

ศักยภาพเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* และ *Beauveria bassiana* เพื่อการควบคุม
มอดเจาะผลกาแฟ (*Hypothenemus hampei* Ferrari) ในห้องปฏิบัติการ
The Potential of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* for Controlling
Coffee Borer Beetle (*Hypothenemus hampei* Ferrari) in Laboratory Conditions

ภัททิรา ศาตรังษ์^{1/*} เมธาสิทธิ์ คนการ^{2/} เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์^{1/} ทิภาพร นวลเนตร^{1/}
Pattira Satwong^{1/} Maythasith konkarn^{2/} Saowanit popoonsak^{1/} Thiphaphorn naunnet^{1/}

Received 22 Apr. 2021/Revised 28 Nov. 2022/Accepted 15 Dec.2022

ABSTRACT

We studied the potential of using entomopathogenic fungi (EPF) for controlling coffee borer beetle (*Hypothenemus hampei* Ferrari, CBB). The experiment was conducted in laboratory at Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture from October 2018 to September 2020. Nine representative fungal isolates i.e *Metarhizium anisopliae* DOA-M8, DOA-M145, DOA-M146, DOA-M147, DOA-M150, *Beauveria bassiana* DOA-B4, DOA-B18, DOA-B19 and DOA-B20 were selected. Concentration of each inoculum was adjusted to 1×10^8 conidia ml^{-1} . Results of insect mortality showed that all fungal isolates infected CBB within 14 days after inoculation, *B. bassiana* was more effective than *M. anisopliae* in controlling CBB, showing lower LT_{50} values than that of *M. anisopliae*. Two *B. bassiana* isolates (DOA-B4 and DOA-B18) were selected to test for optimal conidial concentration for controlling CBB. Results showed that at 1×10^9 conidia ml^{-1} the average infestation of DOA-B18 was 94.2%, the LT_{50} were 7.29 days. Thus, DOA-B18 would be the most suitable isolate for controlling CBB in coffee plantation.

Keywords: coffee borer beetle, entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, 50 Paholyothin Rd. Lad Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

^{2/} สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร 50 ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{2/} Office of Agricultural Regulation, Department of Agriculture, 50 Paholyothin Rd. Lad Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

* Corresponding author: satwong1988@gmail.com

บทคัดย่อ

การทดสอบศักยภาพเชื้อราโรคแมลงในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ (*Hypothenemus hampei* Ferrari.) ดำเนินการทดสอบที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ระหว่าง ต.ค. 2561-ก.ย. 2563 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสายพันธุ์เชื้อราโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟพันธุ์อาราบิก้าในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยคัดเลือกเชื้อราโรคแมลงสายพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร 2 สายพันธุ์ จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท DOA-M8, DOA-M145, DOA-M146, DOA-M147, DOA-M150, *Beauveria bassiana* ไอโซเลท DOA-B4, DOA-B18, DOA-B19 และ DOA-B20 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราที่ความเข้มข้น 1×10^8 โคโคนิด/มล. หลังการทดสอบ 14 วัน พบว่าเชื้อราโรคแมลงทุกไอโซเลทสามารถก่อโรคกับมอดเจาะผลกาแฟได้ ซึ่งเชื้อ *B. bassiana* สามารถก่อโรคได้ดีกว่า *M. anisopliae* และมีค่า LT_{50} ต่ำกว่า *M. anisopliae* จึงคัดเลือกเชื้อรา *B. bassiana* 2 ไอโซเลท (DOA-B4, DOA-B18) มาศึกษาหาอัตราความเข้มข้นที่เหมาะสมในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ โดยทดสอบที่ความเข้มข้น 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 และ 1×10^9 โคโคนิด/มล. หลังการทดสอบ 14 วัน พบว่า DOA-B18 ที่ 1×10^9 โคโคนิด/มล. มีประสิทธิภาพทำให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อได้สูงสุด เฉลี่ย 94.2% และ LT_{50} มีค่า 7.29 วัน จึงมีความเป็นไปได้ที่ในอนาคตจะนำ DOA-B18 มาเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพไร่ต่อไป

