

การประเมินศักยภาพของเชื้อราก่อโรคแมลงครั้งแรกในห้องปฏิบัติการ
ต่อการควบคุมหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู *Sesamia inferens* (Walker)
(Lepidoptera: Noctuidae) ในประเทศไทย

The First Laboratory Evaluation of Potential Entomopathogenic Fungi
for Controlling the Pink Stem Borer *Sesamia inferens* (Walker)
(Lepidoptera: Noctuidae) in Thailand

สิริญา คัมภีโร* และ โสภณ อุไรชื่น
Siriya Kumpiro* and Sopon Uraichuen

ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Entomology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,

Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

*Corresponding author: Email: chulee64@gmail.com

(Received: 27 June 2023; Accepted: 3 August 2023)

Abstract: Entomopathogenic fungi serve as crucial natural enemies to insect pests including the pink stem borer, *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), an important pest of sugarcane in Thailand. Therefore, the first laboratory assessment performed to evaluate the efficacy of entomopathogenic fungi for controlling *S. inferens* was conducted under the aims of determining the pathogenicity and virulence of four species and seven isolates of entomopathogenic fungi: *Beauveria bassiana* isolate B001, *B. bassiana* isolate B002, *Fusarium* sp. isolate FSS, *Metarhizium anisopliae* isolate M001, *M. anisopliae* isolate M002, *M. anisopliae* isolate MSS and *Purpureocillium lilacinum* isolate PSS, retrieved from National Biological Control Research Center (NCBRC), Central Regional Center and Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, to control *S. inferens* through topical application by dropping the conidia suspension of the pathogenic fungi locally on the intersegmental membrane of the thorax between segment 1 and segment 2 of the 4th instar larvae under laboratory conditions. The result revealed that *B. bassiana* isolate B001, *M. anisopliae* isolate M001 and *M. anisopliae* isolate MSS could infect the fourth instar larvae of *S. inferens* with mortality rates at 37.50 ± 5.80 , 72.50 ± 9.60 and $85.00 \pm 5.80\%$ and the LT_{50} at 18.12, 6.03 and 2.93 days, respectively. *M. anisopliae* isolate M001 and *M. anisopliae* isolate MSS that elicited more than 50 percent mortality against *S. inferens* were further assessed for their virulence. The latter isolate was more virulent than the former one with LC_{50} values of 3.69×10^6 and 4.73×10^5 conidia per milliliter, respectively.

Lastly, *M. anisopliae* isolate MSS, the most virulent fungal pathogen among the tested species, was evaluated against *S. inferens* larvae of instars 2-3, 4-5, and 6-7 for its virulence. Remarkably, the fungus infected *S. inferens* larvae of different ages and showed infectivity to its host with LC_{50} values of 9.26×10^4 , 6.02×10^5 and 5.12×10^6 conidia per milliliter, respectively.

Keywords: Entomopathogenic fungi, pink stem borer, *Sesamia inferens*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*

บทคัดย่อ: เชื้อราสาเหตุโรคแมลงเป็นศัตรูธรรมชาติที่สำคัญของแมลงศัตรูพืช รวมถึงหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู (*Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)) ซึ่งจัดเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของอ้อยในประเทศไทย ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษากิจกรรมประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการควบคุมหนอน *S. inferens* ขึ้นเป็นครั้งแรกภายใต้วัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 4 ชนิด 7 ไอโซเลท เชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท B001 เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B002 เชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท FSS เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท M001 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M002 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS และ เชื้อรา *Purpureocillium lilacinum* ไอโซเลท PSS ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ในการควบคุมหนอน *S. inferens* ด้วยวิธีสัมผัสตาย ด้วยการหยดสารแขวนลอยโคโคนิดีของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงลงเฉพาะที่บริเวณเนื้อเยื่อปล้องอกระหว่างปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 ของหนอน *S. inferens* วัยที่ 4 ในระดับห้องปฏิบัติการ ในขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนการคัดกรองการเกิดโรคกับหนอน *S. inferens* จากเชื้อราที่ทดสอบทั้งหมด ผลจากการทดสอบมีเพียงเชื้อรา 2 ชนิด 3 ไอโซเลท ที่สามารถก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ได้แก่เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B001 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 และ เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ซึ่งทำให้หนอนมีอัตราการตาย 37.50 ± 5.80 , 72.50 ± 9.60 และ 85.00 ± 5.80 เปอร์เซ็นต์ และค่า LT_{50} 18.12, 6.03 และ 2.93 วัน ตามลำดับ จากนั้นนำผลการคัดกรองการเกิดโรคกับหนอน *S. inferens* ที่ทำให้มีอัตราการตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มาทำการทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง พบว่า เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ได้ดีกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 4.73×10^5 และ 3.69×10^6 โคโคนิดีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขั้นสุดท้ายเป็นการนำเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ซึ่งมีความรุนแรงที่สุดในการก่อโรคของเชื้อราทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ มาทดสอบกับหนอน *S. inferens* วัย 2-3, 4-5 และ 6-7 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ดังกล่าวสามารถเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* มีค่า LC_{50} เท่ากับ 9.26×10^4 , 6.02×10^5 และ 5.12×10^6 โคโคนิดีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: เชื้อราสาเหตุโรคแมลง หนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู *Sesamia inferens*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*

