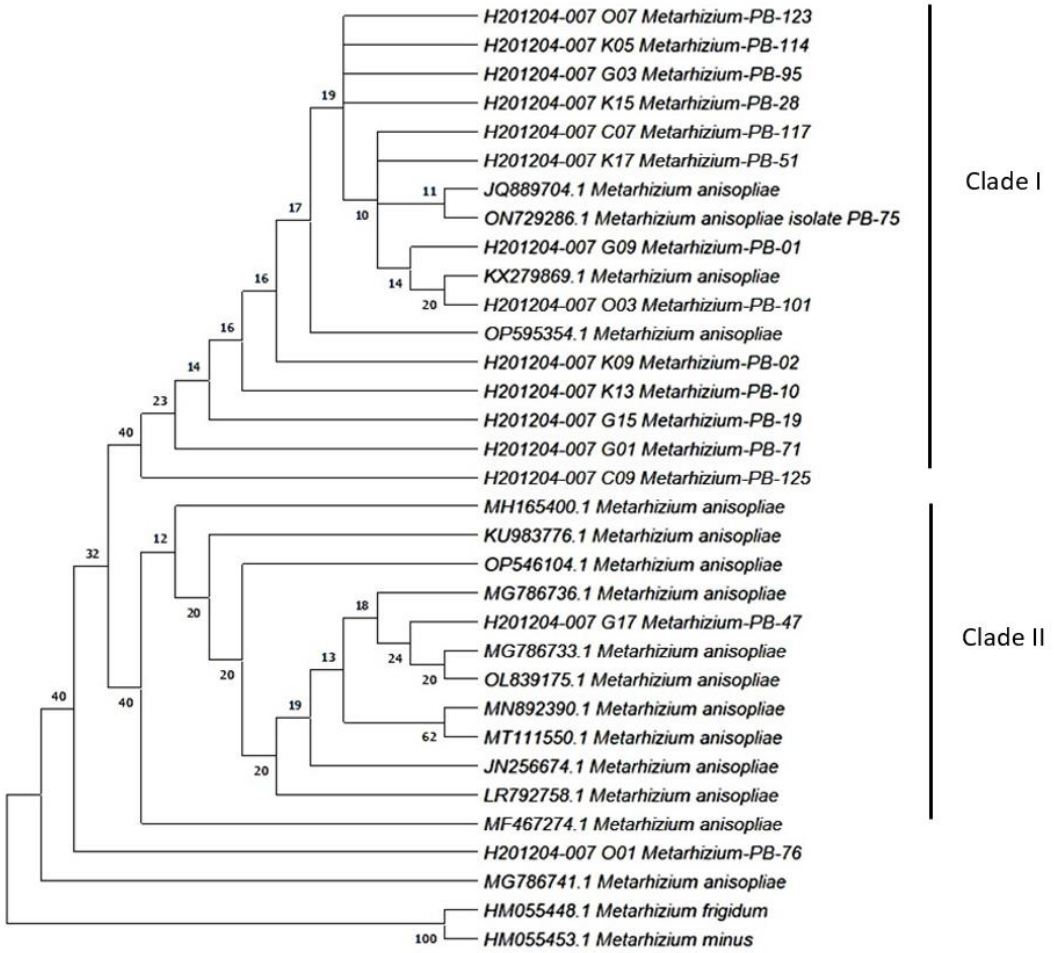
M. anisopliae (Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Clavicipitaceae; *Metarhizium*) โดยมีสัดส่วนความเหมือนตรงกัน (percent identical) สูงมากกว่า 99% ดังนั้น เชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 16 ไอโซเลตในการศึกษานี้จึงควรจัดเป็นชนิด *M. anisopliae*

วิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จากสายพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA ของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่ผ่านการคัดเลือก

ผลการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จากสายพันธุกรรม 18S rDNA ของเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต ร่วมกับสายพันธุกรรม 18S rDNA ของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีความใกล้ชิดจากข้อมูล Genbank จำนวน 16 สายพันธุ์ โดยมี สายพันธุกรรม 18S rDNA ของเชื้อรา *Metarhizium frigidum* HM055448.1 และ *Metarhizium minus* HM055453.1 เป็น outgroups เปรียบเทียบ พบว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นนั้นได้จัดกลุ่มของไอโซเลตเชื้อราเมตาไรเซียมที่ต้องการจัดจำแนกเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ใกล้ชิดซึ่งได้จาก Genbank แยกออกจาก เชื้อรา *M. frigidum* HM055448.1 และ *M. minus* HM055453.1 อย่างชัดเจนด้วย ค่า bootstrap รองรับ 100% นั้น โดยในกลุ่มของเชื้อราเมตาไรเซียม (ingroup) นั้น ได้วิวัฒนาการแยกออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรก เชื่อมต่อจาก outgroups ประกอบด้วย *M. anisopliae* MG786741.1 ซึ่งมีความใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-76 (H201204-007 O01) จากนั้นสายวิวัฒนาการได้แยกตัวและแบ่งกลุ่มเชื้อรา *M. anisopliae* ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 มีค่า bootstrap รองรับที่ 40% ประกอบด้วย *M. anisopliae* MH165400.1, KU983776.1, OP546104.1, LR792758.1, JN256674.1, MT111550.1, MN892390.1, OL839175.1, MG786733.1 และ MG786736.1 โดยมีเชื้อราเมตาไรเซียมไอโซเลต PB-47 รวมอยู่ในกลุ่มนี้และรวมเป็นกลุ่มย่อยขนาดเล็กที่มีความใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* OL839175.1, MG786733.1 และ MG786736.1 กลุ่มที่ 2 มีค่า bootstrap รองรับที่ 40% ประกอบด้วย *M. anisopliae* OP595354.1, KX279869.1, JQ889704.1 ร่วมกับเชื้อราเมตาไรเซียมไอโซเลต PB-125 (H201204-007 C09), PB-71 (H201204-007 G01), PB-19 (H201204-007 G15), PB-10 (H201204-007 K13), PB-02 (H201204-007 K09), PB-101 (H201204-007 O03), PB-01 (H201204-007 G09), PB-51 (H201204-007 K17), PB-117 (H201204-007 C07), PB-28 (H201204-007 K15), PB-95 (H201204-007 G03), PB-114 (H201204-007 K05), PB-123 (H201204-007 O07) และ PB75 (ON729286.1) และมีการรวมกลุ่มย่อยขนาดเล็กของ เชื้อราเมตาไรเซียมไอโซเลต PB-101 (H201204-007 O03), PB-01 (H201204-007 G09), PB-51 (H201204-007 K17), PB-117 (H201204-007 C07) ร่วมกับ JQ889704.1 และ KX279869.1 (ภาพ 8)

ทั้งนี้กลุ่มของเชื้อราไอโซเลตที่มีความใกล้ชิดกับเชื้อรา *M. anisopliae* ที่อ้างอิง พบว่าไอโซเลต PB-117, PB-51, PB-75, PB-01 และ PB-101 มีการรวมกลุ่มใกล้ชิดกับเชื้อรา *M. anisopliae*, JQ889704.1 และ KX279869.1 มาก โดย เชื้อรา *M. anisopliae* KX279869.1 ซึ่งเป็นเชื้อ *M. anisopliae* ที่มีข้อมูลจากฐานข้อมูลใน Genbank ระบุว่า ถูกคัดแยกได้จาก Peninsular Malaysia และมีศักยภาพในการลงทำลายปลวก *Coptotermes curvignathus* (Blattodea: Rhinotermitidae) ส่วน *M. anisopliae* JQ889704.1 นั้นระบุว่าคัดแยกได้จากป่าชายเลนของมณฑล ไหหนาน ของสาธารณรัฐประชาชนจีน และบันทึกข้อมูลลำดับรหัสดีเอ็นเอ 18S rDNA ไว้ใน ฐานข้อมูลของ Genbank แต่ยังไม่พบรายละเอียดของศักยภาพในการลงทำลายแมลงที่ชัดเจน

ในขณะที่ไอโซเลต PB-47 รวมเป็นกลุ่มย่อยที่มีความใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* OL839175.1, MG786733.1 และ MG786736.1 นั้นพบว่า OL839175.1 เป็นเชื้อ *M. anisopliae* จาก Center of Excellence for Olive Research and Training, Barani Agricultural Research Institute, Chakwal, Punjab, Pakistan เป็นผู้รายงานการค้นพบ ส่วน MG786733.1 และ MG786736.1 เป็นเชื้อ *M. anisopliae* จาก Centro de investigacion en biologia celulary molecular, University of Costa Rica, Ciudad de la investigacion, San Pedro, San Jose, Costa Rica ระบุว่าคัดแยกได้จากดินใน Costa Rica ซึ่งเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตนี้ได้บันทึกไว้ในฐานข้อมูลของ Genbank แต่ยังไม่พบรายละเอียดของศักยภาพในการลงทำลายแมลงที่ชัดเจน และในทำนองเดียวกันกับไอโซเลต PB-76 ที่มีความใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* MG786741.1 ซึ่งเป็นเชื้อ *M. anisopliae* คัดแยกได้จากดินใน Costa Rica



ภาพ 8 แผนภูมิต้นไม้ (ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแท็กซ่า) ตามการจัดตำแหน่งของ 18S rDNA ของเชื้อ Metarhizium 16 ไอโซเลต และ *Metarhizium anisopliae* ที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิด โดยมีเชื้อรานอกกลุ่ม 2 ชนิด คือ *Metarhizium frigidum* HM055448.1 และ *Metarhizium minus* HM055453.1 โดยการใช้วิธี bootstraps 1000 ซ้ำ ซึ่งได้จากการคำนวณระยะวิวัฒนาการด้วยเทคนิค P-distance โดยวิธีการของ Neighbor-Joining

ทดสอบความคงทนของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในดินที่อุณหภูมิสูง

การทดสอบความคงทนของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในดินที่อุณหภูมิสูงนั้นในการศึกษานี้พิจารณาจาก จำนวนของโคโลนีเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีชีวิตรอดในดินที่ผ่านการเก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิ 40, 45, และ 50 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน เป็นเกณฑ์ ซึ่งจากการทดลองพบว่าเชื้อราทุกไอโซเลตสร้างโคโลนีได้น้อยลงเมื่อผ่านระยะเวลาการบ่มเชื้อที่นานขึ้น โดยที่ระยะเวลา 7 วัน เชื้อราจะยังสามารถสร้างโคโลนีได้ดีในทุกช่วงอุณหภูมิ โดยไอโซเลตที่มีแนวโน้มในการสร้างโคโลนีได้ดีคือ PB-01, PB-02, PB-10, PB-19, PB-28, PB-75, PB-76, PB-95

และ PB-101 โดยเชื้อราไอโซเลตที่ยังสามารถสร้างโคโลนีได้สูงที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีเพียง 2 ไอโซเลต คือ PB-02 และ PB-75 เมื่อผ่านระยะเวลาการบ่มเชื้อเป็นเวลา 14 วัน พบว่าเชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-75 ยังคงมีแนวโน้มสามารถสร้างโคโลนีได้ดี โดยยังสามารถสร้างโคโลนีได้สูงที่สุดเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มเชื้อราครบ 21 วัน โดยมีรายละเอียดดังนี้

ที่ระยะเวลา 7 วันพบว่า จำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต ที่พบมีชีวิตรอดในแต่ระดับอุณหภูมิมีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับอุณหภูมิของการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น และในภาพรวมค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทุกไอโซเลตในแต่ละระดับอุณหภูมิมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จำนวนโคโลนีของเชื้อราที่พบจากแต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เชื้อราไอโซเลต PB-19 และ PB-28 มีจำนวนโคโลนีสูงที่สุด คือ $16.6x10^4$ และ $16.5x10^4$ CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาคือกลุ่มที่ 2 ได้แก่ เชื้อราไอโซเลต PB-01, PB-02, PB-10, PB-75, PB-76, PB-95, PB-101 และ PB-114 มีจำนวนโคโลนีของเชื้อรา อยู่ในช่วง 10.3 - $13.3x10^4$ CFU/ml กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 6.3-7.8 $x10^4$ CFU/ml ได้แก่ PB-47, PB-51, PB-71, PB-117 และ PB-123 ส่วนกลุ่มที่ 4 คือไอโซเลตที่สามารถสร้างโคโลนีได้น้อยที่สุด คือ PB-125 โดยสามารถสร้างโคโลนีเฉลี่ย 3.6 $x10^4$ CFU/ml

ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จำนวนโคโลนีของเชื้อราที่พบจากแต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 เชื้อราไอโซเลต PB-19 มีจำนวนโคโลนีสูงที่สุด คือ $14.7x10^4$ CFU/ml รองลงมาคือกลุ่มที่ 2 ได้แก่ เชื้อราไอโซเลต PB-02, PB-10, PB-28, PB-75, PB-76 และ PB-95 มีจำนวนโคโลนีของเชื้อรา อยู่ในช่วง 7.5 - $10.8x10^4$ CFU/ml กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 3.5-5.5 $x10^4$ CFU/ml ได้แก่ PB-01, PB-47, PB-53, PB-71 PB-101, PB-114, PB-117 และ PB-123 ส่วนกลุ่มที่ 4 คือ ไอโซเลตที่สามารถสร้างโคโลนีได้น้อยที่สุด คือ PB-125 โดยสามารถสร้างโคโลนีเฉลี่ย 2.6 $x10^4$ CFU/ml ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จำนวนโคโลนีของเชื้อราที่พบจากแต่ละไอโซเลตมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สามารถแบ่งกลุ่มการสร้างโคโลนีของเชื้อราออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 นั้นเป็นกลุ่มที่สามารถสร้างโคโลนีเฉลี่ยสูงที่สุด $9.4x10^4$ CFU/ml ได้แก่เชื้อราไอโซเลต PB-75 และ รองลงมา คือ กลุ่มที่ 2 ได้แก่เชื้อราไอโซเลต PB-02, PB-19 และ PB-28 ซึ่งสามารถสร้างโคโลนีเฉลี่ยต่ำสุดที่ 7.5-$8.5x10^4$ CFU/ml กลุ่มที่ 3 คือไอโซเลตที่สามารถสร้างโคโลนีเฉลี่ยระหว่าง 4.0-$6.6x10^4$ CFU/ml ได้แก่ PB-10, PB-47, PB-71, PB-76, PB-95 และ PB-101 กลุ่มที่ 4 คือเชื้อไอโซเลตที่สร้างโคโลนีระหว่าง 2.7-$3.2x10^4$ CFU/ml ได้แก่ PB-51,

PB-114, PB-117 และ PB-123 ส่วนกลุ่มที่ 5 คือกลุ่มที่สามารถสร้างโคโลนีเฉลี่ยได้น้อยที่สุด คือ PB-01 และ PB-125 ซึ่งสามารถสร้างโคโลนีเฉลี่ยได้ $0.9x10^4$ และ $1.9x10^4$ CFU/ml ตามลำดับ (ตาราง 8)

