รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร

   กิจกรรม : สำรวจและศึกษาศักยภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ศึกษาศักยภาพเชื้อรา *Metarhizium* spp. และ *Beauveria* spp. ในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟพันธุ์อะราบิก้า (*Hypothenemus hampei*)

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : The potential of *Metarhizium* ssp. and *Beauveria* ssp. for controlling coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*)

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง :	นางสาวภัททิรา ศาตร์วงษ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน :	นายเมธาสิทธิ์ คนการ	สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
	นางเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวทิภาพร นวลเนตร	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ**

การทดสอบศักยภาพเชื้อราโรคแมลงในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ (Coffee Berry Borer; *Hypothenemus hampei* Ferrari.) ดำเนินการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ระหว่างเดือนตุลาคม 2561-กันยายน 2563 งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาหาชนิดเชื้อราโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟพันธุ์อะราบิกาในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยทำการเก็บตัวอย่างแมลงและตัวอย่างดินจากแปลงปลูกกาแฟโดยวิธี bait method ได้เชื้อราโรคแมลงโดยจัดจำแนกได้ *M. anisopliae* จำนวน 15 ไอโซเลท และ *B. bassiana* จำนวน 3 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกตัวแทน

กรมวิชาการเกษตร

เชื้อราโรคแมลง จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ *M. anisopliae* ไอโซเลท DOA-M8, DOA-M145, DOA-M146, DOA-M147, DOA-M150, *B. bassiana* ไอโซเลท DOA-B4, DOA-B18, DOA-B19 และ DOA-B20 ทดสอบที่ความเข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดีย/มิลลิลิตร หลังการทดสอบ 14 วัน พบว่า เชื้อราโรคแมลงทุกไอโซเลทสามารถก่อโรคกับมอดเจาะผลกาแฟได้ เชื้อ *B. bassiana* สามารถก่อโรคได้ดีกว่า *M. anisopliae* และมีค่า LT_{50}, LT_{90} ต่ำกว่า *M. anisopliae* ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อรา *B. bassiana* ทั้ง 4 ไอโซเลท มาศึกษาหาอัตราความเข้มข้นที่เหมาะสมในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ โดยทดสอบที่ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ และ $1x10^9$ โคนิเดีย/มิลลิลิตร หลังการทดสอบ 10 วัน พบว่า DOA-B18 ที่ $1x10^9$ โคนิเดีย/มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพดีที่สุด เฉลี่ย 94.17% มีค่า LC_{50}, LC_{90} เท่ากับ $1.12x10^7$ และ $7.43x10^8$ โคนิเดีย/มิลลิลิตร มีค่า LT_{50}, LT_{90} เท่ากับ 5.67 และ 8.52 วัน ตามลำดับ จึงมีความเป็นไปได้ที่ในอนาคตจะนำ DOA-B18 มาเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพไร่ต่อไป

Abstract

The potential of entomopathogenic fungi (EPF) for controlling coffee berry borer (*Hypothenemus hampei* (Ferrari), CBB). The experiment was conducted in EPF laboratory, Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture during October 2018 - September 2020. The objective was to evaluate the efficiency of entomopathogenic fungi against coffee berry borer infestation in the laboratory. The fungal collection was isolated from insect and soil from farmer's coffee plantation by using bait method, altogether 15 isolates comprised of *M. anisopliae* and 3 isolates in *B. bassiana*. Nine representative fungal isolates were selected including *M. anisopliae* DOA-M8, DOA-M145, DOA-M146, DOA-M147, DOA-M150, *B. bassiana* DOA-B4, DOA-B18, DOA-B19 and DOA-B20 at $1x10^8$ conidia/ml^{-1}. The results of insect mortality revealed all fungal isolates infected CBB within 14 days after treatment, *B. bassiana* was the most effective fungal isolates to control CBB more than *M. anisopliae* including showed LT_{50}, LT_{90} was lower than *M. anisopliae*. Therefore, the virulence of 4 fungal isolates (B4, B18, B19 and B20) were selected for 4 conidial concentration tested: $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ and $1x10^9$ conidia/ml^{-1}. The results showed B18 ($1x10^9$ conidia/ml^{-1}) infection was 94.17%, LC_{50}, LC_{90} at 1.12×10^7 and $7.43x10^8$ conidia/ml^{-1}, LT_{50}, LT_{90} at 5.67 and 8.52 days respectively. Thus, DOA-B18 would be considered to be control CBB in coffee plantation.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

มอดเจาะผลกาแฟ (Coffee Berry Borer; *Hypothenemus hampei*) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญในพื้นที่ปลูกกาแฟ ซึ่งระบาดทำความเสียหายให้กับผลผลิตกาแฟในหลายพื้นที่ในเขตภาคเหนือ ผลกาแฟที่ถูกเจาะจะเป็นช่องทางให้เชื้อราและแบคทีเรียเข้าทำลายซ้ำ ทำให้ผลร่วงเสียหายส่งผลให้ผลผลิตกาแฟลดลง หากสามารถเก็บเกี่ยวผลกาแฟที่มอดเจาะผลกาแฟเข้าทำลายอยู่ เมล็ดกาแฟที่ได้จะไม่มีคุณภาพ (บัณฑูรย์ และคณะ, 2551) มอดเจาะผลกาแฟเป็นแมลงปีกแข็งขนาดเล็กประมาณ 1.5-2 มิลลิเมตร ในปี 2553 พบว่า มอดตัวเต็มวัยเข้าทำลายผลกาแฟได้ตั้งแต่ขนาดผลกาแฟมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.3 มิลลิเมตร ขึ้นไป สามารถพบมอดได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งมอดจะอาศัยกัดกินจนถึงขยายพันธุ์ในผลจนกระทั่งผลกาแฟสุก และยังสามารถอยู่ในผลกาแฟที่แห้งคาอยู่ในต้น รวมถึงผลกาแฟที่หล่นลงพื้นดินได้อีกด้วย และมอดจะอาศัยอยู่ในกาแฟกะลาได้ในระยะหนึ่งถ้าเมล็ดกาแฟมีความชื้นเหมาะสม ยังสามารถเข้าทำลายเมล็ดกาแฟกะลาระหว่างการตากเมล็ด ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่ได้คุณภาพตามความต้องการของตลาด

การป้องกันกำจัดมอดเจาะผลกาแฟในแปลงปลูกนั้นมีหลากหลายวิธี เช่น วิธีเขตกรรม วิธีกล การใช้กับดักฟีโรโมน เป็นต้น การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมกันมาก แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเนื่องจากมอดเจาะผลกาแฟอาศัยอยู่ภายในเมล็ดทำให้สารเคมีเข้าไปไม่ถึง ดังนั้นจึงทำให้เกษตรกรมีความสนใจในการป้องกันกำจัดแมลงดังกล่าวโดยวิธีทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น

