การคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมสำหรับผลิตหัวเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 และวิธีการใช้ควบคุมด้วงหมัดผัก

Selection of a Suitable Culture Medium for *Metarhizium* DOA-M3 Stock Culture Production and Application Method to Control Flea Beetles

นิยม ไข่มุกข์ [1] และ รัติกาล ยุทธศิลป์ [2*]

Kaimuk, N. [1] and Yutthasin, R. [2*]

[1] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครพนม 144 ม. 1 ต. ขามเฒ่า อ.เมือง จ.นครพนม 48000

[1] Nakhon Phanom Agricultural Research and Development Center 144 Moo 1, Kham Thao Subdistrict, Mueang District, Nakhon Phanom Province 48000

[2] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3 ขอนแก่น 180 ม. 27 ถ.มิตรภาพ ต.ศิลา อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000

[2] Agricultural Research and Development Region 3 Khon Kaen 180 Moo 27, Mittraphap Road, Sila Subdistrict, Mueang District, Khon Kaen Province 40000

** Corresponding author: rattikan3107@gmail.com*

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin เป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด รวมทั้งด้วงหมัดผักที่เป็นปัญหาสำคัญของการผลิตผักในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกอาหารที่เหมาะสมสำหรับผลิตหัวเชื้อรา *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin ไอโซเลต DOA-M3 (เมตาไรเซียม DOA-M3) ที่เกษตรสามารถนำไปผลิตขยายเป็นชีวภัณฑ์ชนิดเชื้อสด ใช้ได้เอง และวิธีการใช้ควบคุมด้วงหมัดผักได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำการทดลองในสภาพห้องปฏิบัติการ และแปลงทดลอง ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 3 จังหวัดขอนแก่น ระหว่างเดือนตุลาคม 2564 ถึงเดือน ธันวาคม 2565 ผลการทดลอง พบว่า อาหารที่เหมาะสมสำหรับเตรียมหัวเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 คือ เมล็ดข้าวฟ่าง มีอายุเก็บรักษาในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส) ได้นาน 6 เดือน ต้นทุนการผลิตต่ำ และนำไปผลิตขยายเป็นชีวภัณฑ์เชื้อสดในข้าวสวยได้ง่ายกว่าเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บดหยาบ ขณะที่เมล็ดข้าวเปลือก มีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด แต่มีอายุเก็บรักษาและปริมาณเชื้อที่อยู่ระหว่างเก็บรักษาน้อยกว่าเมล็ดธัญพืชทั้งสองชนิด ส่วนเปอร์เซ็นต์การตายของด้วงหมัดผักจากหัวเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 ทั้ง 3 ชนิด ก่อนและหลังเก็บรักษาไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่างร้อยละ 88-100 เมื่อนำหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างมาขยายต่อในข้าวสวยผลิตเป็นชีวภัณฑ์เชื้อสด แล้วทดสอบการควบคุม ด้วงหมัดผักในกวางตุ้งสภาพแปลงทดลอง จำนวน 2 ฤดูปลูก ให้ผลการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน โดยการใช้ชีวภัณฑ์เมตาไรเซียม DOA-M3 ชนิดเชื้อสดอัตรา 2,000 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร สามารถควบคุมด้วงหมัดผักได้ดีเช่นเดียวกับการใช้สารเคมี fipronil 5% SC อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย จำนวน 120 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร ส่วนผลผลิตของกวางตุ้งในฤดูปลูกที่ 1 กรรมวิธีใช้สารเคมี fipronil 5% SC ให้ผลผลิตมากที่สุด (650 กรัมต่อตารางเมตร) ขณะที่ฤดูปลูกที่ 2 ทุกกรรมวิธีให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1,349 - 1,519 กรัมต่อตารางเมตร

คำสำคัญ: เชื้อราเมตาไรเซียม ราแมลง ชีวภัณฑ์ กวางตุ้ง

Abstract

Metarhizium anisopliae (Metsch) Sorokin is entomopathogenic fungi that infects and kills several pest insects. Flea beetles are major pest of many vegetable crops in Upper Northeast Thailand. The objective of this study was to test the culture medium of *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin isolate DOA-M3 for stock culture that farmers can use to produce fresh bioagent and determines the suitable application of flea beetles control. This experiment was studied at laboratory and trial plot of Agricultural Research and Development Region 3, Khon Kaen province from October 2021 to September 2022. The results showed that the sorghum grains have proved to be suitable medium for preparation of *Metarhizium* DOA-M3 starter that can be preserved for 6 months in refrigerator. They were low cost and easy to inoculated in the streamed rice substrate compare with coarse ground corn kernels. Although paddy grains had lowest cost, their storage period was shortest and *Metarhizium* DOA-M3 amount had least. *Metarhizium* DOA-M3 cultured in each medium was highly effective in controlling

