ผลของอุณหภูมิสูงต่อโคนิเดียเชื้อราเมตาไรเซียมที่มีศักยภาพก่อโรคกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

Effects of High Temperature on Conidia of Potential *Metarhizium anisopliae* Infecting Brown Plant Hopper

อารยา บุญศักดิ์[1] สุพรรณิกา อินต๊ะนนท์[1*,2] วิภา หอมหวล[1,2] และ คณิตา เกิดสุข[3]

Araya Bunsak[1], Suphannika Intanon[1*,2], Wipa Homhaul[1,2] and Kanita Kertsuk[3]

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก 65000

[1]Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

[2]ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก 65000

[2]National Biological Control Research Center, Lower Northern Regional Center, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

[3]ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก จ. พิษณุโลก 65000

[3]Phitsanulok Rice Research Center, Phitsanulok 65000, Thailand

**Corresponding author: E-mail: suphannikai@nu.ac.th*

(Received: 6 October 2023; Accepted: 22 December 2023)

Abstract: *Metarhizium anisopliae* is a soil-dwelling fungus that infects various insects and commonly uses as a bioinsecticides worldwide. Previously, the total of 16 isolates of potential *M. anisopliae,* the highest efficiency causing 100% brown planthopper (BPH) *Nilaparvata lugens* (Stål) mortality within 6 days of exposure, composed of PB-01, PB-02, PB-10, PB-19, PB-28, PB-47, PB-51, PB-71, PB-75, PB-76, PB-95, PB-101, PB-114, PB-117, PB-123 and PB-125 was isolated from forest soils in Phetchabun province. The selection of heat tolerant conidia was carried out. The conidia of each isolate were preserved in organic soil under the temperature at 40, 45 and 50 ^{o}C for 21 days. The surviving conidia were evaluated by the number of the growing colonies on PDA media at 7, 14 and 21 days after preservation. The result showed that conidia of most fungal isolates under preserved conditions could survive and form growing colonies on PDA. However, the number of growing colonies was significantly different and declined continuously when temperature and time of preservation were increased. The conidia of two isolates PB-02 and PB-75 significantly survived under the highest stress condition at 50 ^{o}C for 21 days with the highest number of colonies at 3.8 x10^{4} and 3.9x10^{4} CFU/ml.

Keywords: high temperature, *Metarhizium anisopliae*, brown planthopper

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เป็นเชื้อราที่ดำรงชีพในดิน สามารถก่อโรคกับแมลงได้และนิยมใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมแมลงอย่างแพร่หลาย ในช่วงที่ผ่านมาได้ทำการคัดแยกเชื้อราเมตาไรเซียมจากดินป่าของจังหวัดเพชรบูรณ์ พบเชื้อราจำนวน 16 ไอโซเลทมีศักยภาพสูงสามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 100 ภายใน 6 วัน หลังสัมผัสเชื้อ ประกอบด้วย PB-01, PB-02, PB-10, PB-19, PB-28, PB-47, PB-51, PB-71, PB-75, PB-76, PB-95, PB-101, PB-114, PB-117, PB-123 และ PB-125 จึงได้ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิสูงต่อโคนิเดียของเชื้อรานี้ขึ้นเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีความทนทานต่อความร้อนได้ดี โดยทำการเก็บรักษาโคนิเดียของเชื้อราแต่ละไอโซเลทในดินอินทรีย์ที่มีอุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 21 วัน ทำการตรวจสอบโคนิเดียที่รอดชีวิตจากจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ภายหลังการเก็บรักษาที่ 7, 14 และ 21 วันตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า โคนิเดียของไอโซเลทเชื้อราส่วนใหญ่ภายใต้การเก็บรักษาสามารถรอดและเจริญขึ้นเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ อย่างไรก็ตาม จำนวนโคโลนีที่พบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อระดับของอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โคนิเดียเชื้อรา *M. anisopliae* จากสองไอโซเลท คือ PB-02 และ PB-75 สามารถคงความมีชีวิตได้ดีที่สุดที่ $3.8x10^4$ และ $3.9x10^4$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ภายใต้สภาพการเก็บรักษาในดินที่มีอุณหภูมิสูง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

คำสำคัญ: อุณหภูมิสูง เชื้อราเมตาไรเซียม เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

คำนำ

เชื้อราเมตาไรเซียม (green muscardine fungi) เป็นกลุ่มของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) (Iskandarov *et al*., 2006) จัดอยู่ใน Division: Ascomycota, Class: Sordariomycetes, Order: Hypocreales, Family: Clavicipitaceae, Genus: *Metarhizium* โดย *M. anisopliae* จัดเป็นชนิดที่มีพบได้ทั่วไป อาศัยอยู่ในดิน และบนซากแมลงที่ถูกทำลาย สามารถจำแนกได้ในเบื้องต้นจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของโคนิเดีย เช่น รูปร่าง ขนาด และสี เป็นต้น (Luangsa-ard *et al*., 2007, 2009; Dugan, 2017)

