



Research Article

การประยุกต์ใช้เชื้อรา *Beauveria bassiana* (KMB1) ในการฉีดพ่นเพื่อควบคุมแมลง
ค่อมทอง *Hypomeces squamosus* (Fabricius) ในต้นทุเรียนระยะแตกใบอ่อน
Application of *Beauveria bassiana* (KMB1) to Spraying for Controlling of
Hypomeces squamosus (Fabricius) on Stage Young Leaves Period in Durian Trees

สุกฤตา อнуตรากุลชัย คมสันต์ สุป้อง และ ธิติ ทองคำงาม *

Sukritta Anutrakunchai, Khomsan Supong and Titi Thongkamngam *

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมและการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี
อำเภอเขาคิชฌกูฏ จังหวัดจันทบุรี 22210

Department of Plant production and Landscape, Faculty of Agro Industrial Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-ok
Chanthaburi Campus, Khao Khitchakut, Chanthaburi 22210, Thailand.

ABSTRACT

Article history:

Received: 2023-09-21

Revised: 2024-03-27

Accepted: 2024-06-04

Keywords:

Beauveria bassiana (KMB1);

Hypomeces squamosus;

golden weevils;

durian young leaf period

Expansion of golden weevils *Hypomeces squamosus* (Fabricius) in durian orchards during the young leaf stage causes significant damage to durian growers. It has been reported that the weevils chew the young leaves excluding the middle vein. Therefore, effective methods to prevent and control the weevils are necessary to reduce the problem of their expansion in durian plantations. The objective of this research is to apply the fungus *Beauveria bassiana* through spraying to control the weevils in durian trees. The *H. squamosus* (Fabricius) samples were collected, and the insect fungi were identified based on molecular biology. It was found that all fungal isolates were *B. bassiana*. Laboratory control of the weevils was then conducted at concentrations of 10^4 , 10^6 , 10^8 , and 10^{10} spores per milliliter. The results showed that all concentrations could inhibit the weevil growth. Moreover, concentrations of 10^8 and 10^{10} spores per milliliter completely inhibited the growth of the weevils. Subsequently, a field experiment conducted during the young shoot growth period revealed that spraying *B. bassiana* at a concentration of 10^{10} spores per milliliter on young leaves of durian trees reduced the damage caused by the weevils by 64%. In summary, the application of *B. bassiana* fungus through spraying can be utilized as an alternative method for preventing and controlling the expansion of the golden weevils during the young leaf period of durian trees.

* Corresponding author.

E-mail address: Titi_th@rmutto.ac.th

Cite this article as:

Anutrakunchai, S., Supong, K. and Thongkamngam, T. 2025. Application of *Beauveria bassiana* (KMB1) to Spraying for Controlling of *Hypomeces squamosus* (Fabricius) on Stage Young Leaves Period in Durian Trees. **Recent Science and Technology** 17(2): 260494.

บทคัดย่อ

ปัญหาการแพร่ระบาดของแมลงค่อมทอง หรือ *Hypomeces squamosus* (Fabricius) ในสวนทุเรียนในระยะแตกใบอ่อนสร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้ปลูกทุเรียนอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากแมลงค่อมทองเข้าไปทำลายโดยการกัดกินใบอ่อนจนเหลือแต่เพียงเส้นกลางใบจึงจำเป็นที่จะต้องมีการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่สามารถช่วยลดปัญหาการแพร่ระบาดของแมลงค่อมทองในแปลงปลูกทุเรียน โดยงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้เชื้อรา *Beauveria bassiana* (KMB1) ในการฉีดพ่นเพื่อควบคุมแมลงค่อมทอง *Hypomeces squamosus* (Fabricius) ในต้นทุเรียน เริ่มจากการเก็บแมลงค่อมทองมาคัดแยกเชื้อรากินแมลงและจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราโดยชีวโมเลกุล พบว่าเชื้อราที่แยกมาจากแมลงทุกไอโซเลท คือ *B. bassiana* (KMB1) 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงค่อมทองในห้องปฏิบัติการ พบว่าทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น (10^4 10^6 10^8 และ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลงค่อมทองได้ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 10^8 และ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนในการทดลองในแปลงปลูกทุเรียนระยะแตกใบอ่อน พบว่าการฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของแมลงค่อมทองกับใบทุเรียนอ่อนได้ถึง 64 เปอร์เซ็นต์ โดยสรุปจากผลการทดลองการฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) นำจะนำมาใช้เป็นทางเลือกในการป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของแมลงค่อมทองในระยะแตกใบอ่อนของทุเรียนได้

คำสำคัญ: เชื้อราเบียวเวอร์เรีย, *Hypomeces squamosus*, แมลงค่อมทอง, ต้นทุเรียนระยะแตกใบอ่อนของทุเรียน

