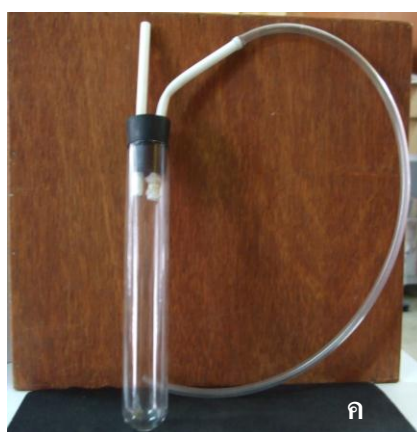


การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการป้องกันกำจัดแมลงหีขาว

1. การเพิ่มปริมาณแมลงหีขาวโรงเรือนในห้องปฏิบัติการ

วิธีการทดลอง

ทำการเพิ่มปริมาณแมลงหีขาวโรงเรือน โดยใช้ต้นมะเขือเทศอายุประมาณ 1 เดือนเป็นพืชอาศัย วางไว้ในกรงตาข่ายขนาด 40 x 50 x 60 เซนติเมตร ใช้หลอดดูดแมลง (aspirator) ดูดแมลงหีขาวตัวเต็มวัยจากต้นพืชที่เลี้ยงไว้เป็นจำนวน 100 ตัว (ratio 2:1) ปลอ่ยเข้าไปในกรงและเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 29 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้น 60 ± 10 เปอร์เซ็นต์) เมื่อครบ 24 ชั่วโมงทำการเปลี่ยนถ่ายต้นมะเขือเทศเพื่อตรวจนับปริมาณไข่และแยกเลี้ยงไว้ในกรงตาข่าย นำไข่ที่ได้มาเลี้ยงต่อบนต้นมะเขือเทศ จนกระทั่งเข้าสู่ตัวอ่อนระยะที่ 2 เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การเพาะเลี้ยงแมลงหีขาวโรงเรือน *Trialeurodes vaporariorum* ในห้องปฏิบัติการ

- ก. กรงเลี้ยง stock แมลงหีขาวขนาด 1.5 x 1.5 เมตร
- ข. กรงที่ใช้เพิ่มปริมาณขนาด 40 x 50 x 60 เซนติเมตร
- ค. เครื่องดูดแมลงขนาดเล็ก

จากการปล่อยแมลงหีขวาวไว้ในกรงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจนับจำนวนไข่บนใบมะเขือเทศ พบว่าแมลงหีขวาววางไข่ไว้บนใบที่สองและที่สามนับจากยอดลงมา โดยในแต่ละใบมีจำนวนไข่เฉลี่ย 56 ฟอง ไข่มีลักษณะเป็นรูปหยดน้ำรียาวสีขาวเหลืองเมื่อใกล้ฟักส่วนปลายของไข่จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเกือบดำ ระยะไข่ 3-5 วัน ตัวอ่อนมี 4 วัย ตัวอ่อนวัย 1 มีขนาดเล็กมาก มีขาเคลื่อนไหวได้ ลำตัวยาวรี ด้านหลังมีสีเขียวอ่อน ระยะตัวอ่อนวัย 1 มีอายุประมาณ 2-3 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 มีลักษณะแบนติดกับใบพืช อายุประมาณ 4-6 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 คล้ายกับตัวอ่อนวัยที่ 2 แต่ลำตัวจะหนาขึ้นมีอายุประมาณ 1 - 3 วัน ตัวอ่อนวัย 4 หรือระยะดักแด้มีอายุประมาณ 3-5 วัน ระยะตั้งแต่วางไข่จนถึงระยะตัวเต็มวัยออกจากดักแด้ประมาณ 15 วัน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แมลงหีขวาวแต่ละระยะการเจริญเติบโต

- | | |
|---------------------|---------------------|
| ก. ระยะไข่ | ข. ตัวอ่อนระยะที่ 1 |
| ค. ตัวอ่อนระยะที่ 2 | ง. ตัวอ่อนระยะที่ 3 |
| จ. ตัวอ่อนระยะที่ 4 | ฉ. ตัวเต็มวัย |

2. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบบนอาหารเทียม

วิธีการทดสอบ

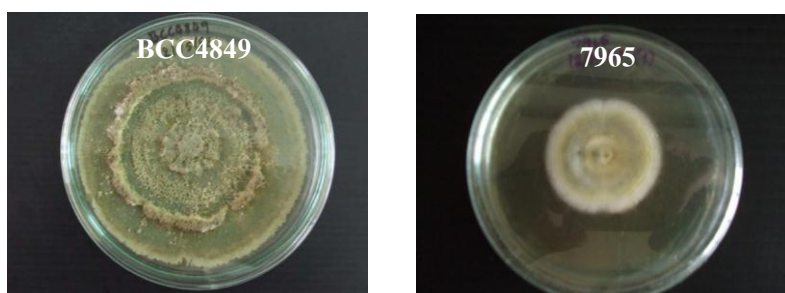
1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt peptone Agar (MA) ในขวดแก้วปริมาตร 400 ml ต่อขวด หนึ่งมาเชื้อ จากนั้นเทอาหาร MA ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และรอให้อาหารแข็งตัว
2. ทำการย้ายเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลต 2637, 5082, 5335, เชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลต 6073, 8003, เชื้อรา *Metarhizium flavoviridae* ไอโซเลต M.fl,

5744 และเชื้อรา *Metarhizium anisopilae* ไอโซเลท Bcc4849, 7965 (ได้รับการอนุเคราะห์จาก ดร. มาลี ตั้งระเปียบ สถาบันวิจัยและเทคโนโลยีการเกษตรลำปาง) ลงบนอาหาร MA ที่เตรียมไว้ โดยใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะลงบนเชื้อรา จากนั้นใช้เข็มเย็บย้ายเชื้อราวางลงบนจานอาหาร

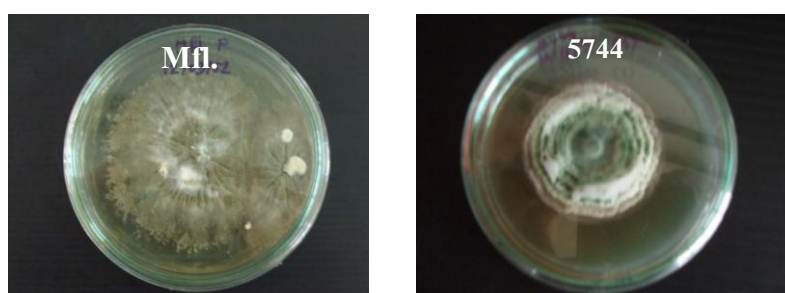
3. บ่มเชื้อราทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีหลังจากย้ายเชื้อแล้วเป็นเวลา 3, 5, 7, 11 และ 15 วัน

ผลการทดสอบ

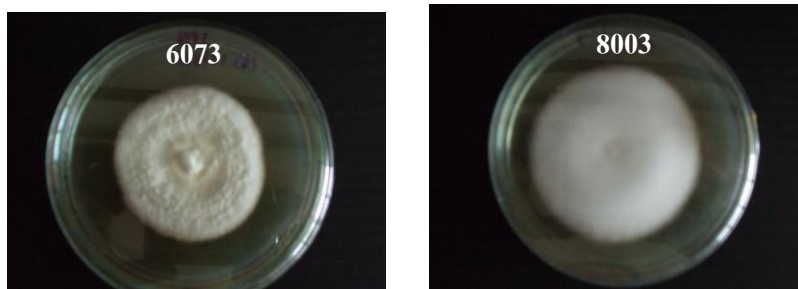
จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อรา พบว่าโคโลนีของเชื้อราแต่ละชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium anisopilae* (ภาพที่ 3) มีลักษณะสีเขียวขี้ม้าปนเหลืองเส้นใยมีสีขาว เชื้อรา *Metarhizium flavoviridae* มีลักษณะสีเขียวเข้มปกคลุมด้วยเส้นใยสีขาว (ภาพที่ 4) สำหรับเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* มีลักษณะเส้นใยฟูสีขาว (ภาพที่ 5) และเชื้อรา *Beauveria bassiana* มีลักษณะสีขาวละเอียด (ภาพที่ 6)



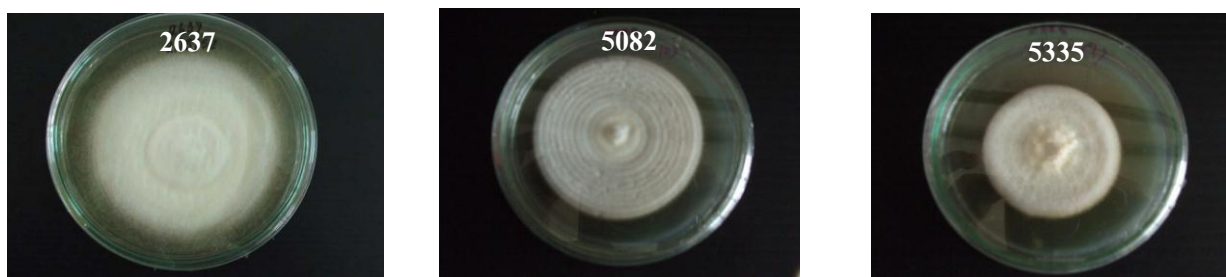
ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium anisopilae*