เชื้อรา *M. anisopliae* เป็นเชื้อรามีความปลอดภัยสูงเนื่องจากไม่พบการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย เช่น นก ปลา หนู หมู และกระต่าย ในพื้นที่ที่มีการใช้เชื้อราควบคุมศัตรูพืช (Zimmermann, 1992) ในปัจจุบันสายพันธุ์ใหม่ ๆ ของเชื้อราได้ถูกค้นพบอย่างต่อเนื่องและพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูพืชที่ได้รับการยอมรับและใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างแพร่หลาย (Brunner-Mendoza *et al*. 2019; Lord, 2005) ในประเทศไทย เชื้อรา *M. anisopliae* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจและมีการทดสอบประสิทธิภาพกับแมลงหลายชนิด เช่น ด้วงงวงมะพร้าว ด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย แมลงนูนหลวง (Suasa-ard *et al*., 2004) แมลงวันผลไม้ (Thaochan and Chinajariyawong, 2008) หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยจักจั่นสีเขียว (Patirupanusara *et al*., 1999) เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม ในการใช้เชื้อราควบคุมแมลงในสภาพพื้นที่การเกษตรนั้น สภาพแวดล้อมที่เชื้อราดำรงชีพเช่นในดิน น้ำ หรือในตัวแมลงอาศัย ปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพโดยรอบมีผลกระทบต่อประสิทธิ-ภาพในการก่อโรคของเชื้อรากับแมลงมาก (Roy *et al*., 2006) และหนึ่งในปัจจัยทางกายภาพที่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อรา คือ อุณหภูมิ (Ouedraogo *et al*., 1997) ซึ่งมีผลต่อความมีชีวิตของโคนิเดีย อัตราการงอก การเจริญของเส้นใย และกระทบต่อเนื่องถึงอัตราการก่อโรค และความรุนแรงของเชื้อราในการเข้าทำลายแมลงศัตรูเป้าหมายได้ (Nussenbaum *et al*. 2013; Vidal *et al*. 1997)

ในช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา Bunsak *et al*. (2023) ได้ทำการคัดแยกเชื้อราเมตาไรเซียมจากดิน ซึ่งเก็บรวบรวมจากพื้นที่ อำเภอเขาค้อ อำเภอหล่มเก่า และอำเภอน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ และคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดี สามารถก่อโรคและทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายในอัตราร้อยละ 100 ภายในเวลา 6 วัน และมีค่าความรุนแรงในส่วนของระยะเวลาที่ทำให้แมลงตายร้อยละ 50 (LT_{50}) ที่ 2.9-4.2 วัน จำนวน 16 ไอโซเลท พร้อมทั้งทำการจัดจำแนกทางชีวโมเลกุลด้วยสารพันธุกรรม 18S rDNA พบว่า เชื้อราทั้ง 16 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา *M. anisopliae* อย่างไรก็ตาม เนื่องจากปัญหาการเปลี่ยนแปลงของสภาพอากาศของโลกในปัจจุบันมีผลทำให้อุณหภูมิในภูมิภาคต่าง ๆ ของโลกสูงขึ้น (Climate Center, 2023) ซึ่งส่งผลกระทบต่อเนื่องทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อชีวิตและความเป็นอยู่ของมนุษย์อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ พื้นที่การเกษตรและนาข้าวของประเทศไทยต่างได้รับผลกระทบด้วยเช่นกัน ในการใช้ประโยชน์เชื้อราเพื่อควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพนาข้าวนั้น เชื้อราควรมีคุณสมบัติสำคัญในการทนทานต่อสภาพอุณภูมิสูงในนาข้าวได้ดีด้วย จึงได้ทำการศึกษาเรื่องผลของอุณหภูมิต่อโคนิเดียของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีศักยภาพก่อโรคกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจำนวน 16 ไอโซเลท ประกอบด้วย PB-01, PB-02, PB-10, PB-19, PB-28, PB-47, PB-51, PB-71, PB-75, PB-76, PB-95, PB-101, PB-114, PB-117, PB-123 และ PB-125 ด้วยการสร้างสภาพแวดล้อมจำลองโดยผสมโคนิเดียของเชื้อราเข้ากับดินอินทรีย์วัตถุซึ่งโดยทั่วไปมีอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส (Thai meteorological department, 2023) และทำการบ่มเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงระดับต่าง ๆ 3 ระดับคือ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงของอุณหภูมิระดับสูงที่พบรายงานการรอดชีวิตและเจริญได้ของเชื้อรา *M. anisopliae* (Raja Namasivayam *et al*., 2015) โดยมีระยะเวลาการเก็บรักษานาน 7-21 วัน เพื่อคัดเลือกไอโซเลทเชื้อราที่มีศักยภาพในการดำรงชีพที่สภาพอุณภูมิสูงได้ดีที่สุดสำหรับพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมโคนีเดียเชื้อรา *Metarhizium anisopliae*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ผ่านการคัดเลือกและจัดจำแนก จำนวน 16 ไอโซเลท ได้แก่ PB-01, PB-02, PB-10, PB-19, PB-28, PB-47, PB-51, PB-71, PB-75, PB-76, PB-95, PB-101, PB-114, PB-117, PB-123 และ PB-125 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ในสภาพอุณหภูมิห้อง 28±2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 14 วัน จนโคนิเดียเจริญขึ้นเต็มจานเพาะเชื้อ จากนั้นทำการเตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อราด้วยสารละลายน้ำของ Tween 80 (Sigma, St. Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตรวจนับความเข้มข้นของโคนิเดียด้วย haemacytometer และปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร (Keppanan *et al*., 2018)

ทดสอบความคงทนของโคนิเดียเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ภายหลังเก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิสูง

นำสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราข้างต้นผสมกับดินอินทรีย์ปริมาตร 100 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Bugeme *et al*., 2008; Sun *et al*. 2003) บรรจุลงในถุงกระดาษสีน้ำตาล ขนาด 12 x 19 x 4 เซนติเมตร ในอัตราส่วน 2 มิลลิลิตรต่อดิน 100 กรัม จากนั้นทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส (Boontud, 2019) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณกลางถุงบรรจุปริมาณ 1 กรัมจากหน่วยทดลอง (Ekesi *et al*., 2003) หลังเก็บรักษาเชื้อที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายน้ำของ Tween 80 (Sigma, St. Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมสารแขวนลอยดินด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง (vortex mixer) เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1}-10^{-3} เท่า ดูดสารแขวนลอยดินที่ได้ของแต่ละตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทำการปาดสารแขวนลอยดินให้การกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ

(spread plate) และเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน ตรวจนับและบันทึกจำนวนโคโลนีของเชื้อในแต่ละช่วงอุณหภูมิ และคำนวณปริมาณเชื้อราจากดินเป็นหน่วย โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยประเมินจากจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อราเป็นเกณฑ์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) ของจำนวนโคโลนีเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลท หลังจากทำการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย วิธี Duncan's multiple, range test (DMRT) ระดับความเชื่อมั่น 95% จากนั้นทำการคัดเลือกไอโซเลทเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ทนทานต่อสภาพอุณภูมิสูงได้ดีที่สุด

ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความมีชีวิตรอดของเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้งหมด 16 ไอโซเลท ที่เก็บรักษาในดินอินทรีย์ ที่ระดับอุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน พบว่า โคนิเดียของเชื้อราส่วนใหญ่สามารถรอดและเจริญขึ้นเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบได้ในทุกระดับของอุณหภูมิ และระยะเวลาการเก็บรักษา แต่จำนวนโคโลนีที่พบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยที่ระยะเวลา 7 วัน โคนิเดียของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่เก็บรักษาในดินที่ทุกระดับอุณหภูมิ ทั้ง 16 ไอโซเลท เจริญเป็นโคโลนีได้ดีบนอาหารเพาะเลี้ยง มีลักษณะเป็นจุดสีขาว กระจายตัวทั่วจานเพาะเลี้ยงเชื้อ และบางส่วนพบการสร้างโคนิเดียสีเขียวเข้มเป็นจุดบริเวณกลางโคโลนี โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบจำนวนโคโลนีมากที่สุดในช่วง 3.6-16.6x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจำนวนโคโลนีมีแนวโน้มลดลงอยู่ในช่วง 2.6-14.7x10^4 และ 0.9-9.4x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อระดับอุณหภูมิของการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นเป็น 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิการเก็บรักษา 40 องศาเซลเซียส เชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท PB-28, PB-19 และ PB-75 พบจำนวนโคโลนีมากที่สุดที่ 16.5x10^4, 16.6x10^4 และ 14.3x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อระดับอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 45 องศาเซลเซียส พบ PB-19 และ PB-75 มีจำนวนโคโลนีมากที่สุด 14.7x10^4 และ 10.8x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และที่อุณหภูมิการเก็บรักษาสูง 50 องศาเซลเซียส พบ PB-75 และ PB-02 เท่านั้นที่มีจำนวนโคโลนีมากที่สุด 9.4x10^4 และ 8.5x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Figure 1, Table 1)

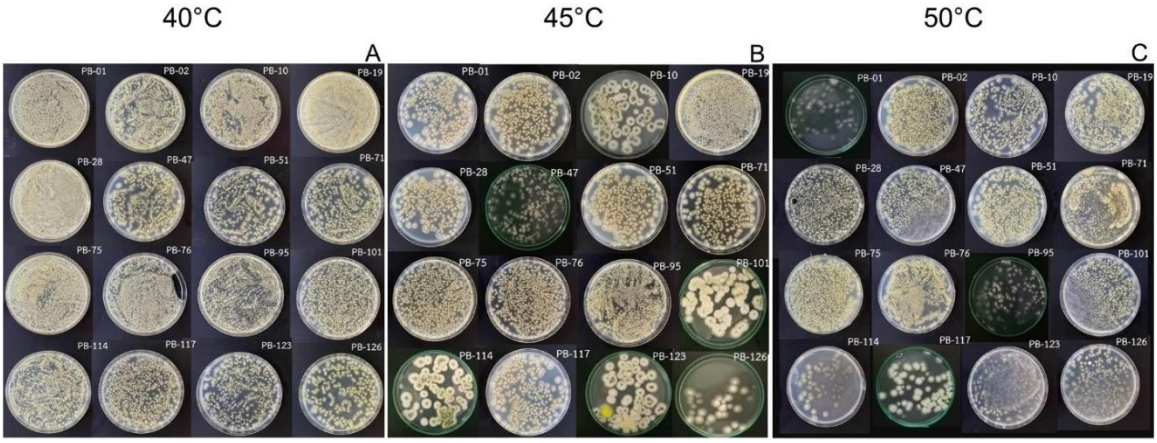


Figure 1. Conidium production of 16 *Metarhizium anisopliae* isolated on the PDA media after 7 days of preservation in organic soil at the temperatures of 40 (A), 45 (B) and 50 (C) degrees Celsius.

Table 1. The number of colonies from 16 *Metarhizium anisopliae* isolated on the PDA media after 7 days of preservation in organic soil at the temperatures of 40, 45 and 50 degrees Celsius.