1. บทนำ

ในปัจจุบันเกษตรกรประสบปัญหาการแพร่ระบาดของแมลงศัตรูพืชที่เข้ามาทำลายผลผลิตทุเรียนทุกระยะตั้งแต่ช่วงแตกใบอ่อน โดยมีแมลงศัตรูพืชหลายหลายชนิด เช่น เพลี้ยไก่แจ้ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน (Zaki, 1998; Burckhardt *et al.*, 2014) ที่เข้ามาดูดกินน้ำเลี้ยงที่ส่วนของใบอ่อนทำให้เกิดอาการบิดเบี้ยวเล็กผิดปกติ แต่ก็ยังไม่เป็นอันตรายมากเท่ากับการเข้าทำลายของแมลงกลุ่มจำพวกด้วงที่เข้ากัดกินใบ เช่น ด้วงกุหลาบ แมลงกินหนูน และแมลงค่อมทอง เป็นต้น (Erlar and Ates, 2015) ซึ่งแมลงค่อมทองเป็นแมลงกลุ่มด้วงที่พบมากในช่วงทุเรียนแตกใบอ่อนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hypomeces squamosus* (Fabricius) สามารถเข้าทำลายได้ตลอดทั้งปี เริ่มจากตัวเต็มวัยเข้าไปกัดกินใบอ่อนและยอดอ่อน โดยใช้ปากกัดทะลุใบ เริ่มจากขอบใบด้านนอกก่อนแล้วค่อยทะลุเข้าไปสู่ภายในของใบ ทำให้ใบเกิดเป็นรอย เว้า ๆ แหว่ง ๆ ถ้าหากเกิดการแพร่ระบาดรุนแรงหรือมีปริมาณจำนวนตัวมากก็จะกัดกินใบเหลือแต่เพียงส่วนของก้านใบ ทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต แคระแกรน เนื่องจากใบถูกทำลายทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ แมลงค่อมทองตัวเต็มวัย ชอบอยู่อาศัยรวมกันเป็นกลุ่ม หรืออยู่กันเป็นคู่ ๆ อยู่อาศัยตามใต้ใบ เคลื่อนที่ค่อนข้างเชื่องช้าไม่ว่องไว แต่ถ้าหากถูกรบกวนเพียงเล็กน้อยก็จะทิ้งตัวลงพื้น และขุดดินหนีจากภัยอันตราย หรือถ้าถูกคุกคามอย่างรุนแรงก็จะหยุดเคลื่อนไหวและหุบส่วนขาและหนวด เข้าเก็บภายในส่วนลำตัว นอกจากนี้ยังพบว่าแมลงค่อมทองยังเข้าทำลายพืชอื่นได้หลายชนิด เช่น มะม่วง ส้ม ลำไย ลิ้นจี่ เป็นต้น (Zafar *et al.*, 2016; Ullah *et al.*, 2018; Boston *et al.*, 2020)

ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำให้เกษตรกรผู้ปลูกทุเรียนตระหนักถึงวิธีการแก้ปัญหาการแพร่ระบาดของแมลงค่อมทอง โดยการใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลง เพื่อช่วยควบคุมประชากรและลดปริมาณของแมลงให้อยู่ในวงที่จำกัด อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีฉีดพ่นไปให้สัมผัสกับตัวแมลงค่อมทองนั้นก็ยังคงมีข้อจำกัดเนื่องจากมีไขปกคลุมลำตัว นอกจากนั้นผนังลำตัวมีลักษณะแข็งคล้ายโล (เกาะกำบัง) จึงทำให้สารเคมีเข้าไปไม่สัมผัสถึงตัวของแมลงอีกทั้งแมลงค่อมทองนั้นหากได้รับการกระทบกระเทือนเพียงเล็กน้อยก็จะมีการทิ้งตัวลงพื้นดินจึงอาจจะทำให้ไม่สัมผัสกับสารเคมีได้เต็มที่ ดังนั้นการฉีดพ่นสารเคมีฆ่าแมลงจึงไม่ค่อยได้ผลในการควบคุม (Ambethger, 2009) จากข้อจำกัดดังกล่าวถ้าหากมีการนำจุลินทรีย์กลุ่มเชื้อรากินแมลง (Entomopathogenic fungi) ได้แก่ เชื้อรา *Beauveria bassiana* *Metarhizium anisopliae* และ *Paecilomyces lilacinus* (Butt *et al.*, 1994; Zimmermann, 2007; Mahdneshtin *et al.*, 2011; Zapata *et al.*, 2021) มาประยุกต์ใช้และฉีดพ่นอาจจะช่วยลดปริมาณและสามารถช่วยควบคุมการแพร่ระบาดของแมลงค่อมทองได้ สำหรับเชื้อรากินแมลงนั้นมีคุณสมบัติในการปรับตัวและติดไปกับอวัยวะต่าง ๆ ของแมลงได้ นอกไปจากนี้ส่วนขยายพันธุ์สามารถงอกส่วนขยายพันธุ์และแพร่กระจายในตัวแมลงได้อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นทำให้แมลงหยุดกินอาหารและตายในที่สุด ยิ่งไปกว่านั้นสามารถติดไปกับแมลงตัวอื่น ๆ ได้เช่นกัน (Anutrakunchai *et al.*, 2019; Wang and Zheng, 2012; Oo *et al.*, 2017; Dannon *et al.*, 2020)

ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (KMB1) ในการฉีดพ่นเพื่อควบคุมแมลงค่อมทอง *Hypomeces*

squamosus (Fabricius) ในต้นทุเรียนระยะแตกใบอ่อนของต้นทุเรียน ตลอดจนสามารถใช้เป็นทางเลือกให้กับเกษตรกรผู้ปลูกทุเรียนทุกภาคของประเทศไทยได้นำไปใช้ต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อรากินแมลง