ตาราง 8 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต หลังบ่มเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 7 วัน

ไอโซเลต	จำนวนโคโลนี[1] (CFUx10^4)/ml/อุณหภูมิ (°C)		
	40	45	50
PB-01	13.3abc	4.3bc	0.9e
PB-02	10.5abcd	9.1abc	8.5ab
PB-10	12.6abc	8.0abc	6.3abcd
PB-19	16.6a	14.7a	7.5abc
PB-28	16.5a	7.8abc	7.5abc
PB-47	7.6bcd	5.5bc	4.0abcd
PB-51	6.3cd	5.3bc	3.2bcd
PB-71	7.8bcd	6.8bc	5.6abcd
PB-75	14.3ab	10.8ab	9.4a
PB-76	11.1abcd	7.5abc	6.4abcd
PB-95	12.6abc	8.4abc	5.6abcd
PB-101	10.3abcd	5.3bc	5.3abcd
PB-114	10.4abcd	3.8bc	3.1bcd
PB-117	7.0bcd	4.0bc	3.0bcd
PB-123	7.5bcd	3.5bc	2.7bcd
PB-125	3.6d	2.6c	1.9d

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's new multiple range test, $p<0.05$)

ส่วนที่ระยะเวลา 14 วันพบว่า จำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต ที่พบมีชีวิตรอดในแต่ระดับอุณหภูมิมีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับอุณหภูมิของการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น และในภาพรวมค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทุกไอโซเลตในแต่ละระดับอุณหภูมิมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียกับที่ 7 วัน

ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จำนวนโคโลนีของเชื้อรามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เชื้อราไอโซเลต PB-28 และ PB-75 มีจำนวนโคโลนีสูงที่สุด คือ 11.2x10^4 และ 13.5x10^4 CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาคือกลุ่มที่ 2 ได้แก่ เชื้อราไอโซเลต PB-02, PB-76 และ PB-95 มีจำนวนโคโลนีของเชื้อรา 8.0 – 9.7 x10^4 CFU/ml กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มที่มีจำนวนโคโลนีไม่ถึง 5.1-6.7 x10^4 CFU/ml ได้แก่ PB-71, PB-101, PB-114, PB-117 และ PB-123 และกลุ่มที่ 4 คือไอโซเลตที่สามารถสร้างโคโลนีในช่วง 3.3-3.5 x10^4 CFU/ml ได้แก่ ไอโซเลต PB-01 และ PB-47 ส่วนกลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มที่สามารถสร้างโคโลนีได้น้อยที่สุด ได้แก่ PB-19, PB-51 และ PB-125 สามารถสร้างโคโลนีในช่วง 1.8-2.2 x10^4 CFU/ml

ที่อุณหภูมิ 45 พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อรามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม เชื้อราไอโซเลต PB-02, PB-75 และ PB-95 มีจำนวนโคโลนีสูงที่สุด คือ 7.7x10^4, 8.7x10^4 และ 6.3x10^4 CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาคือกลุ่มที่ 2 ได้แก่ เชื้อราไอโซเลต PB-28, PB-71, PB-114, PB-117 และ PB-123 มีจำนวนโคโลนีของเชื้อราอยู่ในช่วง 2.8 - 4.8x10^4 CFU/ml กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มที่มีจำนวนโคโลนีน้อยที่สุด คือช่วง 0.1-2.3 x10^4 CFU/ml ได้แก่ PB-01, PB-10, PB-19, PB-47, PB-51, PB-76, PB-101 และ PB-125 ตามลำดับ ที่อุณภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อรามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สามารถแบ่งกลุ่มการสร้างโคโลนีของเชื้อราออกเป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจน คือ กลุ่มที่ 1 นั้นเป็นกลุ่มที่สามารถสร้างโคโลนีเฉลี่ย 6.4x10^4 CFU/ml ได้แก่เชื้อราไอโซเลต PB-75 และกลุ่มที่ 2 เชื้อราไอโซเลต PB-02 สร้างโคโลนีเฉลี่ย 4.7x10^4 CFU/ml กลุ่มที่ 3 ได้แก่ไอโซเลตที่สามารถสร้างโคโลนีอยู่ในช่วง 2.3-3.1x10^4 CFU/ml คือไอโซเลต PB-28, PB-71, PB-117 และ PB-123 และกลุ่มที่ 3 สามารถสร้างโคโลนีเฉลี่ยต่ำสุดที่ 0.8-1.8x10^4 CFU/ml ได้แก่เชื้อราไอโซเลต PB -01, PB -10, PB -19, PB -47, PB -51, PB -76, pH-95, PB -101, PB -114 และ PB-125 โดยเชื้อราไอโซเลต PB-75 มีแนวโน้มการเจริญเติบโตที่ดีในสภาวะอุณหภูมิสูง (ตาราง 9)

ตาราง 9 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต หลังบ่อเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 14 วัน

ไอโซเลต	จำนวนโคโลนี[1] (CFUx10^4)/ml/อุณหภูมิ (°C)		
	40	45	50
PB-01	3.5efg	1.0e	0.8e
PB-02	8.5abcd	7.7a	4.7b
PB-10	2.5fg	2.0cd	1.8cde
PB-19	1.8g	1.7cde	1.5de
PB-28	11.2ab	4.8ab	2.3cd
PB-47	3.3efg	1.3de	0.9e
PB-51	1.9g	1.7cde	1.6de
PB-71	5.5cde	4.6ab	3.1c
PB-75	13.5a	8.7a	6.4a
PB-76	9.7abc	2.3cd	1.4de
PB-95	8.0abcd	6.3a	1.4de
PB-101	6.7bcde	2.0cd	1.2de
PB-114	5.7bcde	3.3bc	1.7de
PB-117	5.6bcde	3.1bc	2.5cd
PB-123	5.1cbde	2.8bc	2.4cd
PB-125	2.2fg	2.1cd	1.6de

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's new multiple range test, $p<0.05$)

ส่วนที่ระยะเวลา 21 วันพบว่า จำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต ที่พบมีชีวิตรอดในแต่ระดับอุณหภูมิมีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับอุณหภูมิของการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น และในภาพรวมค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากทุกไอโซเลตในแต่ละระดับอุณหภูมิมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับที่ 7 และ 14 วัน

ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจำนวนโคโลนีของเชื้อรามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-75 มีจำนวนโคโลนีสูงที่สุด คือ 8.4x10^4 และ 8.6x10^4 CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาคือกลุ่มที่ 2 ได้แก่ เชื้อราไอโซเลต PB-28, PB-76, PB-101, PB-114 และ PB-117 มีจำนวนโคโลนีของเชื้อรา

อยู่ในช่วง 2 - 2.3x10^4 CFU/ml กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มที่มีจำนวนโคโลนีไม่ถึง 2 x10^4 CFU/ml ได้แก่ PB-01, PB-10, PB-19, PB-47, PB-51, PB-71, PB-95, PB-123 และ PB-125

ที่อุณหภูมิ 45 พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อรามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม เชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-75 มีจำนวนโคโลนีสูงที่สุด คือ 5.7x10^4 และ 4.4x10^4 CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาคือกลุ่มที่ 2 ได้แก่ เชื้อราไอโซเลต PB-01, PB-10, PB-19, PB-28, PB-47, PB-71, PB-76, PB-95, PB-101, PB-114, PB-117 และ PB-123 มีจำนวนโคโลนีของเชื้อรา อยู่ในช่วง 0.4 - 1.4x10^4 CFU/ml กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มที่มีจำนวนโคโลนีน้อยที่สุด คือ 0.1 x10^4 CFU/ml และ 0.3 x10^4 CFU/ml ได้แก่ PB-51 และ PB-125 ตามลำดับ

ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อรามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สามารถแบ่งกลุ่มการสร้างโคโลนีของเชื้อราออกเป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจน คือ กลุ่มที่ 1 นั้นเป็นกลุ่มที่สามารถสร้างโคโลนีเฉลี่ย 3.8x10^4 - 3.9x10^4 CFU/ml ได้แก่เชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-75 และกลุ่มที่ 2 เชื้อราไอโซเลต PB-01, PB-10, PB-19, PB-28, PB-47, PB-51, PB-71, PB-76, PB-95, PB-101, PB-114, PB-117 PB-123 และ PB-125 ซึ่งสามารถสร้างโคโลนีเฉลี่ยต่ำสุดที่ 0.1-0.3x10^4 CFU/ml และกลุ่มที่ 3 พบว่าเชื้อราไอโซเลต PB-125 ไม่สามารถสร้างโคโลนีหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 21 วัน โดยเชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-75 มีแนวโน้มการเจริญเติบโตที่ดีในสภาวะอุณหภูมิสูง (ตาราง 10)

ตาราง 10 จำนวนโคโลนีของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต หลังบ่มเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 21 วัน

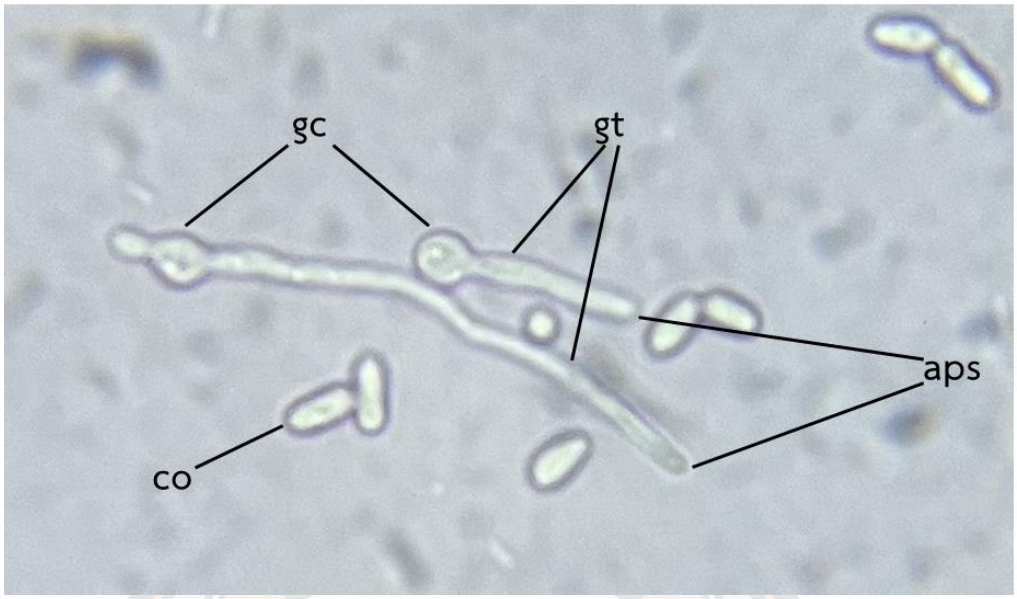
ไอโซเลต	จำนวนโคโลนี[1] (CFUx10^4)/ml/อุณหภูมิ (°C)		
	40	45	50
PB-01	0.8bcd	0.8bcd	0.2bcd
PB-02	8.4a	5.7a	3.8a
PB-10	0.7bcd	0.7bcd	0.1bcd
PB-19	0.5bcd	0.5bcd	0.2bcd
PB-28	2.1bc	0.5cd	0.2bcd
PB-47	0.5cd	0.4de	0.1bcd
PB-51	0.2d	0.1e	0.1bcd
PB-71	1.3bcd	0.5bcd	0.2bcd
PB-75	8.6a	4.4a	3.9a

ไอโซเลต	จำนวนโคโลนี[1] (CFUx10^4)/ml/อุณหภูมิ (°C)		
	40	45	50
PB-76	2.0bc	1.0bc	0.2cbd
PB-95	1.9bcd	1.3bc	0.3b
PB-101	2.1bc	0.6bcd	0.1bcd
PB-114	2.0bc	0.6bcd	0.3c
PB-117	2.3b	1.4b	0.2bcd
PB-123	0.6bcd	0.5bcd	0.1bcd
PB-125	0.5cd	0.3de	0.0e

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's new multiple range test, $p<0.05$)

ทดสอบการเจริญของเชื้อราต่อสภาพความเป็นกรดด่าง ในห้องปฏิบัติการ

จากผลการคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium anisopliea* จำนวน 16 ไอโซเลตต่อสภาพภาพการเก็บในดินที่มีอุณหภูมิสูงนั้นพบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลตเท่านั้นคือ PB-02 และ PB-75 ที่มีแนวโน้มของความมีชีวิตและคงทนในทุกช่วงอุณหภูมิสูงของการทดสอบที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้คัดเลือกทั้ง 2 ไอโซเลตสำหรับทดสอบการเจริญของเชื้อราในสภาพแวดล้อมคืออาหารเลี้ยงที่มีความเป็นกรดด่างในช่วง pH ที่ 4-9 ในห้องปฏิบัติที่ระยะเวลา บ่มเชื้อ 16 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่า โคนิเดียของเชื้อรา ทั้ง 2 ไอโซเลตเจริญงอกเป็นเส้นใยที่เรียกว่า germ tube ยื่นออกมาจากปลายของโคนิเดีย (germinating conidium) โดยส่วนปลายของ germ tube มีลักษณะหนา (appressorium-like structure) (ภาพ 9)



ภาพ 9 ลักษณะการงอกของโคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 และ PB-75; germinating conidium (gc), germ tube (gt), appressorium (aps), conidium (co)

อัตราการงอกของโคนิเดียมีความแตกต่างไปตามระดับของความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% รวมทั้งยังพบว่ารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของอัตราการงอกของโคนิเดียของเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลตที่ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงในระดับต่าง ๆ มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนด้วยเช่นกัน โดยอัตราการงอกของโคนิเดียเชื้อราไอโซเลต PB-02 มีค่าต่ำสุดที่ระดับ pH 4 คือร้อยละ 16.67 และอัตราการงอกเปลี่ยนแปลงเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นร้อยละ 28.00, 31.67, 45.67,46.67 และ57.57 เมื่อระดับ pH มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเป็น 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์สมการความสัมพันธ์พบว่าอัตราการงอกมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงภายใต้สมการความสัมพันธ์

$$y = 7.8431x - 13.272$$

เมื่อ Y คืออัตราการงอกของโคนิเดีย (ร้อยละ)

X คือค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

โดยค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (pH) มีอิทธิพลต่ออัตราการงอกของโคนิเดียสูงถึง ร้อยละ 96.85 ($R^2 = 0.9685$)

ในขณะที่ไอโซเลต PB-75 พบอัตราการงอกของโคนิเดียอยู่ในระดับที่สูงกว่าที่พบในไอโซเลต PB-02 ในทุกระดับของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยที่ ระดับ pH 4 มีอัตราการงอกของโคนิเดียที่ร้อยละ 23.09 เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น pH 5 อัตราการงอกของโคนิเดียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นร้อยละ 55.33 จากนั้นพบการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในช่วงร้อยละ 53.33-61.66 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ pH 6-9 และเมื่อวิเคราะห์แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงด้วยสมการความสัมพันธ์พบว่ามีรูปแบบเป็นโพลี่โนเมียลภายใต้สมการ