Isolate	Number of colonies ($CFUx10^4$)/ml/Temperatures (˚C)		
	40	45	50
PB-01	13.3^{abc}	4.3^{bc}	0.9^{e}
PB-02	10.5^{abcd}	9.1^{abc}	8.5^{ab}
PB-10	12.6^{abc}	8.0^{abc}	6.3^{abcd}
PB-19	16.6^{a}	14.7^{a}	7.5^{abc}
PB-28	16.5^{a}	7.8^{abc}	7.5^{abc}
PB-47	7.6^{bcd}	5.5^{bc}	4.0^{abcd}
PB-51	6.3^{cd}	5.3^{bc}	3.2^{bcd}
PB-71	7.8^{bcd}	6.8^{bc}	5.6^{abcd}
PB-75	14.3^{ab}	10.8^{ab}	9.4^{a}
PB-76	11.1^{abcd}	7.5^{abc}	6.4^{abcd}
PB-95	12.6^{abc}	8.4^{abc}	5.6^{abcd}
PB-101	10.3^{abcd}	5.3^{bc}	5.3^{abcd}
PB-114	10.4^{abcd}	3.8^{bc}	3.1^{bcd}
PB-117	7.0^{bcd}	4.0^{bc}	3.0^{bcd}
PB-123	7.5^{bcd}	3.5^{bc}	2.7^{bcd}
PB-125	3.6^{d}	2.6^{c}	1.9^{d}
P-value	0.01	0.04	0.02
CV (%)	47.05	67.44	66.31

[a,b] Means within a column with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

ที่ระยะเวลา 14 วัน โคนิเดียของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่เก็บรักษาในดินที่ทุกระดับอุณหภูมิทั้ง 16 ไอโซเลท เจริญเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อราได้ดี และมีลักษณะโคโลนี การกระจายตัว และการเปลี่ยนแปลงจำนวนโคโลนีเป็นไปในทิศทางเดียวกับที่ระยะเวลา 7 วัน ทั้งนี้จำนวนโคโลนีพบมากที่สุดในช่วง 1.8-13.5x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิการเก็บรักษา 40 องศาเซลเซียส และมีแนวโน้มลดลงเป็นในช่วง 1.0-8.7x10^4 และ 0.8-6.4x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อระดับอุณหภูมิของการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นเป็น 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยที่ระดับอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 40 องศาเซลเซียส พบจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท PB-75 และ PB-28 ได้สูงสุดที่ 13.5x10^4 และ 11.2x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อระดับอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 45 องศาเซลเซียส พบไอโซเลท PB-75, PB-02 และ PB-95 มีจำนวนโคโลนีสูงสุด 8.7x10^4, 7.7x10^4 และ 6.3x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และที่อุณหภูมิการเก็บรักษาสูง 50 องศาเซลเซียส พบเพียง 2 ไอโซเลทคือ PB-75 และ PB-02 เท่านั้นที่มีจำนวนโคโลนีสูงที่สุด 6.4x10^4 และ 4.7x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Figure 2, Table 2)

ที่ระยะเวลา 21 วัน โคนิเดียของเชื้อรา *M. anisopliae* เจริญเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อราได้ดีที่ระดับอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 40 และ 45 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส พบว่า จำนวนโคโลนีลดลงอย่างชัดเจน โดย

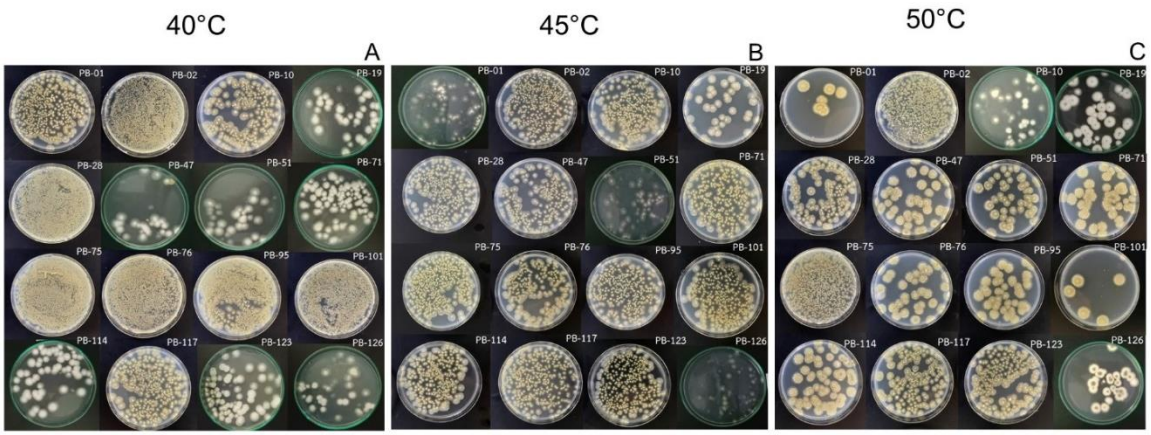


Figure 2. Conidium production of 16 *Metarhizium anisopliae* isolated on the PDA media after 14 days of preservation in organic soil at the temperatures of 40 (A), 45 (B) and 50 (C) degrees Celsius.

Table 2. The number of colonies from 16 *Metarhizium anisopliae* isolated on the PDA media after 14 days of preservation in organic soil at the temperatures of 40, 45 and 50 degrees Celsius.

