

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Nomuraea* และ *Metarhizium*
สาเหตุโรคแมลง ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก
ของดอกดาวเรือง

Efficacy of Entomopathogenic Fungi *Nomuraea* and
Metarhizium for Controlling Common Cutworm on Marigold

ภัทรดนัย ชัยสวัสดิ์^{1/} จิราพร กุลสาริน^{1/} ไสว บุรณพานิชพันธุ์^{1/}
และ สิริญา คัมภีโร^{1/}

Phattharadanai Chaisawas^{1/}, Jiraporn Kulsarin^{1/}, Sawai Buranapanichpan^{1/}
and Siriya Kumpiro^{1/}

Abstract: Common cutworm (*Spodoptera litura* F.) cadavers infected by fungi and soil samples nearby marigold field in Chiang Mai Province were collected, cultured and isolated. Thirteen of *Nomuraea rileyi* were isolated from common cutworm cadavers and nine of *Metarhizium anisopliae* were isolated from soil samples nearby marigold field by baiting technique. Pathogenicity bioassay was performed. Spore suspensions containing 1×10^8 conidia/ml were sprayed on third instars larvae of common cutworm. The result showed that *N. rileyi*, CMU-NR4 isolate, showed the highest pathogenicity (100%) against third instars larvae of common cutworm with LT_{50} at 4.34 days. Meanwhile, *M. anisopliae*, CMU-MA5, isolated from soil sample was also high pathogenicity (74.00%) with LT_{50} at 6.81 days.

Keywords: Entomopathogenic fungi, marigold, common cutworm

^{1/} สาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/} Division of Entomology, Department of Entomology and Plant Pathology Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

บทคัดย่อ: การรวบรวมตัวอย่างหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* F.) ที่คาดว่าจะตายเนื่องจากเชื้อรา และดินบริเวณใกล้เคียงแปลงปลูกดาวเรืองในจังหวัดเชียงใหม่สามารถจำแนกเชื้อรา *Nomuraea rileyi* ได้จำนวน 13 ไอโซเลท จากตัวอย่างหนอนกระทู้ผัก และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ได้จำนวน 9 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินที่แยกได้โดยวิธีเหี่ยยอล่อทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราความเข้มข้น 1×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ลงบนหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 ผลปรากฏว่าเชื้อรา *N. rileyi* ไอโซเลท CMU-NR4 ที่แยกได้จากตัวอย่างหนอนกระทู้ผักสามารถก่อให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผักได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 เฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่า LT_{50} เท่ากับ 4.34 วัน ส่วนเชื้อราที่แยกได้จากดิน *M. anisopliae* ไอโซเลท CMU-MA5 สามารถก่อให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผักได้มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 เฉลี่ย 74.00 เปอร์เซ็นต์ มีค่า LT_{50} เท่ากับ 6.81 วัน