คำสำคัญ : มอดเจาะผลกาแฟ เชื้อราโรคแมลง เมตาไรเซียม บิวเวอเรีย

บทนำ

มอดเจาะผลกาแฟ (coffee borer beetle; *Hypothenemus hampei*) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญในพื้นที่ปลูกกาแฟ ซึ่งระบาดทำความเสียหายให้กับผลผลิตกาแฟหลายพื้นที่ในเขตภาคเหนือ ผลกาแฟที่ถูกเจาะจะเป็นช่องทางให้เชื้อราและแบคทีเรียเข้าทำลายซ้ำ ทำให้ผลร่วงเสียหาย ส่งผลให้ผลผลิตกาแฟลดลง ถ้าสามารถเก็บเกี่ยวผลกาแฟที่มอดเจาะผลกาแฟเข้าทำลายอยู่ เมล็ดกาแฟที่ได้จะไม่มีคุณภาพ (บัณฑิต และคณะ, 2551) มอดเจาะผลกาแฟเป็นแมลงปีกแข็งขนาดเล็กประมาณ 1.5-2 มล. ในปี พ.ศ. 2553 พบว่า มอดตัวเต็มวัยเข้าทำลายผลกาแฟได้ตั้งแต่ขนาดผลกาแฟมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.3 มล. ขึ้นไป สามารถพบมอดได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งมอดจะอาศัยกัดกินและขยายพันธุ์ในผลจนกระทั่งผลกาแฟสุก และสามารถมีชีวิตอยู่ในผลกาแฟที่แห้งคาต้นได้ รวมถึงผลกาแฟที่หล่นลงพื้นดินด้วย นอกจากนี้ มอดจะอาศัยอยู่ในกาแฟกะลาได้ในระยะหนึ่งถ้าเมล็ดกาแฟมีความชื้นเหมาะสม และสามารถเข้าทำลายเมล็ดกาแฟกะลาระหว่างการตาก ทำให้คุณภาพของผลผลิตเสียไม่ได้คุณภาพตามความต้องการของตลาด การป้องกันกำจัดมอดเจาะผลกาแฟในแปลงปลูกมีหลากหลายวิธี เช่น วิธีเขตกรรม วิธีกล การใช้กับดักฟีโรโมน และการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด แต่การใช้สารเคมีไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัด เนื่องจากมอดเจาะผลกาแฟอาศัยอยู่ภายในเมล็ดทำให้สารเคมีเข้าไปไม่ถึง ดังนั้นเกษตรกรจึงมีความสนใจในการป้องกันกำจัดมอดเจาะกาแฟโดยวิธีทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น

เชื้อราโรคแมลง (entomopathogenic fungi) เป็นเชื้อราที่มีอยู่ในธรรมชาติ เชื้อราส่วนใหญ่จะมีความเฉพาะเจาะจงต่อการก่อโรคของแมลง ขึ้นอยู่กับสกุล ชนิด และสายพันธุ์ ของเชื้อรานั้น ๆ

โดยทั่วไป *Metarhizium anisopliae* สามารถพบได้ในแมลงกลุ่ม Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera และ Hemiptera (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2000; De La Rosa *et al.*, 1997) สามารถทำลายเหยื่อในระยะตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย บางสายพันธุ์พบว่า มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายลูกน้ำยุง และปลวกได้ (Boucias and Pendland, 1998) มีการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชทางการเกษตรได้หลายชนิด เช่น ตัวมดมะพร้าว มวนโกโก้ แมลงดำหนามมะพร้าว หนอนหัวดำมะพร้าว ตั๊กแตนปาทังก้า เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ตัวหมัดผัก เพลี้ยอ่อนถั่ว แมลงหวี่ขาว เพลี้ยไฟ และไรแดง เป็นต้น ส่วน *Beauveria bassiana* สามารถพบได้ในแมลงกลุ่ม Lepidoptera, Coleoptera และ Hemiptera บางครั้งอาจพบในกลุ่ม Diptera และ Hymenoptera (Tanada and Kaya, 1993) มีความสามารถในการควบคุมแมลงหวี่ขาว ไรแดง แมลงวันผลไม้ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล มอดเจาะผลกาแฟ หนอนเจาะข้าวโพดงา หนอนเจาะสมอฝ้าย มด ปลวก และเพลี้ยอ่อน เป็นต้น

จากปัญหาที่ผ่านมการนำเชื้อราก็โรคแมลงมาควบคุมมอดเจาะเมล็ดกาแฟไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากเกษตรกรขาดแหล่งเชื้อราที่มีประสิทธิภาพ และวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เชื้อราก็โรคแมลงที่ไม่ถูกต้อง เช่น ระยะเวลาการพ่น ลักษณะสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม อัตราการฉีดพ่น และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงดำเนินการคัดเลือกเชื้อราโรคแมลงที่เลี้ยงขยายไว้ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ เพื่อนำไปต่อยอดงานวิจัยสำหรับประยุกต์ใช้ในสภาพแปลงปลูก ตลอดจนการผลิตเป็นชีวภัณฑ์นำไปขยายผลเชิงพาณิชย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. คัดเลือกเชื้อราโรคแมลงที่มีศักยภาพในห้องปฏิบัติการ

1.1 การเลี้ยงขยายเชื้อราโรคแมลง

นำเชื้อราโรคแมลง จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ *M. anisopliae* ไอโซเลท DOA-M8, DOA-M145, DOA-M146, DOA-M147, DOA-M150, *B. bassiana* ไอโซเลท DOA-B4, DOA-B18, DOA-B19 และ DOA-B20 (Table 1) จากห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณในอาหารสังเคราะห์ PDA (potato dextrose agar) เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้ออื่น ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำเชื้อรา *M. anisopliae* มาเลี้ยงขยายบนข้าวโพดบดหยาบ และ *B. bassiana* เลี้ยงขยายบนข้าวสาร โดยเตรียมข้าวโพดบดหยาบและข้าวสารอย่างละ 200 ก. ใส่ในถุงพลาสติกขยายข้าง ขนาด 3.5x12 นิ้ว เติมน้ำ 200 มล. ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15-20 นาที ปลอมทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นตัดชิ้นนึ่ง PDA ที่มีเชื้อราเจริญเติบโต ขนาด 1x1 ซม. ใส่ลงในถุงข้าวโพดบดหยาบ และข้าวสาร คลุกให้เชื้อกระจายทั่วทั้งถุง นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27±2 °ซ.) เป็นเวลา 14 วัน ให้เชื้อราเจริญเติบโตเต็มถุง จากนั้นล้างโคนิเดียของเชื้อรากับน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อผสม Tween 80 (0.05%) กรองด้วยผ้าขาวบาง ตรวจนับจำนวนโคนิเดียต่อปริมาตรด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพ

Table 1 Entomopathogenic fungi isolates used in this experiment

Fungi	Isolate	Insect host	Crop	Location
<i>M. anisopliae</i>	DOA-M8	White Grub	Pineapple	Huai Sai sub-district, Mueang district, Prachuap Khiri Khan province.
<i>M. anisopliae</i>	DOA-M145	Rice Weevil	Soil, Plant of Coffee	Chumphon Agricultural Research and Development Center, Chumphon province.
<i>M. anisopliae</i>	DOA-M146	Rice Weevil	Soil, Plant of Coffee	Chumphon Agricultural Research and Development Center, Chumphon province.
<i>M. anisopliae</i>	DOA-M147	Rice Weevil	Soil, Plant of Coffee	Chumphon Agricultural Research and Development Center, Chumphon province.
<i>M. anisopliae</i>	DOA-M150	Rice Weevil	Soil, Plant of Coffee	Chumphon Agricultural Research and Development Center, Chumphon province.
<i>B. bassiana</i>	DOA-B4	Coffee Borer Beetle	Coffee	Thep Sadet sub-district, Doi Saket district, Chiang Mai province.
<i>B. bassiana</i>	DOA-B18	Coffee Borer Beetle	Coffee	Tak Agricultural Research and Development Center, Tak province.
<i>B. bassiana</i>	DOA-B19	Leaf Eating Caterpillar	Corn	Tha Maka sub-district, Tha Maka district, Kanchanaburi province.
<i>B. bassiana</i>	DOA-B20	Cotton Leafhopper	Eggplant	Si Prachan sub-district, Si Prachan district, Suphanburi province.

1.2 การเลี้ยงขยายมอดเจาะผลกาแฟ

เก็บมอดเจาะผลกาแฟในแหล่งที่มีการระบาดของมอดในพื้นที่ อ.เมืองตาก จ.ตาก อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ และ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ นำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ ในกรงขนาด 30x30 ซม. โดยใช้ผลเชอร์รี่ของกาแฟเป็นอาหาร

1.3 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราโรคแมลงในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ

นำสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา(spore suspension) ที่เตรียมจากข้อ 1.1 มาปรับความเข้มข้นให้เป็น 1×10^8 โคโคนิดี/มล. แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในห้องปฏิบัติการ วางแผนการทดลองแบบแบบสุ่มสมบูรณ์ 10 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ โดย กรรมวิธีที่ 1-5 ใช้ *M. anisopliae* ไอโซเลท DOA-M8, DOA-M145, DOA-M146, DOA-M147 และ DOA-M150 กรรมวิธีที่ 6-9 ใช้ *B. bassiana* ไอโซเลท DOA-B4, DOA-B18, DOA-B19 DOA-B20 ตามลำดับและกรรมวิธีที่ 10 เป็นกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ

นำสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ปรับความเข้มข้นแล้วใส่ในกล่องพลาสติก ขนาด 7x10 ซม. อัตรา 50 มล./กล่อง นำผลกาแฟที่มีมอดเจาะผลกาแฟเข้าทำลายโดยสังเกตบริเวณสะดือผลกล่องละ 15 ผล ในแต่ละหน่วยการทดลองจุ่มผลกาแฟลงในสารแขวนลอยสปอร์ตามกรรมวิธีข้างต้นเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำผลกาแฟใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 10x15 ซม. พร้อมกับการให้ความชื้น (moist chamber) โดยใช้น้ำเปล่าหยดลงบนกระดาษทิชชูเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นผ่าผลกาแฟทั้งหมดและสุ่มตัวเต็มวัยมอดเจาะผลกาแฟ จำนวน 10 ตัว/ซ้ำ มาบ่มเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. และบันทึกอัตราการตายและการติดเชื้อของมอดทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน และคำนวณหาอัตราการติดเชื้อของมอดเจาะผลกาแฟ และคำนวณค่า lethal time (LT_{50}) โดยใช้วิธี probit analysis ทำการทดสอบ 3 ครั้ง ในช่วงเดือน ม.ค.-มิ.ย. 2562 นำมอดเจาะผลกาแฟที่ตายจากการติดเชื้อราโรคแมลงมาตรวจสอบภายใต้กล้องสเตอริโอ และ

ทำการแยกเชื้อเพื่อยืนยันการเกิดโรค โดยใช้หลัก Koch's postulates (Agrios, 2005) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้ Duncan's new multiple range test (DMRT)

2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเกิดโรคของเชื้อราโรคแมลงในห้องปฏิบัติการ

คัดเลือกเชื้อราโรคแมลงไอโซเลทที่สามารถควบคุมมอดเจาะผลกาแฟได้สูงสุดจากขั้นตอนที่ 1 จำนวน 2 ไอโซเลท มาศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ 4 ระดับ คือ 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 และ 1×10^9 โคโคนีเดีย/มล. มีน้ำเปล่าหนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีควบคุมรวม 9 กรรมวิธี วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ โดยการจุ่มผลกาแฟที่มีมอดเจาะผลกาแฟลงในสารแขวนลอยสปอร์ ตามกรรมวิธีต่าง ๆ ดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 1.3 บันทึกอัตราการตายและการติดเชื้อของมอดทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน และคำนวณหาอัตราการติดเชื้อของมอดเจาะผลกาแฟ ทำการทดสอบ จำนวน 6 ครั้ง ในช่วงเดือน มิ.ย.-ต.ค. 2563 เพื่อยืนยันการเกิดโรคและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับ 1.3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. คัดเลือกเชื้อราโรคแมลงที่มีศักยภาพในห้องปฏิบัติการ