คำนำ

หนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) เป็นแมลงศัตรูที่สำคัญในการเพาะปลูกอ้อย เนื่องจากเป็นแมลง

ศัตรูอ้อยที่เข้าทำลายอ้อยได้ทั้งระยะหนอนอ้อยและระยะอย่างปล้อง โดยระยะหนอนเข้าทำลายหน่ออ้อย ทำให้อ้อยเกิดอาการยอดแห้งตาย แม้อ้อยสามารถแตกหน่อขึ้นใหม่เพื่อชดเชย แต่หน่ออ้อยที่แตกใหม่ในระยะหลังๆ มีอายุสั้นลง ทำให้ผลผลิตและคุณภาพอ้อยลดลง

หากหนอน *S. inferens* เข้าทำลายลำต้นอ้อย มีผลทำให้ยอดอ้อยเหี่ยวและเจาะลำต้นอ้อยเป็นรูกลวงด้านในส่งผลให้ลำต้นอ้อยแตก หากตัวหนอนเข้าทำลายที่บริเวณฐานหรือโคนลำ มักพบรอยเจาะเป็นรูบริเวณโคนต้นอ้อยได้ ส่วนใหญ่หนอน *S. inferens* เข้าทำลายอ้อย เมื่ออายุ 1.5 - 4 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่อ้อยแตกหน่อและสามารถเข้าทำลายอ้อยได้ในทุกพื้นที่ของประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ปลูกอ้อยต่อเนื่องกันเป็นเวลานาน (Attajarusit, 2001) การเข้าทำลายของหนอน *S. inferens* ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต อ้อยที่ถูกทำลายสูญเสียน้ำหนัก 16.59 - 36.53 เปอร์เซ็นต์ สูญเสียค่าโพสซึ่งเป็นค่าร้อยละของน้ำตาลซูโครส 4.03 - 33.95 เปอร์เซ็นต์ และสูญเสียความหวาน (CCS) 3.76 - 40.60 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์อ้อย ซึ่งเป็นการสูญเสียผลผลิตอ้อยทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพส่งผลกระทบโดยตรงต่อผลผลิตน้ำตาล (Kokkan et al., 2008) แม้ว่าในสภาพธรรมชาติมีศัตรูธรรมชาติช่วยในการควบคุมการเข้าทำลายของหนอน *S. inferens* และมีการส่งเสริมให้มีการใช้ตัวห้ำและแตนเบียนในการป้องกันกำจัด อันได้แก่ แตนเบียนหนอนโคทีเซีย *Cotesia flavipes* (Cameron) แตนเบียนไทรโคแกรมมา (*Trichogramma* spp.) และแมลงหางหนีบ *Proreus simulans* (Stal.) (Pitak, 2001) มีข้อจำกัดในการปล่อยแตนเบียนในช่วงฤดูฝนหรือขณะฝนตก แต่ในช่วงฤดูดังกล่าวอาจพบเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงในสภาพธรรมชาติ เชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีความสามารถในการเข้าก่อโรคกับแมลงอาศัยได้ด้วยการสัมผัสและเข้าทำลายแมลงอาศัย โดยทางเส้นใยทะลุผ่านชั้นผนังลำตัวของแมลงเจริญเติบโตภายในช่องว่างลำตัวของแมลง และสร้างเส้นใยปกคลุมตัวแมลง เมื่ออุณหภูมิเหมาะสมเชื้อราผลิตโคนินเดียเพื่อแพร่กระจายต่อไปทำให้แมลงศัตรูมีโอกาสดูดเชื้อราได้มากกว่าเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสที่แมลงอาศัยต้องกินเข้าไป และสร้างพิษในระบบทางเดินอาหารของแมลง นอกจากนี้ ข้อดีอื่น ๆ ของการใช้เชื้อราป้องกันกำจัดแมลง เช่น เชื้อรายังอาศัย ลม ฝน และปัจจัยอื่นในการแพร่กระจายโคนินเดียไปในสภาพแวดล้อมได้ดี (Attathom, 2003)

ยังไม่พบรายงานการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงใน การป้องกันกำจัดหนอน *S. inferens* ในประเทศไทย แต่มีการรายงานในต่างประเทศ Varma and Tandan (1996) และ Varma et al. (1988) รายงานว่า เชื้อรา *Beauveria bassiana* (Bals.), Vuill. เชื้อรา *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin สามารถเข้าก่อโรคกับหนอนวัยที่ 5 ของ *S. inferens* ในสภาพห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม ศักยภาพและความรุนแรงของการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคนั้นมีความแตกต่างไปตามชนิดของเชื้อรา ชนิดและสภาพของแมลงอาศัย และสภาพแวดล้อม ซึ่งจำเป็นต้องมีการทดสอบประเมินและคัดเลือกชนิดของเชื้อราที่มีความเหมาะสมก่อนการพัฒนาต่อยอดเพื่อการใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาประเมินประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงใน การควบคุมหนอน *S. inferens* ภายใต้วัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการก่อโรคและความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 4 ชนิด 7 ไอโซเลท ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ในการควบคุมหนอน *S. inferens* ด้วยวิธีสัมผัสตาย โดยหยดสารแขวนลอยโคนินเดียของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงลงเฉพาะที่บริเวณเนื้อเยื่อปล้องอกระหว่างปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 ของหนอน *S. inferens* ในระดับห้องปฏิบัติการระหว่างเดือนธันวาคม 2562 - เดือนมีนาคม พ.ศ. 2565 เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้ควบคุมหนอน *S. inferens* ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพูเพื่อเป็น stock culture