เชื้อราโรคแมลง (entomopathogenic fungi) เป็นเชื้อราที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยเชื้อราส่วนใหญ่จะมีความเฉพาะเจาะจงต่อการเกิดโรคของแมลงขึ้นอยู่กับสกุล ชนิด และสายพันธุ์ ของเชื้อรานั้นๆ ดังนั้นการสำรวจหรือค้นพบเชื้อราโรคแมลงสายพันธุ์ใหม่ๆ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง และเพื่อนำไปขยายผลการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งมอดเจาะผลกาแฟได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป จากปัญหาที่ผ่านมาการนำเชื้อราโรคแมลงมาควบคุมมอดเจาะเมล็ดกาแฟไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากเกษตรกรขาดแหล่งเชื้อราที่มีประสิทธิภาพและวิธีการใช้ชีวภัณฑ์ราโรคแมลงที่ถูกต้อง เช่น ระยะเวลาการพ่น ลักษณะสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม อัตราการฉีดพ่น และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ จึงทำให้การป้องกันกำจัดมอดเจาะผลกาแฟไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ดังนั้นการทำวิจัยครั้งนี้จึงเป็นการหาเชื้อราโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพห้องปฏิบัติการ และขยายผลต่อยอดงานวิจัยเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในสภาพแปลงปลูกกาแฟอะราบิก้า ตลอดจนการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพานิชย์ในรูปของสารชีวภัณฑ์ต่อไป

ดังนั้นการประยุกต์ใช้เชื้อราโรคแมลง เช่น Beauveria และ Metarhizium ที่พบในธรรมชาติในไร่กาแฟของเกษตรจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง เพื่อเข้ามาเสริมประสิทธิภาพในการควบคุมประชากรของมอดเจาะผลเมล็ดกาแฟให้อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ และเชื้อราโรคแมลงดังกล่าวยังสามารถใช้ร่วมการป้องกันกำจัดศัตรูพืชวิธีการอื่นๆ ในแปลงปลูกกาแฟอะราบิก้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตามนโยบายการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับพืชอาหาร (Good agriculture practice : GAP) ของกรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อราโรคแมลง จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ *M. anisopliae* ไอโซเลท DOA-M8, DOA-M145, DOA-M146, DOA-M147, DOA-M150, *B. bassiana* ไอโซเลท DOA-B4, DOA-B18, DOA-B19 และ DOA-B20

2. มอดเจาะผลกาแฟ และด้วงงวงข้าว

3. ข้าวโพดบดหยาบ

4. Potato Dextrose Agar (PDA)

5. Potato Dextrose Broth (PDB)

6. Malt extract agar (MEA)

7. ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer)

8. เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex)

9. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

10. ตู้เขี่ยเชื้อ

11. กล้องจุลทรรศน์

12. ที่ดูดสปอร์ (Micropipet)

13. บีกเกอร์ ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

14. กระบอกตวง ขนาด 250 และ 1,000 มิลลิลิตร

15. ฟลาสก์ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

16. กล่องเลี้ยงแมลง

วิธีการ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> การเก็บตัวอย่างดิน แมลงที่เป็นโรค และแยกเชื้อราโรคแมลง

1.1 เก็บตัวอย่างแมลงที่ติดเชื้อราจากแปลงปลูกกาแฟอะราบิก้าของเกษตรกรในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน ตาก และเพชรบูรณ์ จากนั้นนำตัวอย่างแมลงที่ติดเชื้อโรคจากสภาพธรรมชาติมาแยกเชื้อราบนอาหาร MEA (malt extract agar) ที่ผสมสารปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 27±2 องศาเซลเซียล ประมาณ 2-3 วัน จากนั้นแยกเชื้อราบริสุทธิ์ โดยวิธี hypal trip (Tutte, 1969) ลงในอาหาร MEA และตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่นๆ อย่างละเอียด ก่อนเก็บเชื้อราไว้เป็น stock culture และจัดจำแนกทางด้านสัณฐานวิทยา

1.2 เก็บตัวอย่างดินที่ได้จากแหล่งปลูกกาแฟอะราบิก้า แปลงละ 5 จุด จุดละ 300 กรัม เก็บในถุงพลาสติก จากนั้นนำดินที่ได้จากแปลงปลูกบรรจุลงในกล่องพลาสติก ขนาด 5x15 เซนติเมตร เพื่อแยกเชื้อราโรคแมลงจากดินโดยวิธี bait method (Zimmerman, 1998) ใช้ด้วงงวงข้าวเป็นเหยื่อล่อเชื้อราจากตัวอย่างดินจำนวน 5 ตัว/กล่อง ให้ความชื้นในปริมาณที่พอเหมาะ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 27±2 องศาเซลเซียล

กรมวิชาการเกษตร

เขย่ากล่องทุกวันในสัปดาห์แรก จากนั้นตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อราโรคแมลง แยกเชื้อราโรคแมลงให้บริสุทธิ์ แล้วเก็บเชื้อราไว้เป็น stock culture และจัดจำแนกทางด้านสัณฐานวิทยา เช่น สีของโคโลนี และขนาดของโคนิเดีย (Humber, 2012)

ขั้นตอนที่ 2 การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราโรคแมลงที่มีศักยภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ

คัดเลือกตัวแทน *M. anisopliae* และ *B. bassiana* ที่ได้จากการจัดจำแนกเบื้องต้น มาเปรียบเทียบกับตัวแทนเชื้อราโรคแมลงในห้องปฏิบัติการ วางแผนการทดลองแบบแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 10 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 *M. anisopliae* ไอโซเลท DOA-M8
กรรมวิธีที่ 2 *M. anisopliae* ไอโซเลท DOA-M145
กรรมวิธีที่ 3 *M. anisopliae* ไอโซเลท DOA-M146
กรรมวิธีที่ 4 *M. anisopliae* ไอโซเลท DOA-M147
กรรมวิธีที่ 5 *M. anisopliae* ไอโซเลท DOA-M150
กรรมวิธีที่ 6 *B. bassiana* ไอโซเลท DOA-B4
กรรมวิธีที่ 7 *B. bassiana* ไอโซเลท DOA-B18
กรรมวิธีที่ 8 *B. bassiana* ไอโซเลท DOA-B19
กรรมวิธีที่ 9 *B. bassiana* ไอโซเลท DOA-B20
กรรมวิธีที่ 10 น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม)

เลี้ยงขยายเชื้อราโรคแมลงบนข้าวโพดบดหยาบ อัตราส่วน ข้าวโพด 200 กรัมต่อน้ำ 200 มิลลิลิตร ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นตัดชิ้นวุ้น PDA ที่มีเชื้อราเจริญเติบโต ขนาด 1x1 เซนติเมตร ใส่ลงในถุงข้าวโพดบดหยาบ คลุกให้เชื้อกระจายทั่วทั้งถุง นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียล) เป็นเวลา 14 วัน เชื้อราจะเจริญเติบโตเต็มถุง จากนั้นล้างโคนิเดียของเชื้อราด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อผสม Tween 80 (0.05%) กรองด้วยผ้าขาวบาง ตรวจนับจำนวนโคนิเดียต่อปริมาตรด้วย Haemocytometer และปรับความเข้มข้นโคนิเดียของเชื้อทุกกรรมวิธี เท่ากับ $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร จุ่มเมล็ดกาแฟที่มีมอดเจาะผลกาแฟลงในสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ตามกรรมวิธีต่างๆ เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำเมล็ดกาแฟใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 10x15 เซนติเมตร กล่องละ 15 เมล็ด พร้อมกับการทำ moist chamber โดยใช้กระดาษทิชชูเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นผ่าเมล็ดกาแฟและบันทึกอัตราการตายและการติดเชื้อของมอดทุกวัน เป็นเวลา 7-14 วัน หรือจนกว่าแมลงจะตายหมด และคำนวณหาอัตราการติดเชื้อของมอดเจาะผลกาแฟ