คำสำคัญ: เชื้อราสาเหตุโรคแมลง ดาวเรือง หนอนกระทู้ผัก

คำนำ

ดาวเรืองเป็นไม้ตัดดอกที่ได้รับความนิยมจากเกษตรกรมาช้านาน (Kessler, 1998) เนื่องด้วยชื่อที่เป็นสิริมงคล คล้องจองกับคำว่ารุ่งเรือง ซึ่งหมายถึงแตกฉาน ไฉ่ฉาง คนไทยจึงนิยมนำดาวเรืองร้อยเป็นพวงมาลัยเพื่อนำไปมอบให้กับผู้ที่เคารพ ไหว้บูชาพระ ประกอบเป็นบายศรี และใช้ประดับแจกันร่วมกับไม้ดอกชนิดอื่น ดาวเรืองเป็นไม้ดอกที่ปลูกง่าย สามารถปลูกได้ทั่วประเทศ (AmeriSeed Inc., 2011) ในปี พ.ศ. 2523 พบว่าประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกดาวเรือง 482.45 ไร่ จำนวนผู้ปลูก 2,226 ราย และมูลค่าการผลิต 14,473,500 บาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2524) ต่อมากรมส่งเสริมการเกษตร (2554) รายงานว่า ในปี พ.ศ. 2553 ดาวเรืองตัดดอกในประเทศไทยมีเนื้อที่ปลูกทั้งหมด 2,430.25 ไร่ จำนวนผู้ปลูก 879 ครัวเรือน ผลผลิตดาวเรืองที่เก็บได้ตลอดทั้งปีอยู่ที่ 22.19 ล้านกิโลกรัม มูลค่าการผลิตอยู่ที่ 745,395,683 บาท ปัจจุบันพบว่าประเทศไทยมีการปลูกดาวเรืองถึง 48 จังหวัด ทั่วประเทศ จังหวัดที่มีการปลูกดาวเรืองมากที่สุดคือ สระแก้ว บุรีรัมย์ อ่างทอง นครปฐม และนครราชสีมา แนวโน้มการผลิตดาวเรืองตัดดอกและมูลค่าการผลิตนั้นสูงขึ้นมากกว่าอดีต การปลูกดาวเรืองตัดดอกในจังหวัดเชียงใหม่ปัจจุบันมีผู้ปลูก 43 ครัวเรือน จำนวนพื้นที่ปลูก 62 ไร่ ผลผลิตดาวเรืองที่เก็บได้ตลอดทั้งปีอยู่ที่ 38,000 กิโลกรัม

หนอนกระทู้ผัก (Common cutworm, *Spodoptera litura* F.) จัดเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของดาวเรือง (ฤชอร, 2545; Pandey and Srivastava, 1967) ทำให้ความเสียหายให้กับดาวเรืองได้ทุกระยะตั้งแต่ระยะต้นกล้า ไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยวดอก หนอนกระทู้ผักเข้าอาศัยอยู่ในกลีบดอก กัดกินจนกลีบดอกร่วง หรือทำให้ดอกเสียหาย ไม่สามารถนำดอกดาวเรืองจำหน่ายได้ ในการแก้ปัญหาการระบาดของหนอนกระทู้ผัก เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมี เนื่องจากสามารถแก้ปัญหาการระบาดได้อย่างรวดเร็ว และทันเวลาที่ แต่การใช้สารเคมีในปริมาณมากขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้เกิดผลเสีย และก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ ตามมามาก เช่น แมลงสร้างภูมิต้านทาน เกิดปัญหาสารพิษตกค้าง ก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกร เกิดการปนเปื้อนของสารพิษในสภาพแวดล้อม ดิน น้ำ อากาศ และทำให้เกิดการระบาดของแมลงศัตรูพืชชนิดใหม่ได้ (นวลรัตน์, 2547; Meyer, 1981; Howarth, 1992; Kogan, 1998) การใช้เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับแมลงนั้นเป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม (วิวัฒน์ และคณะ, 2551) ดังนั้นการใช้เชื้อราในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผัก จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการควบคุมปริมาณแมลง และลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลง ส่งผลถึงให้ช่วยลดปัญหาสารเคมีกำจัดแมลงตกค้างในดอกดาวเรือง และยังช่วยรักษาสภาพแวดล้อมได้ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมเชื้อราสาเหตุของโรคแมลงที่พบในหนอนกระทู้ผักหรือบริเวณที่พบหนอนกระทู้ผัก และทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การรวบรวมตัวอย่างหนอนกระทู้ผักที่เป็นโรค

เก็บรวบรวมตัวอย่างหนอนกระทู้ผักที่เป็นโรคตาย ในแปลงปลูกดาวเรืองตัดดอกของเกษตรกร ในจังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการเก็บตัวอย่างหนอนกระทู้ผักที่ตาย มีเส้นใย หรือสปอร์ของเชื้อราเจริญบริเวณผนังลำตัวบรรจุลงในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดเพื่อป้องกันตัวอย่างเสียหายและคงสภาพความสดของตัวอย่าง ทำการเก็บดินบริเวณที่พบแมลงตาย ลึกจากผิวดินประมาณ 10 เซนติเมตร ประมาณ 0.5 กิโลกรัม บรรจุถุงพลาสติกตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดทำการ บันทึกข้อมูลของสถานที่ วัน เดือน ปีและรหัสหมายเลขตัวอย่าง