เก็บตัวอย่างแมลงค่อมทองที่พบในแปลงปลูกทุเรียนระยะแตกใบอ่อนจากแปลงเกษตรกรอำเภอเขาชะเมาตามลักษณะ (Figure 1 a-e) โดยสังเกตลักษณะใบทุเรียนอ่อนแบบเพสลาด (กิ่งอ่อนกิ่งแก่) มักเป็นส่วนที่พบแมลงค่อมทองกัดกิน โดยจะจับแมลงโดยใช้คีมจับแมลง (forceps) ใส่ลงกล่องพลาสติกใสแบบมีฝาปิด (เจาะบริเวณส่วนด้านบนของฝากล่องและปิดด้วยตะแกรงสแตนเลสเพื่อป้องกันไม่ให้แมลงหลบหนีออกมาภายนอกกล่อง) หลังจากนั้นจะตัดยอดอ่อนและใบอ่อนของทุเรียนนำมาใส่ลงในกล่องเพื่อให้แมลงค่อมทองได้กินเป็นอาหาร เมื่อเวลาผ่านไปรอสังเกตพฤติกรรมของแมลงจากการกินอาหาร การเคลื่อนไหว ถ้าหากแมลงค่อมทองตัวใดมีการหยุดกินอาหารจะจับแยกออกจากตัวอื่น ๆ มาเก็บใส่ไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อและให้ความชื้นโดยการใส่สาลีชุบน้ำหนึ่งมาเชื้อไว้ด้านใดด้านหนึ่งให้ห่างจากตัวแมลงเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราชนิดอื่น ๆ เมื่อระยะเวลาผ่านไปถ้าหากพบการเจริญของเส้นใยเชื้อราสีขาวขึ้นตามส่วนข้อต่อของแมลง เช่น ขา ลำตัว และ ปีก เป็นต้น ให้นำไปแยกเชื้อด้วยวิธี Single spore และ Tissue transplanting technique

(Lee *et al.*, 2019) โดยใช้เข็มเย็บสะกิดสปอร์หรือเส้นใยของเชื้อรามาเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Water agar (WA) เป็นเวลา 3 วัน

หลังจากนั้นย้ายมาเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน นำไปจัดจำแนกโดยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อตามวิธีการมาตรฐานของ Samson *et al.* (1988) เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงต่อไป

2.2 การตรวจสอบและจัดจำแนกเชื้อ *Beauveria* sp. ในระดับชีวโมเลกุล

เลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MEA) ประมาณ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Prep man ultra (Applied Biosystems) โดยบริษัท Macrogen กรุงโซล ประเทศเกาหลี โดยชุดเส้นใยของเชื้อใส่ลงใน Eppendorf tube ขนาด 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นบดเส้นใยของเชื้อแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส บั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที (rpm) ประมาณ 10 นาที เก็บสารแขวนลอยดีเอ็นเอที่ได้ไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปตรวจคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอโดยเครื่องวัดคุณภาพดีเอ็นเอ Nano Drop spectrophotometer แล้วนำไป เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ



Figure 1 Characteristics of damage leaf caused by *Hypomeces squamosus* (Fabricius) on young durian leaves. Tender durian leaves are commonly encountered as a favorite food source for the golden weevil. (a-b) Adult golden weevils coexisted on the leaf. (c) The weevils first chew at the edges of younger leaves, then progress toward the middle of the leaves(d), and severe damage to the leaf (e)

โดยวิธีการ PCR (polymerase chain reaction) ในส่วนของ rDNA (ITS5 และ ITS4) คือ primer ITS5 (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) - ITS4 (5-CCTCCGCTTATTGATATGC-3) (White *et al.*, 1999) โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) (Linnakoski *et al.*, 2010) ด้วยโปรแกรม MEGA 11.0 กำหนดค่า bootstrap analysis (Tamura *et al.*, 2021) ให้มีค่าเท่ากับ 1,000 พร้อมรายงานผลเป็น Phylogenetic tree

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (KMB1) ในการควบคุมแมลงค่อมทองในสภาพห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ในการควบคุมแมลงค่อมทอง โดยปล่อยแมลงค่อมทองลงไปจำนวน 5 ตัวต่อจานเพาะเชื้อ ดัดแปลงจากวิธีการของ Johnson *et al.* (2020) ขนาด 9 เซนติเมตร การฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ใช้ขวดสเปรย์แก้ว ขนาดบรรจุ 2 มิลลิลิตร ก่อนฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ให้เปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้กว้างพอประมาณที่ละอองของเชื้อราที่สเปรย์สามารถฟุ้งกระจายไปโดนบริเวณส่วนกึ่งกลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีแมลงค่อมทองอยู่ โดยเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ ความเข้มข้น 4 ระดับ ได้แก่ 10^4 , 10^6 , 10^8 และ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized design (CRD) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

- กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม (ฉีดพ่นน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ)
- กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) (10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)
- กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) (10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)
- กรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) (10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)
- กรรมวิธีที่ 5 ฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) (10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร)

บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนแมลงค่อมทองที่ตายในแต่ละกรรมวิธี หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมทอง ประเมินจากจำนวนแมลงค่อมทองหลังจากฉีดเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ว่ามีจำนวนที่ตายกี่ตัวเพื่อนำมาใช้คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมทอง และนำข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี

Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นสังเกตการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) บนตัวของแมลงค่อมทองที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์พร้อมทั้งถ่ายภาพ

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (KMB1) ในการควบคุมแมลงค่อมทองในแปลงปลูกทุเรียน

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ในการควบคุมแมลงค่อมทองในแปลงปลูกทุเรียน ดัดแปลงจากวิธีการของ Johnson *et al.* (2020) ทดสอบกับต้นทุเรียนระยะแตกใบอ่อน (ช่วงใบเพสลาด) โดยคัดเลือกต้นทุเรียนต้นเล็กที่มีอายุ 2 ปี (ขนาดทรงพุ่มเท่าๆกัน) การฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ใช้กระบอกอัดแรงดันอากาศ บรรจุ 2 ลิตร โดยกำหนดระดับความเข้มข้นที่ใช้พ่น คือ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร (กรรมวิธีที่ให้ผลเปอร์เซ็นต์การตายดีที่สุดและแมลงค่อมทองตายเร็วที่สุด) โดยการฉีดพ่นจะเลือกช่วงเวลาเพื่อเป็นโจทย์วิจัยในครั้งนี้ วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี ๆ ละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

- กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม (ฉีดพ่นน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ)
- กรรมวิธีที่ 2 ฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) (10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ช่วงเช้า 6.00-9.00 น.
- กรรมวิธีที่ 3 ฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) (10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ช่วงกลางวัน 12.00-14.00 น.
- กรรมวิธีที่ 4 ฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) (10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ช่วงเย็น 16.00-18.00 น.