1.1 การเลี้ยงขยายเชื้อราโรคแมลง

การเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณเชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* ในอาหาร PDA ใช้เวลาประมาณ 7 ± 2 วัน โดย 3-4 วันแรก จะสังเกตเห็นเส้นใยเป็นสีขาว และจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวภายในเวลา 5-7 วัน ส่วนเชื้อรา *B. bassiana* จะเปลี่ยนเป็นสีขาว ตรวจสอบไม่พบการปนเปื้อนเชื้อราและเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ และสามารถเลี้ยงขยายหัวเชื้อลงในอาหารธัญพืช จำนวน 30 ถัง ใช้เวลาในการเลี้ยงเพิ่มปริมาณ ทั้งหมดประมาณ 21 วัน

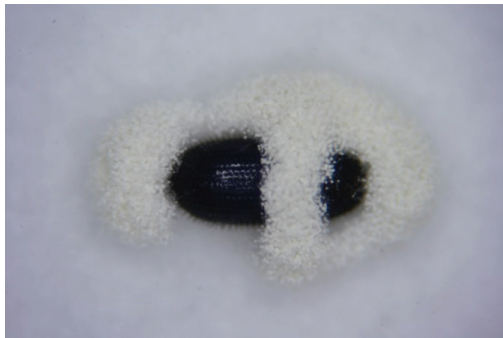
สอดคล้องกับการทดลองของ เกษสินี และจรีมาศ (2564) ที่รายงานไว้ว่า เชื้อรา *B. bassiana* BCC2779 และ *M. anisopliae* BCC30455 สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แต่จำนวนโคโคนีเดียของเชื้อราและความมีชีวิตของเชื้อรานั้นแตกต่างกัน และพบว่า เชื้อรา *B. bassiana* BCC2779 ที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าวสาลีให้มีจำนวนโคโคนีเดียที่มีชีวิตมากที่สุด ส่วน *M. anisopliae* BCC30455 มีจำนวนโคโคนีเดียที่มีชีวิตในอาหารธัญพืชไม่แตกต่างกัน

1.2 การเลี้ยงขยายมอดเจาะผลกาแฟ

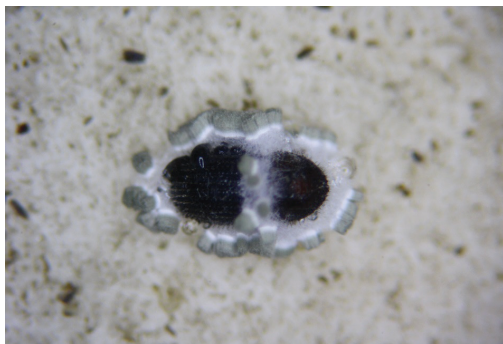
เลี้ยงขยายมอดเจาะผลกาแฟที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C วงจรชีวิตตั้งแต่ระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 25-30 วัน ส่วนใหญ่มอดจะอาศัยอยู่ในผลของกาแฟ โดยตัวเต็มวัยจะกัดกินเข้าไปถึงเมล็ดหรือเอนโดสเปิร์มเพื่อเป็นอาหาร โดยจะเจาะเข้าบริเวณปลายผลกาแฟ สังเกตร่องรอยได้จากรูขนาดเล็กบริเวณสะดือผล สามารถพบได้มากกว่า 1 รู ซึ่งมอดเข้าทำลายผลกาแฟได้ตั้งแต่ระยะผลเท่าหัวไม้ขีด (สีเขียว) จนถึงระยะผลสุกแก่ (ผลสีแดง) ซึ่งสอดคล้องกับ กรรณิการ์ (2543) ที่รายงานไว้ว่า วงจรชีวิตของมอดเจาะผลกาแฟใช้เวลาประมาณ 25-35 วัน ตัวเต็มวัยของมอดเจาะผลกาแฟจะกัดกินผลกาแฟเป็นอาหาร ไม่ชอบการเคลื่อนย้าย ซึ่งเพศเมียจะผลกาแฟเป็นรูแล้ววางไข่ไว้ภายใน และอาศัยกัดกินอยู่ภายในผลกาแฟ

1.3 การทดสอบศักยภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ

ผลการทดสอบเชื้อราโรคแมลง จำนวน 9 ไอโซเลท พบว่า ที่ความเข้มข้น 1×10^6 โคโคนีเดีย/มล. มีประสิทธิภาพในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ จากการตรวจสอบการติดเชื้อราโรคแมลงของมอดเจาะผลกาแฟ โดยใช้หลัก Koch's postulates พบว่า เชื้อราโรคแมลงทั้ง 9 ไอโซเลท ที่ใช้ในการทดสอบสามารถเข้าทำลายมอดได้ สามารถแยกเชื้อออกมาแล้วตรงกับเชื้อที่ใช้ทดสอบ (Figure 1)