2. การแยกเชื้อรา วิเคราะห์ และเพาะเลี้ยงเชื้อ

2.1 ตัวอย่างแมลง วางตัวอย่างแมลงที่เก็บมาจากการรวบรวมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Maltose Agar with Yeast extract (SMAY) และอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติมสารปฏิชีวนะ streptomycin เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเชื้อราเจริญเติบโต ทำการแยกเชื้อโดยใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรเจาะขึ้นส่วนของเชื้อรานำไปวางในอาหารเลี้ยงเชื้อ SMAY หรือ PDA อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.2 ตัวอย่างดิน แยกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผักโดยวิธีใช้เหยื่อล่อ (baiting technique) (Meyling, 2007) ด้วยการนำตัวอย่างดินที่เก็บได้จากแปลงดาวเรือง 150 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท ปรับความชื้นในดินให้ไว้ระหว่าง 75-85 เปอร์เซ็นต์ ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำหนอน greater wax moth (*Galleria mellonella* L.) อายุประมาณ 4 สัปดาห์ ภายหลังฟักออกจากไข่ ใส่ลงไปในดินที่อยู่ในขวดด้วยปากคีบ ปิดฝาให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 0.5 องศาเซลเซียส ไม่มีแสงสว่าง ตรวจผลหลังจากบ่มทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เมื่อตรวจพบหนอนตายที่คาดว่าเกิดจากเชื้อรา ให้ย้ายหนอนที่ตายไปแช่ลงในสารละลาย sodium hypochlorite 1 เปอร์เซ็นต์ นาน

3 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 นาที วางซากหนอนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar with Yeast extract (SDAY) และอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เติมสารปฏิชีวนะ streptomycin เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย เมื่อเชื้อราเจริญเติบโต ทำการแยกเชื้อโดยใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรเจาะขึ้นส่วนของเชื้อรานำไปวางในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDAY หรือ PDA อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.3 การเก็บรักษาเชื้อ ทำการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีการย้ายเชื้อราที่คาดว่าจะเปื้อนเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วลงในหลอดอาหาร SMAY และ SDAY เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส เพื่อความสะดวกในการนำออกมาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ทางสัณฐานวิทยาเพื่อการบ่งชี้สกุล (genus) และชนิด (species) ของเชื้อที่ถูกต้องเพื่อการนำไปศึกษาทดลองต่อไป

2.4 การบ่งบอกชื่อวิทยาศาสตร์ ใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาขั้นต้นเปรียบเทียบกับกุญแจสองทางและรูปวิธานประกอบคำบรรยายในหนังสือ Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites (Poinar and Thomas, 1984)

3. การเพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก

นำกลุ่มไข่หนอนกระทู้ผักจากแปลงปลูกดาวเรืองตัดดอกของเกษตรกรมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้อง เมื่อหนอนฟักออกจากไข่ทำการแยกหนอนใส่ในกล่องเลี้ยงแมลง ให้ดอกดาวเรืองเป็นอาหาร ทำการเปลี่ยนอาหารทุกวัน ปริมาณของอาหารขึ้นอยู่กับขนาดและจำนวนของตัวหนอน ทำความสะอาดกล่องเลี้ยงแมลงทุกครั้งที่เปลี่ยนอาหาร เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อรา

เมื่อหนอนเข้าดักแด้ เจริญเป็นตัวเต็มวัย นำตัวเต็มวัยไปปล่อยในกรงเลี้ยงแมลง ให้อาหารด้วยน้ำผึ้งหรือน้ำหวานความเข้มข้นประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ และนำต้นดาวเรืองใส่กระถางตั้งทิ้งไว้ในกรงเลี้ยงแมลง เพื่อให้เป็นที่พักและขยายพันธุ์ จนได้ปริมาณเพียงพอ เมื่อมีเชื้อวางไข่บนพืชอาหาร เก็บกลุ่มไข่ที่ไข่ในวันเดียวกัน