ภาพที่ 4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Metarhizium flavoviridae*



ภาพที่ 5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes*



ภาพที่ 6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana*

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อราแต่ละชนิดที่เลี้ยงบนอาหาร Malt peptone Agar (MA) เป็นเวลา 15 วัน พบว่าเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท 2637, 5082 และ 5335 โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.3, 7.0 และ 5.1 เซนติเมตร ตามลำดับ เชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลท 8003 และ 6073 โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.9 และ 7.1 เซนติเมตร เชื้อรา *Metarhizium flavoviridae* ไอโซเลท M.11 และ 5744 โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 และ 6.1 เซนติเมตร และเชื้อรา *Metarhizium anisopilae* ไอโซเลท 7965 และ Bcc4849 โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.9 และ 4.4 เซนติเมตร (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตของเชื้อราทดสอบบนอาหารเทียมที่เวลา 15 วัน

Species	Isolate number	เส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราทดสอบ (เซนติเมตร)
<i>Beauveria bassiana</i>	2637	5.3 cde ¹
<i>Beauveria bassiana</i>	5082	7.0 ab
<i>Beauveria bassiana</i>	5335	5.1 de
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	6073	5.9 cd
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	8003	7.1 a
<i>Metarhizium flavoviridae</i>	M.fl	2.5 f
<i>Metarhizium flavoviridae</i>	5744	6.1 bc
<i>Metarhizium anisopilae</i>	7965	4.9 e
<i>Metarhizium anisopilae</i>	BCC 4849	4.4 e

¹ ตัวอักษรในแนวนอนที่ตามหลังค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Least significant difference (LSD)

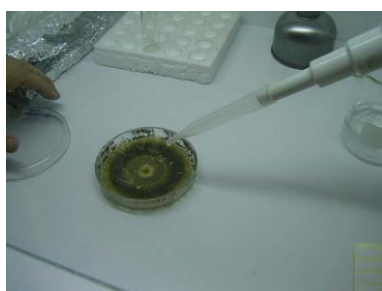
จากตารางที่ 1 แสดงได้ว่าเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลท 8003 มีการเจริญเติบโตดีที่สุดคือ 7.1 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท 5082 ซึ่งเจริญเติบโตได้ 7.0 เซนติเมตร สำหรับเชื้อรา *Metarhizium flavoviridae* ไอโซเลท M.fl มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุดเพียง 2.5 เซนติเมตร จากการศึกษายังไม่สามารถคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดแมลงหวั่นขาว เนื่องจากเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตดีอาจจะผลิตสปอร์หรือสปอร์มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ ดังนั้นจึงทำการทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการคัดเลือกเชื้อราในการกำจัดแมลง

3. ศึกษาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราทดสอบบนอาหารเทียม

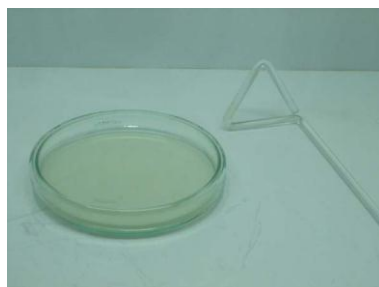
วิธีการทดสอบ

หลังจากเพาะเลี้ยงและสังเกตการเจริญเติบโตของโคโลนีเชื้อ *Beauveria bassiana* ไอโซเลท 2637, 5082, 5335, เชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลท 6073, 8003, เชื้อรา *Metarhizium flavoviridae* ไอโซเลท M.fl, 5744 และเชื้อรา *Metarhizium anisopilae* ไอโซเลท Bcc4849, 7965 เป็นเวลา 15 วัน นำเชื้อราดังกล่าวมาทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์บนอาหารเทียม โดยเตรียมเป็นสปอร์แขวนลอย ดังนี้

1. การเตรียมสปอร์แขวนลอย โดยเติม tween 80 0.1 % ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3-5 มิลลิลิตร ลงบนเชื้อราทดสอบ ใช้ส่วนปลายหลอดดูดดูดสปอร์ให้สปอร์แขวนลอยอยู่ในน้ำกลั่น (ภาพที่ 7)
2. นำมาตรวจนับด้วยเฮมาไซโตเมเตอร์ (hemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อคำนวณหาความเข้มข้น และปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร
3. ใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ดูดสารแขวนลอยสปอร์ประมาณ 100 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้รอบ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 8)
4. สุ่มนับสปอร์ 3 ครั้ง ๆ ละ 100 สปอร์ นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์