บันทึกผลการทดลองโดยนับจำนวนแมลงค่อมทองที่เข้าทำลายใบทุเรียนอ่อนในแต่ละกรรมวิธี เพื่อใช้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายใบของแมลงค่อมทอง ประเมินจากการเข้าทำลายยอดอ่อนของต้นทุเรียนจำนวน 10 ยอด โดยกำหนดหลักเกณฑ์ไว้ 3 ระดับ คือ ระดับ 1 เข้าทำลาย 1-3 ยอด (1-35 เปอร์เซ็นต์) ระดับ 2 เข้าทำลาย 4-6 ยอด (36-70 เปอร์เซ็นต์) ระดับที่ 3 เข้าทำลาย 7-10 ยอด (71-100 เปอร์เซ็นต์) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดลงของการเข้าทำลายใบทุเรียน ประเมินได้จากค่าการเข้าทำลายใบในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วย *B. bassiana* (KMB1) ความเข้มข้นที่แตกต่างกันหักลบกับกรรมวิธีควบคุม จากนั้นนำข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และถ่ายภาพประกอบ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การเก็บตัวอย่างและการจำแนกเชื้อรากินแมลง

จากการเก็บตัวอย่างแมลงค่อมทองที่เข้าทำลายทุเรียนระยะแตกใบอ่อนจากพื้นที่แปลงเกษตรอำเภอเขาคิชฌกูฏ จำนวน 3 สวน สามารถเก็บแมลงค่อมทองมาเลี้ยงและสังเกตพฤติกรรมของการกินและการเคลื่อนไหว พบแมลงค่อมทองมีเส้นใยสีขาวขึ้นปกคลุมบริเวณลำตัว โดยเริ่มจากส่วนของข้อต่อ หนวด แขน และขา บริเวณส่วนอกยาวไปถึงปลายท้อง (Figure 2 a-b) หลังจากนำแมลงค่อมทองมาแยกเชื้อราที่ขึ้นปกคลุมลำตัว พบว่าลักษณะเส้นใยของเชื้อรามีลักษณะเป็นผลสีขาวเจริญอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลา รวม 14 วัน หลังจากนั้นนำไปศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบส่วนขยายพันธุ์โคนิเดีย (Conidia) มีลักษณะ

กลมสีขาวแยกกันอยู่ส่วนบนของก้านชู (Phialides) (Figure 3 a-b) จากการตรวจสอบระดับชีวโมเลกุล และถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ DNA sequencing และ Blast โดยใช้ primer ในส่วนของ rDNA (ITS5 และ ITS4) คือ primer ITS5 (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3)-ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) เปรียบเทียบกับข้อมูลพื้นฐานบน Gene Bank ใน NCBI เบื้องต้นได้เชื้อราในกลุ่ม *Beauveria* ด้วยวิธี maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม MEGA 11.0 กำหนดค่า bootstrap analysis ให้มีค่าเท่ากับ 1,000 และเมื่อนำไปทำ Phylogenetic tree เปรียบเทียบกับเชื้อ *Beauveria bassiana* สายพันธุ์อื่นๆ ก็พบว่ามีความใกล้เคียงกัน สามารถจัดจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อรา *Beauveria bassiana* (KMB1) 100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4)

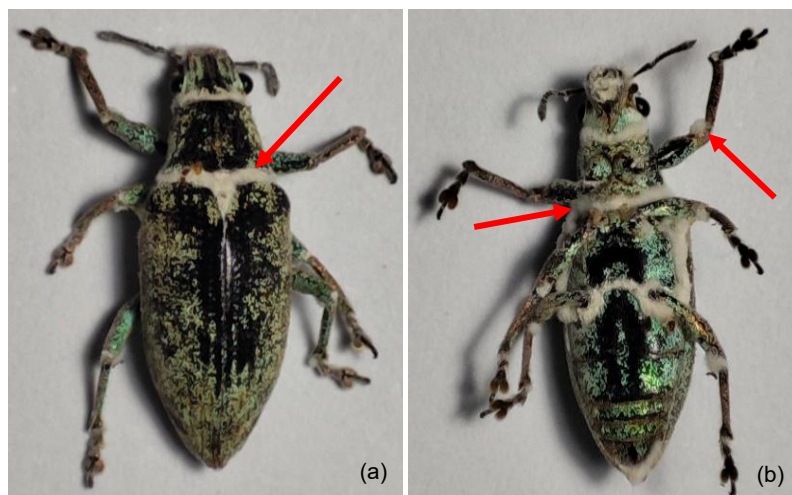


Figure 2 Hyphae of *Beauveria bassiana* that grew and covered on *Hypomeces squamosus* (Fabricius) body: the top portion from head to the base of the wings (a), and lower portion from mouth to the abdomen and around the joints of the arms, legs and chest (b).