ออกมาเลี้ยงในกล่องเลี้ยงแมลงจนฟักออกมาเป็นหนอนวัยที่ 1 แล้วแยกหนอนออกมาใส่กล่องเลี้ยงแมลง ทำการเลี้ยงต่อไปจนได้หนอนวัยที่ 3 จึงนำไปทดสอบกับเชื้อรา

4. การทดสอบความสามารถของเชื้อราในการทำให้เกิดโรครับแมลง

เพิ่มปริมาณเชื้อราที่ใช้ทำการทดสอบ ซึ่งแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้จากข้อ 2 โดย *Nomuraea rileyi* นำมาเลี้ยงในอาหาร SMAY และ *Metarhizium anisopliae* นำมาเลี้ยงในอาหาร SDAY นำเชื้อราที่มีอายุได้ 14 วัน มาทำการล้างสปอร์เชื้อราด้วยน้ำกลั่นแล้วใช้แท่งแก้วรูปตัว L ชูดผิวหน้าของเชื้อรา ผสมกับ Tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่นี้ฆ่าเชื้อกรองสารแขวนลอยสปอร์ด้วยผ้าขาวบาง คำนวณหาความเข้มข้นด้วย hemacytometer ปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 โคโคนิดต่อมิลลิลิตร จัดปนสารแขวนลอยสปอร์ลงบนตัวหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแต่ละเชื้อทำ 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ตัวหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 จำนวน 10 ตัว ในชุดควบคุม (untreated check) ใช้ น้ำกลั่นผสมกับ Tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่นี้ฆ่าเชื้อ เป็นตัวเปรียบเทียบ บันทึกจำนวนการตายของหนอนกระทู้ผักทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอว่าเป็นเชื้อราชนิดเดียวกันกับที่พ่น คำนวณเปอร์เซ็นต์การตายและปรับเปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริงด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925) หากพบการตายของแมลงในชุดควบคุมและคำนวณหา Median Lethal Time (LT_{50}) โดยใช้โปรแกรม Logit PC

ผลและวิจารณ์

1. การรวบรวมตัวอย่างหนอนกระทู้ผักที่เป็นโรค

จากการรวบรวมหนอนกระทู้ผักที่เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราในแปลงปลูกดาวเรืองของเกษตรกร ตำบลดอนแก้ว ตำบลโป่งแยง อำเภอแมริม ตำบลมะขุนหวาน อำเภอสันป่าตอง และตำบลสะเมิงใต้ อำเภอสะเมิง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งในพื้นที่ดังกล่าวมีการส่งเสริมการปลูกดาวเรืองและพบหนอนกระทู้ผักบริเวณใบ และดอก

ดาวเรือง พบตัวอย่างหนอนที่เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราจำนวน 93 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างดินได้จำนวน 33 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่มาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณและจำแนกเชื้อต่อไป

2. การแยกเชื้อรา วิเคราะห์ และเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากการรวบรวมตัวอย่างหนอนกระทู้ผักที่ตายด้วยเชื้อรา และตัวอย่างดินจากแปลงปลูกดาวเรืองในจังหวัดเชียงใหม่ มาทำการแยกเชื้อและวินิจฉัยชนิดของเชื้อราในห้องปฏิบัติการพบว่า

2.1 หลังจากนำตัวอย่างหนอนกระทู้ผักที่ตายด้วยเชื้อรา มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SMAY และ PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 วัน ปรากฏเส้นใยของเชื้อรางอกออกมาจากตัวอย่างหนอนกระทู้ ซึ่งเชื้อราเจริญออกมาบริเวณรอบ ๆ ตัวอย่างหนอนแต่ไม่ได้แผ่ขยายออก หลังจากบ่มเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 14 วัน เส้นใยเริ่มทำการสร้างสปอร์สีเขียวอ่อนจึงได้นำ loop แต่ละบริเวณสปอร์ของเชื้อ ทำการ streak plate เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อ และทำการแยกเชื้อราจนได้เชื้อราที่บริสุทธิ์