ภาพที่ 7 การเตรียมสปอร์แขวนลอย



ภาพที่ 8 ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยสปอร์ให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดสอบ

จากการนำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราทดสอบ เกลี่ยลงบนผิวน้ำอาหารแล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง พบว่าสปอร์ของเชื้อราทดสอบมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่แตกต่างกัน โดยเปอร์เซ็นต์การงอกสปอร์ของเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลท 6073 และเชื้อรา *Metarhizium anisopilae* ไอโซเลท BCC 4849 สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท 2637 มีการงอกต่ำที่สุดคือ 59.02 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราทดสอบบนอาหารเทียมที่เวลา 24 ชั่วโมง

Species	Isolate number	% การงอก
<i>Beauveria bassiana</i>	2637	59.02 e ¹
<i>Beauveria bassiana</i>	5082	84.70 c
<i>Beauveria bassiana</i>	5335	99.04 a
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	6073	100.00 a
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	8003	82.07 d
<i>Metarhizium flavoviridae</i>	M.fl	97.00 b
<i>Metarhizium flavoviridae</i>	5744	99.04 a
<i>Metarhizium anisopilae</i>	7965	97.45 b
<i>Metarhizium anisopilae</i>	BCC 4849	100.00 a

¹ ตัวอักษรในแนวนอนที่ตามหลังค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อทดสอบทางสถิติด้วยวิธี Least significant difference (LSD)

เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อราทดสอบบนอาหารเทียมที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อรา *Metarhizium anisopilae* ไอโซเลท BCC 4849, เชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลท 6073, เชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท 5335 และเชื้อรา *Metarhizium flavoviridae* ไอโซเลท 5744 มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ที่ 100, 100, 99.04 และ 99.04 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อราและเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ พบว่าเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตเร็วแต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ต่ำ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราชนิดนี้มีความสามารถทำให้เกิดโรคกับแมลงได้ยากหรืออาจต้องใช้ระยะเวลาในการงอกเข้าสู่ภายในลำตัวแมลง ส่วนเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตช้าแต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์สูงภายในเวลาอันสั้น อาจทำให้เชื้อรามีโอกาสที่จะเข้าทำลายแมลงได้เร็ว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อราแต่ละชนิดด้วย

เชื้อราที่นำมาทดสอบในการก่อโรคกับแมลงหีวขาวควรมีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์สูง เนื่องจากแมลงหีวขาวมีวงจรชีวิตที่สั้น ใช้เวลาในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในแต่ละระยะการเจริญเติบโตเพียง 1-5 วัน และสามารถขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากเพศเมียสามารถวางไข่ได้โดยไม่ต้องผสมพันธุ์ หากเชื้อราทดสอบมีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ที่สูงอาจมีโอกาสนในการเข้าก่อโรคกับแมลงหีวขาวได้ และควรเป็นเชื้อที่เพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วในวัสดุเพาะเลี้ยงในธรรมชาติ

ดังนั้นการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลงหวี่ขาวโรงเรือน จึงคัดเลือกเชื้อราทั้งหมดนำมาทดสอบ เนื่องจากเชื้อราทดสอบส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์มากกว่า 50 %

4. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

1. เพิ่มปริมาณเชื้อราที่ใช้ทำการทดสอบ โดยการนำมาเลี้ยงในอาหาร malt peptone agar (MA) ซึ่งประกอบด้วย malt extract 3% , peptone form soymeal 0.5% , Agar 1.5% และน้ำ 100 มิลลิลิตร (ภาพที่ 9)

2. นำเชื้อรามาทำสปอร์แขวนลอยในน้ำกลั่นผสม tween 80 0.1% ที่นิ่งมาเชื้อ (ภาพที่ 10) แล้วนับด้วย haemocytometer เพื่อคำนวณหาความเข้มข้น ปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร จัดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนแมลงหวี่ขาวที่อยู่บนใบพืชอาหาร (ภาพที่ 11)

3. นำตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวที่ฟักเชื้อราแล้ววางบนถาดที่ใส่น้ำเพื่อเพิ่มความชื้นให้กับเชื้อรา สังเกตการงอกของเส้นใยเชื้อราบนตัวแมลงหวี่ขาว ส่วนแมลงหวี่ขาวที่ไม่มีเส้นใยขึ้นปกคลุมบนตัวแมลงเก็บไว้ในกระดวยกรองที่ขึ้นที่อยู่อันเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 12) เพื่อให้เส้นใยของเชื้อราเจริญเติบโต