การบันทึกข้อมูล :

1. นำมอดเจาะผลกาแฟที่ตายจากการติดเชื้อราโรคแมลงมาตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอ และทำการแยกเชื้อจากแมลงเพื่อยืนยันการเกิดโรค

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

2. นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของมอดเจาะผลกาแฟมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ และคำนวณค่า Lethal Time (LT_{50} และ LT_{90}) วิเคราะห์โดยใช้วิธี Probit Analysis

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเกิดโรคของเชื้อราโรคแมลงบนมอดเจาะผลกาแฟอะราบิก้า

คัดเลือกไอโซเลทที่ดีที่สุดจากขั้นตอนที่ 2 จำนวน 4 ไอโซเลท มาศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 17 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	ไอโซเลท A	เข้มข้น $1x10^6$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 2	ไอโซเลท A	เข้มข้น $1x10^7$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 3	ไอโซเลท A	เข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 4	ไอโซเลท A	เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 5	ไอโซเลท B	เข้มข้น $1x10^6$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 6	ไอโซเลท B	เข้มข้น $1x10^7$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 7	ไอโซเลท B	เข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 8	ไอโซเลท B	เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 9	ไอโซเลท C	เข้มข้น $1x10^6$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 10	ไอโซเลท C	เข้มข้น $1x10^7$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 11	ไอโซเลท C	เข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 12	ไอโซเลท C	เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 13	ไอโซเลท D	เข้มข้น $1x10^6$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 14	ไอโซเลท D	เข้มข้น $1x10^7$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 15	ไอโซเลท D	เข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 16	ไอโซเลท D	เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 17	น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม)	

เลี้ยงขยายเชื้อราโรคแมลงบนเมล็ดข้าวโพดบดหยาบ โดยชั่งเมล็ดข้าวโพดบดหยาบ 200 กรัม เติมน้ำ 200 มิลลิลิตร ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียล ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นตัดชิ้นวุ้น PDA ที่เลี้ยงขยายเชื้อราโรคแมลง ขนาด 1x1 เซนติเมตร ใส่ลงในถุงข้าวโพดบดหยาบ คลุกให้เชื้อกระจายทั่วทั้งถุง นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27$\pm$2 องศาเซลเซียล) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นล้างโคนิเดียของเชื้อราด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อผสม Tween 80 (0.05%) กรองด้วยผ้าขาวบาง ตรวจนับจำนวนโคนิเดียต่อปริมาตรด้วย Haemocytometer และปรับความเข้มข้นโคนิเดีย เท่ากับ $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ และ $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร จากนั้นจุ่มเมล็ดกาแฟที่มีมอดเจาะผลกาแฟลงใน spore suspension ตามกรรมวิธีต่างๆ เป็นเวลา 1 นาที นำเมล็ดกาแฟใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 10x15 เซนติเมตร กล่องละ 15 เมล็ด พร้อมกับการทำ moist chamber โดยใช้กระดาษทิชชูเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นผ่าเมล็ดกาแฟ

กรมวิชาการเกษตร

และบันทึกอัตราการตายและการติดเชื้อของมอดทุกวัน เป็นเวลา 7-14 วัน และคำนวณหาอัตราการติดเชื้อของมอดเจาะผลกาแฟ

การบันทึกข้อมูล :

1. นำมอดเจาะผลกาแฟที่ตายจากการติดเชื้อราโรคแมลงมาตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอ และทำการแยกเชื้อจากแมลงเพื่อยืนยันการเกิดโรค

2. นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของมอดเจาะผลกาแฟมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ และคำนวณค่า Lethal Concentration (LC_{50} และ LC_{90}) และ Lethal Time (LT_{50} และ LT_{90}) วิเคราะห์โดยใช้วิธี Probit Analysis

เวลาและสถานที่ : เริ่มต้น ตุลาคม 2561 – สิ้นสุด กันยายน 2563

- ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- แปลงปลูกกาแฟอะราบิก้าของเกษตรกร จังหวัดจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน ตาก และเพชรบูรณ์

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ขั้นตอนที่ 1 การเก็บตัวอย่างดิน แมลงที่เป็นโรค และแยกเชื้อราโรคแมลง

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างซากแมลงที่ติดเชื้อราโรคแมลงและการเก็บตัวอย่างดินจากสภาพธรรมชาติในแปลงปลูกกาแฟอะราบิก้า รวมทั้งสิ้น 33 จุด โดยใช้ด้วงงวงข้าวเป็นเหยื่อล่อโดยวิธี bait method แยกเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA เพื่อจัดจำแนกสกุล (genus) และชนิด (species) ของเชื้อรา โดยดูสัณฐานวิทยาภายนอกตามวิธีการของ Humber (2012) โดยทดสอบในห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร พบว่า สีโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร MEA มีลักษณะแตกต่างกัน สามารถจำแนกเชื้อได้ 18 ไอโซเลท ได้แก่ *M. anisopliae* จำนวน 15 ไอโซเลท และ *B. bassiana* จำนวน 3 ไอโซเลท จัดเก็บเชื้อที่แยกได้ไว้ที่ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ จากนั้นคัดเลือกตัวแทนเชื้อราดังกล่าวมาทำการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในห้องปฏิบัติการ จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ *M. anisopliae* จำนวน 4 ไอโซเลท (DOA-M145, M146, M147 และ M150) และ *B. bassiana* จำนวน 1 ไอโซเลท (DOA-B18) มาเปรียบเทียบกับตัวแทนเชื้อราโรคแมลงจากห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ *M. anisopliae* จำนวน 1 ไอโซเลท (DOA-M8) และ *B. bassiana* จำนวน 3 ไอโซเลท (DOA-B4, DOA-B19 และ DOA-B20) (Table 1)

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 2 การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราโรคแมลงที่มีศักยภาพในการควบคุมมอดเจาะผล