2.2 การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน โดยใช้เหยื่อล่อ (baiting technique) (Meyling, 2007) ตรวจการตายของหนอน greater wax moth หลังจากบ่มทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าหนอนตายโดยมีเส้นใยสีขาวแทงขึ้นตามผนังลำตัว จากนั้นนำไปบ่มต่อพบว่า ตัวหนอนมีสปอร์ของเชื้อราสีเขียวเข้มปกคลุมทั่วตัวจึงย้ายหนอนที่ตายแช่ลงในสารละลาย sodium hypochlorite 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 นาที วางซากหนอนบนอาหาร SDAY และ PDA หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 วัน พบเส้นใยของเชื้อราสีขาวเจริญอยู่รอบ ๆ ตัวอย่างหนอน หลังจากบ่มเวลา 14 วัน พบเชื้อรามีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้ม จึงได้นำ cork borer เจาะชิ้นส่วนของเชื้อรานำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDAY และ PDA เพื่อความบริสุทธิ์ของเชื้อรา

เมื่อทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างหนอนกระทู้ผัก และตัวอย่างดินจนได้เชื้อราที่บริสุทธิ์แล้ว นำเชื้อราที่แยกได้จนบริสุทธิ์มาทำ slide culture เพื่อตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงตาม ฤกษ์แสงของ

ทางและรูปวิธานประกอบคำบรรยายในหนังสือ Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites ของ Poinar and Thomas (1984) พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างหนอนกระทู้ผักคือ *Nomuraea rileyi* และเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินคือ *Metarhizium anisopliae* จากการจำแนกชนิดของเชื้อราสามารถจำแนกเชื้อรา *N. rileyi* ได้จำนวน 13 ไอโซเลท และ *M. anisopliae* ได้จำนวน 9 ไอโซเลท (ตารางที่ 1)

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้จากตัวอย่างหนอนจำนวน 13 ไอโซเลท และตัวอย่างดินจำนวน 9 ไอโซเลท ที่เก็บได้จากแปลงดาวเรืองในจังหวัดเชียงใหม่ ทำการพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อราความเข้มข้น 1×10^8 โคโรเดียต่อมิลลิลิตร ตามงานทดลองของ Srisukchayakul *et al.* (2005) และ Trizelia and Nurdin (2010) กับหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 พบว่าหลังจากการพ่นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 3-5 วัน ตัวหนอนเริ่มมีอาการเคลื่อนไหวช้าลง กินอาหารน้อยลง และไม่มีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ฉีดพ่นหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 ด้วยน้ำกลั่นผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ซึ่งตัวหนอนแข็งแรง กินอาหารได้ดี มีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นโดยการขับถ่ายฟูกันเหวี่ยง หลังจากการพ่นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 4-6 วัน หนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 เริ่มตายโดยที่ซากของหนอนกระทู้ผักจะแข็ง สีซีดลง สังเกตเห็นเส้นใยสีขาวแทงออกมาจากผนังลำตัว และเส้นใยเริ่มสร้างสปอร์ออกมาเป็นสีเขียว ถึงเขียวเข้มขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง โดยเชื้อรา *N. rileyi* จะสร้างเส้นใยสีขาวที่หนาแน่นปกคลุม ซึ่ง conidiophores หรือก้านชูสปอร์ถูกสร้างจากเส้นใย จากนั้นสร้าง conidia ซึ่งมีสีเขียวอ่อน เบา และสามารถปลิวไปตามลมได้ในขณะที่เชื้อรา *M. Anisopliae* หลังจากเส้นใยแทงทะลุผ่านผนังลำตัวออกมา ก้านชูสปอร์จะอยู่รวมกันหนาแน่น สปอร์ตอนแรกจะสร้างเป็นสีขาว และค่อยเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวเมื่อแก่ขึ้น จนถึงสีเขียวเข้มเกือบดำ (ทิพย์วดี, 2535)

จากการทดสอบเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้จากตัวอย่างหนอนที่เก็บได้จากแปลงดาวเรืองในจังหวัด