ทำการเพิ่มปริมาณหนอน *S. inferens* โดยการรวบรวมหนอน *S. inferens* จากแปลงปลูกอ้อยของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี และ ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง จังหวัด

นครปฐม ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 - เดือนธันวาคม 2564 แยกเลี้ยงตัวหนอนในกล่องพลาสติกใส ทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 17.5 เซนติเมตร สูง 7 เซนติเมตร เจาะฝากล่องเพื่อให้มีการถ่ายเทอากาศ และไม่ให้อากาศในกล่องขึ้นมากเกินไป โดยให้ท่อนอ้อยอ่อนสดสายพันธุ์ LK92-11 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ยาว 22 เซนติเมตร จำนวน 3-4 ท่อนต่อกล่อง เป็นพืชอาหาร เมื่อหนอน *S. inferens* เข้าดักแด้ ทำการคัดแยกเพศผู้และเพศเมีย จากความห่างของ genital slit และ anal slit ที่ตั้งอยู่ด้านล่างของปล้องท้องที่ 8 และ 9 โดยเพศผู้มี genital slit ชิด anal slit มากกว่าเพศเมีย (Tonphukhiaw et al. 2018; Tuncer and Aker, 2017) ภายใต้อุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม นำดักแด้มาวางในกล่องใบใหม่เส้นผ่านศูนย์กลาง 17.5 เซนติเมตร สูง 7 เซนติเมตร จำนวน 10 คู่ต่อกล่อง จำนวน 5 กล่อง เพื่อให้เจริญเติบโตเป็นผีเสื้อตัวเต็มวัยสืบพันธุ์และวางไข่บนกระดาษทิชชูอเนกประสงค์ที่พับเป็นรูปพัดเหลื่อมซ้อนกัน ใช้ก้อนสำลีชุบน้ำฝ้างเจือจาง 1 เปอร์เซ็นต์ วางบนฝาขวดน้ำดื่มเป็นอาหาร และให้ความชื้นภายในกล่องด้วยก้อนสำลีชุบน้ำวางบนฝาขวดน้ำดื่มเช่นเดียวกัน เก็บรวบรวมไข่แต่ละวันหลังจากแม่ผีเสื้อได้รับการผสมพันธุ์ 2 วัน ทำการเก็บไข่ทุกวันจนตัวเต็มวัยตาย แยกไข่ลงในกล่องพลาสติกทรงกลมใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร

ที่เจาะฝากล่องเป็นรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เพื่อระบายอากาศ เมื่อไข่หนอน *S. inferens* มีจุดสีดำหรือ blue point จากส่วนหัวของหนอนภายในไข่หรือระยะ black head เริ่มวางอาหารเทียมของ *S. inferens* ซึ่งเป็นสูตรที่พัฒนาโดย Maneerat et al. (2006) ตัดอาหารเป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ขนาด 1x1x1 เซนติเมตร (Tonphukhiaw et al., 2018) และทำการเปลี่ยนอาหารเทียมทุก 3 วัน นำหนอน *S. inferens* ในระยะการเจริญเติบโตที่ต้องการใช้ในการทดลองต่อไป

การเพิ่มปริมาณและเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเพื่อการทดสอบ

นำเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม (Table 1) เพิ่มปริมาณบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร potato dextrose agar (PDA, Difco®) ป่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยโคโคนีด้วยน้ำกลั่นผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนิ่งฆ่าเชื้อแล้วประมาณ 3-5 มิลลิเมตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อราใช้ด้านหลังช้อนออลูมิเนียมที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วถูเบา ๆ ที่ผิวหน้าของโคโคนี เพื่อเก็บโคโคนีเดียวของเชื้อราสาเหตุโรค

Table 1. List of entomopathogenic fungi, and their previous insect hosts, pathenogenic and virulent screening on pink stem borer (*Sesamia inferens* (Walker)) (Lepidoptera: Noctuidae)

Species ¹	Isolates	Insect hosts
<i>Beauveria bassiana</i>	B001	<i>Nilaparvata lugens</i> (Stål) (Hemiptera: Delphacidae)
<i>Beauveria bassiana</i>	B002	<i>Phyllotreta sinuata</i> Stephens (Coleoptera: Chrysomelidae)
<i>Fusarium</i> sp.	FSS	<i>Chilo tumidicostalis</i> (Hampson)(Lepidoptera: Pyralidae)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	M001	<i>Dorycthenes buqueti</i> Guerin (Coleoptera: Cerambycidae)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	M002	<i>Oryctes rhinoceros</i> (Linnaeus) (Coleoptera: Scarabaeidae)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	MSS	<i>Chilo tumidicostalis</i> (Hampson)(Lepidoptera: Pyralidae)
<i>Purpleocillium lilacinum</i>	PSS	<i>Chilo tumidicostalis</i> (Hampson)(Lepidoptera: Pyralidae)