A



B

Figure 1 Characteristic of infected coffee borer beetle by different species of entomopathogenic fungi (magnification: 20 times): A) *Beauveria bassiana*, B) *Metharhizium anisopliae*

มอดเจาะผลกาแฟที่ติดเชื้อเคลื่อนไหวนำลงและหยุดการเคลื่อนไหวนหลังการจุ่มผลเป็นเวลา 3 วัน แต่ยังไม่พบเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุมลำตัวมอดเจาะผลกาแฟ หลังการจุ่มผล 4-7 วัน สามารถมองเห็นเส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุมลำตัวมอดเจาะผลกาแฟชัดเจนขึ้น ที่ 6 วันหลังจุ่มผล จะพบการตายของมอดเจาะผลกาแฟในกรรมวิธีต่าง ๆ และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดสอบครั้งที่ 1 พบว่า *B. bassiana* DOA-B18 มีประสิทธิภาพในการก่อโรคกับมอดเจาะผลกาแฟสูงที่สุด 95.00% รองลงมา คือ DOA-B4 (87.50%), DOA-M145 (72.50%) และ DOA-B19 (70.00%) ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 4 ไอโซเลต ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ทดสอบครั้งที่ 2 พบว่า *B. bassiana* DOA-B18 ยังคงมีประสิทธิภาพในการก่อโรคกับมอดเจาะผลกาแฟสูงที่สุด คือ 87.5% รองลงมา คือ

DOA-M8 (70.0%), DOA-B4 (60.0%), DOA-B19 (60.0%) และ DOA-B20 (52.5%) ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 5 ไอโซเลต ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ และผลการทดสอบครั้งที่ 3 พบว่า *B. bassiana* DOA-B4 มีประสิทธิภาพสูงที่สุด ถึง 100% รองลงมา คือ DOA-B18 (97.5%), DOA-B20 (92.5%), DOA-M8 (75.0%) และ DOA-B19 (70.0%) ตามลำดับ และทั้ง 5 ไอโซเลต ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ เช่นเดียวกัน (Table 2)

จากผลการทดสอบทั้ง 3 ครั้ง พบว่า เชื้อราโรคแมลงทุกไอโซเลตสามารถเข้าทำลายมอดเจาะผลกาแฟได้และพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อตั้งแต่ 10.0-100% ผลการทดสอบทั้ง 3 ครั้ง เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งพบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อในทุกกรรมวิธีมีค่าแตกต่างกันกับกรรมวิธีในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับ Bustillo *et al.* (1999) ที่รายงานว่า การใช้ *M. anisopliae* มีความรุนแรงน้อยกว่าการใช้ *B. bassiana* การใช้เชื้อราโรคแมลงควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ

DOA-B18 มี LT_{50} ต่ำสุดที่ 7.97 วัน รองลงมาคือ DOA-B4, DOA-B20 และ DOA-B19 มีค่า 8.28, 9.52 และ 9.58 วัน ตามลำดับ (Table 2) สังเกตเห็นได้ว่า DOA-B4 และ DOA-B18 พบอัตราการติดเชื้อในมอดเจาะผลกาแฟสูงและมีระยะเวลา (LT_{50}) ในการติดเชื้อเร็วกว่าไอโซเลตอื่น ๆ อาจเนื่องมาจากเป็นเชื้อราโรคแมลงที่แยกเชื้อมาจากมอดเจาะผลกาแฟโดยตรง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Samuels *et al.* (2002) ที่รายงานว่า เชื้อราโรคแมลง *B. bassiana* ไอโซเลต LPP5 และ LPP1 สามารถเข้าทำลายมอดเจาะผลกาแฟได้ดีที่สุด 95.7 และ 91.0% ตามลำดับ ขณะที่ *M. anisopliae* พบการเข้าทำลายเพียง 46.7% ซึ่ง LPP5 เป็นไอโซเลตที่แยกเชื้อได้จากมอดเจาะผลกาแฟที่ติดเชื้อตามธรรมชาติ และ LPP1 แยกเชื้อมาจากตัว Chrysomelid เชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* DOA-M145,

DOA-M146, DOA-M147 และ DOA-M150 เป็น ที่นำมาทดสอบในการทดลองนี้ เป็นเชื้อราที่แยก เชื้อมาจากดินในแปลงปลูกกาแฟ ซึ่งพบการก่อโรค ในมอดเจาะผลกาแฟต่ำกว่า 50% อาจเนื่องจาก มอดเจาะผลกาแฟไม่ใช่แมลงศัตรูเป้าหมายของ *M. anisopliae* และเป็นเชื้อที่ต้องอาศัยอุณหภูมิต่ำ และความชื้นสูง ซึ่งสอดคล้องกับ Apriyanto and Nadrawati (2019) ที่รายงานว่า *B. bassiana* Cf-Bb (แยกเชื้อจากด้วงงวงมันเทศ *Cylas formicarius*, *B. bassiana* Cf-Nv (แยกเชื้อจากมวนเขียวข้าว *Nezara viridula*), *M. anisopliae* sc-Ma (แยกเชื้อ จากดินในแปลงกาแฟ) และ *M. anisopliae* sfc-Ma (แยกเชื้อจากดินในแปลงผัก) ความเข้มข้น 1×10^9 โคโคนิดี/มล. สามารถทำให้มอดตายได้ 80.0, 76.7, 63.3 และ 60.0% ตามลำดับ ซึ่งพบว่า *B. bassiana* ที่แยกเชื้อจากแมลงสามารถเข้า ทำลายมอดเจาะผลกาแฟได้สูงกว่า *M. anisopliae* ที่แยกเชื้อมาจากดิน