เชียงใหม่ จำนวน 13 ไอโซเลท หลังจากการพ่น 7 วัน พบว่าเชื้อรา *N. rileyi* ไอโซเลท CMU-NR4 สามารถก่อให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผักได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 เฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ ความรวดเร็วในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้จากหนอนกระทู้ผักในแปลงดาวเรืองพบว่าเชื้อรา *N. rileyi* ไอโซเลท CMU-NR4 สามารถทำให้หนอนกระทู้ผักเกิดโรคใช้เวลาอันน้อยที่สุดโดยมีค่า LT_{50} เท่ากับ 4.34 วัน Padanad and Krishnaraj (2009) ได้ศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *N. rileyi* กับหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 ด้วยวิธี topical application จำนวน 10 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 1×10^8 โคโรเดียต่อมิลลิลิตร ผลปรากฏว่าหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การตายระหว่าง 85 ถึง 97 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า LT_{50} อยู่ระหว่าง 5.5 ถึง 6.6 วัน ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Sonairajan and Muthukrishnan (2009) ได้ทำการทดสอบการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *N. rileyi* ไอโซเลท PDBC กับหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 ผลปรากฏว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่ 70.60 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า LT_{50} เท่ากับ 103.84 ชั่วโมง หรือ 4.33 วัน นอกจากนี้เชื้อรา *N. rileyi* ที่สามารถก่อให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 พบอัตราการตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์จำนวน 5 ไอโซเลท คือ CMU-NR1, CMU-NR2, CMU-NR4, CMU-NR7 และ CMU-NR13 (ตารางที่ 2)

จากการทดสอบเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บได้จากแปลงดาวเรืองในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 9 ไอโซเลท หลังการพ่น 7 วันพบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท CMU-MA5 สามารถก่อให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผักโดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ย 74.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวใกล้เคียงกับการศึกษาของ Kotwal *et al.* (2012) ที่ได้ศึกษาผลของสปอร์แขวนลอย *M. anisopliae* กับหนอนกระทู้ผักด้วยวิธี topical application พบว่าสปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 2.5×10^8 โคโรเดียต่อมิลลิลิตร ก่อให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก โดยมีการตายเท่ากับ 76.66 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการพ่นสปอร์แขวนลอย 10 วัน

Table 1 Isolate number, origin and location of entomopathogenic fungi in Mae Rim district, Chiang Mai province

No.	Species	Isolated from	Location	GPS
CMU-MA1	<i>Metarhizium anisopliae</i>	soil sample	Mae Rim, Don Kao	N 18°52'51.600, E 98°58'25.799
CMU-MA2	<i>Metarhizium anisopliae</i>	soil sample	Mae Rim, Don Kao	N 18°53'08.399, E 98°58'55.800
CMU-MA3	<i>Metarhizium anisopliae</i>	soil sample	Mae Rim, Don Kao	N 18°53'41.999, E 98°58'52.200
CMU-MA4	<i>Metarhizium anisopliae</i>	soil sample	Mae Rim, Don Kao	N 18°53'41.999, E 98°58'52.201
CMU-MA5	<i>Metarhizium anisopliae</i>	soil sample	Mae Rim, Don Kao	N 18°53'29.400, E 98°58'51.599
CMU-MA6	<i>Metarhizium anisopliae</i>	soil sample	Mae Rim, Don Kao	N 18°52'51.600, E 98°58'25.799
CMU-MA7	<i>Metarhizium anisopliae</i>	soil sample	Mae Rim, Don Kao	N 18°53'06.000, E 98°59'00.600
CMU-MA8	<i>Metarhizium anisopliae</i>	soil sample	Mae Rim, Don Kao	N 18°52'51.600, E 98°58'25.799
CMU-MA9	<i>Metarhizium anisopliae</i>	soil sample	Mae Rim, Don Kao	N 18°53'08.399, E 98°58'55.800
CMU-NR1	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'40.799, E 98°49'23.399
CMU-NR2	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'40.799, E 98°49'23.399
CMU-NR3	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'40.799, E 98°49'23.399
CMU-NR4	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'40.799, E 98°49'23.399
CMU-NR5	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'40.799, E 98°49'23.399
CMU-NR6	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'41.400, E 98°49'56.999
CMU-NR7	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'41.400, E 98°49'56.999
CMU-NR8	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'41.400, E 98°49'56.999
CMU-NR9	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'41.400, E 98°49'56.999
CMU-NR10	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'41.400, E 98°49'56.999
CMU-NR11	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'41.400, E 98°49'56.999
CMU-NR12	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'41.400, E 98°49'56.999
CMU-NR13	<i>Nomuraea rileyi</i>	common cutworm cadaver	Mae Rim, Pong Yaeng	N 18°53'41.400, E 98°49'56.999