จากการคัดเลือกตัวแทนเชื้อราโรคแมลงเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในห้องปฏิบัติการ จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ *M. anisopliae* จำนวน 5 ไอโซเลท (DOA-M8, M145, M146, M147 และ M150) และ *B. bassiana* จำนวน 4 ไอโซเลท (DOA-B4, DOA-B18, DOA-B19 และ DOA-B20) ที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดสอบ จำนวน 3 ครั้ง ได้แก่ ครั้งที่ 1 ทดสอบช่วงวันที่ 22 มกราคม 2562-5 กุมภาพันธ์ 2562 ครั้งที่ 2 ช่วงวันที่ 22 มกราคม 2562-5 กุมภาพันธ์ 2562 และครั้งที่ 3 ช่วงวันที่ 29 พฤษภาคม 2562-12 มิถุนายน 2562 จากนั้นตรวจสอบการติดเชื้อราโรคแมลงของมอดเจาะผลกาแฟ โดยตรวจดูโครงสร้างของเชื้อราโดยใช้หลัก Koch's postulates เพื่อยืนยันการเกิดโรคของเชื้อให้ตรงกับเชื้อราที่ทำการปลูกเชื้อไปในครั้งแรก โดยพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราในมอดเจาะผลกาแฟหลังการฉีดพ่น 14 วัน ดังนี้ (Table 2)

ผลการทดสอบครั้งที่ 1 พบว่า *B. bassiana* DOA-B18 มีประสิทธิภาพในการก่อโรคกับมอดเจาะผลกาแฟสูงสุด 95% รองลงมา คือ DOA-B4 (87.50%), DOA-M145 (72.50%) และ DOA-B19 (70.00%) ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ

ผลการทดสอบครั้งที่ 2 พบว่า *B. bassiana* DOA-B18 ยังคงมีประสิทธิภาพในการก่อโรคกับมอดเจาะผลกาแฟสูงที่สุด คือ 87.50% รองลงมา คือ DOA-M8 (70.00%), DOA-B4 (60.00%), DOA-B19 (60.00%) และ DOA-B20 (52.50%) ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 5 ไอโซเลท ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ

ผลการทดสอบครั้งที่ 3 พบว่า *B. bassiana* DOA-B4 มีประสิทธิภาพสูงสุดถึง 100% รองลงมา คือ DOA-B18 (97.50%), DOA-B20 (92.50%), DOA-M8 (75.00%) และ DOA-B19 (70.00%) ตามลำดับ และทั้ง 5 ไอโซเลท ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ

จากผลการทดสอบทั้ง 3 ครั้ง จะสังเกตเห็นได้ว่า เชื้อราโรคแมลงทุกไอโซเลทสามารถเข้าทำลายมอดเจาะผลกาแฟได้ และพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ ตั้งแต่ 10.00-100.00% โดยมอดเจาะผลกาแฟจะเคลื่อนไหวช้าลงและหยุดการเคลื่อนไหวหลังจากจุ่มสารแขวนลอยสปอร์ หลังการทดสอบ 3 วัน และยังไม่พบเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุมลำตัวมอดเจาะผลกาแฟ เริ่มพบการติดเชื้อและมองเห็นโครงสร้างของเชื้อราหลังการทดสอบ 4-7 วัน สามารถมองเห็นโครงสร้างเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุมลำตัวมอดเจาะผลกาแฟชัดเจนมากขึ้นซึ่งเชื้อราสร้างโคนิเดียในปริมาณมากหลังการทดสอบ 7-14 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าการทดลองทั้ง 3 ครั้ง เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในทุกกรรมวิธีมีค่าแตกต่างกันกับกรรมวิธีในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำข้อมูลทั้ง 3 ครั้งมาคิดค่าเฉลี่ย พบว่า *B. bassiana* ทั้ง 4 ไอโซเลท (DOA-B4, DOA-B18, DOA-B19 และ DOA-B20) มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อใกล้เคียงกัน ซึ่งพบค่าเฉลี่ยการติดเชื้อของ DOA-B18 ดีที่สุดที่ 93.33% รองลงมา คือ DOA-B4 พบที่ 82.50% ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลทไม่มีความแตกต่างกัน และ DOA-B4 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ DOA-B19 และ DOA-B20 ซึ่งพบการติดเชื้อ 66.67% และพบแนวโน้มประสิทธิภาพในการเข้าทำลายมอดเจาะผล

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

กาแฟของ *B. bassiana* สูงกว่า *M. anisopliae* (DOA-M8, DOA-M145, DOA-M146, DOA-M147 และ DOA-M150) พบการติดเชื้ออยู่ระหว่าง 20.00-60.00% ซึ่งจากการทดลองที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Bustillo *et al*. (1999) ได้รายงานว่า ในการใช้เชื้อราโรคแมลงควบคุมมอดเจาะผลกาแฟนั้น การใช้ *M. anisopliae* มีความรุนแรงน้อยกว่าการใช้ *B. bassiana*

เมื่อคำนวณค่า LT_{50} ที่ 14 วันหลังการทดลอง พบว่า DOA-B18 มี LT_{50} ต่ำสุดที่ 7.97 วัน รองลงมาคือ DOA-B4, DOA-B20 และ DOA-B19 เท่ากับ 8.28, 9.52 และ 9.58 วัน ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่า LT_{90} พบว่า DOA-B18 ยังคงมี LT_{90} ต่ำสุดที่ 11.18 วัน รองลงมาคือ DOA-B4, DOA-B20 และ DOA-B19 เท่ากับ 13.20, 16.33 และ 17.13 วัน ตามลำดับ (Table 3) สังเกตเห็นได้ว่า DOA-B4 และ DOA-B18 พบอัตราการติดเชื้อในมอดเจาะผลกาแฟสูงและมีระยะเวลา (LT_{50} และ LT_{90}) ในการติดเชื้อเร็วกว่าไอโซเลทอื่นๆ อาจเนื่องมาจากเป็นเชื้อราโรคแมลงที่แยกเชื้อมาจากมอดเจาะผลกาแฟโดยตรง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Samuels *et al*. (2002) ได้ทดสอบเชื้อราโรคแมลง จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ *B. bassiana* จำนวน 3 ไอโซเลท (LPP1, LPP5 และ CG11) และ *M. anisopliae* จำนวน 1 ไอโซเลท (CG-46) ที่ความเข้มข้น $1x10^7$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพห้องปฏิบัติการ หลังการทดสอบ 10 วัน พบว่า เชื้อราโรคแมลงที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถก่อโรคกับมอดเจาะผลกาแฟได้ทุกไอโซเลท แต่มีความรุนแรงที่แตกต่างกัน ซึ่ง LPP1 และ LPP5 สามารถเข้าทำลายมอดเจาะผลกาแฟได้ดีที่สุด เท่ากับ 91.00 และ 95.70% ตามลำดับ ส่วน CG11 และ CG-46 พบเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายน้อย เท่ากับ 53.00 และ 46.70% ตามลำดับ ซึ่ง LPP5 เดิมแยกเชื้อได้จากมอดเจาะผลกาแฟที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ และ LPP1 แยกเชื้อมาจากด้วง chrysomelid จาก Table 1 พบว่า *M. anisopliae* DOA-M145, DOA-M146, DOA-M147 และ DOA-M150 เป็นเชื้อราที่แยกเชื้อมาจากดิน ซึ่งพบเปอร์เซ็นต์การก่อโรคในมอดเจาะผลกาแฟส่วนใหญ่น้อยกว่า 50% ซึ่งมีค่าเฉลี่ยไม่สูงมากนัก อาจเป็นเพราะมอดเจาะผลกาแฟไม่ได้เป็นแมลงศัตรูเป้าหมายของ *M. anisopliae* ดังกล่าวข้างต้น และอาจเนื่องมาจากเป็นเชื้อที่ต้องอาศัยอุณหภูมิต่ำ และความชื้นสูงจึงจะสามารถเจริญเติบโตได้ดี ซึ่งอาจจะเหมาะสมในการนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่มีวงจรชีวิตอาศัยอยู่ในดินได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดสอบของ Apriyanto and Nadrawati (2019) ทดสอบเชื้อราโรคแมลงควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ *B. bassiana* Cf-Bb (แยกเชื้อธรรมชาติจากด้วงงวงมันเทศ; *Cylas formicarius*), *B. bassiana* Cf-Nv (แยกเชื้อธรรมชาติจากมวนเขียวข้าว; *Nezara viridula*), *M. anisopliae* sc-Ma (แยกเชื้อธรรมชาติจากดินในแปลงกาแฟ) และ *M. anisopliae* sfc-Ma (แยกเชื้อธรรมชาติจากดินในแปลงผัก) ความเข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้มอดตายได้ 80.00, 76.70, 63.30 และ 60.00% ตามลำดับ ซึ่งพบว่า *B. bassiana* ที่แยกเชื้อธรรมชาติมาจากแมลงสามารถเข้าทำลายมอดเจาะผลกาแฟได้สูงกว่า *M. anisopliae* ที่แยกเชื้อมาจากดิน