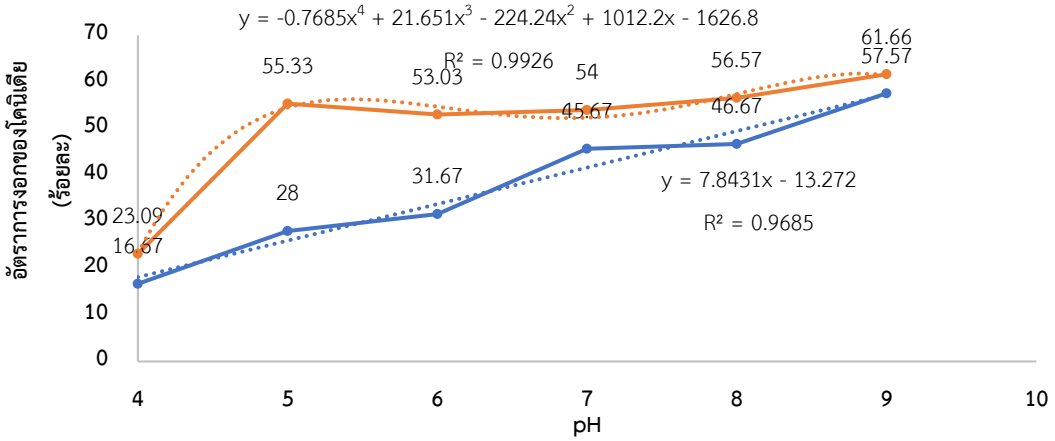
$$y = -0.7685x^4 + 21.651x^3 - 224.24x^2 + 1012.2x - 1626.8$$

โดยความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่ออัตราการงอกของโคนิเดียเชื้อราภายใต้สมการสูงถึงร้อยละ 99.26 ($R^2 = 0.9926$) (ตาราง 11 และ ภาพ 10)

ตาราง 11 อัตราการงอกของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 และ PB-75 ที่ระดับ pH ต่างกันหลังบ่มเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง

pH	อัตราการงอก[1] (%)	
	PB-02	PB-75
4	16.67[d]	23.09[c]
5	28.00[c]	55.33[b]
6	31.67[c]	53.03[b]
7	45.67[b]	54.00[b]
8	46.67[b]	56.57[b]
9	57.57[a]	61.66[a]

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's new multiple range test, $p<0.05$)



ภาพ 10 การเปลี่ยนแปลงของอัตราการงอกของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) และ PB-75 (เส้นกราฟสีส้ม) ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4-9 หลังบ่มเป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง

ในส่วนของผลการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อราจากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่ระยะเวลา 1-12 วัน พบว่า

เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 สามารถเจริญสร้างเส้นใยขยายออกจากแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นได้ในทุกระดับของความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีความแตกต่างไปตามระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ในทุกวันที่ทำการบันทึกผล

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 1 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 0.73, 0.76 และ 0.75 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 0.56 เซนติเมตร ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยแต่มีการขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 0.5 เซนติเมตร เท่ากัน

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 2 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 1.28 และ 1.3 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 และ pH 7 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 0.66 และ 0.89 เซนติเมตร ตามลำดับ ทั้งนี้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 0.72 และ 0.57 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 3 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 1.78 และ 1.83 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 และ pH 7 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 1.61 และ 1.64 เซนติเมตร ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 1.27 และ 1.24 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 4 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 9 เฉลี่ย 2.42 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6, pH 7 และ pH 8 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 2.23, 2.35 และ 2.33 เซนติเมตร ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 1.63 และ 1.83 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 5 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 3.44, 2.98 และ 3.13 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 2.73 เซนติเมตร ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 1.8 และ 2.18 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 6 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7 เฉลี่ย 4.15 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6, pH 8 และ pH 9 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 3.19, 3.39 และ 3.61 เซนติเมตร ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 2.24 และ 2.53 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 7 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 4.55, 4.29 และ 4.13 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 3.55 เซนติเมตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 2.52 และ 2.86 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 8 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 4.97, 4.76 และ 4.61 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 4.04 เซนติเมตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 2.89 และ 3.23 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 9 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 5.39, 5.14 และ 5.18 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 4.52 เซนติเมตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 3.20 และ 3.58 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 10 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 5.91, 5.65 และ 5.64 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 5.02 เซนติเมตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 3.59 และ 4.15 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 11 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 6.45, 6.13 และ 6.23 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 5.37 เซนติเมตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 3.95 และ 4.47 เซนติเมตร ตามลำดับ

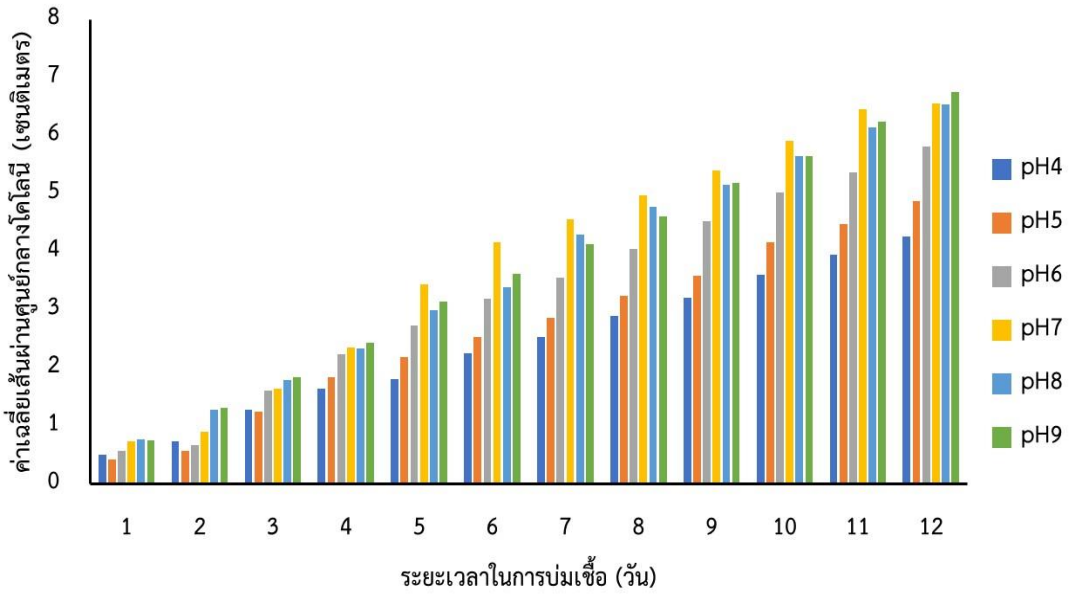
ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 12 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 6.55, 6.54 และ 6.74 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 5.81 เซนติเมตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 และ pH 5 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 4.25 และ 4.87 เซนติเมตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าที่ pH 7 pH 8 และ pH 9 มีแนวโน้มทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อรา ไอโซเลต PB-02 เจริญเติบโตได้ดีตลอดระยะเวลาของการบ่มเชื้อ (ตาราง 12)

ตาราง 12 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ที่ระดับ pH ต่างกันหลังบ่มเป็นระยะเวลา 1-12 วัน

pH	อัตราการเจริญของเชื้อรา[1] (เซนติเมตร)/วัน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4	0.5c	0.72bc	1.27c	1.63d	1.8c	2.24c	2.52c	2.89c	3.20c	3.59c	3.95c	4.25c
5	0.5c	0.57c	1.24c	1.83c	2.18c	2.53c	2.86c	3.23c	3.58c	4.15c	4.47c	4.87c
6	0.56bc	0.66bc	1.61b	2.23b	2.73b	3.19b	3.55b	4.04b	4.52b	5.02b	5.37b	5.81b
7	0.73ab	0.89b	1.64b	2.35ab	3.44a	4.15a	4.55a	4.97a	5.39a	5.91a	6.45a	6.55ab
8	0.76a	1.28a	1.78ab	2.33ab	2.98ab	3.39b	4.29a	4.76a	5.14ab	5.65ab	6.13a	6.54ab
9	0.75a	1.3a	1.83a	2.42a	3.13ab	3.61ab	4.13ab	4.61ab	5.18ab	5.64ab	6.23a	6.74a

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's new multiple range test, $p<0.05$)

การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลต PB-02 มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุกระดับ pH โดยแบ่งระดับการเจริญเติบโตได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ที่ระดับ pH 7, pH 8 และ pH 9 เชื้อรามีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในทุกระยะการบ่มเชื้อ กลุ่มที่ 2 คือ ที่ระดับ pH 6 พบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตรองลงมาจากกลุ่มที่ 1 ในทุกระยะการบ่มเชื้อ และกลุ่มที่ 3 ที่ระดับ pH 4 และ pH 5 มีการเจริญเติบโตของเชื้อน้อยที่สุดในทุกระยะการบ่มเชื้อ (ภาพ 11)



ภาพ 11 อัตราการเจริญของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่ระยะเวลา 1-12 วัน

เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 สามารถเจริญสร้างเส้นใยขยายออกจากแผ่นอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นได้ในทุกระดับของความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีความแตกต่างไปตามระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ในทุกวันที่ทำการบันทึกผล

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 1 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 0.71, 0.80 และ 0.78 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4, pH 5 และ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 0.63, 0.63 และ 0.66 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 2 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 1.35, 1.27 และ 1.35 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4, pH 5 และ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 0.82, 0.73 และ 0.69 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 3 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 9 เฉลี่ย 1.83 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7 และ pH 8 และ มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 1.72 และ 1.68 เซนติเมตร ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4, pH 5 และ pH 6 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 1.21, 1.37 และ 1.51 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 4 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 9 เฉลี่ย 2.45 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7 และ pH 8 และ มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 2.32 และ 2.33 เซนติเมตร ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4, pH 5 และ pH 6 พบการเจริญของเส้นใยขยายออกน้อยที่สุด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 1.51, 1.9 และ 2.15 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 5 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 9 เฉลี่ย 3.18 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 7 และ pH 8 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 2.82 และ 2.89 เซนติเมตร ตามลำดับ ตามด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 5 และ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 2.56 และ 2.59 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี น้อยที่สุด เฉลี่ยที่ 1.70 เซนติเมตร ตามลำดับ

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 6 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 9 เฉลี่ย 3.70 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 8 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 3.44 เซนติเมตร ตามด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 5, pH 6 และ pH 7 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 3.26, 3.14 และ 3.32 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 พบมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแคบที่สุด 2.21 เซนติเมตร

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 7 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 9 เฉลี่ย 4.26 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 8 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 3.94 เซนติเมตร ตามด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 5, pH 6 และ pH 7 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 3.73, 3.64 และ 3.81 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 พบมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแคบที่สุด 2.51 เซนติเมตร

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 8 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 4.72 และ 4.83 เซนติเมตร รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 5 และ pH 7 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 4.38 และ 4.38 เซนติเมตร ตามด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 4.02 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 พบมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีแคบที่สุด 2.75 เซนติเมตร

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 9 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 5, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 5.27, 5.33 และ 5.40 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 และ pH 7 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 4.47 และ 4.85 เซนติเมตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 5 พบมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 3.05 เซนติเมตร

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 10 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 5, pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 5.83, 5.42, 5.78 และ 5.81 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 4.99 เซนติเมตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 พบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 3.25 เซนติเมตร

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 11 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 5, pH 7, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 6.43, 5.78, 6.33 และ 6.36 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 6 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 5.48 เซนติเมตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 พบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 3.77 เซนติเมตร

ภายหลังบ่มเชื้อราได้ 12 วัน พบว่า การเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ขยายออกและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างที่สุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 5, pH 8 และ pH 9 เฉลี่ย 6.49, 6.87 และ 6.88 เซนติเมตร ตามลำดับ รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ

pH 6 และ pH 7 มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 5.88 และ 5.93 เซนติเมตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH 4 พบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยที่ 4.02 เซนติเมตร

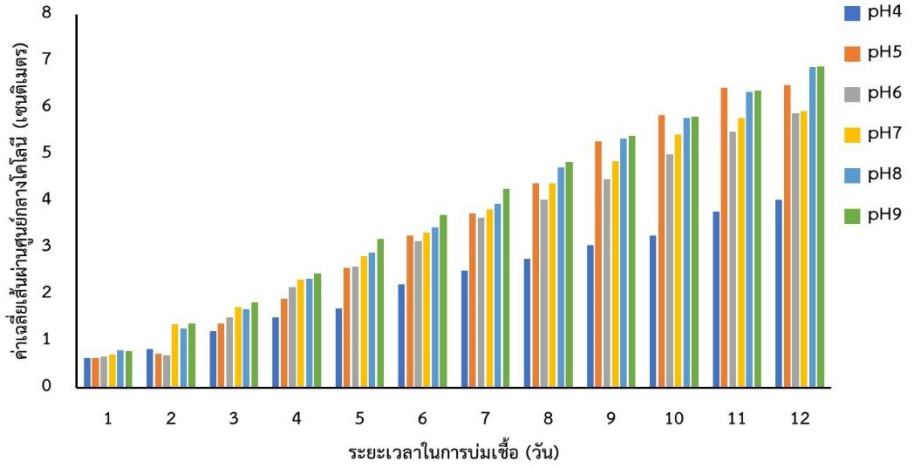
จากผลการทดลองพบว่าที่ pH 8 และ pH 9 มีแนวโน้มทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 เจริญเติบโตได้ดีตลอดระยะเวลาของการบ่มเชื้อ (ตาราง 13)

ตาราง 13 การเจริญเติบโตของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่ระดับ pH ต่างกันหลังบ่มเป็นระยะเวลา 1-12 วัน

pH	อัตราการเจริญของเชื้อรา[1] (เซนติเมตร)/วัน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
4	0.63c	0.82b	1.21d	1.51e	1.7d	2.21d	2.51d	2.75d	3.05d	3.25c	3.77c	4.02c
5	0.63c	0.73b	1.37c	1.9d	2.56c	3.26bc	3.73bc	4.38ab	5.27ab	5.83a	6.43a	6.49ab
6	0.66bc	0.69b	1.51c	2.15c	2.59c	3.14c	3.64c	4.02c	4.47c	4.99b	5.48b	5.88b
7	0.71abc	1.35a	1.72ab	2.32b	2.82b	3.32bc	3.81bc	4.38ab	4.85bc	5.42ab	5.78ab	5.93b
8	0.8a	1.27a	1.68b	2.33b	2.89b	3.44b	3.94b	4.72a	5.33ab	5.78a	6.33a	6.87a
9	0.78ab	1.37a	1.83a	2.45a	3.18a	3.7a	4.26a	4.83a	5.4a	5.81a	6.36a	6.88a

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan’s new multiple range test, $p<0.05$)

การเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลต PB-75 มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุกระดับ pH โดยแบ่งระดับการเจริญเติบโตได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ที่ระดับ pH 5, pH 8 และ pH 9 เชื้อรามีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในทุกระยะการบ่มเชื้อ กลุ่มที่ 2 คือ ที่ระดับ pH 6 และ pH 7 พบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตรองลงมา ในทุกระยะการบ่มเชื้อ และกลุ่มที่ 3 ที่ระดับ pH 4 มีการเจริญเติบโตของเชื้อน้อยที่สุดในทุกระยะการบ่มเชื้อ (ภาพ 12)



ภาพ 12 อัตราการเจริญของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่ระยะเวลา 1-12 วัน

อัตราการเจริญของเชื้อราโดยประเมินจากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 และ PB-75 ที่ระยะเวลา 12 วัน มีแนวโน้มขยายเพิ่มขึ้นเมื่อระดับของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้น มีการเจริญขยายขนาดโคโลนีสูงสุดที่ระดับ pH 9 โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของ เชื้อราไอโซเลต PB-02 มีขนาดเล็กที่สุด 4.25 เซนติเมตรที่ pH ของอาหารเลี้ยงที่ระดับ 4 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเปลี่ยนแปลงเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็น 4.87, 5.81, 6.55, 6.54 และ 6.74 เมื่อระดับ pH มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเป็น 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์สมการความสัมพันธ์พบว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงขนาดของโคโลนีมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงภายใต้สมการความสัมพันธ์

$$y = 0.52x + 2.4133$$

เมื่อ Y คือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา (เซนติเมตร)

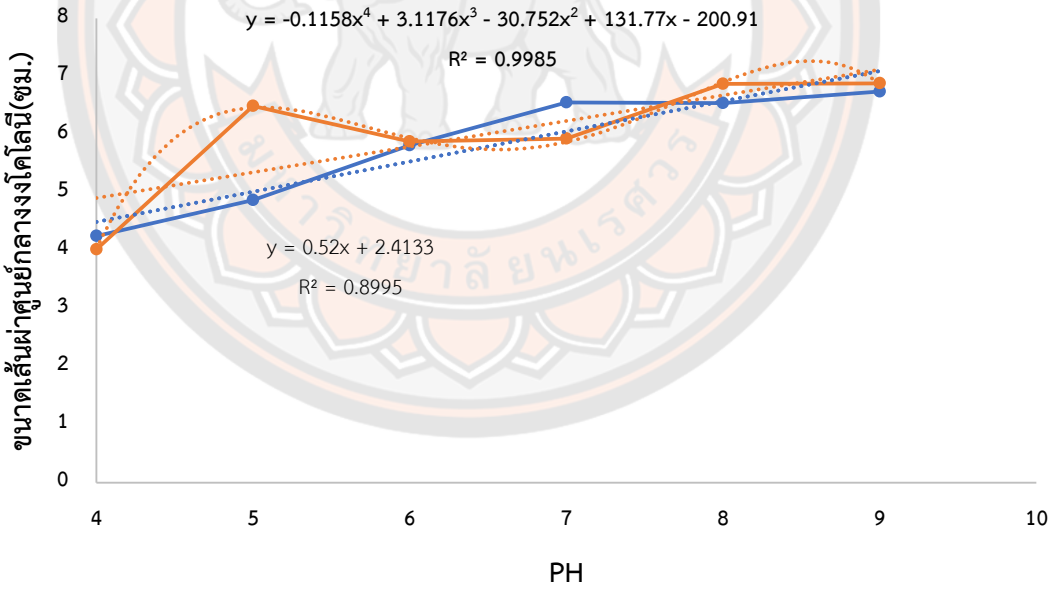
X คือค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

โดยค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (pH) มีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราสูงถึงร้อยละ 89.95 (R^2 = 0.8995)

ในขณะที่ไอโซเลต PB-75 พบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมีขนาดเล็กที่สุด 4.02 เซนติเมตรที่ pH ของอาหารเลี้ยงที่ระดับ 4 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเปลี่ยนแปลงเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็น 6.49, 5.88, 5.93, 6.87 และ 6.88 เมื่อระดับ pH มีค่าเพิ่มสูงขึ้นเป็น 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์สมการความสัมพันธ์พบว่าอัตราการเปลี่ยนแปลงขนาดของโคโลนีมีความสัมพันธ์แบบโพลีโนเมียลกับระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงภายใต้สมการความสัมพันธ์

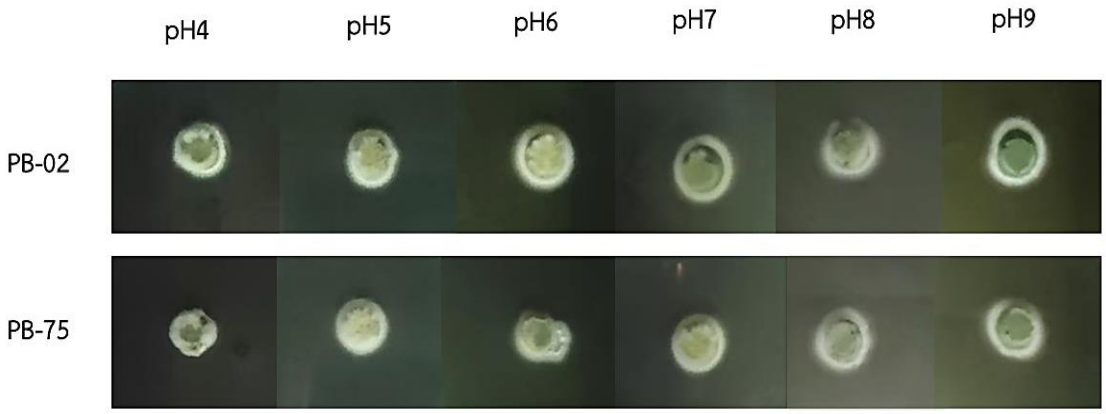
$$y = -0.1158x^4 + 3.1176x^3 - 30.752x^2 + 131.77x - 200.91$$

โดยความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราภายใต้สมการสูงถึงร้อยละ 99.85 (R^2 = 0.9985) (ภาพ 13)



ภาพ 13 การเปลี่ยนแปลงของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) และ PB-75 (เส้นกราฟสีส้ม) ที่ระดับ pH 4-9 หลังบ่มเป็นระยะเวลา 12 วัน

ลักษณะของเชื้อราการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ระดับ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่ระยะเวลา 1-12 วัน ของทั้ง 2 ไอโซเลต พบว่าเชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวขยายเป็นวงรอบ ๆ โคโลนี และเริ่มสร้างโคนิเดียสีเขียวจากบริเวณกลางโคโลนีขยายออกรอบ ๆ ในทุกระดับ pH โดยที่ระดับ pH 9 นั้นพบว่าบริเวณรอบ ๆ สามารถสร้างโคนิเดียสีเขียวได้เต็มโคโลนีภายในระยะเวลา 12 วัน (ภาพ 14)



ภาพ 14 ลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-02 และ PB-75 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงที่ระดับ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ที่ระยะเวลา 12 วันหลังการเพาะเชื้อ

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลตจากผลการศึกษาอัตราการงอกของโคนิเดีย ที่ 16 ชั่วโมง และผลศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อที่ 12 วันภายใต้อาหารเลี้ยงเชื้อราที่มีสภาพความเป็นกรด-ด่างในระดับต่าง ๆ 6 ระดับคือ 4, 5, 6, 7, 8, และ 9 พบว่าเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลต มีอัตราการงอกของโคนิเดียและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของทั้ง 2 ไอโซเลตที่ pH 9 มีความแตกต่างกันน้อยมาก แต่อย่างไรก็ตามที่ pH 5 เชื้อราไอโซเลต PB-75 มีแนวโน้มของศักยภาพที่สูงกว่ามาก โดยอัตราการงอกของโคนิเดียร้อยละ 55.33 สูงว่าที่พบจากเชื้อราไอโซเลต PB-02 ซึ่งอัตราการงอกร้อยละ 28.0 นอกจากนี้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีวัดได้ 6.49 เซนติเมตร มีแนวโน้มการเจริญได้ดีกว่าเชื้อราไอโซเลต PB-02 ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 4.87 เซนติเมตร เท่านั้น ดังนั้น จึงได้คัดเลือกเชื้อราไอโซเลต PB-75 สำหรับพัฒนาต่อยอดเป็นสูตรผสมต่อไป

พัฒนาสารชีวภัณฑ์เบื้องต้นชนิดผงจากเชื้อรา *Metarhizium* spp.

ผลการทดสอบ ความมีชีวิตรอดของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับ ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30, 60 และ 90 วัน

ที่ระยะเวลา 30 วัน พบว่า เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่เก็บรักษาไว้ในสารพา pumice: potassium humate (90:10) สามารถสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงที่สุด คือ 4.66×10^2 CFU/ml รองลงมา คือ สารพา kaolin: potassium humate (90:10) และ kaolin สามารถสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 2.66×10^2 และ 3.30 x 10 CFU/ml ตามลำดับ ส่วนเชื้อราที่เก็บรักษาในสารพา pumice และ diatomaceous earth ไม่สามารถสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้

ที่ระยะเวลา 60 วัน พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ในสารพา pumice: potassium humate (90:10) สามารถสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงที่สุด คือ 3.33×10^2 CFU/ml รองลงมา คือ สารพา kaolin: potassium humate (90:10) และ kaolin สามารถสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 2.00×10^2 และ 2.33 x 10 CFU/ml ตามลำดับ ส่วนเชื้อราที่เก็บรักษาในสารพา pumice และ diatomaceous earth ไม่สามารถสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้

หลังบ่มเชื้อที่ระยะเวลา 90 วัน พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่ถูกเก็บรักษาไว้ในสารพา pumice: potassium humate (90:10) สามารถสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้สูงที่สุด คือ 1.33×10^2 CFU/ml รองลงมา คือ สารพา kaolin: potassium humate (90:10) และ kaolin สามารถสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 3.20 x 10 และ 1.30 x10 CFU/ml ตามลำดับ ส่วนเชื้อราที่เก็บรักษาในสารพา pumice และ diatomaceous earth ไม่สามารถสร้างโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (ตาราง 14)

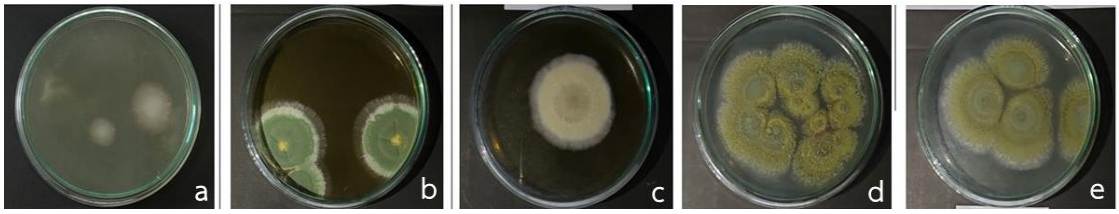
ตาราง 14 จำนวนโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่เก็บรักษาในสารพา 5 สูตร ที่ระยะเวลา 30, 60 และ 90 วัน

สูตรสารพา	จำนวนโคโลนีของเชื้อราที่ระยะเวลา[1] (วัน)		
	30	60	90
Pumice	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{c}
Kaolin	3.30×10^{b}	2.33×10^{c}	1.30×10^{b}
Diatomaceous earth	0.00^{c}	0.00^{d}	0.00^{c}
Pumice: Potassium humate (90:10)	4.66×10^{2a}	3.33×10^{2a}	1.33×10^{2a}
Kaolin: Potassium humate (90:10)	2.66×10^{2a}	2.00×10^{2b}	3.20×10^{b}

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's new multiple range test, $p<0.05$)

ลักษณะโคโลนีที่เกิดใหม่ของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 มีเส้นใยสีขาวเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวคล้ำ โคโลนีขึ้นเป็นจุด กระจายตัวทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยเชื้อราที่เก็บรักษาในสารพา pumice และ diatomaceous earth ไม่สามารถสร้างโคโลนีได้หลังบ่มเชื้อที่ ระยะเวลา 30, 60 และ 90 วัน ส่วนเชื้อราที่เก็บรักษาในสารพา kaolin สามารถสร้างโคโลนีมีลักษณะกลม สร้างเส้นใยสีขาวแผ่กระจาย และสร้างโคนิเดียสีเขียวเข้ม โคนิเดียมีความหนาแน่น และตรงกลางโคนิเดียเป็นจุดสีเหลือง ในขณะที่เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่เก็บรักษาในสารพา pumice: potassium humate (90:10) และ kaolin: potassium humate (90:10) โคนิเดียที่สร้างจะมีสีเขียวเหลือง (เขียวขี้ม้า) มีลักษณะเป็นฝุ่นผง และตรงกลางโคนิเดียเป็นจุดสีเขียว (ภาพ 15)



ภาพ 15 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์ 5 ตำรับ ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน; ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่บ่มเชื้อในสารพา pumice (a); ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่บ่มเชื้อในสารพา kaolin (b); ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่บ่มเชื้อในสารพา diatomaceous earth (c); ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่บ่มเชื้อในสารพา pumice: potassium humate (90:10) (d); ลักษณะของโคโลนีของเชื้อราที่บ่มเชื้อในสารพา kaolin: potassium humate (90:10) (e)

ทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน หรือ 3 เดือน กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในเรือนทดลอง

ผลการทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับ ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน หรือ 3 เดือน พบว่าเชื้อราจากตำรับที่ผสมกับสารพา kaolin, kaolin: potassium humate (90:10) และ pumice: potassium humate (90:10) เท่านั้นที่สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ได้ แต่มีประสิทธิภาพในระดับที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนเชื้อราที่เก็บรักษาในสารพา pumice และ diatomaceous earth ไม่พบอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ตายจากการลงทำลายของเชื้อราเริ่มพบตั้งแต่วันที่ 1 หลังสัมผัสเชื้อรา โดยเชื้อราในตำรับที่ผสมสารพา pumice: potassium humate (90:10) พบอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสูงที่สุดร้อยละ 55.30 รองลงมาคือ ตำรับที่ผสมสารพา kaolin: potassium humate (90:10) และ kaolin ร้อยละ 44.66 และ 34.28 ตามลำดับ ซึ่งอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่พบ เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในลักษณะทำนองเดียวกับที่วันที่ 1 จนครบ 7 วันของการติดตามผล โดยในวันที่ 7 เชื้อราในตำรับที่ผสมสารพา pumice: potassium humate (90:10) พบอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสูงที่สุดร้อยละ 85.08 รองลงมาคือ ตำรับที่ผสมสารพา kaolin: potassium humate (90:10) และ kaolin ร้อยละ 77.23 และ 69.37 ตามลำดับ (ตาราง 15)

ตาราง 15 อัตราการตายที่แท้จริงของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 หลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับ ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน หรือ 3 เดือน