Isolate	Number of colonies (CFUx10^4)/ml/Temperatures (˚C)		
	40	45	50
PB-01	3.5^{efg}	1.0^{e}	0.8^{e}
PB-02	8.5^{abcd}	7.7^{a}	4.7^{b}
PB-10	2.5^{fg}	2.0^{cd}	1.8^{cde}
PB-19	1.8^{g}	1.7^{cde}	1.5^{de}
PB-28	11.2^{ab}	4.8^{ab}	2.3^{cd}
PB-47	3.3^{efg}	1.3^{de}	0.9^{e}
PB-51	1.9^{g}	1.7^{cde}	1.6^{de}
PB-71	5.5^{cde}	4.6^{ab}	3.1^{c}
PB-75	13.5^{a}	8.7^{a}	6.4^{a}
PB-76	9.7^{abc}	2.3^{cd}	1.4^{de}
PB-95	8.0^{abcd}	6.3^{a}	1.4^{de}
PB-101	6.7^{bcde}	2.0^{cd}	1.2^{de}
PB-114	5.7^{bcde}	3.3^{bc}	1.7^{de}
PB-117	5.6^{bcde}	3.1^{bc}	2.5^{cd}
PB-123	5.1^{cbde}	2.8^{bc}	2.4^{cd}
PB-125	2.2^{fg}	2.1^{cd}	1.6^{de}
P-value	0.00	0.00	0.00
CV (%)	64.04	75.62	70.71

[a,b] Means within a column with different letters are significantly different (P<0.05).

ไอโซเลท PB-125 ไม่พบการเจริญของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โคโลนีที่เจริญมีลักษณะ การกระจายตัว และการเปลี่ยนแปลงจำนวนโคโลนีเป็นไปในทิศทางเดียวกับที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน ทั้งนี้จำนวนโคโลนีพบมากที่สุดในช่วง 0.2-8.6x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 40 องศาเซลเซียส และมีแนวโน้มลดลงอยู่ในช่วง 0.1-5.7x10^4 และ 0.0-3.9x 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อระดับอุณหภูมิของการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นเป็น 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทั้งนี้ ไอโซเลทของเชื้อราที่พบจำนวนโคโลนีสูงสุดในทุกระดับอุณหภูมิ คือ PB-75 และ PB-02 โดยที่ระดับอุณหภูมิสูง 50 องศาเซลเซียส พบจำนวนโคโลนี สูงสุดที่ 3.9x10^4 และ 3.8x10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Figure 3, Table 3)

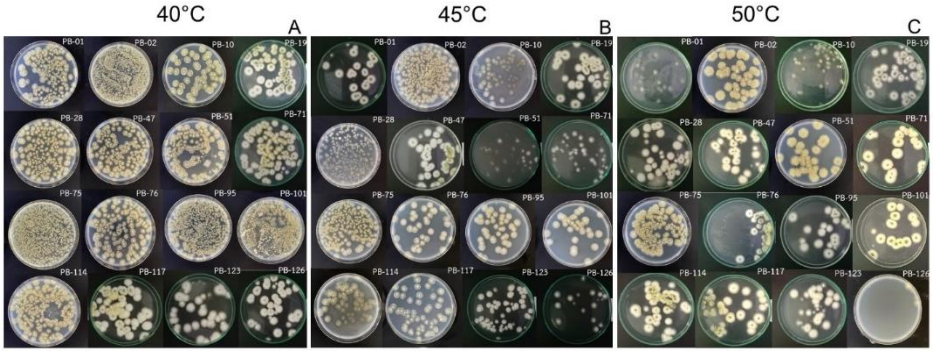


Figure 3. Conidia production of 16 *Metarhizium anisopliae* isolated on the PDA media after 21 days of preservation in organic soil at the temperatures of 40 (A), 45 (B) and 50 (C) degrees Celsius.

Table 3. The number of colonies from 16 *Metarhizium anisopliae* isolated on the PDA media after 21 days of preservation in organic soil at the temperatures of 40, 45 and 50 degrees Celsius.

Isolate	Number of colonies (CFUx10^4)/ml/Temperatures (˚C)		
	40	45	50
PB-01	0.8^{bcd}	0.8^{bcd}	0.2^{bcd}
PB-02	8.4^{a}	5.7^{a}	3.8^{a}
PB-10	0.7^{bcd}	0.7^{bcd}	0.1^{bcd}
PB-19	0.5^{bcd}	0.5^{bcd}	0.2^{bcd}
PB-28	2.1^{bc}	0.5^{cd}	0.2^{bcd}
PB-47	0.5^{cd}	0.4^{de}	0.1^{bcd}
PB-51	0.2^{d}	0.1^{e}	0.1^{bcd}
PB-71	1.3^{bcd}	0.5^{bcd}	0.2^{bcd}
PB-75	8.6^{a}	4.4^{a}	3.9^{a}
PB-76	2.0^{bc}	1.0^{bc}	0.2^{cbd}
PB-95	1.9^{bcd}	1.3^{bc}	0.3^{b}
PB-101	2.1^{bc}	0.6^{bcd}	0.1^{bcd}
PB-114	2.0^{bc}	0.6^{bcd}	0.3^{c}
PB-117	2.3^{b}	1.4^{b}	0.2^{bcd}
PB-123	0.6^{bcd}	0.5^{bcd}	0.1^{bcd}
PB-125	0.5^{cd}	0.3^{de}	0.0^{e}
P-value	0.00	0.00	0.00
CV (%)	121.91	143.67	199.71

^{a,b} Means within a column with different letters are significantly different (P<0.05).