จากการทดลองยังพบว่า เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ DOA-M8 ของมอดเจาะผลกาแฟพบที่ 59.17% ซึ่งเชื้อ DOA-M8 แยกเชื้อธรรมชาติมาจากแมลงนูนหลวงดังนั้นจึงพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไม่สูงมากนัก สอดคล้องกับการทดลองของ Lecuona *et al*. (1986) พบว่า *M. anisopliae* ที่แยกได้จากด้วงงวงเจาะ

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

สมอฝ้าย (cotton boll weevil; *Anthonomus grandis*) ความเข้มข้น $1.5x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟตายได้เพียง 60% และไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Balakrishnan and Naik (2014) ได้ทดสอบประสิทธิภาพ *M. anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ BCRL Ma6, BCRL 6911, CCRI *Ma*1, CCRI *Ma*2, CCRI *Ma*3, IWST *Ma*11, IWST *Ma*15, MTCC 3210, MTCC 6060 และ MTCC 6067 เข้มข้น $1x10^5$, $1x10^6$, $1x10^7$ และ $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่า เชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BCRL 6911, CCRI Ma1 และ CCRI Ma2 เข้มข้น $1x10^7$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถความคุมมอดเจาะผลกาแฟได้สูงสุดและมากกว่า 90%

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อราโรคแมลงก่อโรคในแมลงอาศัยนั้น ขึ้นอยู่กับหลายๆ ปัจจัย เช่น ความเฉพาะเจาะจงในการเข้าทำลายแมลง ซึ่งวงจรชีวิตของเชื้อราโรคแมลงส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับวงจรชีวิตของแมลงอาศัยเช่นเดียวกัน รวมถึงสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา เช่น อุณหภูมิ แสง และความชื้น (Shah and Pell, 2003) จากผลการทดลองดังกล่าวเชื้อราโรคแมลงนั้นมีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงศัตรูเป้าหมาย ดังนั้นการนำเชื้อราโรคแมลงไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดนั้น ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราโรคแมลงกับแมลงอาศัยซ้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีและมีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเกิดโรคของเชื้อราโรคแมลงบนมอดเจาะผลกาแฟอะราบิก้า

ทำการคัดเลือกเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ สายพันธุ์ DOA-B4, DOA-B18, DOA-B19 และ DOA-B20 มาทำการศึกษาหาอัตราความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำไปใช้ควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ โดยทดสอบที่ความเข้มข้น $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ และ $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ในสภาพห้องปฏิบัติการ จำนวน 6 ครั้ง โดยทดสอบในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ครั้งที่ 1 และ 2 ระหว่างวันที่ 9-19 กรกฎาคม 2563 ครั้งที่ 3 และ 4 ช่วงวันที่ 20-30 สิงหาคม 2563 และครั้งที่ 5 และ 6 ช่วงวันที่ 24 กันยายน 2563-4 ตุลาคม 2563 พบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราในมอดเจาะผลกาแฟหลังการฉีดพ่น 10 วัน ดังนี้ (Table 4)

ครั้งที่ 1 พบว่า DOA-B4 เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อได้สูงที่สุดถึง 97.50% รองลงมา คือ DOA-B18, DOA-B20 และ DOA-B19 ที่ความเข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 85.00, 85.00 และ 82.50% ตามลำดับ และทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ

ครั้งที่ 2 พบว่า DOA-B18 เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อได้สูงที่สุด เท่ากับ 97.50% รองลงมา คือ DOA-B20, DOA-B4 และ DOA-B19 เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 92.50, 87.50 และ 85.00% ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ

กรมวิชาการเกษตร

ครั้งที่ 3 พบว่า DOA-B20 เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อได้สูงถึง 100.00% รองลงมา คือ DOA-B19, DOA-B4 และ DOA-B18 เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 95.00, 92.50 และ 92.50% ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 4 ไอโซเลท ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ

ครั้งที่ 4 พบว่า DOA-B18 และ B19 เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อได้สูงสุด เท่ากับ 95.00% รองลงมา คือ DOA-B4 และ DOA-B20 เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 92.50 และ 90.00% ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติทั้ง 4 ไอโซเลท

ครั้งที่ 5 พบว่า DOA-B18 เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อได้สูงถึง 100.00% รองลงมา คือ DOA-B4, DOA-B19 และ DOA-B20 เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 97.50, 95.00 และ 95.00% ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติทั้ง 4 ไอโซเลท

ครั้งที่ 6 พบว่า DOA-B18 เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ยังคงมีประสิทธิภาพสูงที่สุด ซึ่งสามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อได้ดีที่สุดที่ 95.00% รองลงมา คือ DOA-B4, DOA-B19 และ DOA-B20 เข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 90.00, 90.00 และ 87.50% ตามลำดับ และไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติทั้ง 4 ไอโซเลท

จากผลการทดลองทั้ง 6 ครั้ง แสดงให้เห็นว่า เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราของมอดเจาะผลกาแฟเป็นไปในทิศทางเดียวกัน เมื่อความเข้มข้นของ *B. bassiana* สูงขึ้น อัตราการติดเชื้อของมอดเจาะผลกาแฟเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน โดยความรุนแรงของเชื้อแต่ละไอโซเลทและในความเข้มข้นที่แตกต่างกันนั้นมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำผลการทดลองของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท รวมทั้ง 6 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ย พบว่า ความเข้มข้นที่ $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร พบมอดติดเชื้อสูงสุดอยู่ระหว่าง 90.42-94.17% ที่ความเข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร พบอยู่ระหว่าง 68.75-72.50% ที่ความเข้มข้น $1x10^7$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร พบอยู่ระหว่าง 39.17-54.58% และที่ความเข้มข้น $1x10^6$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร พบอยู่ระหว่าง 20.00-32.08% เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร และพบว่า *B. bassiana* ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อได้ดีมากกว่า 90% ซึ่ง DOA-B18 มีประสิทธิภาพดีที่สุดสามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อได้สูงสุดถึง 4 ครั้ง พบค่าเฉลี่ยที่ 94.17% รองลงมา คือ DOA-B4 (92.08%), DOA-B20 (90.83%) และ DOA-B19 (90.42%) ตามลำดับ และทั้ง 4 ไอโซเลทไม่มีความแตกต่างกัน