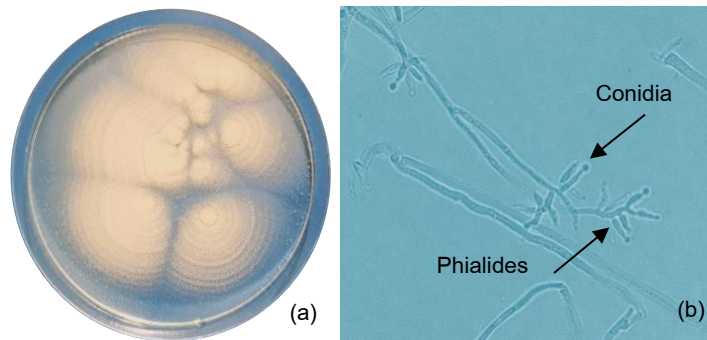


Figure 3 Morphological characteristics of *Beauveria bassiana* (KMB1): colony on PDA after 14 days of incubation period (a), and conidia and phialides (b).

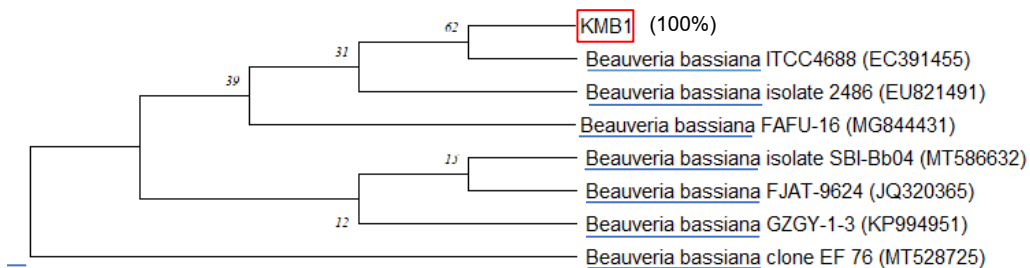


Figure 4 Phylogenetic tree of *Beauveria bassiana* (KMB1) built using maximum likelihood (ML) with ITS sequence data and a bootstrap test (1000 replications) through MEGA 11.0.

3.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (KMB1) ในการควบคุมแมลงค่อมทองในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ในการควบคุมแมลงค่อมทองในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าการใช้เชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น (10^4 , 10^6 , 10^8 และ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร) สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของแมลงค่อมทองได้ตั้งแต่ช่วงแรกของการทดลอง (3-5 วันหลังการฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana*) พบเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงค่อมทองอยู่ระหว่าง 24-92 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุด และแมลงค่อมทองตายเร็วที่สุด รองลงมาคือ ระดับความเข้มข้น 10^8 , 10^6 และ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1; Figure 5) หลังจากนั้นเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงวันที่ 7 หลังการฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) พบว่าระดับ

ความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร แมลงค่อมทองตายทั้งหมดและเริ่มสังเกตเห็นเป็นเส้นใยสีขาวเจริญปกคลุมลำตัว (Figure 5) และในระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ก็มีแนวโน้มให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับในช่วงแรกของการทดลอง และเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (14 วันหลังการฉีดพ่นเชื้อ) พบว่าในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยระดับความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แมลงค่อมทองตายทั้งหมดและเริ่มมีเส้นใยเจริญปกคลุมลำตัวแมลงค่อมทอง ในขณะที่กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วย 10^4 และ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าแมลงที่เหลื้อยังตายไม่หมดแต่หยุดกินอาหารและมีการเคลื่อนไหวช้าลง โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 76 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1; Figure 5) สอดคล้องกับการวิจัยของ Mascarín and Jaronski (2016) ซึ่งพบว่าเชื้อรา *B. bassiana* ที่ความเข้มข้น 10^3 - 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลงกินหนูนและด้วงวงได้

Table 1 Percentage of mortality of adult of *Hypomeces squamosus* (Fabricius) infected by *Beauveria bassiana* (KMB1) in vitro

Treatment	Percentage of Mortality (%) ¹					
	3 DAI ²	5 DAI	7 DAI	10 DAI	14 DAI	C.V.
Tr 1 Spray of water (Healthy control)	0d ³	0d	0d	0c	0c	-
Tr 2 Spray of <i>B. bassiana</i> (KMB1) (10 ⁴ spore/ml)	24Cc	32Bc	36Bc	68Bb	76ABb	17.6
Tr 3 Spray of <i>B. bassiana</i> (KMB1) (10 ⁶ spore/ml)	36Bbc	56Bb	76Bb	80Bb	88Aa	15
Tr 4 Spray of <i>B. bassiana</i> (KMB1) (10 ⁸ spore/ml)	68Bb	76Bb	88Aa	92Aa	100Aa	4.1
Tr 5 Spray of <i>B. bassiana</i> (KMB1) (10 ¹⁰ spore/ml)	80Ba	92Aa	100Aa	100Aa	100Aa	3.7
C.V. (%)	23.2	19.7	11.2	4.7	3.4	-
F-value	*	*	*	*	*	-

¹ Percent of Mortality = (total number of insects – number of insect dead) x 100² DAI = Day after inoculation³ Values followed by lowercase letters in the same row and uppercase letters in the same column are not significantly different at P = 0.05, according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