วิจารณ์

โดยทั่วไป ดิน จัดเป็นแหล่งอาศัยที่เหมาะสมต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์หลากหลายชนิดรวมทั้งเชื้อราก่อโรคกับแมลง เช่น เชื้อรา *M. anisopliae* (Meyling and Eilenberg, 2007) เนื่องจากดินทำหน้าที่เป็นโล่ปกป้องเชื้อจุลินทรีย์จากแสงแดด และ แสงยูวี รวมทั้งอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมทางธรรมชาติที่รุนแรงต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี (Sánchez-Peña *et al*., 2011) ผลการทดสอบความคงทนของเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 16 ไอโซเลท ในดินอินทรีย์ที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลทเชื้อราส่วนใหญ่สามารถสร้างโคโลนีได้หลังการเก็บรักษาเชื้อที่ระยะเวลา 7,14 และ 21 วัน มีเพียงไอโซเลท PB-125 เท่านั้นที่ไม่สามารถสร้างโคโลนีภายใต้การเก็บรักษาที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ได้ โดยเชื้อราไอโซเลท PB-02 และ PB-75 มีแนวโน้มในการสร้างโคโลนีได้ระดับสูงที่สุด ที่ 50 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาการเก็บรักษาเชื้อที่ 14 และ 21 วัน สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Raja Namasivayam *et al*. (2015) ที่พบว่า เชื้อรา *M. anisopliae* เจริญได้ในสภาพดินที่มีอุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส โดยพบจำนวนโคโลนีของเชื้อราลดลงอย่างต่อเนื่องจาก $78.1x10^8$-$50.6x10^8$ โคนิเดียต่อกรัม เมื่อมีระดับของอุณหภูมิสูงขึ้น Ihara *et al*. (2003) และ Chandra Teja and Rahman (2017) รายงานว่าเชื้อราเขียว *M. anisopliae* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพบจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *M. anisopliae* มากที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 และ 21 วัน นอกจากนี้ Couceiro *et al*. (2021) พบว่า เชื้อรา *M. anisopliae* สามารถทนอุณหภูมิได้สูงถึง 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *M. brunneum* และ *M. robertsii* ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งโดยรวมเชื้อรา *M. anisopliae* เป็นเชื้อราที่ได้รับการยอมรับว่ามีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงมากกว่าชนิดอื่น ๆ (Horaczek and Viernstein, 2004; Rangel *et al*., 2005)

อย่างไรก็ตาม Kershaw *et al*. (1999) รายงานว่า เชื้อรา *M. anisopliae* ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียสและมีบางไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ ช่วง 5-10 องศาเซลเซียส และ 35-40 องศาเซลเซียส ซึ่งในบางรายงานการวิจัยที่มีความแตกต่างจากผลการวิจัย ในส่วนของช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรา *M. anisopliae* เช่น Ghayedi and Abdollahi (2013) พบว่า เชื้อรา *M. anisopliae* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ 27-35 องศาเซลเซียส ภายใต้ช่วงแสงที่เหมาะสม แต่ไม่สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส Ouedraogo *et al*. (1997) พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยเชื้อรา *M. anisopliae* มีความสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 35 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความทนอุณหภูมิสูงกว่าเชื้อรา *M. flavoviride* Fernandes *et al*. (2008) และ Rangel *et al*. (2005) พบว่า โคนิเดียเชื้อรา *M. anisopliae* ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ในสภาพสารแขวนลอยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 4-8 ชั่วโมง

นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ไอโซเลทเชื้อรา PB-02 และ PB-75 มีแนวโน้มตอบสนองต่อสภาวะกดดันจากอุณหภูมิสูงได้ดีและรวดเร็วกว่าไอโซเลทอื่น ๆ โดยพบว่า การเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โคนิเดียที่รอดและเจริญเป็นโคโลนี มีจำนวนน้อยกว่าเชื้อราไอโซเลทอื่น ๆ แต่เมื่อระดับอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น เป็น 45 และ 50 องศาเซลเซียส โคนิเดียที่รอดและเจริญเป็นโคโลนีกลับมีจำนวนที่เพิ่มสูงมากกว่าไอโซเลทอื่น ๆ อย่างชัดเจน ซึ่งคุณลักษณะพิเศษนี้เกิดจากกลไกการปรับตัวทางสรีรวิทยาในระดับเซลล์ของเชื้อราทั้งสองไอโซเลทที่เกิดขึ้นและตอบสนองต่อสภาพอุณหภูมิสูงได้อย่างรวดเร็วมากกว่าไอโซเลทอื่น ๆ จนสามารถปกป้องโครงสร้างการทำงานของเอ็นไซม์ และโปรตีนที่สำคัญต่าง ๆ ไม่ให้เกิดความเสียหายหรือถูกทำลายจนไม่สามารถควบคุมการทำงานของเซลล์ได้ โดยกลไกที่มีบทบาทสำคัญคือกระบวนการเพิ่มปริมาณการสร้างโปรตีนพวก heat shock protein และ chaperones ที่ทำหน้าที่ป้องกันและซ่อมแซมความเสียหายของโครงสร้างการทำงานของโปรตีนและเอ็นไซม์ต่าง ๆ ที่ได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิสูง เป็นต้น (Bai *et al*.,