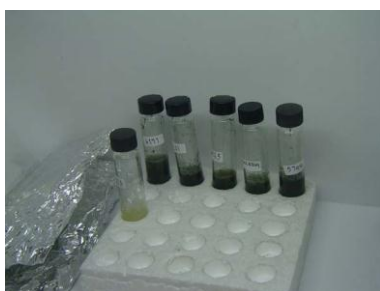
วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยแต่ละเชื้อทำ 3 ซ้ำแต่ละซ้ำใช้แมลงหวี่ขาว 100 ตัว ใช้น้ำกลั่นผสม tween 80 0.1% เป็นตัวเปรียบเทียบ บันทึกจำนวนแมลงหวี่ขาวที่ตายทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน นำแมลงหวี่ขาวที่ตายมาตรวจดูภายใต้กล้อง stereomicroscope เพื่อตรวจสอบว่าเป็นเชื้อราชนิดเดียวกันกับที่ฟักหรือไม่ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott 's formula (Finney, 1971)



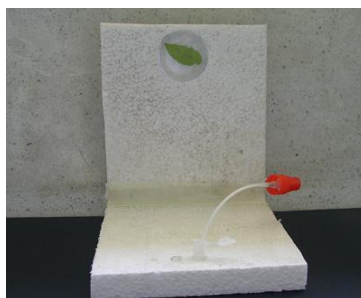
ภาพที่ 9 สารเคมีชนิดต่างๆ สำหรับทำอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. malt extract, Agar, peptone form soymeal

ข. malt peptone agar (MA)



ภาพที่ 10 การทำสปอร์แขวนลอยเชื้อรา



ภาพที่ 11 การฉีดพ่นสารแขวนลอยลงบนแมลงหีขาวที่อยู่บนใบพืชอาหาร



ภาพที่ 12 การเพิ่มความชื้นให้กับเชื้อราและจานเลี้ยงเชื้อที่เก็บตัวอ่อนของแมลงหีขาวที่เส้นใยยังไม่เจริญ

ผลการทดสอบ

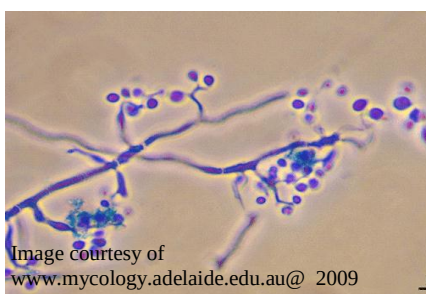
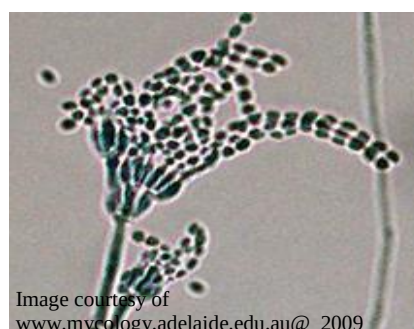
จากการนำเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท 2637, 5082, 5335, เชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลท 6073, 8003, เชื้อรา *Metarhizium flavoviride* ไอโซเลท M.fl, 5744 และเชื้อรา *Metarhizium anisopilae* ไอโซเลท BCC 4849, 7965 มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลงหีขาวโรงเรือนที่ความเข้มข้น 10^8 สปอร์/มิลลิลิตร หลังการพ่นสารแขวนลอยเชื้อราแล้ว 3 วัน พบเชื้อราบางไอโซเลทสามารถเข้าทำลายตัวอ่อนของแมลงหีขาวได้โดยสังเกตจากลักษณะสีลำตัวของตัวอ่อนแมลงหีขาวเปลี่ยนจากใสเป็นสีส้ม (ภาพที่ 13) เมื่อเทียบกับ control ซึ่งลำตัวของตัวอ่อนของแมลงหีขาวยังใสและสามารถเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโต (ลอกคราบ) เป็นระยะถัดไปได้ จากนั้นเริ่มมีเส้นใยงอกและเจริญบนตัวอ่อน ซึ่งในเชื้อราแต่ละสกุลมีลักษณะของเส้นใยที่ปรากฏบนตัวแมลงแตกต่างกัน (ภาพที่ 14)