Table 2 Pathogenicity of *Nomuraea rileyi* isolates on 3rd instar larvae of common cutworm (*Spodoptera litura* F.) at 1×10^8 conidia/ml

Isolate	Mortality (%)	LT ₅₀ (days)
	7 days after spraying	
CMU-NR1	90.00 ^{b1}	5.22
CMU-NR2	80.00 ^{bc}	6.07
CMU-NR3	10.00 ^g	> 7
CMU-NR4	100.00 ^a	4.34
CMU-NR5	10.00 ^g	> 7
CMU-NR6	32.00 ^{ef}	> 7
CMU-NR7	72.00 ^{bc}	5.90
CMU-NR8	8.00 ^g	> 7
CMU-NR9	20.00 ^{fg}	> 7
CMU-NR10	6.00 ^g	> 7
CMU-NR11	48.00 ^{de}	> 7
CMU-NR12	2.00 ^g	> 7
CMU-NR13	60.00 ^{cd}	6.63
untreated check	0.00 ^g	

^{1/} Means within the column followed by the same letters are not significantly different according to LSD test ($P \leq 0.05$)

Table 3 Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* isolates on 3rd instar larvae of common cutworm (*Spodoptera litura* F.) at 1×10^8 conidia/ml

Isolate	Mortality (%)	LT ₅₀ (days)
	7 days after spraying	
CMU-MA1	10.00 ^{d1}	> 7
CMU-MA2	28.00 ^c	> 7
CMU-MA3	6.00 ^d	> 7
CMU-MA4	2.00 ^d	> 7
CMU-MA5	74.00 ^a	6.81
CMU-MA6	8.00 ^d	> 7
CMU-MA7	58.00 ^{ab}	> 7
CMU-MA8	8.00 ^d	> 7
CMU-MA9	48.00 ^b	> 7
untreated check	0.00 ^d	

^{1/} Means within the column followed by the same letters are not significantly different according to LSD test ($P \leq 0.05$)

สรุป

รวบรวมตัวอย่างหนอนที่เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา และตัวอย่างดินบริเวณใกล้เคียงในบริเวณแปลงปลูก ดาวเรืองที่มีหนอนกระตุ้มกระบาด ในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ ตำบลดอนแก้ว ตำบลโป่งแยง อำเภอแมริม ตำบลมะขุนหวาน อำเภอสันป่าตอง และตำบลสะเมิงใต้ อำเภอสะเมิง พบตัวอย่างหนอนจำนวน 93 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินจำนวน 33 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อรา *N. rileyi* ได้จำนวน 13 ไอโซเลท จากตัวอย่างหนอนกระตุ้ม และเชื้อรา *M. anisopliae* ได้จำนวน 9 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินที่แยกได้โดยใช้วิธีเหยื่อล่อนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยทำการพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อราความเข้มข้น 1×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร กับหนอนกระตุ้มฝักวัยที่ 3 ผลปรากฏว่า เชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างหนอน *N. rileyi* ไอโซเลท CMU-NR4 สามารถก่อให้เกิดโรคกับหนอนกระตุ้มฝักได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระตุ้มฝักวัยที่ 3 เฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากการฉีดพ่น 7 วัน โดยที่สามารถก่อให้เกิดโรคกับหนอนกระตุ้มฝักได้รวดเร็วที่สุด โดยมีค่า LT_{50} เท่ากับ 4.34 วัน ส่วนเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท CMU-MA5 ที่แยกได้จากดินสามารถก่อให้เกิดโรคกับหนอนกระตุ้มฝักได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระตุ้มฝักวัยที่ 3 เฉลี่ย 74.00 เปอร์เซ็นต์ หลังการพ่นเชื้อรา 7 วัน มีค่า LT_{50} เท่ากับ 6.81 วัน