สารพา	อัตราการตายที่แท้จริง[1] (%) / วัน						
	1	2	3	4	5	6	7
Pumice	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{d}
Kaolin	34.28^{b}	43.43^{b}	46.15^{b}	48.42^{b}	51.22^{b}	63.39^{b}	69.37^{c}
diatomaceous earth	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{c}	0.00^{d}
pumice: Potassium humate (90:10)	55.30^{a}	58.08^{a}	61.32^{a}	68.08^{a}	68.34^{a}	75.03^{a}	85.08^{a}
kaolin: Potassium humate (90:10)	46.66^{ab}	51.67^{ab}	56.42^{ab}	64.63^{ab}	65.15^{ab}	70.62^{ab}	77.23^{b}

[1]ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงค่าที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Duncan's new multiple range test, $p<0.05$)

ผลการศึกษาระยะเวลาที่เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับ ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน หรือ 3 เดือน ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ตายร้อยละ 50 นั้น พบว่าเชื้อราในตำรับที่ผสมสารพา pumice: potassium humate (90:10) ใช้ระยะในการให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 สั้นที่สุด คือ 2.47 วัน รองลงมาคือ ตำรับที่ผสมสารพา kaolin: potassium humate (90:10) และ kaolin ใช้ระยะเวลา 3.03 และ 4.24 วัน ตามลำดับ (ตาราง 16)

ตาราง 16 ระยะเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ตายร้อยละ 50 หลังสัมผัสเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน หรือ 3 เดือน

สารพา	LT_{50}
Pumice	-
Kaolin	4.24
diatomaceous earth	-
Pumice: Potassium humate (90:10)	2.47
Kaolin: Potassium humate (90:10)	3.03

ลักษณะการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ที่ถูกเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับ ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน หรือ 3 เดือนนั้น พบว่า เชื้อราจะแทงเส้นใยเข้าไปในลำตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และสร้างเส้นใยปกคลุมลำตัวแมลง จากนั้นจึงสร้างโคนิเดียรอบ ๆ ลำตัวแมลง โดยลักษณะโคนิเดียมีลักษณะเป็นผงมีสีเขียวขี้ม้าไม่ละลายน้ำ และลักษณะของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ตายนั้นยังเกาะอยู่บนต้นข้าวทดสอบ (ภาพ 16)

ภาพ 16 ลักษณะของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ที่ถูกเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-75 ที่ในสารผสมชีวภัณฑ์เบื้องต้น 5 ตำรับ ที่ผ่านการเก็บรักษาภายใต้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 วัน

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์เพื่อพัฒนาสารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าในเขตจังหวัดเพชรบูรณ์ เพื่อคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างสูง และเพื่อพัฒนาสารชีวภัณฑ์เบื้องต้นชนิดผงจากเชื้อรา *Metarhizium* spp. ควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ผลการค้นหาเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินป่าในเขตจังหวัดเพชรบูรณ์พบว่าสามารถแยกเชื้อรา *Metarhizium* spp. จากดินได้ จำนวน 126 ไอโซเลต โดยแยกเชื้อราจากดินที่เก็บจากอำเภอเขาค้อ ได้ทั้งหมด จำนวน 52 ไอโซเลต ใส่รหัส PB-01 - PB-52 แยกเชื้อราจากดินที่เก็บจากอำเภอหล่มเก่า ได้ทั้งหมด จำนวน 48 ไอโซเลต ใส่รหัส PB-53 - PB-100 และแยกเชื้อราจากดินที่เก็บจากอำเภอน้ำหนาว ได้ทั้งหมด จำนวน 26 ไอโซเลต ใส่รหัส PB-101 - PB-126 ผลการทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบเชื้อรา จำนวน 16 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ตายร้อยละ 100 ได้ภายใน 6 วันหลังสัมผัสเชื้อรา และมีระดับความรุนแรงของการก่อโรคที่ LT_{50} ในช่วง 2.9-4.2 วัน เมื่อทำการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่คัดเลือกทั้ง 16 ไอโซเลต ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และโคนิเดีย ร่วมกับการเปรียบเทียบสายพันธุกรรม ITS ของ 18S rDNA พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลต คือชนิด *Metarhizium anisopliae*

ผลการนำเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต เก็บรักษาในดินที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลตสามารถสร้างโคโลนีได้ภายหลังการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน โดยเชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-75 มีแนวโน้มในการสร้างโคโลนีได้ระดับสูงที่สุด ที่ 50 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาการบ่มเชื้อที่ 14 และ 21 วัน โดยในวันที่ 21 เชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถสร้างโคโลนีได้ $3.8x10^4$ และ $3.9x10^4$ CFU/ml ตามลำดับ

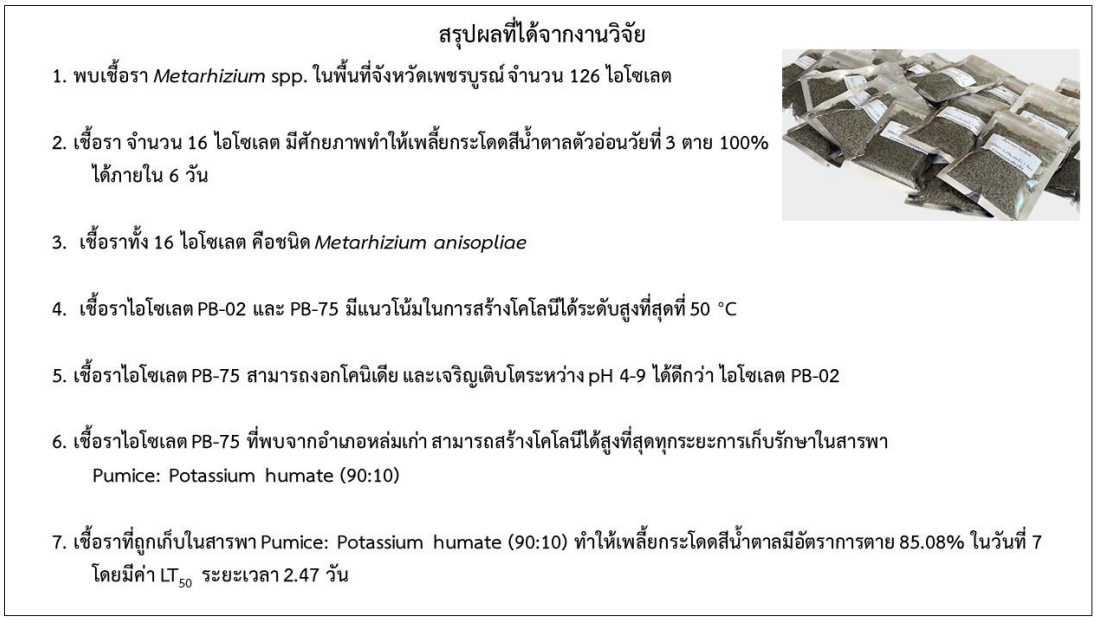
ผลการทดสอบการเจริญของเชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-75 บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่มีระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4-9 ด้วยอัตราการงอกของโคนิเดียที่ 16 ชั่วโมง และ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่ 12 วัน พบว่าโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-75 สามารถเจริญงอกได้ในทุกระดับ pH โดยอัตราการงอกของโคนิเดียของเชื้อราไอโซเลต PB-75 อยู่ในระดับที่

สูงกว่าไอโซเลต PB-02 ในทุกระดับของค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ อัตราการงอกของโคนิเดียของเชื้อราไอโซเลต PB-75 ที่ระดับ pH 4 คือร้อยละ 23.09 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นร้อยละ 55.33 ที่ pH 5 จากนั้นพบการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในช่วงร้อยละ 53.33-61.66 ที่ pH 6-9 และระดับ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่ออัตราการงอกของโคนิเดียร้อยละ 99.26 (R^2 = 0.9926) ภายใต้สมการความสัมพันธ์แบบโพลี่โนเมียล $y = -0.7685x^4 + 21.651x^3 - 224.24x^2 + 1012.2x - 1626.8$ ซึ่งแตกต่างจากไอโซเลต PB-02 ที่ค่า pH อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่ออัตราการงอกของโคโลนีของเชื้อรา ร้อยละ 89.95 (R^2 = 0.8995) ภายใต้สมการความสัมพันธ์แบบเส้นตรง $y = 7.8431x - 13.272$

อัตราการเจริญจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-75 ที่ระยะเวลา 12 วัน พบว่ามีแนวโน้มขยายเพิ่มขึ้นเมื่อ ระดับของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้น ที่ระดับ pH 9 พบการเจริญขยายขนาดโคโลนีสูงสุดโดย เชื้อราไอโซเลต PB-02 โคโลนีของมีขนาด 6.74 เซนติเมตร และ pH ของอาหารเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราภายใต้สมการความสัมพันธ์แบบเส้นตรง $y = 0.52x + 2.4133$ สูงถึงร้อยละ 89.95 (R^2 = 0.8995) ในขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของไอโซเลต PB-75 ที่ pH 9 คือ 6.88 เซนติเมตร ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อขนาดของโคโลนีภายใต้สมการความสัมพันธ์แบบโพลีโนเมียล $y = -0.1158x^4 + 3.1176x^3 – 30.752x^2 + 131.77x – 200.91$ สูงถึงร้อยละ 99.85 (R^2 = 0.9985) ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อราไอโซเลต PB-75 ที่แยกได้จากอำเภอหล่มเก่าศึกษาขั้นตอนต่อไป

จากการทดสอบการเก็บรักษาเชื้อราไอโซเลต PB-75 ในสารพา 5 ตำรับ ได้แก่ pumice, kaolin, diatomaceous earth, pumice : potassium humate (90:10) และ kaolin: potassium humate (90:10) พบว่าเชื้อราสามารถมีชีวิตรอดในสารพา kaolin, pumice: potassium humate (90:10) และ kaolin: potassium humate (90:10) ที่ระยะเวลา 30, 60 และ 90 วันได้ โดยเชื้อราไอโซเลต PB-75 ในสารพา pumice: potassium humate (90:10) สามารถสร้างโคโลนีได้สูงที่สุดทุกระยะการเก็บรักษา

จากการทดสอบศักยภาพของเชื้อราไอโซเลต PB-75 ที่ถูกเก็บรักษาในสารพาทั้ง 5 สูตรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าเชื้อราที่ถูกเก็บในสารพา จำนวน 3 สูตร คือ kaolin, kaolin: potassium humate (90:10) และ pumice: potassium humate (90:10) สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ โดยเชื้อราที่ถูกเก็บในสารพา pumice: potassium humate (90:10) ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 มีอัตราการตายที่แท้จริงสูงที่สุดตั้งแต่วันที่ 1-7 โดยในวันที่ 7 มีอัตราการตายที่ร้อยละ 85.08 โดยผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ตามแผนภาพ 17



ภาพ 17 สรุปผลการศึกษาทั้งหมด

อภิปรายผล

เชื้อราเมตาไรเซียม *Metarhizium* spp. เป็นกลุ่มของเชื้อราสาเหตุโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) และเป็นเชื้อราที่ดำรงชีพอิสระ (free living) ในดินด้วยอินทรียวัตถุ สามารถแยกได้ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของโคโลนี และ โคนิเดีย เช่น รูปร่าง ขนาด และสี เป็นต้น (Dent, & Nina, 1998) ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการค้นหาเชื้อราเมตาไรเซียมจากตัวอย่างดินที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ป่าในจังหวัดเพชรบูรณ์ ผลการคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* spp. ในเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคนิเดียตามแนวทางของ Tulloch (1976) และ Humber (2005) พบ เชื้อราจำนวน 126 ไอโซเลต ประกอบด้วยเชื้อราจากดินที่เก็บจากอำเภอเขาค้อ 52 ไอโซเลต ใส่รหัส PB-01 - PB-52 จากอำเภอหล่มเก่า 48 ไอโซเลต ใส่รหัส PB-53 - PB-100 และจากอำเภอน้ำหนาว 26 ไอโซเลต ใส่รหัส PB-101 - PB-126 คิดเป็นสัดส่วนร้อยละ 41.3, 38.1 และ 20.6 ตามลำดับ

เชื้อรา *Metarhizium* spp. จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการก่อโรคกับแมลงได้หลากหลายชนิด (Roberts, & St. Leger, 2004) อย่างไรก็ตาม ศักยภาพและความรุนแรงในการลงทำลายมีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงอาศัย และแตกต่างไปตาม ชนิด สายพันธุ์ หรือในระดับของไอโซเลตได้ (นาวิน สุขเลิศ และคณะ, 2559; มนัสนิตย์ บุญตัด และคณะ, 2563; อารยา บุญศักดิ์ และคณะ, 2558) เนื่องจากการก่อโรคของเชื้อรากับแมลงเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันอย่างมากกับชนิดของเชื้อราเมตาไรเซียม แมลงเป้าหมาย และสภาพแวดล้อม (de´Oliveira et al., 2004) ในการเจริญของ

โคนิเดีย เชื้อราต้องการสภาพแวดล้อมเช่น อุณหภูมิ ความชื้น ความเป็นกรดด่าง ตำแหน่งของผนังลำตัวที่เข้าสัมผัสและยึดติด รวมทั้งศักยภาพในการงอกของโคนิเดียและการเข้าสู่ภายในตัวแมลงหลังจากสัมผัสกับผนังลำตัวของแมลง (Bugeme et al., 2008; St. Leger et al., 1998) ในส่วนของแมลงนั้นผนังลำตัวเป็นด่านแรกที่เชื้อเข้าสู่แมลง เมื่อโคนิเดียเชื้อรางอก ที่ปลายเส้นใยที่งอกจะผลิตเอนไซม์มากมายเพื่อช่วยในการแทงทะลุผนังลำตัวแมลงเข้าไปภายใน (Santi et al., 2010) ประสิทธิภาพและความรวดเร็วของกลไกในการป้องกันตัวของแมลงที่ผิวผนังลำตัวมีบทบาทสำคัญมาก ซึ่งมีความแตกต่างไปตามชนิดและกลุ่มของแมลงในระดับต่าง ๆ นอกจากนี้แม้เชื้อราสามารถแทงทะลุผนังลำตัวแมลงเข้าไปภายในได้ แมลงยังมีกลไกของระบบภูมิต้านทานของแมลงซึ่งทำหน้าที่ป้องกันและกำจัดเซลล์ของเชื้อราที่เข้ามาในร่างกายอีกชั้นหนึ่ง เชื้อราต้องชนะระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ เหล่านี้ จึงสามารถใช้ประโยชน์จากของเหลวและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกายแมลงเป็นอาหารได้ หรืออีกนัยหนึ่งคือก่อโรคกับแมลงได้ เมื่อแมลงตายและหมดสภาพการเป็นแหล่งอาหาร เชื้อราจะสร้างเส้นใยแทงทะลุผนังลำตัวแมลงออกมาสร้างโคนิเดียปกคลุมตัวแมลงในที่สุด และแพร่กระจายติดต่อไปสู่แมลงตัวอื่น ๆ ได้ในวงกว้าง จนทำให้เกิดการระบาดขึ้นได้ นอกจากนี้เชื้อราชนิดนี้ยังสามารถสร้างสารพิษที่เรียกว่า destruxin ซึ่งส่งผลให้แมลงบางชนิดที่อ่อนแอและตายอย่างรวดเร็ว ก่อนการสร้างเส้นใยทะลุตัวแมลงและสร้างโคนิเดียได้ (Aw, & Hue, 2017; Khan et al., 2012; Mora et al., 2017) ศักยภาพในการก่อโรคของเชื้อราได้สามารถประเมินได้อัตราการตายของแมลงอาศัย และระยะเวลาตั้งแต่เชื้อสัมผัสแมลงจนถึงจุดที่แมลงตายร้อยละ 50 (LT_{50})