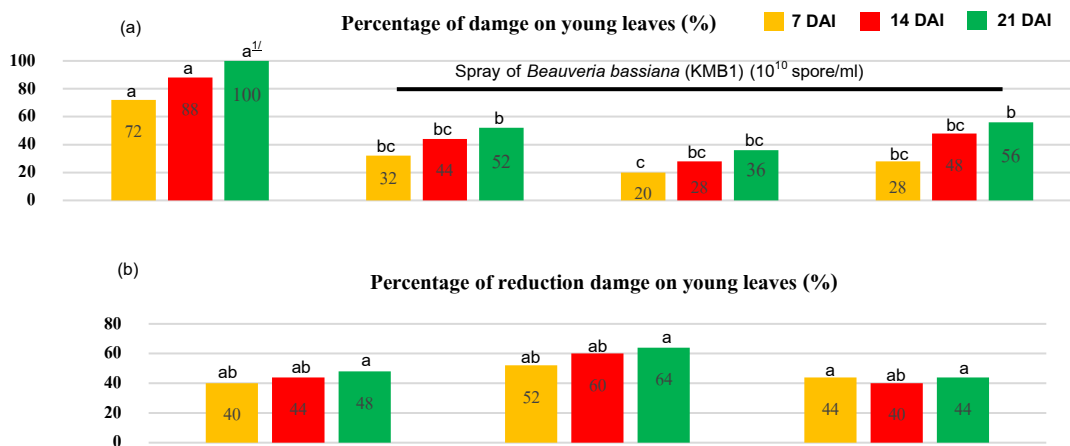
Tr1 Spray of water (Healthy control)

Tr 2 Spray of *B. bassiana* (KMB1) (10⁴ spore/ml)Tr 3 Spray of *B. bassiana* (KMB1) (10⁶ spore/ml)Tr 4 Spray of *B. bassiana* (KMB1) (10⁸ spore/ml)Tr 5 Spray of *B. bassiana* (KMB1) (10¹⁰ spore/ml)**Figure 5** Adults of *Hypomeces squamosus* (Fabricius) were sprayed with a spore suspension of *Beauveria bassiana* (KMB1) at four different concentrations (10⁴, 10⁶, 10⁸ and 10¹⁰ spore/ml) following a 14-day inoculation period.

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (KMB1) ในการควบคุมแมลงค่อมทองในแปลงปลูกทุเรียน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (KMB1) ในการควบคุมแมลงค่อมทองในแปลงปลูกทุเรียนระยะแตกใบอ่อน พบว่าการใช้เชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ฉีดพ่นในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน 3 ช่วงเวลา คือ ช่วงเช้า (6.00-9.00 น.) กลางวัน (12.00-15.00 น.) และเย็น (17.00-19.00 น.) จากผลการทดลองในช่วงแรก 7 วันหลังการฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* (KMB1) ยังพบการเข้าทำลายของแมลงค่อมทองอยู่ระหว่าง 20-32 เปอร์เซ็นต์ และช่วงเวลากลางวัน เป็นช่วงเวลาที่พบการเข้าทำลายน้อยที่สุด รองลงมาคือช่วงเย็น (17.00-19.00 น.) และช่วงเวลาที่พบการเข้าทำลายใบอ่อนมากที่สุดคือ ช่วงเช้า (6.00-9.00 น.) เมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่ากับพบเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายสูงที่สุดเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 6) หลังจากนั้นเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง (21 หลังการฉีดพ่นเชื้อรา) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของทุกกรรมวิธีเพิ่มขึ้น โดยจะเห็นเด่นชัดในกรรมวิธีที่ฉีดพ่นน้ำเปล่า ที่เพิ่มขึ้นถึง 100 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือใบอ่อนของทุเรียนถูกแมลงค่อมทองกัดกินเหลือแต่เพียงเส้นกลางใบ (Figure 8) ในขณะที่เดียวกันกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อรา *B. bassiana* ระดับ

ความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ช่วงกลางวัน (12.00-15.00 น.) ก็เป็นช่วงเวลาที่พบการเข้าทำลายของแมลงค่อมทองน้อยที่สุด รองลงมาคือ ช่วงเช้า และช่วงเย็น พบการเข้าทำลาย เท่ากับ 36, 52 และ 56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P = 0.05$ (Figure 6) และเมื่อนำค่าของเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของแมลงค่อมทองมาคิดวิเคราะห์เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การลดลงของการเข้าทำลายหลังฉีดพ่นเชื้อรา *B. bassiana* ก็สามารถสรุปได้ว่า ช่วงระยะเวลามีผลต่อการเข้าทำลายของแมลงค่อมทอง และการใช้เชื้อรา *B. bassiana* สามารถช่วยลดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของแมลงค่อมทองได้อยู่ในช่วง 40-64 เปอร์เซ็นต์ (Figure 7) สอดคล้องกับการทดลองของ White *et al.* (2021) ทดสอบเชื้อรา *B. bassiana* 4×10^{11} สปอร์ต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแมลงวันบ้าน นอกจากนั้นยังทำให้ตัวอ่อนที่พัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัยเจริญไม่สมบูรณ์ เพราะเชื้อรา *B. bassiana* ไปส่งผลต่อกระบวนการฟักเป็นตัวเต็มวัยนอกจากนี้งานทดลองของ Nichanun (2020) ที่ทดสอบเชื้อรา *B. bassiana* ความเข้มข้น 10^7 - 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตรกับเพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก และเพลี้ยจักจั่นสีเขียว สามารถควบคุมได้ 67 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ Lin *et al.* (2017) ทดสอบเชื้อรา *B. bassiana* 10^1 - 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถควบคุมเพลี้ยอ่อน และมวนแดงในข้าวโพดได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



^{1/} Values followed by lowercase letters in the same row and uppercase letters in the same column are not significantly different at $P = 0.05$, according to Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

Figure 6 Percentage of leaf damage (a) and reduction (b) by *Hypomeces squamosus* (Fabricius) after spraying with a spore suspension of *Beauveria bassiana* (KMB1) at different time intervals (morning, afternoon and evening) at 7, 14 and 21 days after the inoculation period.