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชากีฏวิทยา และโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2524. สถิติข้อมูลการผลิตไม้ดอกไม้ประดับที่สำคัญ. ฝ่ายไม้ดอกไม้ประดับ กองส่งเสริมพืชพันธุ์, กรุงเทพฯ. 38 หน้า.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2554. รายงานสถิติข้อมูลผลิตไม้ดอกไม้ประดับ กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ. 8 หน้า.
- ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535. โรควิทยาแมลง. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 205 หน้า.
- นวรรตน์ นุศาสตร์เลิศ. 2547. การใช้ประโยชน์สารเมตาโบไลต์ที่มีพิษของเชื้อรานำโรค จากอำเภอทองผาภูมิในการกำจัดหนอนกระตุ้มฝัก *Spodoptera litura* (Fabricius). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 88 หน้า.
- ฤชอร วรรณะ. 2545. การทดสอบสารเคมีและสารชีวธรรมชาติฆ่าแมลงในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพไร่เพื่อควบคุมหนอนกระตุ้มฝัก *Spodoptera litura* (F.) ในดาวเรืองอาหารสัตว์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา. 148 หน้า.
- วิวัฒน์ เสือสะอาด พิมพ์พรณ สมมาตรย์ บัณฑิต วิชาเทียน อาภรณ์ ปันทองคำ และ รัตติรส เชียงสิน. 2551. การประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราขาว *Beauveria bassiana* ในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชเศรษฐกิจ. หน้า 161-168. ใน: รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2551. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- AmeriSeed Inc. 2011. Marigold. (Online). Available: <http://www.marigoldasia.com/en/about.php> (August 12, 2011).
- Howarth, F. G. 1992. Environmental impacts of species purposefully introduced for biological control of pests. Pac. Sci. 46: 388-389.

- Kessler, J. R., Jr. 1998. Greenhouse Production of Marigolds. (Online). Available: <http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-1125/index2.tmpl> (January 16, 2012).
- Kogan, M. 1998. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary development. *Annu. Rev. Entomol.* 43:243-270.
- Kotwal, S., R. L. Parate, S. S. Mane and V. V. Deshmukh. 2012. Effect of *Metarhizium anisopliae* on *Spodoptera litura* and compatibility with chemical. *IJEST.* 1(5): 499-505.
- Meyer, M. K. P. 1981. Mite pest of crops in Southern Africa. *Sci. Bull. Dept. Agric. Fish. Repub. S. Afr.* 397: 1-92.
- Meyling, N. V. 2007. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Department of Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark. 18 pp.
- Padanad, M. S. and P. U. Krishnaraj. 2009. Pathogenicity of native entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. (Online). Available: <http://plantmanagementnetwork.ork/pub/php/research/2009/litura/> (August 1, 2013).
- Pandy, S. H. and R. P. Srivastava. 1967. Growth of larvae of *Prodenia litura* (F.) in relation to wild food plants. *Indian J. Entomol.* 29(4): 229-233.
- Poinar, G. D., Jr. and G. M. Thomas. 1984. Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites. Plenum Press, New York. 392 p.
- Sonairajan, T. and N. Muthukrishnan. 2009. Pathogenicity of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolates against *Spodoptera litura* (Fabricius). *J. Biol. Control.* 23(1): 17-20.
- Srisukchayakul, P., C. Wiwat and S. Pantuwatana. 2005. Studies on the pathogenesis of the local isolates of *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. *SciencAsia.* 31: 273-276.
- Trizelia and F. Nurdin. 2010. Virulence of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* isolates to *Crociodolomia pavonana* F. (Lepidoptera: Crambidae). *Agrivita, J. Agri. Sci.* 32(3): 254-261.
-