เมื่อคำนวณค่า LC_{50} และ LC_{90} ที่ 10 วัน หลังการทดสอบ พบว่า DOA-B4 มีค่า LC_{50} ต่ำสุด เท่ากับ 6.66×10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ DOA-B18, DOA-B19 และ DOA-B20 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 1.12×10^7, 1.50×10^7 และ 1.88×10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า LC_{90} พบว่า DOA-B18 มีค่า LC_{90} ต่ำสุด เท่ากับ 7.43×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ DOA-B4, DOA-B19 และ DOA-B20 มีค่า LC_{90} เท่ากับ 8.45×10^8, 1.14×10^9 และ 1.48×10^9 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 5)

เมื่อคำนวณค่า LT_{50} และ LT_{90} หลังการทดสอบ 10 วัน พบว่า ที่ความเข้มข้น $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตรเชื้อราสามารถก่อโรคในแมลงได้เร็วที่สุด พบ DOA-B18 มีค่า LT_{50} ต่ำสุด เท่ากับ 5.66 วัน

รองลงมา คือ DOA-B4 , DOA-B19 และ DOA-B20 เท่ากับ 5.64, 5.82 และ 6.06 วัน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า LT_{90} พบว่า DOA-B18 มีค่า LT_{90} ต่ำสุด เท่ากับ 8.52 วัน รองลงมา คือ DOA-B4, DOA-B19 และ DOA-B20 เท่ากับ 8.79, 9.08 และ 9.61 วัน ตามลำดับ (Table 6)

จากค่า LC_{50}, LC_{90}, LT_{50} และ LT_{90} ที่คำนวณได้นั้นทำให้ทราบว่าเชื้อราที่มีความรุนแรงสูงจะมีค่า LC_{50}, LC_{90}, LT_{50} และ LT_{90} ต่ำ ซึ่งไอโซเลท DOA-B4 และ DOA-B18 พบว่ามีค่าสถิติดังกล่าวต่ำกว่าไอโซเลทอื่นๆ เป็นเชื้อราที่มีความรุนแรงในการทำให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อราได้เร็วที่สุดเพียง 5-6 วัน ผลการทดลองมีความใกล้เคียงกับการทดลองของ De La Rosa *et al*., (1997) ทดสอบเชื้อราโรคแมลงจำนวน 9 ไอโซเลทกับมอดเจาะผลกาแฟพบว่า เชื้อราโรคแมลงสามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟตายได้ระหว่าง 20.00-100.00% และไอโซเลทที่มีความรุนแรงมากที่สุดคือ Bb-26 สามารถทำให้มอดตายได้ 50% (LT_{50}) ในเวลา 4.3 วัน โดยเป็นเชื้อราที่แยกเชื้อธรรมชาติจากมอดเจาะผลกาแฟ และยังสอดคล้องกับการทดลองของ Cárdenas-Ramírez *et al.* (2007) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ Bb 9020, Bb 9023, Bb 9205, Bb 9001, Bb 9119 และ Bb 9024 โดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยเข้มข้น $1x10^6$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในระดับห้องปฏิบัติการ ตรวจผลการทดลองทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 วัน พบอัตราการตาย 81.67, 83.33, 88.33, 76.67, 73.33 และ 53.33% ตามลำดับ เมื่อผสมสายพันธุ์ระหว่าง Bb 9020, Bb 9023 และ Bb 9205 พบอัตราการตายต่ำสุด เท่ากับ 65.00% และผสมสายพันธุ์ระหว่าง Bb 9001, Bb 9119 และ Bb 9024 พบอัตราการตายสูงถึง 100% เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ทางการค้า ซึ่งพบอัตราการตาย 83.33% จากนั้นทำการทดสอบในสภาพธรรมชาติ พบอัตราการตายในทุกสายพันธุ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติอยู่ในช่วง 53.10-60.10% ยกเว้นการผสมสายพันธุ์ระหว่าง Bb 9001, Bb 9119 และ Bb 9024 พบอัตราการตายสูงสุดเท่ากับ 66.60% จึงมีความเป็นไปได้ในอนาคตที่จะนำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพมาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้ควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพไร่ รวมทั้งพัฒนาเทคนิค อัตราการใช้หรือการฉีดพ่นเชื้อราโรคแมลงเพื่อให้สามารถนำไปใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างดินและตัวอย่างซากแมลง จำนวน 33 จุด สามารถจำแนกเชื้อราโรคแมลงตามสันฐานวิทยาได้ 18 ไอโซเลท ได้แก่ *M. anisopliae* จำนวน 15 ไอโซเลท และ *B. bassiana* จำนวน 3 ไอโซเลท จัดเก็บเชื้อที่แยกได้ไว้ที่ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำหรับการใช้ *B. bassiana* ที่ $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อได้ดีกว่าการใช้ *M. anisopliae* ในสภาพห้องปฏิบัติการและพบค่า LT_{50}, LT_{90} ของ *B. bassiana* ต่ำกว่า *M. anisopliae* ซึ่ง *B. bassiana* DOA-B18 ที่ $1x10^9$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในห้องปฏิบัติการ มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ เท่ากับ 94.17% มีค่า LC_{50}, LC_{90} เท่ากับ $1.12x10^7$ และ $7.43x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร และมีค่า LT_{50}, LT_{90} เท่ากับ 5.67 และ 8.52 วัน ตามลำดับ

กรมวิชาการเกษตร

ดังนั้น *B. bassiana* DOA-B18 จึงมีความเหมาะสมในการนำไปทดสอบเพื่อหาอัตราและเทคนิควิธีการใช้ที่เหมาะสมในสภาพไร่ รวมทั้งการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมมอดเจาะผลกาแฟต่อไป และในการทดลองครั้งนี้ยังขาดการทดลองเกี่ยงกับผลกระทบของ mycotoxin ที่เชื้อราผลิตขึ้นมาเพื่อสร้างความเป็นพิษกับแมลงศัตรูเป้าหมาย และเนื่องจากงานวิจัยที่ผ่านมาเชื้อรา *B. bassiana* สามารถอยู่ร่วมกับพืชในสภาวะ endophytic fungi ซึ่งงานวิจัยในอนาคตสามารถประยุกต์ใช้คุณสมบัติของเชื้อราดังกล่าวนี้ไปใช้ในการสร้างความต้านทานโรคและแมลงของพืชได้ (Vega *et al.,* 2012; Wei *et al*., 2020)