จากการทดลองยังพบว่า มอดเจาะผล กาแฟติดเชื้อ DOA-M8 59.2% ซึ่งเชื้อ DOA-M8 เป็นเชื้อแยกมาจากแมลงหนอนหลวง (เสาวนิตย์ และ เมธาสิทธิ์, 2564) ดังนั้น จึงพบการติดเชื้อไม่สูง มากนัก สอดคล้องกับการทดลองของ Lecuona *et al.* (1986) พบว่า *M. anisopliae* ที่แยกได้ จากด้วงงวงเจาะสมอฝ้าย (cotton boll weevil; *Anthonomus grandis*) ความเข้มข้น 1.5×10^8 โคโคนิดี/มล. สามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟตาย ได้เพียง 60% แต่ไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Balakrishnan and Naik (2014) ที่รายงานว่า *M. anisopliae* จำนวน 3 จาก 10 ไอโซเลท ที่ระดับ ความเข้มข้น 1×10^7 โคโคนิดี/มล. สามารถควบคุม มอดเจาะผลกาแฟได้มากกว่า 90%

2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเกิดโรค ของเชื้อราโรคแมลงในห้องปฏิบัติการ

จากการคัดเลือกได้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพ ทำให้มอดติดเชื้อได้สูงสุด จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ *B. bassiana* DOA-B4 และ DOA-B18 มาทำการ

ศึกษาหาอัตราความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำไป ใช้ควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ โดยทดสอบที่ความ เข้มข้น 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 และ 1×10^9 โคโคนิดี/มล. พบว่า ผลการทดลองทั้ง 6 ครั้ง การ ติดเชื้อราของมอดเจาะผลกาแฟเป็นไปในทิศทาง เดียวกัน เมื่อความเข้มข้นของ *B. bassiana* สูงขึ้น อัตราการติดเชื้อของมอดเจาะผลกาแฟเพิ่มมากขึ้น โดยความรุนแรงของเชื้อแต่ละไอโซเลท ในแต่ละ ความเข้มข้นจะมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ (Table 3) ค่าเฉลี่ยการติดเชื้อหลังการ จุ่มผล 14 วัน ที่ความเข้มข้น 1×10^9 โคโคนิดี/มล. พบมอดติดเชื้อ DOA-B18 85.0-100% รองลง มาคือ DOA-B4 พบที่ 85-97.5% และความเข้มข้น ของเชื้อไอโซเลท DOA-B18 และ DOA-B4 ที่ 1×10^8 โคโคนิดี/มล. พบมอดติดเชื้อ 55.0-50% และ 52.5-97.5% ตามลำดับ

ส่วน LT_{50} พบว่า ที่ความเข้มข้น 1×10^9 โคโคนิดี/มล. เชื้อราสามารถก่อโรคในมอดได้เร็ว ที่สุด โดย DOA-B18 และ DOA-B4 มีค่า LT_{50} เท่ากับ 7.29 และ 7.32 วัน ตามลำดับ จากค่า LT_{50} ที่ คำนวณได้นั้นทำให้ทราบว่าเชื้อราที่มีความรุนแรง สูงจะมีค่า LT_{50} ต่ำ ซึ่งไอโซเลท DOA-B4 และ DOA-B18 เป็นเชื้อราที่มีความรุนแรงในการทำ ให้มอดเจาะผลกาแฟติดเชื้อราได้เร็วที่สุด 6-7 วัน ผล การทดลองมีความใกล้เคียงกับ De La Rosa *et al.* (1997) รายงานว่า เชื้อราโรคแมลงสามารถทำให้ มอดเจาะผลกาแฟตายได้ระหว่าง 20.0-100% และไอโซเลทที่มีความรุนแรงมากที่สุดคือ Bb-26 เป็นเชื้อราที่แยกเชื้อมาจากมอดเจาะผลกาแฟ สามารถทำให้มอดตายได้ 50% (LT_{50}) ในเวลา 4.3 วัน และยังสอดคล้องกับ Cárdenas-Ramírez *et al.* (2007) ที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ Bb 9020, Bb 9023, Bb 9205, Bb 9001, Bb 9119 และ Bb 9024 โดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยเข้มข้น 1×10^6 โคโคนิดี/มล. พบว่า ไอโซเลท Bb 9205 สามารถ ควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในระดับห้องปฏิบัติการ ได้ สูงสุด 88.3% เมื่อผสมเชื้อรา 3 ไอโซเลท ระหว่าง

Table 2 Coffee berry borer (CBB) infected by 9 fungal isolates using a concentration of 1×10^8 conidia ml^{-1} at 14 days after treatment