¹Source: National Biological Control Research Center (NBCRC), Central Regional Center, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom

แมลง และนับปริมาณโคนินเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า ด้วย hemacytometer จากนั้นปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยโคนินเดียด้วยน้ำกลั่นที่นี้้่งฆ่าเชื้อผสมกับ Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1×10^8 โคนินเดียต่อมิลลิลิตรเตรียมนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

เพื่อให้การวิจัยเป็นไปตามลำดับขั้นตอน การวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย การทดลอง 2 การทดลองหลัก คือ การคัดกรองเชื้อราและการทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความสามารถในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens*

การคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงกับหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพูด้วยวิธีสัมผัสตาย

นำสารแขวนลอยโคนินเดียของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงแต่ละไอโซเลทที่ความเข้มข้น 1×10^8 โคนินเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร หยดลงบนด้านสันหลังของหนอน *S. inferens* วัยที่ 4 บริเวณเนื้อเยื่อปล้องอกระหว่างปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 (Mehinto *et al.*, 2014) กรรมวิธีละ 10 ตัว จำนวน 4 ซ้ำ ซึ่งประกอบด้วยเชื้อรา 7 ไอโซเลท (Table 1) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) ให้้อยาสายพันธุ์ LK 92-11 อ่อนและสดที่ตัดเป็นท่อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ยาว 2.54 เซนติเมตร เป็นอาหารของหนอนที่ได้รับการทดสอบ และเปลี่ยนท่อนอ้อยทุก 2 วัน บ่มไว้ในตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่าง 16 ชั่วโมง และเก็บไว้ที่มีด 8 ชั่วโมง (Bautista-Galvez *et al.*, 2012) บันทึกผลการเข้าก่อโรคทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน ย้ายหนอนที่ติดเชื้อตายวางบนแผ่นพลาสติกแข็งใสสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 4×4 เซนติเมตร ในกล่องพลาสติกใสทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร เพื่อสังเกตลักษณะเส้นใยและโคนินเดียที่เชื้อราผลิตออกมาคลุมตัวหนอนให้ความชื้นในกล่องด้วยผ้าชุบน้ำพอหมาด คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ตายที่แท้จริงของแมลงด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925) และวิเคราะห์ระยะเวลาที่ทำให้หนอน *S. inferens* ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (ค่า LT_{50}) โดย Probit analysis (Finney,

1952) ด้วย Excel version 2021 (Mekapogu, 2021) ทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถทำให้หนอน *S. inferens* ตายในอัตราที่สูงกว่าร้อยละ 50 เพื่อใช้ในการทดลองลำดับต่อไป

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความสามารถในการเข้าก่อโรคกับหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู

ภายหลังการคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงกับหนอน *S. inferens* ด้วยวิธีสัมผัสตาย นำผลที่ได้มาทดสอบมาทดสอบความรุนแรงของเชื้อ ซึ่งในหัวข้อนี้แบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย คือ การทดลองย่อยที่ 1 ทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ทำให้หนอน *S. inferens* มีอัตราการตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากการคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* และการทดลองย่อยที่ 2 นำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความรุนแรงการก่อโรคสูงสุดจากการทดลองย่อยที่ 1 มาทดสอบความรุนแรงการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ระยะวัยต้น (หนอนวัยที่ 2-3) หนอนระยะวัยกลาง (หนอนวัยที่ 4-5) และ หนอนระยะวัยท้าย (หนอนวัยที่ 6-7)

การทดลองย่อยที่ 1 นำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความสามารถในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ด้วยสารแขวนลอยเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ (5 กรรมวิธี) 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 1.0×10^7 , 1.0×10^8 และ 1.0×10^9 โคนินเดียต่อมิลลิลิตร ใช้วิธีสัมผัสตาย เช่นเดียวกับการคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคแมลง กรรมวิธีละ 10 ตัว จำนวน 4 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) การสังเกตการตายและบันทึกผลการเข้าก่อโรคทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ตายที่แท้จริงของแมลงด้วย Abbott's formula (Abbott, 1925) และวิเคราะห์ความเข้มข้นสารแขวนลอยโคนินเดียเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ทำให้หนอน *S. inferens* ตายร้อยละ 50 (ค่า LC_{50}) โดย Probit analysis (Finney, 1952) ด้วย Excel version 2021 (Mekapogu, 2021) ทำการคัดเลือกเชื้อราสาเหตุ

โรคแมลงที่มีความรุนแรงของการก่อโรคได้สูงสุด (ค่า LC_{50} ต่ำที่สุด) เพื่อใช้ในการทดลองลำดับต่อไป

การทดลองย่อยที่ 2 ทำการทดลองในทำนองเดียวกับการทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงด้วยค่าความเข้มข้นของโคนิเดียที่ทำให้หนอน *S. inferens* ตายร้อยละ 50 (LC_{50}) โดยนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีรุนแรงในการเกิดโรคกับหนอน *S. inferens* สูงที่สุด ทดสอบความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ใน 3 ช่วงระยะการเจริญเติบโต คือ หนอนระยะวัยต้น (หนอนวัยที่ 2-3) หนอนระยะวัยกลาง (หนอนวัยที่ 4-5) และ หนอนระยะวัยท้าย (หนอนวัยที่ 6-7) โดยใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 5 กรรมวิธี ได้แก่ 1.0×10^4 , 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 1.0×10^7 และ 1.0×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร กรรมวิธีละ 10 ตัว ทำ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการมวนควบคุม (Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) ด้วยวิธีสัมผัสตายเช่นเดียวกับการคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคแมลง การสังเกตการตายและการบันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ค่า LC_{50} ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองย่อยที่ 1