2015; Kroll *et al*., 2014; Miteva-Staleva *et al*., 2017; Tiwari *et al*., 2015) ทำให้เชื้อราทั้งสองไอโซเลทสามารถทนต่อสภาวะความเครียดจากอุณหภูมิสูงได้ ส่งผลให้มีอัตราการรอดสูงขึ้นในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมดังกล่าว (Williams *et al*., 2011)

ผลการคัดแยกเชื้อรา *M. anisopliae* จากดินอินทรีย์ในการศึกษานี้ทำให้ค้นพบเชื้อราไอโซเลท PB-02 และ PB-75 ที่โคนิเดียมีความสามารถทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงได้ถึง 50 องศาเซลเซียสในระยะเวลานานถึง 21 วัน ซึ่งเมื่อเชื้อราต้องเผชิญกับสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงในธรรรมชาติ เชื้อราทั้งสองไอโซเลทมีโอกาสรอดชีวิต ดำรงชีพ เจริญแพร่กระจายได้ดีและมีแนวโน้มที่สามารถก่อโรคกับแมลงได้สูงกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* โดยปกติทั่วไป คุณสมบัติดังกล่าวนี้เป็นความจำเพาะที่สำคัญมากที่ช่วยให้การเก็บรักษาเชื้อราและผลิตภัณฑ์สามารถทำได้ในสภาพอุณหภูมิปกติทั่วไป และการพัฒนาต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์ในนาข้าวหรือพื้นที่อื่น ๆ ได้ ซึ่งกำลังอยู่ในขั้นตอนของการดำเนินการวิจัยต่อเนื่องของคณะผู้วิจัย โดยมีเป้าหมายสู่การพัฒนาเป็นสูตรชีวภัณฑ์ที่สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพในที่สุด

สรุป

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อโคนิเดียของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 16 ไอโซเลท ซึ่งมีประสิทธิภาพในการก่อโรคและทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายในอัตราร้อยละ 100 ภายในเวลา 6 วัน และมีค่าความรุนแรงในส่วนของระยะเวลาที่ทำให้แมลงตายร้อยละ 50 (LT_{50}) ที่ 2.9-4.2 วัน ในระดับห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยไอโซเลท PB-01, PB-02, PB-10, PB-19, PB-28, PB-47, PB-51, PB-71, PB-75, PB-76, PB-95, PB-101, PB-114, PB-117, PB-123 และ PB-125 เพื่อคัดเลือกไอโซเลทเชื้อราที่มีศักยภาพในการรอดชีวิตที่สภาพอุณภูมิสูงได้ดีที่สุดซึ่งมีแนวโน้มในการใช้ประโยชน์สำหรับควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพแปลงนาข้าวได้ดี โดยทำการเก็บรักษาโคนิเดียเชื้อราในดินที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7-21 วัน และทำการศึกษาการรอดชีวิตของโคนิเดียจากการเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า โคนิเดียของไอโซเลทเชื้อราส่วนใหญ่สามารถรอดและเจริญขึ้นเป็นโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบได้ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกระดับของอุณหภูมิ และระยะเวลาการเก็บรักษา โดยโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อระดับอุณหภูมิในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น และระยะเวลาในการเก็บรักษายาวนานขึ้น อย่างไรก็ตาม เชื้อรา *M. anisopliae* เพียงสองไอโซเลท คือ PB-02 และ PB-75 เท่านั้นที่สามารถคงความมีชีวิตได้ดีที่สุดที่ 3.8×10^4 and 3.9×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ภายใต้สภาพการเก็บรักษาในดินที่มีอุณหภูมิสูง 50 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน และผ่านการคัดเลือกเพื่อศึกษาคุณสมบัติและศักยภาพอื่น ๆ เพิ่มเติมรวมถึงการพัฒนาต่อยอดเป็นชีวภัณฑ์สำหรับใช้ควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพแปลงนาข้าวซึ่งมีสภาพอุณหภูมิสูงต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนล่าง มหาวิทยาลัยนเรศวร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม และศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลกที่ให้ความอนุเคราะห์ เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์การวิจัย และแมลงทดสอบ ทำให้การดำเนินการวิจัยเป็นไปอย่างเรียบร้อย

เอกสารอ้างอิง

Bai, Y., S. Wang, H. Zhong, Q. Yang, F. Zhang, Z. Zhuang, J. Yuan, X. Nie and S. Wang. 2015. Integrative analyses reveal transcriptome-proteome correlation in biological pathways and secondary

metabolism clusters in *A. flavus* in response to temperature. Scientific reports 5: 14582, https://doi.org/10.1038/srep28154.

Boontud, M. 2019. Potential of entomopathogenic fungi isolated from soils in Uttaradit Province for controlling diamondback moth larva. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 80 p. (in Thai)

Brunner-Mendoza, C., M.R. Reyes-Montes, S. Moonjely, M.J. Bidochka and C. Toriello. 2019. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. Biocontrol Science and Technology 29(1): 83-102.

Bugeme, D.M., N.K. Maniania, M. Knapp and H.I. Boga. 2008. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*. Experimental and Applied Acarology 46: 275-285.

Bunsak, A., W. Homhaul, W. Pongprasert, K. Ruangrit and S. Intanon. 2023. Occurrence of entomopathogenic fungi from natural ecosystems in Phetchabun, Thailand and their virulence against brown planthopper. Current Applied Science and Technology 23(4): 1-15.