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากงานวิจัยในครั้งนี้ได้ไอโซเลทของเชื้อราโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพห้องปฏิบัติการ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปพัฒนาต่อยอดในการทดสอบในสภาพไร่เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟต่อไป

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางสาวฉัตรนภา ข่มอาวุธ และนายสุเมธ พากเพียร ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการติดต่อประสานงานกับเกษตรกรในพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างซากแมลงและตัวอย่างดิน ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตากที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการเก็บตัวอย่างมอดเจาะผลกาแฟเพื่อใช้ในการทดสอบ ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์ทางสถิติงานวิจัยเกษตร กรมวิชาการเกษตร ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ผลการทดลอง และขอขอบคุณคณะทำงานกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

บัณฑูรย์ วาฤทธิ์ ชวลิต กอสัมพันธ์ วราพงษ์ บุญมา ประเสริฐ คำออน นิธิ ไทยสันทัด ถาวร สุภาวงศ์ เยาวลักษณ์ จันทร์บาง และ สมบัติ ศรีชูวงศ์. 2551. การศึกษาการระบาดและป้องกันกำจัดมอดเจาะผลกาแฟอะราบิก้าแบบผสมผสาน, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 38 หน้า.

Apriyanto, D. and Nadrawati. 2019. Laboratory evaluation of Bengkulu isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against coffee berry borer, *Hyphotenemus hampei*, using spraying method. Journal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika. 19(2): 93-100.

กรมวิชาการเกษตร

Balakrishnan, M.M. and P.R Naik. 2014. Infectivity of Ten *Metarhizium anisopliae* Isolates to the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Entomology and Zoology Studies. 2(5): 246-249.

Bustillo. A., M.G. Bernal, P. Benavides and B. Chaves. 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infeceting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. Florida Entomologist. 82(4): 491-498.

Cárdenas-Ramírez, A.B., D.A. Villalba-Guott, A.E. Bustillo-Pardey, E.C. Montoya-Restrepo and C.E. Góngora-Botero. 2007. Eficacia de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin en el control de la broca del café. Revista Cenicafé (Colombia). 58(4): 293-303.

De La Rosa, W., R. Alatorre, J. Trujillo and J.F. Barrera. 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) Strains Against the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scolytidae). Biological and Microbial Contral. 90(6): 1534-1538.

Humber, R.A. 2012. Preservation of entomopathogenic fungal cultures, pp. 317-328. *In*: L.A. Lacey. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology.* Elsevier Ltd.

Lecuona, RE., PM. Fernandez, SB. Alves, E. Bleicher. 1986. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* Ferrari., 1867 (Coleoptera: Scolytidae). Anais da Sociedade Entomologia do Brazil. 15: 21-27.

Samuels, R.I., R.C. Pereira and C.A.T. Gava. 2002. Infection of the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) by Brazilian Isolates of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Biocontrol Science and Technology. 12: 631-635.

Shah P.A. and J.K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl Microbiol Biotechnol. 61: 413-423.

Vega, F.E., N.V. Meylingy, J.J. Luangsa-ard and M. Blackwellz. 2012. Fungal Entomopathogens, pp. 171-220. *In*: F.E. Vega and H.K. Kaya., eds. *Insect Pathology.* Elsevier Ltd.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Wei, Q.-Y., Y.-Y. Li, C. Xu, Y.-X. Wu, Y.-R. Zhang and H. Liu. 2020. Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. Arthropod-Plant Interactions. https://doi.org/10.1007/s11829-020-09746-9.

Tutte, J. 1969. Plant pathological methods Fungi and bacteria Burgess publishing company, U.S.A. pp. 229.

Zimmerman, G. 1998. Suggestions for a standardised method for reisolation of entomopathogenic fungi from soil using the bait method. IOBC/WPRS Bulletin, 21 (4): 289 p.

Table 1 Entomopathogenic fungi strains used during the present studies.

Isolate	Insect host	Crop	Location
M. anisopliae DOA-M8	White grub	Pineapple	Huai Sai Sub-district, Mueang District, Prachuap Khiri Khan Province.
M. anisopliae DOA-M145	Rice weevil	Soil	Plant of *Coffea arabica*, Chumphon Province.
M. anisopliae DOA-M146	Rice weevil	Soil	Plant of *Coffea arabica*, Chumphon Province.
M. anisopliae DOA-M147	Rice weevil	Soil	Plant of *Coffea arabica*, Chumphon Province.
M. anisopliae DOA-M150	Rice weevil	Soil	Plant of *Coffea arabica*, Chumphon Province.
B. bassiana DOA-B4	Coffee berry borer	Coffee	Thep Sadet Sub-district, Doi Saket District, Chiang Mai Province.
B. bassiana DOA-B18	Coffee berry borer	Coffee	Tak Agricultural Researce And Development Canter, Tak Province.
B. bassiana DOA-B19	Leaf eating catterpillar	N/A	N/A
B. bassiana DOA-B20	Leafhopper	Eggplant	Suphanburi Province.

กรมวิทยาศาสตร์

Table 2 Mortality of coffee berry borer (CBB) caused by infection with 9 fungal isolates using a concentration of $1x10^8$ conidia/ml^{-1} at 14 days after treatment.

Isolate	No. of CBB	Experiment 1 January 19	Experiment 2 January 19	Experiment 3 May 19	Mean
DOA-M8	40[1/]	32.50 c[2/]	70.00 ab	75.00 a	59.17 c
DOA-M145	40	72.50 ab	15.00 d	10.00 b	32.50 d
DOA-M146	40	35.00 c	22.50 cd	22.50 b	26.67 d
DOA-M147	40	37.50 c	42.50 bcd	25.00 b	35.00 d
DOA-M150	40	30.00 c	12.50 d	20.00 b	20.83 d
DOA-B4	40	87.50 ab	60.00 ab	100.00 a	82.50 ab
DOA-B18	40	95.00 a	87.50 a	97.50 a	93.33 a
DOA-B19	40	70.00 ab	60.00 ab	70.00 a	66.67 bc
DOA-B20	40	55.00 bc	52.50 abc	92.50 a	66.67 bc
Control	40	0.00 d	0.00 d	0.00 c	0.00 e
CV (%)		37.1	48.3	46.2	28.6

[1/]Average of 4 replications, 10 adults/replication.

[2/]In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

กรมวิชาการเกษตร

Table 3 Lethal Time (LT_{50} and LT_{90}) for entomopathogenic fungi strains a concentration of $1x10^8$ conidia/ml^{-1} during laboratory bioassay of coffee berry borer at 14 days after treatment.