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่คัดแยกได้ 126 ไอโซเลต กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 พบว่าเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 100 ได้ภายใน 6 วันหลังสัมผัสเชื้อรา จำนวน 16 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 12.70 ของจำนวนเชื้อราที่พบทั้งหมด โดยมีระดับความรุนแรงของการก่อโรคที่ LT_{50} ในช่วง 2.9-4.2 วัน ซึ่งเป็นระดับความรุนแรงที่มีทิศทางเดียวกับเชื้อราเมตาไรเซียมที่คัดแยกจากดินในพื้นที่นาจังหวัดพิจิตรที่ อารยา บุญศักดิ์ และคณะ (2558) และรายงานของ Geng, & Zhang (2004) ว่า เชื้อรา *M. anisopliae* มีศักยภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาข้าวได้ดีโดยมีอัตราการลงทำลายร้อยละ 100

ในการจัดจำแนกเชื้อรานั้น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราจัดเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่นิยมใช้เป็นอันดับแรก เนื่องจากสะดวก รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก ไม่ต้องใช้อุปกรณ์หรือเทคนิคที่ซับซ้อน ประกอบกับมีคู่มือการจัดจำแนกหลากหลายรูปแบบให้เลือกใช้งาน ในกรณีของ เชื้อรา *Metarhizium* spp. สัณฐานวิทยาของเชื้อ เช่น สีและรูปทรงของโคโลนี รูปทรงและขนาดความกว้าง-ยาวของโคนิเดีย สามารถใช้จัดจำแนกชนิดของเชื้อราเมตาไรเซียมในเบื้องต้นได้ (Dugan, 2017; Humber, 2005; Luangsa-ard et al. 2007, 2009; Tulloch, 1976) โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน

ส่วนความยาวของโคนิเดียสามารถใช้ระบุได้ถึงระดับชนิดของ *M. anisopliae* ได้ (Bischoff et al., 2009; Driver et al., 2000) โดย Rombach et al. (1987) ระบุว่าโคนิเดียของ *M. anisopliae* ควรมีความยาวที่น้อยกว่า 9 µm จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 16 ไอโซเลตที่ผ่านการคัดเลือกด้วยคุณสมบัติการก่อโรคโดยสามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตาย 100% และมีระดับความรุนแรงของการก่อโรคที่ LT_{50} อยู่ในช่วง 2.9-4.2 วัน พบว่า โคโลนีของเชื้อเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตมีลักษณะกลม สีเขียวขี้ม้าเข้มหรือเขียวโอลีฟ ขอบโคโลนีมีสีขาว ส่วนโคนิเดียมีรูปทรงกระบอกปลายมน คล้ายแคปซูล ขนาดของความยาว อยู่ในช่วง 5.0-8.9 µm และความกว้างอยู่ในช่วง 2.0-4.6 µm ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อราที่สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีและโคนิเดียของเชื้อรา *M. anisopliae* อธิบายไว้โดย Humber, (2005), Rombach et al. (1987), Tanada, & Kaya (1993), Tangthirasunun et al. (2010) และ Tulloch, 1976 จึงมีแนวโน้มของการจัดจำแนกเป็นเชื้อรา *M. anisopliae* (Rombach et al., 1987; Tulloch, 1976)

เมื่อทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มทางสถิติ ด้วย hierarchical cluster analysis ด้วยวิธี within group-linkage ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลต เปรียบเทียบร่วมกับ *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium album*, *Metarhizium majus* และ *Metarhizium granulomatis* พบว่า เชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตถูกจัดรวมเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ร่วมกับ *M. anisopliae* และแยกตัวออกจาก *M. album*, *M. majus* และ *M. granulomatis* อย่างชัดเจน ภายในกลุ่มสามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกประกอบด้วยไอโซเลต PB-51, PB-101, PB-125, PB-01, PB-71, PB-02, PB-10, PB-47 และ PB-76 ร่วมกับ *M. anisopliae* อ้างอิง กลุ่มที่สองประกอบด้วยไอโซเลต PB-95, PB-117, PB-75, PB-28, PB-114, PB-123 และ PB-19 ในกรณีนี้ทำให้เชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลตในส่วนของ ingroup นี้มีแนวโน้มจัดเป็น เชื้อรา *M. anisopliae* ได้มากที่สุด

อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลได้เข้ามามีบทบาทสำคัญมากขึ้น เนื่องจากมีช่องทางให้เลือกหลากหลาย มีความสะดวก รวดเร็วและแม่นยำ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การใช้รูปแบบการเรียงตัวของรหัสพันธุกรรมนิวคลิโอไทด์เบสในชิ้นส่วนสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถให้รายละเอียดของการจัดจำแนกในระดับต่ำกว่าชนิดได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและความยาวของสายพันธุกรรมที่ใช้ในการเปรียบเทียบ (Dentinger et al., 2011; Raja et al., 2017) ในกรณีการจัดจำแนกเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีความเกี่ยวเนื่องกับสภาพแวดล้อมนั้น มักนิยมใช้ สายพันธุกรรม 18S rDNA เนื่องจากสายพันธุกรรมประกอบด้วยส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับที่รวดเร็ว ช้ามาก หรือไม่เปลี่ยนแปลง ทำให้สามารถใช้จัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ทั้งในระดับที่ต่ำกว่าหรือสูงกว่าระดับชนิดได้ (Bich et al., 2021; Epp et al., 2012; Suzuki et al., 2020) นอกจากนี้ยังมีบันทึกและรายงานในส่วนนี้ของเชื้อเมตาไรเซียมเป็นจำนวนมากในฐานข้อมูล

Genbank ซึ่งสะดวกต่อการเปรียบเทียบและค้นหาชนิดของเชื้อราเมตาไรเซียมได้อย่างรวดเร็ว (Nilsson, 2012)

จากการเทียบเคียงลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรมนิวคลิโอไทด์ของ 18S rDNA ของเชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 16 ไอโซเลต และพบว่าเชื้อราเมตาไรเซียมทุกไอโซเลต มีลำดับสารพันธุกรรมตรงกับ เชื้อราเมตาไรเซียมชนิด *Metarhizium anisopliae* (Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Clavicipitaceae; *Metarhizium*) โดยมีสัดส่วนความเหมือนตรงกัน (percent identical) สูงมากกว่า 99% ทั้งนี้ โดยหลักการของสัดส่วนความเหมือนตรงกันระบุว่า หากมีค่าที่ 100% สิ่งมีชีวิตนั้นจัดอยู่ในสายพันธุ์ (strain) เดียวกัน หากมีค่าสูงกว่า 99% จัดได้ว่าเป็นชนิดเดียวกัน และหากอยู่ในช่วง 89-99% จัดเป็น genus เดียวกัน (Henry et al., 2000) ดังนั้น เชื้อราเมตาไรเซียมทั้ง 16 ไอโซเลตในการศึกษานี้จึงควรจัดเป็นชนิด *M. anisopliae*

เมื่อทำการวิเคราะห์และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จากสายพันธุกรรม 18S rDNA ของเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลต ร่วมกับสายพันธุกรรม 18S rDNA ของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีความใกล้ชิดจากข้อมูล Genbank จำนวน 16 สายพันธุ์ โดยมี สายพันธุกรรม 18S rDNA ของเชื้อรา *Metarhizium frigidum* HM055448.1 และ *Metarhizium minus* HM055453.1 เป็น outgroups เปรียบเทียบ พบว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นนั้นได้จัดกลุ่มของไอโซเลตเชื้อราเมตาไรเซียมที่ต้องการจัดจำแนกเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ใกล้ชิดซึ่งได้จาก Genbank แยกออกจาก เชื้อรา *M. frigidum* HM055448.1 and *M. minus* HM055453.1 อย่างชัดเจนด้วย ค่า bootstrap รองรับ 100% นั้น โดยในกลุ่มของเชื้อราเมตาไรเซียม (ingroup) นั้น ได้วิวัฒนาการแยกออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรก เชื่อมต่อจาก outgroups ประกอบด้วย *M. anisopliae* MG786741.1 ซึ่งมีความใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-76 (H201204-007 O01) จากนั้นสายวิวัฒนาการได้แยกตัวและแบ่งกลุ่มเชื้อรา *M. anisopliae* ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยพบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-117, PB-51, PB-75, PB-01 และ PB-101 มีการรวมกลุ่มใกล้ชิดกับเชื้อรา *M. anisopliae*, JQ889704.1 (Xu et al., 2012) และ KX279869.1 (Syazwan et al., 2016) มาก โดย เชื้อรา *M. anisopliae* KX279869.1 ซึ่งเป็นเชื้อ *M. anisopliae* ที่มีข้อมูลจากฐานข้อมูลใน Genbank ระบุว่า ถูกคัดแยกได้จาก Peninsular Malaysia และมีศักยภาพในการลงทำลายปลวก *Coptotermes curvignathus* (Blattodea: Rhinotermitidae) (Syazwan et al., 2016) ส่วน *M. anisopliae* JQ889704.1 นั้น Xu et al. (2012) ระบุว่าคัดแยกได้จากป่าชายเลนของมณฑล ไหหนาน ของสาธารณรัฐประชาชนจีน และบันทึกข้อมูลลำดับรหัสดีเอ็นเอ 18S rDNA ไว้ในฐานข้อมูลของ Genbank แต่ยังไม่พบรายละเอียดของศักยภาพในการลงทำลายแมลงที่ชัดเจน

ในขณะที่ไอโซเลต PB-47 รวมเป็นกลุ่มย่อยที่มีความใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* OL839175.1, MG786733.1 และ MG786736.1 นั้นพบว่า OL839175.1 เป็นเชื้อ *M. anisopliae* ที่ Nawaz (2021) จาก Center of Excellence for Olive Research and Training, Barani Agricultural Research Institute, Chakwal, Punjab, Pakistan เป็นผู้รายงานการค้นพบ ส่วน MG786733.1 และ MG786736.1 เป็นเชื้อ *M. anisopliae* ที่ Castro-Vasquez et al. (2018) จาก Centro de investigacion en biologia celulary molecular, University of Costa Rica, Ciudad de la investigacion, San Pedro, San Jose, Costa Rica ระบุว่าคัดแยกได้จากดินใน Costa Rica ซึ่งเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตนี้ได้บันทึกไว้ใน ฐานข้อมูลของ Genbank แต่ยังไม่พบรายละเอียดของศักยภาพในการลงทำลายแมลงที่ชัดเจน และในทำนองเดียวกันกับไอโซเลต PB-76 ที่มีความใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* MG786741.1 ซึ่งเป็นเชื้อ *M. anisopliae* คัดแยกได้จากดินใน Costa Rica ที่ Castro-Vasquez et al. (2018) ได้บันทึกไว้เช่นกัน

โดยทั่วไป ดิน จัดเป็นแหล่งอาศัยที่เหมาะสมต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์หลากหลายชนิด รวมทั้งเชื้อราก่อโรคกับแมลงเช่น เชื้อรา *M. anisopliae* (Meyling, & Eilenberg, 2007) เนื่องจากดินทำหน้าที่ปกป้องเชื้อจุลินทรีย์จากแสงแดด และ แสงยูวี รวมทั้งอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติที่รุนแรงต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี (Sergio et al., 2011) ผลการทดสอบความคงทนของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ทั้ง 16 ไอโซเลต ในดินที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลตสามารถสร้างโคโลนีได้หลังการบ่มเชื้อที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน โดยเชื้อราไอโซเลต PB-02 และ PB-75 มีแนวโน้มในการสร้างโคโลนีได้ระดับสูงที่สุด ที่ 50 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาการบ่มเชื้อที่ 14 และ 21 วัน สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Raja Namasivayam et al. (2015) ที่พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* เจริญได้ในสภาพดินที่มีอุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส โดยพบจำนวนโคโลนีของเชื้อราลดลงอย่างต่อเนื่องจาก $78.1x10^8$-$50.6x10^8$ CFU/g เมื่อมีระดับของอุณหภูมิสูงขึ้น Chandra Tejaa, & Rahman (2017) และ Ihara et al. (2003) รายงานว่าเชื้อราเขียว *M. anisopliae* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพบจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *M. anisopliae* มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 และ 21 วัน นอกจากนี้ Couceiro et al. (2021) พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *M. brunneum* และ *M. robertsii* ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งโดยรวมเชื้อรา *M. anisopliae* เป็นเชื้อราที่ได้รับการยอมรับว่ามีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงมากกว่าชนิดอื่น ๆ (Horaczek, & Viernstein, 2004; Rangel et al., 2005)

อย่างไรก็ตาม Kershaw et al. (1999) รายงานว่า เชื้อรา *M. anisopliae* ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียสและมีบางไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ ช่วง 5-10 องศาเซลเซียส และ 35-40 องศาเซลเซียส ซึ่งในบางรายงานการวิจัยเช่นกันที่มีความแตกต่าง

จากผลการวิจัยนี้ในส่วนของช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรา *M. anisopliae* เช่น Ghayadi, & Abdollahi (2013) พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ 27–35 องศาเซลเซียส ภายใต้ช่วงแสงที่เหมาะสม แต่ไม่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส Oliveira et. al. (2018) พบว่าอัตราการรอดของเชื้อรา *M. anisopliae* มีเพียง 2% เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในน้ำที่มีอุณหภูมิ ≤36 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง Ouedraogo et al. (1997) ที่พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่เชื้อรา *M. anisopliae* มีความสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 35 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความทนอุณหภูมิสูงกว่าเชื้อรา *M. flavoviride* Fernandes et al. (2008) และ Rangel et al. (2005) โคนิเดียเชื้อรา *M. anisopliae* ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ในสภาพสารแขวนลอยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 4–8 ชั่วโมง