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงกับหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพูด้วยวิธีสัมผัสตาย

จากเชื้อรา 4 ชนิด 7 ไอโซเลท และกรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่นผสม Tween 80) (Table 1) มีเชื้อราสาเหตุโรคแมลง เพียง 2 ชนิด 3 ไอโซเลท สามารถเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* คือ เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B001 แยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* (Stål) เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 แยกได้จากด้วงหนวดยาวอ้อย *Dorystenes buqueti* Guerin และเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS แยกได้จากหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยลายจุดใหญ่ *Chilo tumidicostalis* (Linnaeus) (Table 1) โดยเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 3 ไอโซเลท ดังกล่าวสามารถเริ่มเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ในระยะเวลา 2 วัน หลังจากหนอนได้รับเชื้อรา ส่วนหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อรา

(กรรมวิธีควบคุม) ตัวหนอนมีลักษณะปกติ (Figure 1a) ขณะที่หนอนที่ได้รับเชื้อราและตายมีลักษณะตัวแข็งต่อมาเมื่อเส้นใยสีขาวและผลิโคนิเดียสีขาวขึ้นปกคลุมบนตัวหนอน *S. inferens* (Figure 1b) สำหรับหนอน *S. inferens* ที่สัมผัสเชื้อรา *M. anisopliae* มีลักษณะของเส้นใยเชื้อราสีขาวขึ้นปกคลุมบนตัวหนอนหลังจากนั้นผลิโคนิเดียสีเขียวปกคลุมลำตัว (Figure 1c, 1d)

เมื่อครบ 10 วัน หลังการบันทึกข้อมูลการตายของหนอน *S. inferens* ที่ตายด้วยการเข้าก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS สามารถทำให้หนอน *S. inferens* เกิดโรคและมีอัตราตายสูงสุด รองลงมาคือ *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 และ *B. bassiana* ไอโซเลท B001 ตามลำดับ ด้านความสามารถทำให้หนอน *S. inferens* มีการตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LT_{50}) ในระยะเวลาสั้นที่สุดเท่ากับ 2.93 วัน โดยเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS (Table 2)

จากผลทดลองนี้ เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B001 ที่แยกได้จาก *N. lugens* เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 ที่แยกได้จากหนอน *D. buqueti* และเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ที่แยกได้จากหนอน *C. tumidicostalis* สามารถเข้าก่อโรคกับ *S. inferens* ในอัตราที่ทำให้หนอน *S. inferens* สูงถึงร้อยละ 85 ในระยะเวลา 10 วัน หลังได้สัมผัสโคนิเดียของเชื้อรา ซึ่งสอดคล้องและเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการศึกษา Varma and Tandan (1996) และ Varma et al. (1988) ที่ได้ประเมินการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* ที่แยกจากตัวเต็มวัยของด้วง *Phytoscapus* sp. และเชื้อรา *M. anisopliae* ที่แยกได้จากผีเสื้อของ *Pyrilla perpusilla* สามารถเข้าก่อโรคกับหนอนระยะที่ 5 ของ *S. inferens* ได้ 20 - 70 เปอร์เซ็นต์ แต่ในการศึกษานี้แสดงผลเปอร์เซ็นต์การตายที่สูงกว่าเล็กน้อย

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความสามารถในการเข้าก่อโรคกับหนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยสีชมพู

การทดลองย่อยที่ 1 จากการทดลองข้างต้นได้คัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 และเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS

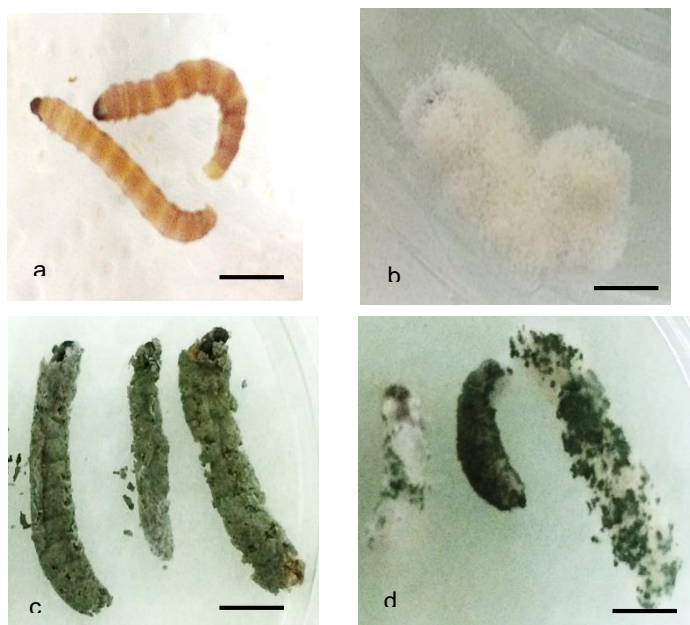


Figure 1 . Symptoms of larval cadavers of *Sesamia inferens* (Walker) (a) Normal and (b) infected by *Beauveria bassiana* B001, (c) *Metarhizium anisopliae* M001, (d) *Metarhizium anisopliae* MSS. Each bar represents 2 millimeters