flea beetles both before storage and in each month of preservation (88-100%). The *Metarhizium* DOA-M3 fresh formulation produced from the sorghum grains was evaluated to control flea beetles in two growing seasons of Chinese flowering cabbage trial plot. They showed similar results The *Metarhizium* DOA-M3 fresh formulation 2,000 grams in 20 water liters was the highest efficiency in controlling flea beetles same as spraying fipronil 5% SC at a ratio of 5 ml/20 water liters of water and applying *Steinernema siamkayia* Thai strain 120 million infective juveniles /20 water liters. In the first growing season, the insecticide treatment gave the highest yield of Chinese flowering cabbage (650 g/m^2), while there was no difference in later crop growing season (1,349 - 1,519 g/ m^2).
Keywords: *Metarhizium*, entomopathogenic fungi, bioagent, Chinese flowering cabbage

บทนำ

เชื้อราเขียวเมตาไรเซียม (*Metarhizium anisopliae*) (Metsch) Sorokin เป็นจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อยู่ใน Phylum: Ascomycota เชื้อราในกลุ่มนี้มักจะเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรค “muscardine” ในแมลง ทำให้เชื้อรา *M. anisopliae* มีชื่อเรียกว่า “green muscardine” พบแพร่กระจายได้ทั่วไป สามารถใช้ควบคุมแมลงในกลุ่ม Diptera Lepidoptera Orthoptera Coleoptera Hemiptera และ Hymenoptera จากปัญหาการผลิตผักกินใบของเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนพบการระบาดของด้วงหมัดผักอย่างรุนแรงโดยเฉพาะในผักกวางตุ้ง และคะน้า เสาวนิตย์และคณะ (2555) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมเพื่อป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในห้องปฏิบัติการ พบว่า เชื้อราเขียวเมตาไรเซียม ไอโซเลต M3, M5, M7, M8, M2, M9, M1, M0 และ M6 ที่ปรับความเข้มข้น 1x 10^9 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพทำให้ด้วงหมัดผักติดเชื้อราเขียวได้ดีไม่แตกต่างกันในทางสถิติ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เฉลี่ย 100, 100, 100, 97.50, 95, 91.25, 90, 88.75 และ 85% ตามลำดับ และได้เลือกราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลต M3 มาเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณ โดยเริ่มต้นจากการเลี้ยงในอาหารเหลว Potato dextrose broth บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำมาเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณบนเมล็ดข้าวโพดบดหยาบปลอดเชื้อ เป็นเวลา 14 วัน นำมาล้างโคนิเดียออกจากเมล็ดข้าวโพดกรองแยกโคนิเดียนำไปอบที่อุณภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 ชั่วโมง แล้วนำไปใช้ทดสอบการควบคุมด้วงหมัดผักในสภาพไร่ในพื้นที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี และแปลงเกษตรกรที่ อ.ท่ามะกา จ กาญจนบุรี พบว่า การใช้ราเขียวไอโซเลต M3 ไม่สามารถควบคุมประชากรด้วงหมัดผักได้ทั้ง 2 พื้นที่ เนื่องจากระยะเวลาและเทคนิคการใช้ยังไม่เหมาะสม (เสาวนิตย์และคณะ, 2556) ปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากเชื้อรานิยมใช้ในรูปแบบหัวเชื้อสด โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เช่น Potato dextrose broth (PDB) Potato Dextrose Agar (PDA) Malt agar (MA) Potato Sucrose Agar (PSA) Oatmeal Agar (OA) และSabouraud Dextrose Agar plus Yeast (SDAY) แล้วนำมาเพิ่มปริมาณในเมล็ดธัญพืช ได้แก่ เมล็ดข้าวโพดบดหยาบ ข้าวจ้าวเสาไห้ และข้าวเปลือก (เสาวนิตย์ และคณะ, 2548; ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ม.ป.ป; Philippine Rice Research Institute, 2022; เบญจพร และคณะ, 2565) โดยกระบวนการเลี้ยงและขยายเพิ่มปริมาณเชื้อต้องทำในตู้ปลอดเชื้อ และต้องใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้เป็นข้อจำกัดในการส่งเสริมระดับเกษตรกร อีกทั้งหัวเชื้อราสดในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถคงความมีชีวิตและประสิทธิภาพได้นาน ถึงแม้จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ 4-5 องศาเซลเซียส ซึ่งมีอายุเก็บรักษาประมาณ 15 วัน (สุลีวรรณ ตั้นซู่ และคณะ, 2560) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบอาหารที่เหมาะสมสำหรับผลิตหัวเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 ที่สามารถเก็บรักษาได้นาน มีปริมาณและประสิทธิภาพในการควบคุมด้วงหมัดผัก และเกษตรกรสามารถนำไปใช้เพิ่มปริมาณเป็นชีวภัณฑ์ชนิดเชื้อสดได้ด้วยตนเอง และทดสอบวิธีการนำไปใช้ควบคุมด้วงหมัดผักเพื่อให้ได้อัตราและวิธีการใช้ที่มีประสิทธิภาพสำหรับนำไปทดสอบในแปลงเกษตรกรที่พบการระบาดของด้วงหมัดผักในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงตอนบนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดสอบอาหารสำหรับผลิตหัวเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3