Isolate	CBB infected by fungal ^{1/} (%)			LT ₅₀ (Day) ^{3/}	95% Confidence limit	
	Expt. 1	Expt. 2	Expt. 3		Lower	Upper
	January 19	January 19	May 19			
DOA-M8	32.5 c ^{2/}	70.0 ab	75.0 a	10.10	8.27	12.34
DOA-M145	72.5 ab	15.0 d	10.0 b	12.71	11.21	14.41
DOA-M146	35.0 c	22.5 cd	22.5 b	15.11	12.35	18.49
DOA-M147	37.5 c	42.5 bcd	25.0 b	13.72	11.34	16.60
DOA-M150	30.0 c	12.5 d	20.0 b	16.53	13.33	20.51
DOA-B4	87.5 ab	60.0 ab	100.0 a	8.28	7.20	9.52
DOA-B18	95.0 a	87.5 a	97.5 a	7.97	7.10	8.95
DOA-B19	70.0 ab	60.0 ab	70.0 a	9.58	8.13	11.28
DOA-B20	55.0 bc	52.5 abc	92.5 a	9.52	8.15	11.12
Control	0 d	0 d	0 c	10.10	8.27	12.34
CV (%)	37.1	48.3	46.2			

^{1/} Average of 4 replications, 10 adults/replication.

^{2/} Mean in the same column, followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

^{3/} Lethal time (LT50) of different strains of fungi calculated by probit analysis.

Table 3 Coffee berry borer (CBB) infected by 2 fungal isolates at 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 and 1×10^9 conidia ml^{-1} at 14 days after treatment

Isolate	Concentration (Conidia ml^{-1})	CBB infected by fungal ^{1/} (%)						LT ₅₀ (Day) ^{3/}	95% Confidence limit	
		Expt. 1	Expt. 2	Expt. 3	Expt. 4	Expt. 5	Expt. 6		Lower	Upper
		July 20	July 20	Aug. 20	Aug. 20	Sept. 20	Sept.20			
DOA-B4	10^6	35.0 c ^{2/}	42.5 c	5.0 d	0.0 d	70.0 bc	40.0 c	14.00	11.75	16.69
	10^7	37.5 c	65.0 bc	32.5 c	30.0 c	80.0 ab	82.5 ab	10.85	9.40	12.53
	10^8	75.0 ab	60.0 bc	60.0 b	52.5 b	97.5 a	90.0 ab	9.44	8.39	10.63
	10^9	97.5 a	87.5 ab	92.5 a	92.5 a	97.5 a	85.0 ab	7.32	6.43	8.34
DOA-B18	10^6	62.5 b	42.5 c	2.5 d	7.5 d	22.5 de	30.0 c	17.46	13.15	23.18
	10^7	35.0 c	37.5 c	30.0 c	45.0 bc	45.0 cd	65.0 b	11.93	10.39	13.72
	10^8	80.0 ab	55.0 c	70.0 b	75.0 a	65.0 bc	67.5 b	9.00	8.08	10.03
	10^9	85.0 ab	97.5 a	92.5 a	95.0 a	100 a	95.0 a	7.29	6.41	8.29
Control		0 d	0 d	0 d	0 d	0 e	0 d			
CV (%)		26.0	37.2	27.0	28.8	28.3	26.2			

^{1/} Average of 4 replications, 10 adults/replication.

^{2/} Mean in the same column, followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

^{3/} Lethal time (LT50) of different strains of fungi calculated by probit analysis.

Bb 9001, Bb 9119 และ Bb 9024 พบอัตราการตายสูงถึง 100% เปรียบเทียบกับชีวภัณฑ์ทางการค้า ซึ่งพบอัตราการตาย 83.3% เมื่อทำการทดสอบในสภาพไร่ พบอัตราการตายในทุกไฮโซเลทไม่แตกต่างกันทางสถิติอยู่ในช่วง 53.1-60.1% ยกเว้นการผสมไฮโซเลทระหว่าง Bb 9001, Bb 9119 และ Bb 9024 พบอัตราการตายสูงสุด 66.6%

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เชื้อราโรคแมลงก่อโรคในแมลงอาศัยนั้น ขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัย เช่น ความเฉพาะเจาะจงในการเข้าทำลายแมลง ซึ่งวงจรชีวิตของเชื้อราโรคแมลงส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับวงจรชีวิตของแมลงอาศัยเช่นเดียวกัน รวมถึงสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา เช่น อุณหภูมิ แสง และความชื้น (Shah and Pell, 2003) จากผลการทดลองดังกล่าวเชื้อราโรคแมลงนั้นมีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงศัตรูเป้าหมาย ดังนั้น การนำเชื้อราโรคแมลงไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดนั้น ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราโรคแมลงกับแมลงอาศัยหลาย ๆ ครั้ง เพื่อยืนยันผลการทดสอบและเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดี การนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในอนาคต และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้ควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพไร่ รวมทั้งพัฒนาเทคนิค อัตรา และวิธีการใช้เชื้อราโรคแมลงเพื่อให้สามารถนำไปใช้ป้องกันกำจัดมอดเจาะผลกาแฟได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถถ่ายทอดให้แก่เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัย และเกษตรกรในพื้นที่ รวมทั้งหน่วยงานอื่น ๆ และสามารถพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ถ่ายทอดให้กับบริษัทหรือภาคเอกชนที่สนใจนำไปผลิตใช้ในเชิงการค้าต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบศักยภาพเชื้อราโรคแมลงในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในสภาพห้องปฏิบัติการ การใช้ *B. bassiana* ที่ 1×10^8 โคโคนีเดีย/มล. สามารถทำให้มอดเจาะผลกาแฟติด