Table 2. Mortality of the fourth instar larvae of *Sesamia inferens* (Walker) at day 10 after contact to conidia suspension of entomopathogenic fungi at 1.0×10^8 conidia/milliliter and their median lethal time values (LT_{50})

Fungi	% Mortality	LT_{50} (days)	95% Fiducial CI	
			Lower	Upper
<i>Beauveria bassiana</i> B001	37.50 ± 5.80	18.12	8.88	36.97
<i>Beauveria bassiana</i> B002	0.00	-	-	-
<i>Fusarium</i> sp. FSS	0.00	-	-	-
<i>Metarhizium anisopliae</i> M001	72.50 ± 9.60	6.03	4.94	7.36
<i>Metarhizium anisopliae</i> M002	0.00	-	-	-
<i>Meatrhzium anisopliae</i> MSS	85.00 ± 5.80	2.93	2.21	3.87
<i>Purpureocillium lilacinum</i> PSS	0.00	-	-	-
Control (distilled water mixed with 0.1% Tween 80)	0.00	-	-	-

ที่สามารถเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* มีการตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Table 2) นำมาทดสอบความรุนแรงในการเข้าก่อโรคที่ความเข้มข้นของสารแขวนลอยระดับต่าง ๆ ค่าความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีความรุนแรงในการเกิดโรคกับหนอน *S. inferens* ที่ความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อราที่มีค่า LC_{50} น้อยกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 ซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 4.73×10^5 และ 3.69×10^6 โคนิดีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 3)

การประเมินความรุนแรงของเชื้อรานั้น ในกรณีนี้สามารถพิจารณาได้จากค่าระยะเวลาที่ทำให้หนอน *S. inferens* ตายร้อยละ 50 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ที่แยกได้จากหนอนของ *C. tumidicostalis* (หนอนเจาะลำต้นและยอดอ้อยลายจุดใหญ่) มีความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ในความเข้มข้นของโคนิดีแขวนลอย LC_{50} 4.73×10^5 โคนิดีต่อมิลลิลิตร ที่ต่ำกว่า เชื้อรา *M. anisopliae* M001 ที่แยกได้จากหนอน *D. buqueti* LC_{50} 3.69×10^6 โคนิดีต่อมิลลิลิตร เนื่องจากมีค่า LT_{50} และ LC_{50} ต่ำกว่ามากถึง 2.06 และ 12.82 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าแมลงอาศัยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS คือ หนอนผีเสื้อ *C. tumidicostalis* ซึ่งมีความใกล้ชิดกับหนอน *S. inferens* มากกว่าแมลงอาศัยของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 ที่เป็นด้วงหนวดยาวอ้อย *D. buqueti*

เชื้อรา *M. anisopliae* มีคุณสมบัติในการเข้าทำลายก่อโรคในแมลงได้ดี ในกลุ่มของแมลงจำพวกหนอนผีเสื้อและหนอนด้วง โดยมีกลไกการทำงานเป็น

ขั้นตอนโดยรวมเชื้อราสาเหตุโรคแมลงติดไปกับผนังลำตัวของแมลง และส่วนของโคนิดีงอกโดยอาศัยความชื้นจากตัวแมลง ซึ่งมีประมาณ 50 - 90 เปอร์เซ็นต์ (Thungrabeab, 2018) สอดคล้องกับการรายงานของ Wangspa et al. (2015) ซึ่งได้ศึกษาความชื้นของแมลงพบว่า ด้วงงวงข้าว *Sitophilus oryzae* มีความชื้น 66.53, 64.21 และ 46.96 เปอร์เซ็นต์ ในระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ตามลำดับ หลังจากสปอร์งอกแทงทะลุผ่านเข้าไปในตัวแมลง มีการสร้าง blastospore และเพิ่มปริมาณในระบบเลือดของแมลง ทำให้แมลงแสดงอาการอ่อนแอและตาย (Thungrabeab, 2018) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยที่เป็นสาเหตุของความรุนแรงที่แตกต่างกันนี้ยังไม่สามารถสรุปผลชัดเจนได้ และควรต้องมีการศึกษาในรายละเอียดเพิ่มเติมต่อไป ในการทดลองนี้จึงได้คัดเลือกเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS เพื่อทดสอบในลำดับถัดไป

การทดลองย่อยที่ 2 ผลจากการทดลองย่อยที่ 1 ได้คัดเลือกเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ทดสอบความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ในระยะการเจริญเติบโตของหนอนที่แตกต่างกัน 3 ช่วง เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ในแต่ละช่วงการเจริญเติบโตแตกต่างกัน โดยหนอน *S. inferens* ระยะวัยต้น (วัยที่ 2 - 3) มีค่า LC_{50} น้อยที่สุด ถัดมาหนอน *S. inferens* ระยะวัยกลาง (วัยที่ 4 - 5) และ หนอน *S. inferens* ระยะวัยท้าย (วัยที่ 6 - 7) มีค่า LC_{50} มากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 9.26×10^4 , 6.02×10^5 และ 5.12×10^6 โคนิดีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 4)

Table 3. Median lethal concentration (LC_{50}) of *Metarhizium anisopliae* isolate M001 and *M. anisopliae* isolate MSS on the fourth instar larvae of *Sesamia inferens* (Walker) after topical application of suspension concentrations ranging from 1.0×10^5 to 1.0×10^9 conidia/milliliter.