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

Climate Center. 2023. Climate change in Thailand. (Online). Available: http://climate.tmd.go.th/content/category/11 (November 8, 2023). (in Thai)

Couceiro, J.C., M.B. Fatoretto, C.G.B. Demétrio, N.V. Meyling and I. Delalibera. 2021. UV-B radiation tolerance and temperature-dependent activity within the entomopathogenic fungal genus *Metarhizium* in Brazil. Frontiers in Fungal Biology 2: e645737.

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

Ekesi, S., N.K. Maniania and S.A. Lux. 2003. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. Journal of Invertebrate Pathology 83(2): 157-167.

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

Ghayedi, S. and M. Abdollahi. 2013. Biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae), isolated from suppressive soils of the Boyer-Ahmad region, Iran, against J2s of *Heterodera avenae*. Journal of Plant Protection Research 53(2): 165-171.

Horaczek, A. and H. Viernstein. 2004. *Beauveria brongniartii* subjected to spray-drying in a composite carrier matrix system. Journal of Microencapsulation 21(3): 317-330.

Ihara, F., M. Toyama and T. Sato. 2003. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* to

the chestnut weevil larvae under laboratory and field conditions. Applied Entomology and Zoology 38(4): 461-465.

Iskandarov, U.S., A.G. Guzalova and K.D. Davranov. 2006. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Applied Biochemistry and Microbiology 42: 72-76.

Keppanan, R., S. Sivaperumal, L.C. Ramos Aguila, M. Hussain, B.S. Bamisile, C.K. Dash and L. Wang. 2018. Isolation and characterization of *Metarhizium anisopliae* TK29 and its mycoinsecticide effects against subterranean termite *Coptotermes formosanus*. Microbial Pathogenesis 123: 52-59.

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

Kroll, K., V. Pähtz and O. Kniemeyer. 2014. Elucidating the fungal stress response by proteomics. Journal of proteomics 97; 151-163.

Lord, J.C. 2005. From Metchnikov to Monsanto and beyond: The path of microbial control. Journal of Invertebrate Pathology 89(1): 19-29.

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

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

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

Miteva-Staleva, J.G., E.T. Krumova, S.V. Vassilev and M.B. Angelova. 2017. Cold-stress response during the stationary-growth phase of Antarctic and temperate-climate *Penicillium* strains. Microbiology 163(7); 1042-1051.

Nussenbaum, A.L., M.A. Lewylle and R.E. Lecuona. 2013. Germination, radial growth and virulence to boll weevil of entomopathogenic fungi at different temperatures. World Applied Sciences Journal 25(8): 1134-1140.

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

Patirupanusara, P., T. Patirupanusara and P. Pattawatang. 1999. Pathogenicity of entomopathogenic fungi on brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) and green leafhopper (*Nephotettix virescens*). Phisanulok Rice Research Center, Phitsanulok. (in Thai)

Raja Namasivayam, S.K., R. Aarthi, and P. Anbazhahan. 2015. Studies on factors

influencing the viability of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* in soil adapting culture dependent method. Journal of Biopesticides, 8(1): 23-27.

Rangel, D.E.N., G.U.L. Braga, A.J. Anderson and D.W. Roberts. 2005. Influence of growth environment on tolerance to UV-B radiation, germination speed, and morphology of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* conidia. Journal of Invertebrate Pathology 90(1): 55-58.

Roy, H.E., D.C. Steinkraus, J.E. Eilenberg, A.K. Hajek and J. Pell. 2006. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. Annual Review of Entomology 51: 331-357.

Sánchez-Peña S.R., J.S. Lara and R.F. Medina. 2011. Occurrence of entomopathogenic fungi from agricultural and natural ecosystems in Saltillo, México, and their virulence towards thrips and whiteflies. Journal of Insect Science 11(1): 1, doi:10.1673/031.011.0101.

Suasa-ard, W., P. Sommartya, P. Buchatian, A. Puntongcum and R. Chiangsin. 2004. Effect of *Metarhizium anisopliae* on infection of sugarcane stems borer, *Dorysthenes buqueti* Guerin (Coleoptera: Cerambycidae) in laboratory. Kasetsart Journal (Natural Science) 51(46): 115 - 160. (in Thai)

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

Thai Meteorological Department. 2023. Daily agromet forecast. (Online). Available: https://www.tmd.go.th/en/forecast/dailyweatheragro (November 8, 2023). (in Thai)

Thaochan, N. and A. Chinajariyawong. 2008. Control potential of entomophathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, in fruit fly Pest (Diptera: Tephritidae) Agricultural Science Journal, 39(3) (Suppl.): 21-25. (in Thai)

Tiwari, S., R. Thakur and J. Shankar. 2015. Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi. Biotechnology research international: 132635, doi:10.1155/2015/132635.

Vidal, C., J. Fargues and L. A. Lacey. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. Journal of Invertebrate Pathology 70(1): 18-26.

Williams, T.J., F.M. Lauro, H. Ertan, D.W. Burg, A. Poljak, M.J. Raftery and R. Cavicchioli. 2011. Defining the response of a microorganism to temperatures that span its complete growth temperature range (-2°C to 28°C) using multiplex quantitative proteomics. Environmental microbiology 13(8): 2186-2203.

Zimmermann, G. 1992. *Metarhizium anisopliae* an entomopathogenic fungus, Pflanzenschutz Nachrichten Bayer 45(63): 113-128.