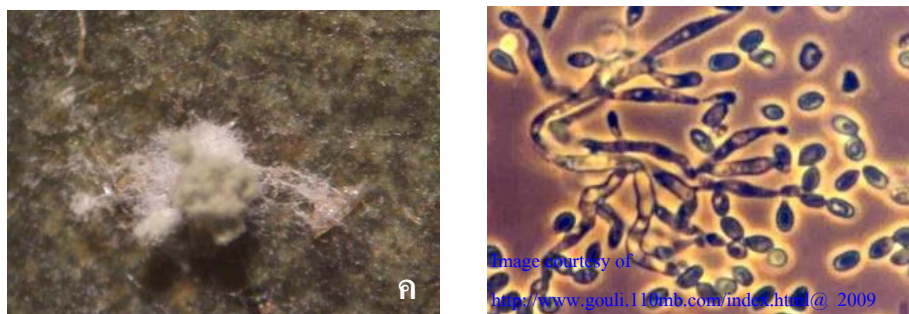


ภาพที่ 13 ลักษณะของตัวอ่อนแมลงหีขาวหลังจากพ่นสาร 3 วัน

ก. Control

ข. พ่นด้วยสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา





ภาพที่ 14 ลักษณะแมลงหีขาวที่ถูกปกคลุมด้วยเส้นใยเชื้อราหลังจากฟ่นสาร 7 วัน

ก. เชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* : 6073

ข. เชื้อรา *Beauveria* sp.: 2637

ค. เชื้อรา *Metarhizium anisopilae* : BCC 4849

จากการทดสอบดังกล่าว พบว่าเชื้อรามีความสามารถในการทำให้แมลงหีขาวโรงเรือน *Trialeurodes vaporariorum* เกิดโรคได้ โดยเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลท 6073 ทำให้แมลงหีขาวโรงเรือนมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดคือ 77.67 เปอร์เซ็นต์, รองมาเป็นเชื้อรา *Metarhizium anisopilae* ไอโซเลท BCC 4849, เชื้อรา *Beauveria* sp ไอโซเลท 2637 และเชื้อรา *Metarhizium flavoviride* (M.fl) โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายที่ 72.67, 33.67 และ 30.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเชื้อราชนิดอื่น ๆ ไม่พบการงอกเส้นใยของเชื้อราบนตัวแมลง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงหีขาวโดยเชื้อราชนิดต่าง ๆ

Species	Isolate number	% Mortality
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb 5335	-
<i>Beauveria bassiana</i>	Bb 5082	-
<i>Beauveria</i> sp	2637	33.67
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Pt 8003	-
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Pt 6073	77.67
<i>Metarhizium flavoviride</i>	M.fl	30.00
<i>Metarhizium flavoviride</i>	Mf.5744	-
<i>Metarhizium anisopilae</i>	Ma.7965	-
<i>Metarhizium anisopilae</i>	BCC 4849	72.67

สำหรับเชื้อราทดสอบที่ยังไม่มีการออกเส้นใยบนตัวแมลง ได้เก็บไว้ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อโดยวางบนกระดาษกรองที่ให้ความชื้น และสังเกตอาการต่อไป ส่วนเชื้อราที่สามารถทำให้แมลงหิวขาวโรงเรือน *Trialeurodes vaporariorum* มีการตายมากกว่า 50 % ขึ้นไปทำการทดสอบหาค่าความรุนแรงของเชื้อราโดยการคำนวณหาค่า LC_{50} (median lethal concentration)

5. การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราปฏิชีวนะในการทำให้เกิดโรคกับแมลงหิวขาว

นำเชื้อราทดสอบที่ทำให้เกิดโรคกับแมลงหิวขาวซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์จากข้อ 4 มาทดสอบความรุนแรงที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือที่ระดับความเข้มข้น 1×10^2 , 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^7 และ 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบกับตัวอ่อนแมลงหิวขาว 20 ตัวต่อซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละระดับความเข้มข้น สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นผสม Tween 80 เข้มข้น 0.1% เป็นตัวเปรียบเทียบ บันทึกจำนวนแมลงหิวขาวที่มีเส้นใยขึ้นปกคลุม เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาคำนวณหาค่า median lethal concentration (LC_{50}) ด้วยโปรแกรม LOGIT PC

ผลการทดสอบ

จากการนำเชื้อรา *P. tenuipes* ไอโซเลท 6073 และเชื้อรา *M. anisopila* BCC 4849 ที่สามารถทำให้เกิดโรคกับตัวอ่อนแมลงหิวขาว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยการนำสปอร์แขวนลอยของเชื้อราฉีดพ่นลงบนตัวอ่อนแมลงหิวขาววัยที่ 2 เพื่อทดสอบความรุนแรงของเชื้อราที่ระดับความเข้มข้น 1×10^2 , 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^7 และ 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อคำนวณหาค่า median lethal concentration (LC_{50}) พบว่าเชื้อรา *P. tenuipes* ไอโซเลท 6073 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.219×10^6 (1.472×10^6 , 3.239×10^6) และเชื้อรา *M. anisopila* BCC 4849 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 1.005×10^7 (2.803×10^6 , 4.801×10^7) ในระยะเวลา 7 วัน

เชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลท 6073 เป็นไอโซเลทของเชื้อราสกุล *Paecilomyces* ในประเทศไทยซึ่งยังไม่มีรายงานการเข้าก่อโรคในแมลงหิวขาว แต่ในต่างประเทศมีรายงานของเชื้อรา *P. tenuipes* เข้าทำลายตัวหนอนของผีเสื้อ คือ หนอนเจาะลำต้นข้าวโพด (*Ostrinia furnacalis* Guenée), ผีเสื้อข้าวโพด (*Ephestia cautella* Walker), หนอนผีเสื้อข้าวสาร (*Corcyra cephalonica* Stainton), หนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.), หนอนเจาะฝักข้าวโพด (*Helicoverpa armigera* Hübner) และหนอนไหม (*Bombyx mori* L.) เป็นต้น (Wang Zu, 1996) และในต่างประเทศพบว่าเชื้อราในสกุล *Paecilomyces* ที่สามารถเกิดโรคกับแมลงหิวขาวโรงเรือน *T. vaporariorum* นั้นเป็นเชื้อรา *P. fumosoroseus* และ *P. lilacinus* โดยทำให้ตัวอ่อนของแมลงหิวขาวโรงเรือนตายหลังจากพ่นเชื้อราแล้ว 6 วัน มีเปอร์เซ็นต์การตายมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (Gökçe, 2004) นอกจากเข้าทำลายแมลงโดยตรงแล้วมีรายงานการศึกษาถึงสารเคมีในเชื้อราชนิดนี้แล้วพบว่าสามารถสร้างสารพิษ beauvericin เช่นเดียวกับเชื้อรา *Beauveria*

bassiana (Intamas *et al.*, 2552) และพบรายงานการใช้เชื้อรา *P. tenuipes* เป็นส่วนประกอบของ เครื่องดื่ม ยาบำรุง (tonic) และเป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อสุขภาพในการป้องกันโรคในประเทศ ญี่ปุ่น เกาหลี และจีน (Zhu *et al.*, 1998) ดังนั้นการนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่คัดเลือกได้ใน ห้องปฏิบัติการไปทดสอบกับแมลงหวี่ขาวโรงเรือนในสภาพแปลงปลูกนั้นจะไม่ส่งผลกระทบต่อ สิ่งมีชีวิตอื่น ๆ และปลอดภัยต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม

6. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการป้องกันกำจัดแมลงหวี่ขาวในสภาพแปลงปลูก

ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพริกหวานครั้งนี้ไม่พบปัญหาการเข้าทำลายของแมลงหวี่ขาว เพราะส่วนใหญ่แล้วแมลงหวี่ขาวไม่ได้เป็นแมลงศัตรูที่สำคัญ เพียงอาศัยวัชพืชในและรอบนอกบริเวณ โรงเรือนปลูกพริกหวานดังได้กล่าวไว้ข้างต้น เมื่อกำจัดวัชพืชโดยการถอนและใช้สารเคมีป้องกันกำจัด วัชพืชแล้วในโรงเรือนก็ไม่พบแมลงหวี่ขาว และด้วยพริกหวานเป็นพืชที่มีมูลค่าสูงจึงไม่นำเชื้อรา สาเหตุโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงหวี่ขาวทดลองพ่นกับพริกหวาน แต่พบว่า บริเวณใกล้เคียงมีการปลูกมะเขือเทศและมีการเข้าทำลายของแมลงหวี่ขาวชนิดเดียวกันกับที่พบบริเวณ โรงเรือนปลูกพริกหวาน จึงทดลองพ่นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในโรงเรือนปลูกมะเขือเทศเพื่อทดสอบ ประสิทธิภาพของเชื้อราในสภาพโรงเรือน ภาพที่ 15



ภาพที่ 15 สภาพโรงเรือนปลูกมะเขือเทศในหมู่บ้านม่วงคำ ต.โป่งแยง อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

จากการนำเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท 2637, 5082, 5335, เชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลท 6073, 8003, เชื้อรา *Metarhizium flavoviride* ไอโซเลท M.fl, 5744 และเชื้อรา *Metarhizium anisopilae* ไอโซเลท BCC 4849, 7965 มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลงหวี่ขาวโรงเรือนที่ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อรา *P. tenuipes* ไอโซเลท 6073 มีเปอร์เซ็นต์การตายของตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวสูงสุดจึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพในโรงเรือนโดยทำการสูมนับจำนวนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวบนต้นมะเขือเทศจำนวน 20 ต้น ตรวจนับบนต้นมะเขือเทศ 3 จุด (ยอด กลาง และล่างของต้นพืช) จุดละ 3 ใบ จากนั้นนิตพินสารตามกรรมวิธีดังนี้

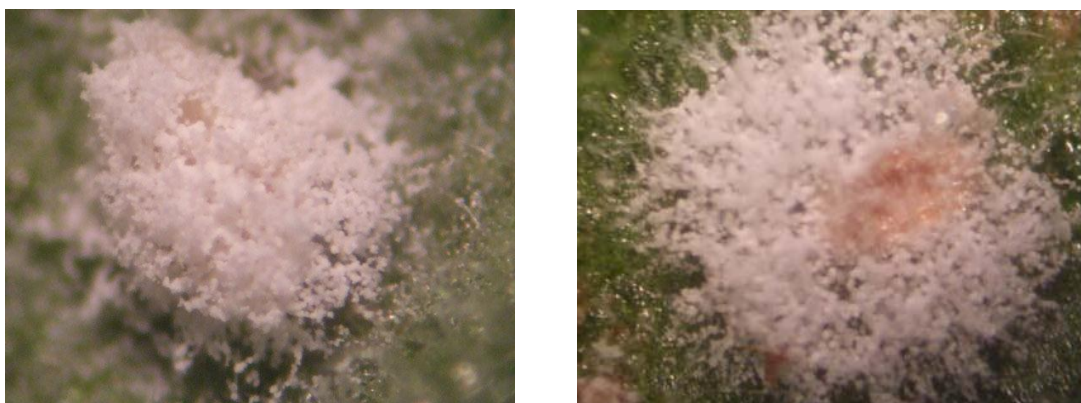
กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อรา *P. tenuipes* ไอโซเลท 6073 ที่ความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร อัตรา 250 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ชุบน้ำคลุม (ใช้น้ำเปล่าผสมสารจับใบ)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) บันทึกผลการทดลองหลังจากพ่นสารเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน สุ่มเก็บใบมะเขือเทศ จำนวน 9 ใบต่อต้น โดยสุ่มเก็บ 10 ต้นต่อกรรมวิธี นำมาใส่ในกล่องที่ให้ความชื้น บันทึกการตายโดยตรวจนับตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวที่ตายและมีเส้นใยหรือสปอร์เชื้อราขึ้นปกคลุมภายใต้กล้อง stereomicroscope และปรับเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott's formula หากพบการตายของแมลงในชุดควบคุม

ผลการทดสอบ

จากการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *P. tenuipes* ไอโซเลท 6073 ในสภาพแปลงปลูก โดยใช้ อัตรา 250 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร พบว่าหลังจากพ่นเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน ตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 74.36 เปอร์เซ็นต์ สังเกตได้จากแมลงหวี่ขาวมีเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุมและเป็นชนิดเดียวกับที่พ่นในห้องปฏิบัติการ (ภาพที่ 16) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยน้ำเปล่าผสมสารจับใบ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเชื้อรา *P. tenuipes* ไอโซเลท 6073 มีความสามารถที่จะเข้าก่อโรคกับแมลงหวี่ขาวโรงเรือนในสภาพแปลงปลูกได้ ตารางที่ 4



ภาพที่ 16 ลักษณะของเส้นใยเชื้อราบนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวโรงเรือนหลังจากฟ่นสารแขวนลอยเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Paecilomyces tenuipes* ไอโซเลต 6073 ในสภาพแปลง

กรรมวิธี	ก่อนพ่นเชื้อรา	หลังพ่นเชื้อรา		
	จำนวนแมลงหวี่ขาว (ตัว)	จำนวนแมลงหวี่ขาวทั้งหมด (ตัว)	จำนวนแมลงหวี่ขาวที่มีเชื้อราขึ้นปกคลุม (ตัว)	% การตาย
ชุดควบคุม	18.71 ± 4.96A	15.77 ± 4.67A	0.00B	0.00B
เชื้อรา 1×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร	19.03 ± 2.69A	16.11 ± 3.39A	11.98 ± 2.70A	74.36 ± 6.11A
CV	21.16	25.61	31.81	11.62

เอกสารอ้างอิง

Finney, D. J. 1971. Probit Analysis 3.rd ed. Cambridge Univ. Press, London.