Fungi	LC_{50} (conidia/ml)	95 % Fiducial CI	
		Lower	Upper
<i>Metarhizium anisopliae</i> isolate M001	3.69×10^6	5.17×10^5	2.64×10^7
<i>Metarhizium anisopliae</i> isolate MSS	4.73×10^5	5.47×10^4	4.09×10^6

Table 4. Median lethal concentration (LC₅₀) of *Metarhizium anisopliae* MSS on different instar larvae of *Sesamia inferens* (Walker) after the topical application of suspension concentrations ranging from 1.0x 10⁴ to 1.0 x 10⁸ conidia/milliliter.

Larval instar	LC ₅₀ (conidia/ml)	95 % Fiducial CI	
		Lower	Upper
2 nd - 3 rd	9.26 x 10 ⁴	1.47 x 10 ⁴	5.82 x 10 ⁵
4 th - 5 th	6.02 x 10 ⁵	1.27 x 10 ⁵	2.58 x 10 ⁶
6 th - 7 th	5.12 x 10 ⁶	1.27 x 10 ⁶	2.06 x 10 ⁷

เมื่อนำเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ที่มีความรุนแรงของการก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ในระยะหนอนที่แตกต่างกัน ความรุนแรงของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีค่าของ LC₅₀ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อหนอนมีระยะที่เพิ่มขึ้น แสดงถึงเชื้อมีความรุนแรงในการเข้าก่อโรคกับหนอนในช่วงวัยที่ 2-3 มากที่สุด และลดลงต่อเนื่องจนต่ำสุดในหนอนระยะที่ 6-7 ซึ่งวัยของแมลงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา ซึ่งแต่ละวัยของแมลงมีความอ่อนแอต่อเชื้อแตกต่างกัน โดยเชื้อราสามารถเข้าก่อโรคกับหนอนวัยต้นได้ง่ายกว่าหนอนวัยท้าย (Patirupanusara, 2011)

จากผลการทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในประเทศไทยที่นำเชื้อราก่อโรคของแมลงมาทดสอบเพื่อเป็นแนวทางควบคุมหนอน *S. inferens* ในอ้อย และมีแนวโน้มว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันกำจัดหนอน *S. inferens* ได้ ทั้งนี้ยังมีความจำเป็นต้องมีงานวิจัยรวบรวมคัดกรองและทดสอบ *M. anisopliae* ไอโซเลทใหม่ ๆ และการทดสอบในแปลงทดลองเพิ่มเติม เพื่อให้ได้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพดีและสูงยิ่งขึ้น รวมทั้งการผสมเทคโนโลยีใหม่ เช่น การห่อหุ้มเชื้อรา (encapsulation) เพื่อให้เชื้อราสามารถทนต่อสภาพแวดล้อม และในด้านการปลดปล่อยสารพิษทำให้แมลงติดเชื้อได้ดีขึ้น เมื่อนุภาคเชื้อราสัมผัสกับตัวแมลง (Celestino and Oliveira, 2022; Meirelles et al., 2023) นอกจากการนำเชื้อรา *M. anisopliae* มาควบคุมหนอน *S. inferens*

การศึกษากการเป็นเชื้อราที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตในอ้อย (endophyte) เพื่อให้ต้นอ้อยเพิ่มความต้านทานต่อการเข้าทำลายของ *S. inferens* และเพิ่มผลผลิตอ้อย เป็นอีกมุมมองที่น่าสนใจ ซึ่งเคยมีการศึกษาในมะเขือเทศ (Elena et al., 2011; Siqueira et al., 2020; Meirelles et al., 2023)

สรุป

การวิจัยครั้งนี้ดำเนินการด้วย 2 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนแรก การคัดกรองเชื้อราสาเหตุโรคแมลง จำนวน 4 ชนิด 7 ไอโซเลท คือ 1. เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B001 ที่แยกจาก *Nilaparvata lugens* (Stål) 2. เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B002 ที่แยกจาก *Phyllotreta sinuala* Stephens 3. เชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท FSS ที่แยกจาก *Chilo tumidicostalis* (Hampson) 4. เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 ที่แยกจาก *Dorystenes buqueti* Guerin 5. เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M002 ที่แยกจาก *Orystenes rhinoceros* (Linnaeus) 6. เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS ที่แยกจากหนอน *C. tumidicostalis* และ 7. เชื้อรา *P. lilacinum* ไอโซเลท PSS ที่แยกจากหนอน *C. tumidicostalis* กับหนอน *S. inferens* ในห้องปฏิบัติการ ผลการคัดกรองพบว่า มีเชื้อราเพียง 2 ชนิด 3 ไอโซเลท ที่สามารถก่อโรคกับหนอน *S. inferens* ได้แก่ เชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท B001 เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 และเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS จากนั้นในขั้นตอนที่สอง