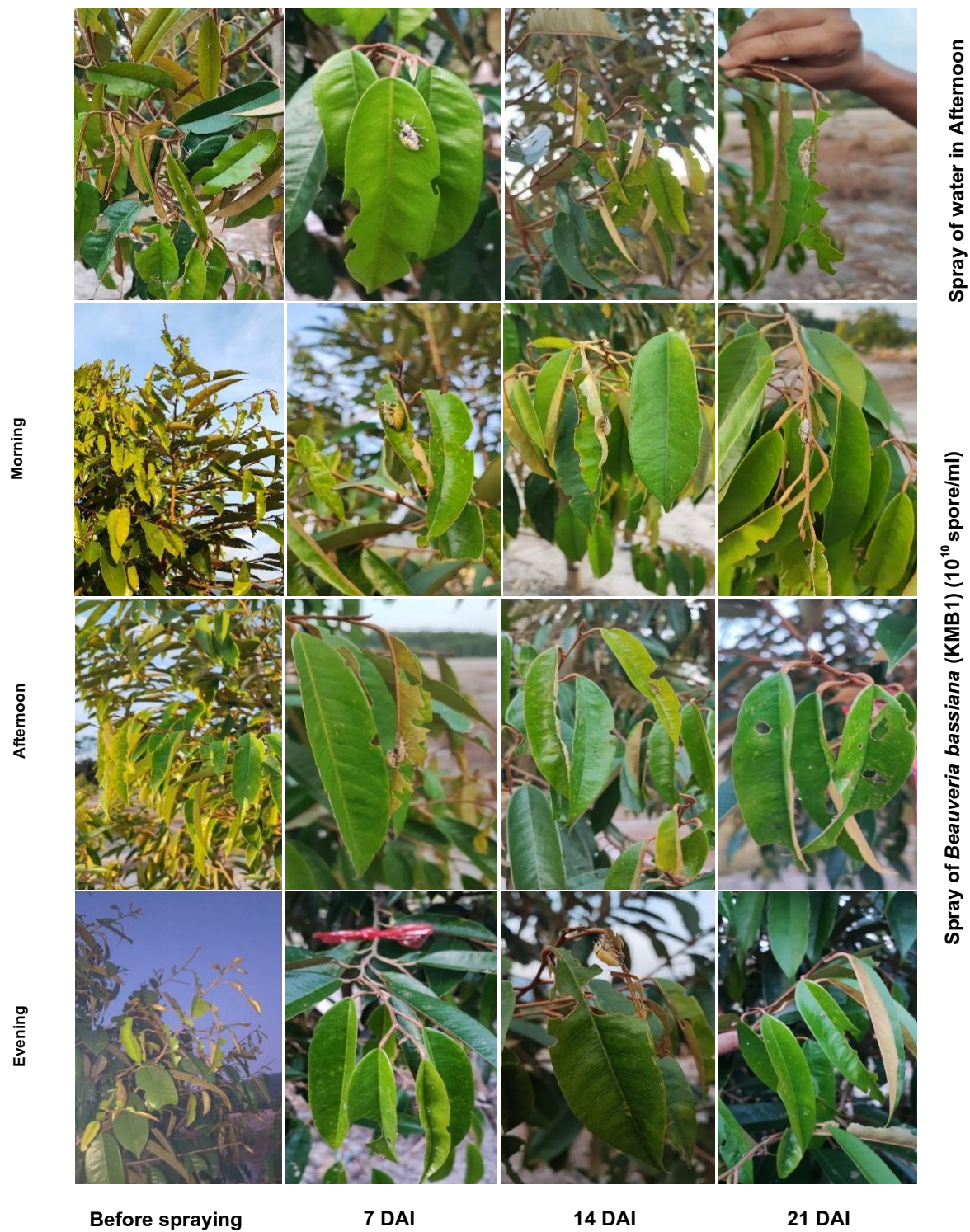


Figure 7 Percentage of leaf damage by *Hypomeces squamosus* (Fabricius) after spraying with *Beauveria bassiana* (KMB1) at different time intervals (morning, afternoon and evening) at 7, 14 and 21 days after inoculation.

4. สรุป

จากการเก็บตัวอย่างแมลงคอมทองศัตรูของทุเรียนในช่วงแตกใบอ่อนและนำมาแยกเชื้อรากินแมลงและจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาและระดับชีวโมเลกุล พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นเมื่อนำมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงคอมทองในห้องปฏิบัติการ พบว่าสารแขวนลอยสปอร์ทั้ง 4 ระดับความเข้มข้น (10^4 , 10^6 , 10^8 และ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลงคอมทองได้ โดยที่ความเข้มข้น 10^8 และ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบการยับยั้งได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบแมลงคอมทองตายทั้งหมดตั้งแต่วันที่ 7 หลังการฉีดพ่น และพบการเจริญของเส้นใยเชื้อราขึ้นปกคลุมลำตัวแมลงคอมทอง ในส่วนของการทดลองในแปลงปลูกทุเรียนระยะแตกใบอ่อน พบว่าช่วงเวลาที่ฉีดพ่นมีผลต่อการเข้าทำลายของแมลงคอมทองและการฉีดพ่นเชื้อรา *Beauveria bassiana* (KMB1) ความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของแมลงคอมทองกับใบทุเรียนอ่อนได้ถึง 64 เปอร์เซ็นต์ โดยสรุปจากผลการทดลองการฉีดพ่นเชื้อรา *Beauveria bassiana* (KMB1) น่าจะนำมาใช้เป็นแนวทางและทางเลือกให้กับเกษตรกรผู้สนใจในการฉีดพ่นและป้องกันกำจัดแมลงคอมทองในช่วงทุเรียนแตกใบอ่อนได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา ของสาขาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี ที่สนับสนุนสถานที่ทำงานวิจัยในครั้งนี้

6. เอกสารอ้างอิง

Ambethger, V. 2009. Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management. **Journal of Biopesticide** 2: 177-193.