ในส่วนของสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) นั้นมีอิทธิพลต่อความมีชีวิต อัตราการงอก และการเจริญของของเชื้อรา *M. anisopliae* เช่นกัน เนื่องจาก pH มีผลโดยตรงต่อการดูดซึมสารอาหารภายในเซลล์และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลล์ และต่อเนื่องถึงการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์ และการแบ่งเซลล์ได้ (Chandra Teja and Rahman, 2017; Glazebrook et al., 1992; Liu et al., 2007; Tamerler et al., 1998) โดยทั่วไปเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถเจริญได้ในช่วงของ pH ที่กว้างมาก ตั้งแต่สภาพที่มีความเป็นกรด 2.5 ถึงในระดับความเป็นด่างที่ 10.5 (Hallsworth, & Magan, 1996) แต่จะเจริญเติบโตได้ดีระหว่าง pH 5 ถึง 8 (St. Leger et al., 1999) ซึ่งช่วงของ pH ในการศึกษานี้อยู่ในช่วง 5-9 ซึ่งอยู่ในช่วงของรายงานดังกล่าว และพบว่าโคนิเดียของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต PB-02 และ PB-75 สามารถเจริญงอกเส้นใยได้ รวมทั้งโคโลนีเจริญขยายขนาดได้ โดยที่ pH 9 พบอัตราการงอกของโคนิเดียสูงร้อยละ 57.57 และ 61.66 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่ 6.74 และ 6.88 เซนติเมตร ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัย Quiroga-Cubides et al. (2022) ที่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงที่ระดับ pH 5-9 เชื้อรา *M. anisopliae* (CPMa1502) มีอัตราการ >90% และ Villamizar et al. (2021) ที่พบว่าเชื้อรา *M. novozealandicum* สามารถเจริญเป็นโคโลนีได้ที่ pH 5, 7 และ 9 และเชื้อราสามารถสร้างโคนิเดียได้สูงที่สุดที่ pH 9 ภายในระยะเวลา 10 วัน

จากการทดสอบการเก็บรักษาเชื้อราไอโซเลต PB-75 ในสารพา 5 ตำรับ พบว่าเชื้อราสามารถมีชีวิตรอดในสารพา kaolin, pumice: potassium humate (90: 10) และ kaolin: potassium humate (90: 10) ที่ระยะเวลา 30, 60 และ 90 วันได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ นวลศิริ สีบุญมี และคณะ (2561) ที่พบว่าดินขาวลพบุรี และ ดินขาวลำปางมีศักยภาพในการเก็บรักษาโคนิเดียของเชื้อรา *M. anisopliae* ได้นานถึง 5 เดือน ในส่วนของสารพา pumice นั้น ในการศึกษานี้ไม่พบโคโลนีของเชื้อราเจริญขึ้นได้ แตกต่างจากผลการศึกษาของ เสาวนิตย์

โพธิ์พูนศักดิ์ และคณะ (2551) ที่พบว่า pumice มีความเหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นสารพาในสูตรผสมเพื่อการเก็บรักษาเนื่องจากพบโคนิเดียเชื้อรา *Metarhizium* ได้สูงสุด และเชื้อยังเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องได้ 3 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำเมื่อเทียบกับการผสมสูตรโดยใช้สารพาชนิดอื่น อย่างไรก็ตามเมื่อนำดิน pumice ผสมกับสารพาอื่น เช่น potassium humate พบว่าสารพาผสมของ pumice: potassium humate (90: 10) มีโคโลนีเจริญได้ดีและสูงที่สุดในทุกระยะของการเก็บรักษา ในขณะที่ ดินขาว เมื่อผสมกับ potassium humate กลับพบจำนวนโคโลนีเจริญได้ลดลง สารพา potassium humate เป็นสารอินทรีย์คอลลอยด์ที่มีประจุลบสูงทำให้ดินบางชนิดที่มีความจุในการแลกเปลี่ยนไอออนบวกต่ำสามารถดูดซับไอออนบวกไว้ได้ในปริมาณมากขึ้น ซึ่งช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงระดับความเป็นกรด-ด่าง (buffer) ของดินไม่ให้รวดเร็วเกินไป จัดเป็นสารประกอบของฮิวมัสที่ได้จากการย่อยสลายอินทรียวัตถุในดิน ทำหน้าที่เสมือนอินทรีย์วัตถุในดินที่ช่วยทำให้เก็บรักษาเชื้อราได้ยาวนานขึ้น (นวลศิริ สีบุญมี และคณะ, 2561; Jackson et al., 2010; Post, & Mann, 1990) เมื่อผสมกับดิน Pumice หรือ หินภูเขาไฟ โครงสร้างร่วนฟู คล้ายทรายละเอียด ไม่อัดแน่น มีแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น ซิลิกา แคลเซี่ยม แมกนีเซียม โซเดียม โพแทสเซียม เป็นต้น เป็นองค์ประกอบ ทำให้ส่วนผสมมีลักษณะคล้ายดินอินทรีย์วัตถุที่มีความร่วนซุย และส่งผลทำให้การเก็บรักษาเชื้อราในดินได้ดีขึ้น นานขึ้นได้ (นวลศิริ สีบุญมี และคณะ, 2561) แตกต่างจากลักษณะของส่วนผสมของ ดินขาว ที่ผสมกับ potassium humate มีลักษณะเนียนและแน่นกว่ามาก แต่กลไกที่ส่งผลกระทบต่อการโคนิเดียและศักยภาพของเชื้อรายังไม่ชัดเจน

จากการทดสอบศักยภาพของเชื้อราไอโซเลต PB-75 ที่ถูกเก็บรักษาในสารพาทั้ง 5 สูตรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าเชื้อราที่ถูกเก็บในสารพา จำนวน 3 สูตร คือ kaolin, kaolin: potassium humate (90: 10) และ pumice: potassium humate (90: 10) สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตัวอ่อนวัยที่ 3 ได้ โดยเชื้อราที่ถูกเก็บในสารพา pumice: potassium humate (90: 10) ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีอัตราการตายที่แท้จริงสูงที่สุดตั้งแต่วันที่ 1-7 โดยอัตราการตายที่แท้จริงสูงสุดในวันที่ 7 คือ ร้อยละ 85.08 อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการเปรียบประสิทธิภาพที่ระยะเวลา 6 วันพบว่าอัตราการตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลร้อยละ 75.03 ลดลงจากผลการทดสอบในการคัดเลือกครั้งแรก ซึ่งมีอัตราการตายที่ร้อยละ 100 ที่ระยะเวลา 6 วัน หลังสัมผัสเชื้อรา ลดลงถึง 1.3 เท่า ดังนั้นควรมีการศึกษาถึงสภาพการเก็บรักษาและสารพาที่เหมาะสมเพิ่มเติมในอนาคต เพื่อให้เชื้อรา *M. anisopliae* ในผลิตภัณฑ์สามารถคงประสิทธิภาพในการก่อโรคได้สูงขึ้นและยาวนานขึ้น รองรับการใช้ประโยชน์ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้เหมาะสม ชัดเจน ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาด้านอายุการเก็บรักษา อัตราการใช้เชื้อรา *M. anisopliae* เปรียบเทียบกับสารชีวภัณฑ์ทางการค้า

2. ควรทำการศึกษาด้านศักยภาพของเชื้อรา *M. anisopliae* ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นเพิ่มเติม

3. ควรศึกษาด้านคุณลักษณะของชีวภัณฑ์ที่เหมาะกับการใช้ประโยชน์

4. เชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่พบในพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์จำนวนทั้งหมด 126 ไอโซเลต สามารถลงทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ ดังนั้นควรมีการศึกษาด้านความจำเพาะเจาะจงในการลงทำลายแมลงชนิดอื่นเพิ่มเติม

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กนกกาญจน์ ตลึงผล, และนริศ ท้าวจันทร์. (2557). การใช้เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM04 ควบคุมเพลี้ยอ่อนผัก *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Homoptera: Aphididae) ใน ผักคะน้าระบบไฮโดรโปนิกส์, *แก่นเกษตร*, *42*(พิเศษ 3), 634-638.

กนกกาญจน์ ตลึงผล, และนริศ ท้าวจันทร์. (2559). การครอบครองต้นคะน้าของเชื้อรา *Metarhizium guizhouense* PSUM04 ที่ปลูกในระบบไฮโดรโปนิกส์. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*, *3*(พิเศษ), 78-83.

กรมพัฒนาที่ดิน. (2562). *ลักษณะและสมบัติของชุดดินจัดตั้งในประเทศไทย*. กองสำรวจดินและวิจัยทรัพยากรดิน. สืบค้น 30 มีนาคม 2563, จาก http://oss101.ldd.go.th/thaisoils_museum/knownlg/series_all_pfdesc.html

กรมอุตุนิยมวิทยา. (2550). *แผนที่สถิติอุณหภูมิสูงสุดของประเทศไทย*. ศูนย์ภูมิอากาศ กรมอุตุนิยมวิทยา. สืบค้น 30 มีนาคม 2563, จาก; http://climate.tmd.go.th/statistic/stat30y

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

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

ทิพย์วดี อรรถธรรม. (2535). *โรควิทยาแมลง.* กรุงเทพฯ: ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไทยแพน. (2564). ปริมาณการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชของไทยอยู่อันดับไหนของโลก. สืบค้น 30 , มกราคม, 2566, จาก; https://thaipan.org/highlights/2426

นพวรรณ นิลสุวรรณ, และนริสา จันทร์เรือง. (2558). การคัดเลือกและผลิตผงเชื้อ *Trichoderma* spp. เพื่อควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus microporus* สาเหตุโรครากขาวของยางพารา. *วารสารยางพารา*, *36*(4), 5-19.

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

นาวิน สุขเลิศ, จิราพร กุลสาริน, ไสว บรูณพานิชพันธุ์, และวีรเทพ พงษ์ประเสริฐ. (2559). ประสิทธิภาพของ สารชีวภัณฑ์เชื้อรากำจัดแมลงในการควบคุมด้วงหมัดผักแถบลายในเบบี้ฮ่องเต้บนพื้นที่สูงของจังหวัดเชียงใหม่. *วารสารเกษตร*, *32*(2), 171-180.

มนัสนิตย์ บุญตัด, วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ, ไสว บูรณพานิชพันธุ์ และจิราพร กุลสาริน. (2563). ศักยภาพในการควบคุมหนอนใยผักของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่คัดแยกจากดินในจังหวัดอุตรดิตถ์. *วารสารเกษตร*, *36*(1), 15-22.

มนัสนิตย์ บุญตัด. (2562). *ศักยภาพในการควบคุมหนอนใยผักของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่คัดแยกจากดินในจังหวัดอุตรดิตถ์* (ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต). เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มูลนิธิโครงการหลวง. (2555). *เชื้อราสาเหตุโรคแมลง (Entomopathogenic Fungi)*. สืบค้น 30 มีนาคม 2563, จาก; www.royalprojectthailand.com

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

วินันท์ดา หิมะมาน, จันจิรา อายะวงศ์, กิตติมา ด้วงแค, และกฤษณา พงษ์พานิช. (2552). ราทำลายแมลง และแมงมุมในกลุ่มป่าแก่งกระจาน. ใน *การประชุมวิชาการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ครั้งที่ 3* (น. 124-154). กรุงเทพฯ: กลุ่มงานกีฏวิทยาและจุลชีววิทยาป่าไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.

วิวัฒน์ เสือสะอาด, พิมพรรณ สมมาตย์, อาภรณ์ ปั้นทองคำ, ปวีณา บูชาเทียน และดอกกล้วยไม้ หอมระหัด. (2551). การใช้เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin เพื่อควบคุมหนอนด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย *Dorysthenes buqueti* (Guerin) (Coleoptera: Cerambycidae). ใน *รวมบทคัดย่อผลงานวิจัย การประชุมวิชาการประจำปี 2551* (น. 1). กรุงเทพฯ: ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ.

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. (2565). *การนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร (รายประเภทการใช้).* สืบค้น 30 มกราคม 2566, จาก https://data.go.th/dataset/importchemvol

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2566). *ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร: ร้อยละผลผลิตข้าวนาปีและนาปรัง ปี 2565*. สืบค้น 30 มกราคม 2566, จาก https://www.oae.go.th.

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). *เรียนรู้การจัดการศัตรูข้าวโดยผสมผสาน*. กรุงเทพฯ: กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์, วัชรี สมสุข, และสุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต. (2551). การเก็บรักษาเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ในรูปผง ใน *รายงานผลงานวิจัยและพัฒนาด้านพืชและเทคโนโลยีการเกษตร ประจำปี 2551* (น. 124-125). กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

อัญชลี นาทองคำ, ศิวิลัย สิริมังครารัตน์, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, หทัยรัตน์ อุไรรงค์, และเบญจมาศ แก้วรัตน์. (2553). ประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. ไอโซเลตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในการควบคุมแมลงศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจ. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น*, *15*(10), 930-940.

อารยา บุญศักดิ์, วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ, ไสว บูรณพานิชพันธุ์, และจิราพร กุลสาริน. (2558). การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) ที่มีศักยภาพในการควบคุม เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาข้าว. *วารสารเกษตร*, *31*(3), 291-299.

Abbott, W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology, 18*, 265-267.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403-410.

Amiri-Besheli, B., Khambay, B., Cameron, S., Deadman, M.L., & Butt, T.M. (2000). Inter- and intra-specific variation in destruxin production by insect pathogenic *Metarhizium* spp., and its significance to pathogenesis. *Mycological Research*, *104*(4), 447-452.

Anderson, D. L., & Trueman, J. W. H. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, *24*(3), 165–189.

Asan, C., Hazir, S., Cimen, H., Ulug, D., Taylor, J., Butt, T., & Karagoz, M. (2017). An innovative strategy for control of the chestnut weevil Curculio elephas (Coleoptera: Curculionidae) using *Metarhizium brunneum*. *Crop Protection*, *102,* 147-153.

Aw, K. M. S., & Hue, S. M. (2017). Mode of infection of *Metarhizium* spp. fungus and their potential as biological control agents. *Journal of Fungi, 3*(2), 30. doi: 10.3390/jof3020030.

Baek, J. M., & Kenerley, C. M. (1998). The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system. *Fungal Genetics and Biology*, *23*(1), 34–44.

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

Bich, G. A., Castrillo, M. L., Kramer, F. L., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2021). Morphological and molecular identification of entomopathogenic fungi from agricultural and forestry crops. *Floresta e Ambiente*, *28*(2), e20180086, doi: 10.1590/2179-8087-FLORAM-2018-0086.

Bidochka, M. J., Kamp, A. M., Lavender, T. M., Dekoning, J., & 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.

Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, *101*(4), 512-530.

Bridge, P. D., Williams, M. A. J., Prior, C., & Paterson, R. R. M. (1993). Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Journal of General Microbiology*, *139*, 1163-1169.

Bugeme, D. M., Maniania, N. K., Knapp, M., & Boga, H. I. (2008). Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi. Experimental and Applied Acarology*, *46*, 257-285.

Burge, M. N. (1988). *Fungi in Biological Control Systems*. Manchester: Manchester University Press.

Castro-Vasquez, R., Montero-Astua, M., Hernandez-Villalobos, S., Vargas-Martinez A., & Molina-Bravo, R. (2018). *Identification and molecular characterization of Metarhizium spp. from soil of Costa Rica.* Retrieved January 30, 2023, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG786733.1?report=genbankandlog$=nucltopandblast_rank=1and RID=ZY3UJ2KR013

Chandra Teja, K. N. P., & Rahman, S. J. (2017). Effect of media pH on the growth of entomopathogenic fungi isolated from different rhizosphere soils. *International Journal of Bioassays*, *6*(3), 5325-5327.