วางแผนการทดลองแบบ Split plot design จำนวน 3 ซ้ำ ประกอบด้วย ปัจจัยหลัก (Main plot) คือ อาหารสำหรับทำหัวเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บดหยาบ และ ข้าวเปลือก ปัจจัยรอง (Subplot) คือ ระยะเวลาเก็บรักษาหัวเชื้อ คือ 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน

เตรียมอาหารสำหรับทำหัวเชื้อ โดยนำเมล็ดข้าวฟ่าง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บดหยาบ และข้าวเปลือก มาต้มจนเมล็ดนิ่ม แล้วนำเมล็ดมาผึ่งลมให้หมาด จากนั้นบรรจุในขวดกลมโซดา ปริมาณ 50 กรัมต่อขวด ปิดด้วยจุกสำลี ทับด้วยกระดาษ 2 ชั้น แล้วรัดด้วยยางรัด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 30 นาที หลังจากที่อาหารเย็นแล้ว นำเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 ที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน มาเลี้ยงโดยใช้เข็มเขี่ยปลอดเชื้อตัดปลาย

เส้นใยขนาด 1X1 เซนติเมตร จำนวน 1 ชิ้นต่อขวด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน จึงนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (4±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 เดือน

ตรวจสอบปริมาณเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 ที่มีชีวิต และประสิทธิภาพการก่อโรคในด้วงหมัดผักของหัวเชื้อในอาหารแต่ละชนิด โดยนำหัวเชื้อที่เก็บรักษา 0 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน มาตรวจนับปริมาณของเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 ที่มีชีวิตด้วยวิธี Dilution plating technique บนอาหารในจานเพาะเชื้อ PDA ที่ระดับการเจือจาง 10^{-5} 10^{-7} และ 10^{-9} จำนวน 3 จานต่อระดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน และทดสอบการก่อโรคในด้วงหมัดผัก โดยนำหัวเชื้อในอาหารแต่ละชนิดมาเพิ่มปริมาณในข้าวสวยบ่มที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน ปรับความเข้มข้น 1x 10^{10} โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดสปอร์แขวนลอยปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่วางอยู่ในจานอาหารปลอดเชื้อ จากนั้นปล่อยด้วงหมัดผักจำนวน 10 ตัวต่อจาน จำนวน 3 จานต่อกรรมวิธี เป็นเวลา 7 วัน

บันทึกผลโดยนับจำนวนโคโลนีของเชื้อราเมตไรเซียม DOA-M3 ที่เจริญบนอาหาร PDA คำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมของหัวเชื้อ และตรวจนับจำนวนหมัดผักที่ติดเชื้อราภายใต้กล้องสเตอริโอ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละกรรมวิธีโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

การทดสอบวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เมตาไรเซียม DOA-M3 ควบคุมด้วงหมัดผักในผักกวางตุ้งสภาพแปลงทดลอง