Anutrakunchai, S., Tongla, T. and Thongkamngam, T. 2019. A Survey of Shot-Hole Borer (*Xyleborus fornicates* Eichoff) Scolytidae: Coleoptera-an Insect pest on durian in Chanthaburi province, pp. 118-123. In **Proceedings of 3rd International Symposium on Agricultural Technology and 17th**

International Symposium on Biocontrol and Biotechnology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok.

Boston, W., Leemon, D. and Cunningham, J.P. 2020. Virulence screen of *Beauveria bassiana* isolates for Australian Carpophilus (Coleoptera: Nitidulidae) beetle biocontrol. **Agronomy** 10(8): 1207.

Burckhardt, D., Ouvrard, D., Queiroz, D. and Percy, D. 2014. Psyllid host-plants (Hemiptera: Psylloidea): Resolving a semantic problem. **Florida Entomologist** 97(1): 242-246.

Butt, T.M., Ibrahim, L., Ball, B.V. and Clarks, S.J. 1994. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. **Bicontrol Science and Technology** 4(2): 207-214.

Dannon, H.F., Dannon, A.E., Douro-Kpindou, O.K., Zinsod, A.V., Houndete, A.T., Toffa-Mehinto, J., Elegbede, I.A.T.M., Olou, B.D. and Tamo, M. 2020. Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. **Journal of Cotton Research** 3: 24-45.

Erler, F. and Ates, A.O. 2015. Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Coleoptera: Scarabaeidae), as biological control agents against the June beetle. **Journal of Insect science** 15(1): 44-62.

Johnson, D.M., White, R.L., Pereira, R.M. and Geden, C.J. 2020. *Beauveria bassiana* culturing and harvesting for bioassays with House Flies. **Journal of Insect Science** 20(6): 1-7.

Lee, T.J., Zobayed, S., Firmani, F. and Park, E. 2019. A novel automated transplanting system for plant tissue culture. **Biosystems Engineering** 181: 63-72.

Lin, G., Tanguay, A., Guertin, C., Todorova, S. and Brodeur, J. 2017. A new method for loading predatory mites with entomopathogenic fungi for biological control of their prey. **Biological Control** 115: 105-111.

- Linnakoski, R., Beer, Z.W., Ahtiainen, J., Sidorov, E., Niemela, P., Pappinen, A. and Wingfield, M.J. 2010. Ophiostoma spp. associated with pine– and spruce–infesting bark beetles in Finland and Russia. **Persoonia** 25: 72-93.
- Mahdneshtin, Z., Vojoudi, S., Ghosta, Y., Safaralizadeh, M.H. and Saber, M. 2011. Laboratory evaluation of the entomopathogenic fungi, Iranian isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin against the control of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). **African Journal of Microbiology Research** 5(9): 5215-5220.
- Mascarin, G.M. and Jaronski, S.T. 2016. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 32(11): 177-203.
- Nichanun, K. 2020. Utilization of Entomopathogenic Pathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Control *Recilia dorsalis* and *Nephotettix virescens* (Hemiptera: Cicadellidae). **Khon Kaen Agriculture Journal** 48(1): 153-162. (in Thai)
- Oo, N.L., Mekkamol, S., Srithi, K. and Saengyot, S. 2017. Effect of different concentrations of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Hemiptera: Aphididae). **Interdisciplinary Research Review** 12(3): 26-30.
- Samson, R., Evans, H. and Latge, J.P. 1988. **Atlas of Entomopathogenic fungi**. Springer Verlag Publication, New York.
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution** 38: 3022-3027.
- Ullah, M.I., Arshad, M., Abdullah, A., Khalid, S., Iftikhar, Y. and Zahid, A.M. 2018. Use of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) and *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) to control *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) under laboratory and semi-field conditions. **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 28: 75-80.
- Wang, J. and Zheng, C. 2012. Characterization of newly discovered *Beauveria bassiana* isolate to *Frankliniella occidentalis* Perganda, a non-native invasive species in China. **Microbiological Research** 167(2): 116-120.
- White, R.L., Geden, C.J. and Kaufman, P.E. 2021. Exposure timing and method affect *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) efficacy against House Fly (Diptera: Muscidae) Larvae. **Journal of Medical Entomology** 58(1): 372-378.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B. and Taylor, J.W. 1999. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics, pp. 315-322. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J., eds. **PCR Protocols a Guide to Methods and Applications**. Academic Press, Inc. New York.
- Zafar, J., Freed, S., Khan, B.A. and Farooq, M. 2016. Effectiveness of *Beauveria bassiana* Against Cotton Whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Aleyrodidae: Homoptera) on Different Host Plants. **Pakistan Journal of Zoology** 48(1): 91-99.
- Zaki, F.N. 1998. Efficiency of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals), against *Aphis craccivora* Koch and *Bemisia fabae*, Gennadius. **Journal of Applied Entomology (Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie)** 122(7): 397-399.
- Zapata, Q.I., Gonzalez, F.M.S., Santillana, L.E.J., Gonzalez, N.A. and Pacheco, G.F.L. 2021. Late effects of *Beauveria bassiana* on larval stages of *Aedes aegypti* Linneo, 1762 (Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Biology** 10(82): e237789.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology** 7(6): 553-596.