Couceiro, J.C., Fatoretto, M.B., Demétrio, C.G.B., Meyling, N.V. and Delalibera, I. (2021). UV-B radiation tolerance and temperature-dependent activity within the entomopathogenic tungal genus *Metarhizium* in Brazil. *Frontiers in Fungal Biology, 2*, 645737, doi:10.3389/ffunb.2021.645737.

Daoust, R.A., Ward, M.G., and Roberts, D.W. (1982). Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, *40*(2), 228-236.

de´Oliveira, R.C.D., Neves, P.M.O.J. and Alves, L.F.A. (2004). Entomopathogenic fungi selection to control *Oligonychus yothersi* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) in Paraguay tea crops (Ilex paraguariensis St. Hill.). *Neotropical Entomology*, *33,* 347-351.

Dent, D., & Nina, J. (1998). *Safety, Specificity and Distribution of Fungal Isolates*. N.P.: London.

Dentinger, B. T. M., Didukh, M. Y., & Moncalvo, J. M. (2011). Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (*Agaricomycotina*). *PLoS ONE*, *6*(9), e25081, doi:10.1371/journal.pone.0025081.

Driver, F., Milner, R. J., & Trueman, J. W. H. (2000). A taxanomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, *104*(2), 134-150.

Dugan, F.M. (2017). *The Identification of Fungi: An Illustrated Introduction with Keys, Glossary, and Guide to Literature.* St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society Press.

Epp, L.S., Boessenkool, S., Bellemain, E.P., Haile, J., Esposito, A., Riaz, T.,...Brochmann, C. (2012). New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1821-1833.

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

Fernandes, E. K. K., Rangel, D. E. N., Moraes, Á. M. L., Bittencourt, V. R. E. P., & Roberts, D. W. (2008). Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *98*(1), 69–78.

Geng, B. W., & 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.

Ghayedi, S., & 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*. *Journal of Plant Protection Research*, *53*(2), 165-171.

Gilman, J. C. (1957). *A Manual of Soil Fungi* (revised 2nd ed.) Calcutta: India Oxford and IBH Publishing Company.

Glazebrook, M. A., Vining, L. C., & White, R. L. (1992). Growth morphology of *Streptomyces akiyoshiensis* in submerged culture: Influence of pH, inoculum, and nutrients. *Canadian Journal of Microbiology*, *38*(2), 98-103. DOI: 10.1139/m92-016.

Goettel, M. S., & Inglis, G. D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. In L.A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*, (pp. 213-249). London: Acadamic Press.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Hallsworth, J. E., & Magan, N. (1996). Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(7), 2435-2442.

Han, J. H., Jin, B. R., Kim, J. J., & Lee, S. Y. (2014). Virulence of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces fumosoroseus* for the microbial control of *Spodoptera exigua*. *Mycobiology*, *42*(4), 385-390.

Henry, T., Iwen, P. C., & Hinrichs, S. H. (2000). Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(4), 1510-1515.

Hernández-Domínguez, C., Guzmán-Franco, A.W, Carrillo-Benítez, M.G, Alatorre-Rosas, R., Rodríguez-Leyva, E., & Villanueva-Jiménez, J.A. (2016). Specific diversity of *Metarhizium* isolates infecting *Aeneolamia* spp. (Hemiptera: Cercopidae) in sugarcane plantations. *Neotropical Entomology*, *45*(1), 80–87.

Hill, D. S. (1996). *The Economic Importance of Insects*. London: Chapman and Hall.

Horaczek, A., & Viernstein, H. (2004). *Beauveria brongniartii* subjected to spray-drying in a composite carrier matrix system. *Journal of Microencapsulation*, *21*, 317-330.

Hu, G., & St. Leger, R. J. (2002). Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. *Applied Environmental Microbiology*, *68*, 6383-6387.

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

Humber, R. A. (2005). *Entomopathogenic fungal identification*. Retrieved May 29, 2018, from https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80620520/ apswkshoprev. pdf

Ignoffo, C.M. (1992). Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. *Florida Entomologist*, *75*(4), 516-525.

Ihara, F., Toyama, M., & Sato, T. (2003). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* to the chestnut weevil larvae under laboratory and field conditions. *Applied Entomology and Zoology*, *38*(4), 461-465.

Inglis, G. D., Enkerli, J., & Goettel, M. S. (2012). Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In L.A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 189-253). San Diego: Academic Press.

Jackson, M. A., Dunlap, C. A., & Jaronski, S. T. (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol*, *55*(1), 129-145.

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

Khan, A. L., Hamayun, M., Khan, S. A., Kang, S.-M., Shinwari, Z. K., Kamran, M., Rehman, S., Kim, J. G., & Lee, I. -J. (2012). Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28*(4), 1483-1494.

Kirubakaran, S. A., Abdel-Megeed, A., & Senthil-Nathan, S. (2018). Virulence of selected indigenous *Metarhizium pingshaense* (Ascomycota: Hypocreales) isolates against the rice leaffolder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) (Lepidoptera: Pyralidae). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *110,* 105-115.

Kobayashi, Y. (1941). *The Genus Cordyceps and Its Allies*. Tokyo: Botanical Institute, Tokyo Bunrika Daigaku.

Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., and Goettel, M.S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1-41.

Lal, S., Rajak, D. C., Sinha, O. K., & Singh, V. (2010). Effect of different media on growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae*, a fungal bioagent. *Journal of Biological Control*, *24*(1), 80-81.

Liu, B.-L., Rou, T.-M., Rao, Y. K., & Tzeng, Y.-M. (2007). Effect of pH and aeration rate on the production of destruxins A and B from *Metarhizium anisopliae*. *International Journal of Applied Science and Engineering*, *50*(1), 17-26.

Luangsa-ard, J. J., Tasanathai, K., Mongkolsamrit, S., & Hywel-Jones, N. (2007). *Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand, Volume 1.* Pathum Thani: National Science and Technology Development Agency.

Luangsa-ard, J. J., Tasanathai, K., Mongkolsamrit, S., & Hywel-Jones, N. (2009). *Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand, Volume 2.* Pathum Thani: National Science and Technology Development Agency.

Madelin, M. F., Robinson, R. K., & Williams, R. J. (1967). Appressorium-like structures insect-parasitizing Deuteromycetes. *Journal of Invertebrate Pathology, 9*(3), 404-412.

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

Meyling, N. V., & Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, *43*(2), 145-155.

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

Nawaz, H. (2021). *Metarhizium anisopliae strain Ma01 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence*. Retrieved January 30, 2023, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OL839175.1?report =genbankandlog$=nucltopandblast_rank=2andRID=ZY2XZXTP01R.

Nilsson, R. H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Ryberg, M., Kristiansson, E., Hartmann, M,... Kõljalg, U. (2012). Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. *MycoKeys*, *4,* 37-63.

Nishi, O., Hasegawa, K., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., & Shimizu, S. (2011). Phylogenetic analysis of Metarhizium spp. isolated from soil in Japan. *Applied Entomology and Zoology, 46*(3), 301-309. https://doi.org/10.1007/s13355-011-0045-y

Oliveira, D. G. P. D., R. B. Lopes, J. M. Rezende, & I. Delalibera. (2018). Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high temperature provided by oil-based formulations. *Journal of invertebrate pathology*, *151,* 151-157.

Onsongo, S. K., Gichimu, B. M., Akutse, K. S., Dubois, T., & Mohamed, S. A. (2019). Performance of three isolates of *Metarhizium anisopliae* and their virulence against *Zeugodacus cucurbitae* under different temperature regimes, with global extrapolation of their efficiency. *Insects*, *10*(9), 270, doi: 10.3390/insects10090270

Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M. S., & Lomer, C. J. (1997). Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*, *137*(1), 37-43.

Pantou, M. P., Mavridou, A., & 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*(2), 159-174.

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

Post, W. M., & Mann, L. K. (1990). Changes in soil organic carbon and nitrogen as a result of cultivation (pp. 401-406). In A. F. Bouwman (Ed.). *Soils and the Greenhouse Effect*. New York: John Wiley and Sons.

Quiroga-Cubides, G., Borrero-Echeverry, F., Jiménez, A. M., Montes-Bazurto, L.G., Pardey, A. B., Gómez, M.I., & Cuartas Otalora, P. E. (2022). Initial characterisation of *Metarhizium anisopliae* CPMa1502 for the development of a biopesticide against the oil palm fruit scraper *Demotispa neivai* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Oil Palm Research*, doi:10.21894/jopr.2022.0076.

Raja Namasivayam, S. K., Aarthi, R., & Anbazhahan, P. (2015). Studies on factors influencing the viability of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* in soil adapting culture dependent method. *Journal of Biopesticides*, *8*(1), 23-27.

Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N.H. (2017). Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products*, *80*(3), 756-770.

Rangel, D. E. N., Braga, G. U. L., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of Invertebrate Pathology*, *88*(2), 116-125.

Renganayaki, K., Fritz, A.K., Sadasivam, S., Pammi, S., Harrington, S. E., McCouch, S. R., Kumar, S. M., & Reddy, A. S. (2002). Mapping and progress toward map-based cloning of brown planthopper biotype-4 resistance gene introgressed from *Oryza officinalis* into cultivated rice, *O. sativa*. *Crop Science*, *42*(6), 2112-2117.

Roberts, D. W., & St. Leger, R. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, *54*, 1-70.

Rombach, M. C., Humber, R. A., & Evans, H. C. (1987). *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf- and planthoppers of rice. *Transactions of the British Mycological Society*, *88*(4), 451-459.

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

Samson, R. A. (1981). Identification: entomopathogenic Deuteromycetes. In H.D. Burges (Ed.), *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980* (pp. 94-106). New York: Academic Press.

Sánchez-Peña, S. R., Lara, J. S.-J., & Medina, R. F. (2011). Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards thrips and whiteflies. *Journal of Insect Science*, doi: 10.1673/031.011.0101

Santi, L., e Silva, L. A. D., da Silva, W. O. B., Corrêa, A. P. F., Rangel, D. E. N., Carlini, C. R., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2011). Virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(10), 2297-2303.

Schmidt, V., Klasen, L., Schneider, J., Hübel, J., & Pees, M. (2017). Fungal dermatitis, glossitis and disseminated visceral mycosis caused by different *Metarhizium granulomatis* genotypes in veiled chameleons (*Chamaeleo calyptratus*) and first isolation in healthy lizards. *Veterinary Microbiology*, *207*, 74-82.

Sergio, F., Caro, T., Brown, D., Clucas, B., Hunter, J., Ketchum, J., McHugh, K., & Hiraldo, F. (2008). Top predators as conservation tools: Ecological rationale, assumptions, and efficacy. *Annual review of ecology evolution and systematics*, *39*, 1-19.

Sevim, A., Demir, I., Höfte, M., Humber, R. A., & Demirbag, Z. (2010). Isolation and characterization of entomopathogenic fungi from hazelnut-growing region of Turkey. *BioControl*, *55*(2), 279-297.

Sharififard, M., Mossadegh, M. S., Vazirianzadeh, B., & Latifi, S. M. (2014). Evaluation of conidia-dust formulation of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* to biocontrol the brown-banded cockroach, *Supella longipalpa* F. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *7*(6), e10721, doi: 10.5812/jjm.10721

Shi, W.-B., & 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*(2), 165-173.

St. Leger, R. J., Joshi, L., & Roberts, D. (1998). Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(2), 709-713.

St. Leger, R. J., Nelson, J. O., & Screen, S. E. (1999). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology, 145*(10), 2691-2699.

Subramanyam, B., & Roesli, R. (2000). Inert dusts. In B. Subramanyam and D.N. Hagstrum (Eds.), *Alternatives to Pesticides in Stored-Product IPM,* (pp. 321-380). New York: Springer Science+Business Media.

Sun, J., Fuxa, J. R., & Henderson, G. (2003). Effects of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *84*(1), 38-46.

Suzuki, K., Takahashi, K., & Harada, N. (2020). Evaluation of primer pairs for studying arbuscular mycorrhizal fungal community compositions using a MiSeq platform. *Biology and Fertility of Soils*, *56*(6), 853-858.

Syazwan, S. A., Sajap, A. S., & Mohamed, R. (2016). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycete) isolates from Peninsular Malaysia against subterranean Termites, *Coptotermes curvignathus* (Blattodea: Rhinotermitidae). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 53*(3), 551-555.

Tamerler, C., Ullah, M., Adlard, M. W., & Keshavarz, T. (1998). Effect of pH on physiology of *Metarhizium anisopliae* for production of swainsonine. *FEMS Microbiology Letters, 168*(1), 17-23.

Tanada, Y., & Kaya, H. K. (1993). *Insect Pathology.* San Diego: Academic Press, New York.

Tangthirasunun, N., Poeaim, S., Soytong, K., Sommartya, P., & Popoonsak, S. (2010). Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. *International Journal of Agricultural Technology, 6*(2), 317-329.

TeBeest, D. O., & Templeton, G. E. (1985). Mycoherbicides: Progress in the biological control of weeds. *Plant Disease*, *69*(1), 6-10.

Thompson, J. D., Gibson T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research, 25*(24), 4876-4882.

Tulloch, M., (1976). The genus Metarhizium. *Transaction of the British Mycological Society*, *66*(3), 407-411.

Tumuhaise, V., Ekesi, S., Maniania, N.K., Tonnang, H.E.Z., Tanga, C.M., Ndegwa, P.N., Irungu, L.W., Srinivasan, R., & Mohamed, S.A. (2018). Temperature-Dependent growth and virulence, and mass production potential of two candidate isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin for managing *Maruca vitrata* Fabricius (Lepidoptera: Crambidae) on Cowpea. *African Entomology*, *26*(1), 73-83.

Van Driesche, R. G., & Bellows, Jr., S.T., (1996). *Biological Control*. Boston: Kluwer Academic Publishers.

Villamizar, L. F., Barrera, G., Hurst, M., & Glare, T. R. (2021). Characterization of a new strain of *Metarhizium novozealandicum* with potential to be developed as a biopesticide. *Mycology*, *12*(4), 261-278.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. (pp. 315–322). In M.A., Innis, D.H., Gelfand, J.J., Sninsky and T.J., White (Eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* San Diego: Academic Press.

Wyrebek, M., Huber, C., Sasan, R. K., & Bidochka, M. J. (2011). Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity. *Microbiology*, *157*(10), 2904-2911.

Xu, Y. L., Bao, S. X., Huang, H. Q., Liu, M., & Zhu, J. (2012). *Diversity and Distribution of Culturable Fungi in Mangrove Soil in Hainan*. National Center for Biotechnology Information.

Yang, H., Ren, X., Weng, Q., Zhu, L., & He, G. (2002). Molecular mapping and genetic analysis of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene. *Hereditas, 136*(1), 39-43.

Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, *37*(4), 375-379.

Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, *17*(9), 879-920.