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราพบว่า เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีค่า LC_{50} เท่ากับ 4.73×10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M001 ที่มีค่า LC_{50} เท่ากับ 3.69×10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท MSS มีศักยภาพในการนำไปใช้ป้องกันกำจัดหอน *S. inferens* ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อราสาเหตุโรคแมลง วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ทำการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18(2): 265-267.
- Attajarusit, J. 2001. Sugarcane borer and its control. Documentation for farmer training program on the Sugarcane Borer and Sugarcane White Leaf Disease Project. Division of Entomology and Zoology, Department of Agriculture, Bangkok. 17 p. (in Thai)
- Attathom, T. 2003. Use of microorganisms to control insect pests. pp. 163-193. *In*: C. Chamswang (ed.). *Biological Control of Plant Diseases and Pests*. Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. (in Thai)
- Bautista-Galvez, A., J.F. Barrera, E. Payro de la Cruz, S. Salgado-Garcia, J. Gomez-Ruiz and J.E. Gomez-Leyva. 2012. Genetic Characterisation of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin isolates from sugarcane fields and their pathogenicity against *Aeneolamia postica* (Walker) (Hemiptera: Cercopidae). *Universidad Ciencia* 28(3): 217-229.
- Celestino, M. and J.A. dos S. Oliveira. 2022. Encapsulation methods of entomopathogenic fungi for their application in the biological control. *Research, Society and Development* 11(16): DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i16.38031> (Abstract)
- Elena, G.J., P.J. Beatriz, P. Alejandro and E. Roberto. 2011. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin Promotes growth and has endophytic activity in tomato plants. *Advances in Biological Research* 5 (1): 22-27.
- Finney, D.J. 1952. *Probit Analysis*. 2nded. Cambridge University Press, New York. 256 p.
- Kokkan, P., N. Siri and N. Pitaksa. 2008. The effect of stem borers infestations on yield and quality of 8 sugarcane varieties. *Khon Kaen Agriculture Journal* 36(Suppl.): 165-171. (in Thai)
- Maneerat, T., S. Rattanakaand and W. Suasa-ard. 2006. Comparative study for foodstuff of *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) for *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) production. pp. 390-395. *In*: *Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference: Plants*. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Meirelles, L.N., E. Mesquita, T.A. Correa, R. de O.B. Bitencourt, J.L. Oliveira, L.F. Fraceto, M.G. Camargo and V.R.E.P. Bittencourt. 2023. Encapsulation of entomopathogenic fungal conidia: evaluation of stability and control potential of *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 14: 102-184.

- Mehinto, J.T., P. Atachi, O.K.D. Kpindou, E.A. Dannon and M. Tamò. 2014. Mortality of *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae) larval stages induced by different doses of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. International Journal of Advanced Research 2(4): 273-285.
- Mekapogu, A.R. 2021. Finney's probit analysis spreadsheet calculator (Version 2021). (Online). Available: <https://probitanalysis.wordpress.com/> (December 12, 2021).
- Patirupanusara, P. 2011. The role of insect fungi in controlling insect pests. Phitsanulok Rice Research Center Phitsanulok. 184 p. (in Thai)
- Pitak, N. 2001. Alternative technologies for IPM. pp. 241-255. In: Proceedings of the 4th Academic Symposium on the Prevention and Control of Sugarcane Insect Pests by Integrated Methods. Division of Entomology and Zoology, Department of Agriculture, Bangkok. (in Thai)
- Siqueira, A.C.O.G., M. Mascarin, C.R.N.C.B. Gonçalves, J. Marcon, M.C. Quecine, A. Figueira and I. Delalibera Jr. 2020. *Metarhizium* species and their activities that stimulate the growth of tomato plants. Frontier in Sustain. Food System Volume 4: 1-15.
- Thungrabeab, M. 2018. Entomopathogenic Fungi as Alternatives for Insect Pest Control. O.S. Printing House CO., LTD. Bangkok. 240 p. (in Thai)
- Tonphukhiaw, V., N. Siriand and T. Jamjanya. 2018. Mass rearing technique of pink stem borer, *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) using baby corn for Larval Parasitoid, *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) production. Khon Kaen Agriculture Journal 46(5): 975-982.
- Tuncer, C. and O. Aker. 2017. Sexual Dimorphism in the Pupal Stage of *Hyphantria Cunea* (Lepidoptera: Erebidiae). Entomological News 127(2): 112-116.
- Varma, A. and B.K. Tandan. 1996. Pathogenicity of three entomogenous fungi against insect pests of sugarcane. Journal of Biological Control 10(1&2): 87-91.
- Varma, A., B.K. Tandan and K. Singh. 1988. First record of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, an entomogenous fungus from the sugarcane defoliator *Phytoscaphus* sp. (Coleoptera: Curculionidae) from India. Current Science 57(7): 396.
- Wangspa, W., Y. Chanbang and S. Vearasilp. 2015. Radio frequency heat treatment for controlling rice weevil in rough rice cv. Khao Dawk Mali 105. Journal of Natural Sciences 14(2): 189-197.