เชื้อราได้ดีกว่าการใช้ *M. anisopliae* และพบค่า LT_{50} ของ *B. bassiana* ต่ำกว่า *M. anisopliae* ซึ่ง *B. bassiana* DOA-B18 ที่ 1×10^8 โคโคนีเดีย/มล. มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในห้องปฏิบัติการ มีการติดเชื้อ 85-100% LT_{50} มีค่า 7.29 วัน ดังนั้น *B. bassiana* DOA-B18 จึงมีความเหมาะสมในการนำไปทดสอบเพื่อหาอัตราและเทคนิควิธีการใช้ที่เหมาะสมในสภาพไร่ เนื่องจากการทดสอบข้างต้นใช้วิธีการจุ่มผลทำให้สารแขวนลอยโคโคนีเดียของเชื้อราโรคแมลงสามารถเข้าถึงตัวแมลงที่อยู่ภายในผลได้ดี แต่ถ้ามมีการนำไปปรับใช้โดยวิธีการฉีดพ่นอาจจะส่งผลให้อัตราการติดเชื้อมีแนวโน้มลดลง ดังนั้น *B. bassiana* DOA-B18 จึงมีความเหมาะสมในการนำไปทดสอบเพื่อหาอัตราและเทคนิควิธีการใช้ที่เหมาะสมในสภาพไร่ รวมทั้งการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมมอดเจาะผลกาแฟต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางสาวฉัตรนภา ช่มอาวูธ และนายสุเมธ พากเพียร ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการติดต่อประสานงานกับเกษตรกรในพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างซากแมลงและตัวอย่างดิน ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการเก็บตัวอย่างมอดเจาะผลกาแฟเพื่อใช้ในการทดสอบ ขอขอบคุณกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์ทางสถิติงานวิจัยเกษตร กรมวิชาการเกษตร ที่ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ผลการทดลอง และขอขอบคุณคณะทำงานกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพทุกท่านที่ทำงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ เฟื่องคุ้ม. 2543. มอดเจาะผลกาแฟ: ศัตรูกาแฟอาราบิก้าในภาคเหนือ. ว.กัญและสัตววิทยา. 22(3): 247-249.

- เกษลิณี แก้วสระแสน และจุรีมาศ วังศิริ. 2564. วัสดุที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณสปอร์ของเชื้อราและประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยแป้งสีชมพู (*Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero). *ว.แก่นเกษตร*. 49 (พิเศษ 1): 254-259.
- บันฑูรย์ วาฤทธิ์ ขวลิท กอสมพันธ์ วราพงษ์ บุญมา ประเสริฐ คำออน นิธิ ไทยสันทัด ถาวร สุภาวงศ์ เยาวลักษณ์ จันทรียง และสมบัติ ศรีชูวงศ์. 2551. *การศึกษาระบาดและป้องกันกำจัดมอดเจาะผลกาแฟอาราบิก้าแบบผสมผสาน*. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 38 หน้า.
- เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และเมธาสิทธิ์ คนการ. 2564. ศักยภาพของราสาเหตุโรคแมลงบางชนิดในการควบคุมเพลี้ยอ่อนดำ *Aphis craccivora* (Koch) ในถั่วฝักยาว. *ว.วิชาการเกษตร*. 39(2): 159-167.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Academic Press, Gainesville, U.S.A. 952 p.
- Apriyanto, D. and N. Nadrawati. 2019. Laboratory evaluation of Bengkulu isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, using spraying method. *Journal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. 19(2): 93-100.
- Balakrishnan, M.M. and P.R Naik. 2014. Infectivity of ten *Metarhizium anisopliae* isolates to the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Zoo. Stud*. 2(5): 246-249.
- Boucias, D.G. and J.C. Pendland. 1998. *Principles of Insect Pathology*. Kluwer Academic Publishers. 537 p.
- Bustillo. A., M.G. Bernal, P. Benavides and B. Chaves. 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. *Fla. Entomol*. 82(4): 491-498.
- Cárdenas-Ramírez, A.B., D.A. Villalba-Guott, A.E. Bustillo-Pardey, E.C. Montoya-Restrepo and C.E. Góngora-Botero. 2007. Efficacia de mezclas de cepas del hongo *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin en el control de la broca del café. *Revista Cenicafe (Colombia)*. 58(4): 293-303.
- De La Rosa, W., R. Alatorre, J. Trujillo and J.F. Barrera. 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). *J Eoon. Entomol*. 90(6): 1534-1538.
- Lecuona, RE., PM. Fernandez, SB. Alves and E. Bleicher. 1986. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* Ferrari., 1867 (Coleoptera: Scolytidae). *Anais da Sociedade Entomologia do Brazil*. 15: 21-27.
- Lezama-Gutiérrez, R., A. Trujillo-de la Luz, J. Molina-Ochoa, O. Rebolledo-Domínguez, A. R. Pescador, M. Lopez-Edwards and M. Aluja. 2000. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): laboratory and field trials. *J. Econo. Entomol*. 93: 1080-1084.
- Samuels, R.I., R.C. Pereira and C.A.T. Gava. 2002. Infection of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) by Brazilian isolates of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biocontrol Science and Technology*. 12: 631-635.
- Shah, P.A. and J.K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. 61: 413-423.
- Tanada, Y and H.K. Kaya. 1993. *Insect pathology*. Academic press, Inc. 666 p.