Isolate	LT_{50} (Day)	95% Confidence limit		LT_{90} (Day)	95% Confidence limit	
		Lower	Lower		Lower	Upper
DOA-M8	10.10	8.27	12.34	21.14	17.31	25.82
DOA-M145	12.71	11.21	14.41	18.40	16.22	20.86
DOA-M146	15.11	12.35	18.49	28.06	22.94	34.33
DOA-M147	13.72	11.34	16.60	25.43	21.02	30.78
DOA-M150	16.53	13.33	20.51	30.65	24.71	38.02
DOA-B4	8.28	7.20	9.52	13.20	11.48	15.18
DOA-B18	7.97	7.10	8.95	11.18	9.96	12.55
DOA-B19	9.58	8.13	11.28	17.13	14.55	20.17
DOA-B20	9.52	8.15	11.12	16.33	13.99	19.08

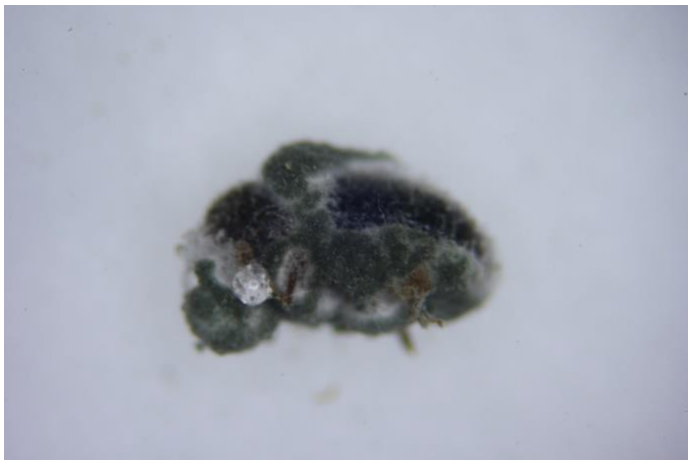

Figure 1 Coffee berry borer infected by *Metharhizium anisopliae*

Figure 2 Coffee berry borer infected by *Beauveria bassiana*

กรมวิชาการเกษตร

Table 4 Mortality of coffee berry borer (CBB) caused by infection with 4 fungal isolates using a concentration of $1x10^6$, $1x10^7$, $1x10^8$ and $1x10^9$ conidia/ml^{-1} at 10 days after treatment.

Isolate	Concentration (Conidia/ml.)	No. of CBB	Experiment 1 July 20		Experiment 2 July 20		Experiment 3 August 20		Experiment 4 August 20		Experiment 5 September 20		Experiment 6 September 20		Mean	
DOA-B4	10^6	40[1/]	35.00	de[2/]	42.50	e-g	5.00	g	0.00	g	70.00	a-e	40.00	cd	32.08	ef
	10^7	40	37.50	de	65.00	b-e	32.50	de	30.00	e	80.00	a-d	82.50	a	54.58	c
	10^8	40	75.00	abc	60.00	c-f	60.00	c	52.50	cd	97.50	a	90.00	a	72.50	b
	10^9	40	97.50	a	87.50	abc	92.50	a	92.50	a	97.50	a	85.00	a	92.08	a
DOA-B18	10^6	40	62.50	bc	42.50	e-g	2.50	g	7.50	f	22.50	g	30.00	d	27.92	fg
	10^7	40	35.00	de	37.50	e-h	30.00	def	45.00	cde	45.00	efg	65.00	abc	42.92	d
	10^8	40	80.00	ab	55.00	d-g	70.00	bc	75.00	ab	65.00	b-e	67.50	abc	68.75	b
	10^9	40	85.00	ab	97.50	a	92.50	a	95.00	a	100.00	a	95.00	a	94.17	a
DOA-B19	10^6	40	22.50	ef	27.50	gh	12.50	efg	7.50	f	27.50	fg	47.50	cd	24.17	fg
	10^7	40	32.50	de	27.50	gh	35.00	d	27.50	ef	60.00	cde	52.50	bcd	39.17	de
	10^8	40	65.00	bc	42.50	e-h	90.00	ab	60.00	bc	85.00	abc	82.50	a	70.83	b
	10^9	40	82.50	ab	85.00	a-d	95.00	a	95.00	a	95.00	ab	90.00	a	90.42	a
DOA-B20	10^6	40	5.00	f	12.50	h	10.00	fg	7.50	f	42.50	efg	42.50	cd	20.00	g
	10^7	40	17.00	ef	32.50	fgh	30.00	def	32.50	de	52.50	def	80.00	ab	40.83	de
	10^8	40	55.00	cd	57.50	c-g	62.00	c	62.50	bc	95.00	ab	87.50	a	70.00	b
	10^9	40	85.00	ab	92.50	ab	100.00	a	90.00	a	90.00	abc	87.50	a	90.83	a
Control		40	0.00	f	0.00	i	0.00	h	0.00	g	0.00	h	0.00	e	0.00	h
CV (%)			27.2		35.2		29.7		27.2		27.7		26.2		11.7	

[1/]Average of 4 replications, 10 adults/replication.

[2/]In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 5 Lethal Concentration (LC_{50} and LC_{90}) for entomopathogenic fungi strains during laboratory bioassay of coffee berry borer at 10 days after treatment.

Isolate	LC_{50} (Conidia/ml^{-1})	95% Confidence limit		LC_{90} (Conidia/ml^{-1})	95% Confidence limit	
		Lower	Upper		Lower	Upper
DOA-B4	6.66×10^6	1.31×10^6	3.38×10^7	8.45×10^8	1.66×10^8	4.29×10^9
DOA-B18	1.12×10^7	2.71×10^6	4.60×10^7	7.43×10^8	1.80×10^8	3.07×10^9
DOA-B19	1.50×10^7	3.51×10^6	6.43×10^7	1.14×10^9	2.65×10^8	4.87×10^9
DOA-B20	1.88×10^7	4.34×10^6	8.13×10^7	1.48×10^9	3.41×10^8	6.39×10^9

Table 6 Lethal Time (LT_{50} and LT_{90}) for entomopathogenic fungi strains during laboratory bioassay of coffee berry borer at 10 days after treatment.

Isolate	Concentration	LT_{50} (Day)	95% Confidence limit		LT_{90} (Day)	95% Confidence limit	
			Lower	Lower		Lower	Upper
DOA-B4	10^6	11.32	9.58	13.40	20.60	16.96	23.74
	10^7	8.64	7.58	9.85	14.36	12.59	16.37
	10^8	7.42	7.42	6.68	11.35	10.22	12.61
	10^9	5.64	5.04	6.30	8.79	7.86	9.82
DOA-B18	10^6	14.35	14.35	11.02	37.77	29.01	49.17
	10^7	9.63	8.43	10.98	15.67	13.74	17.89
	10^8	7.57	6.77	8.46	11.89	10.63	13.29
	10^9	5.67	5.09	6.31	8.52	7.65	9.49
DOA-B19	10^6	12.65	10.52	15.22	22.27	18.51	26.79
	10^7	10.34	8.91	11.99	17.39	14.99	20.18
	10^8	7.46	6.63	8.38	11.91	10.59	13.39
	10^9	5.82	5.21	6.50	9.08	8.12	10.15
DOA-B20	10^6	13.53	11.19	16.35	22.98	19.01	27.77
	10^7	9.92	8.66	11.36	16.08	14.04	18.41
	10^8	7.73	6.99	8.55	11.40	10.31	12.61
	10^9	6.06	5.40	6.79	9.61	8.57	10.77

กรมวิทยาศาสตร์