การเตรียมชีวภัณฑ์เมตาไรเซียม DOA-M3 ชนิดเชื้อสด

นำหัวเชื้อ 5-10 เมล็ด มาเพิ่มปริมาณในข้าวสวยที่ใช้วิธีการหุงข้าวแบบใช้น้ำน้อย (ข้าว 3 ส่วนต่อน้ำ 2 ส่วน) บรรจุในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 6X9 นิ้ว ปริมาณ 125 กรัมต่อถุง รัดยางตรงปากถุงให้แน่น แล้วใช้เข็มสะอาดแทงรอบๆ ปากถุงบริเวณใต้ที่รัดยาง ถุงละประมาณ 15-20 จุด นำไปบ่มในห้องที่มีแสง และอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน

การเตรียมแปลงทดลอง และพืชทดสอบ

ไถตากดินตากแดดประมาณ 7 วัน แล้วไถพรวนอีก 1-2 ครั้ง ทำแปลงทดสอบขนาด 1X 30 เมตร จำนวน 4 แปลง หว่านโดโลไมท์ อัตรา 260 กิโลกรัมต่อไร่ ปุ๋ยคอกอัตรา 4 ตันต่อไร่ แต่ละแปลงแบ่งเป็นแปลงย่อยขนาด 1x5 เมตร จำนวน 6 แปลงย่อย หยอดเมล็ดผักกวางตุ้งในหลุมปลูก ระยะปลูก 20X25 เซนติเมตร จำนวน 4 แถวๆละ 20 หลุม รวม 80 หลุมต่อพื้นที่ 5 ตารางเมตร รดน้ำด้วยระบบมินิสปริงเกอร์ ให้ทั่วทั้งแปลง เมื่อต้นผักกวางตุ้งแข็งแรง ถอนให้เหลือหลุมละ 1 ต้น หว่านปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ หลังหยอดเมล็ด 14 วัน และเพิ่มอัตราเป็น 100 กิโลกรัมต่อไร่ หลังหยอดเมล็ด 21 และ 30 วัน แล้วเปลี่ยนเป็นปุ๋ยเคมีสูตร 13-13-21 อัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ หลังหยอดเมล็ด 45 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่ผักกวางตุ้งออกดอก ให้น้ำด้วยระบบมินิสปริงเกอร์ วันละ 1-2 ครั้ง และหลังจากใส่ปุ๋ยทันที เก็บผลผลิตระยะที่ดอกบานสีเหลือง

การทดสอบวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เมตาไรเซียม DOA-M3 ควบคุมด้วงหมัดผัก

ทำการทดสอบ 2 ฤดูปลูก คือ เดือนเมษายน – มิถุนายน 2565 (ฤดูร้อน) และ เดือนตุลาคม– ธันวาคม 2565 (ฤดูหนาว) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Randomized complete block) 6 กรรมวิธีๆละ 4 ซ้ำ (ซ้ำละ 48 ต้นในพื้นที่ปลูก 3 ตารางเมตร) ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พ่นเชื้อราเมตาไรเซียม ที่มีความเข้มข้น 1x 10^{9} โคนิเดียต่อมิลลิลิตร (ชีวภัณฑ์เชื้อสดอัตรา 500 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กรองแยกเมล็ดข้าวออก) อัตรา 100 ลิตรต่อไร่ หลังจากเมล็ดงอกทุก 7 วัน จนเก็บผลผลิต

กรรมวิธีที่ 2 พ่นเชื้อราเมตาไรเซียม ที่มีความเข้มข้น 5x 10^{9} โคนิเดียต่อมิลลิลิตร (ชีวภัณฑ์เชื้อสดอัตรา 1,000 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กรองแยกเมล็ดข้าวออก) อัตรา 100 ลิตรต่อไร่ หลังจากเมล็ดงอกทุก 7 วัน จนเก็บผลผลิต

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเชื้อราเมตาไรเซียม ที่มีความเข้มข้น 1x 10^{10} โคนิเดียต่อมิลลิลิตร (ชีวภัณฑ์เชื้อสดอัตรา 2,000 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตรกรองแยกเมล็ดข้าวออก) อัตรา 100 ลิตรต่อไร่ หลังจากเมล็ดงอกทุก 7 วัน จนเก็บผลผลิต

กรรมวิธีที่ 4 รดหรือพ่นไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย จำนวน 120 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร ฉีดหรือรดให้ครอบคลุมพื้นที่กว้าง 1x20 เมตร ก่อนปลูก และหลังปลูกทุก 7 วัน ติดต่อกันจนเก็บผลผลิต

กรรมวิธีที่ 5 พ่นสารเคมี fipronil 5% SC อัตรา 50 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร เมื่อพบตัวเต็มวัย 1 ตัวต่อต้น พ่นทุก 7 วัน และหยุดใช้ก่อนเก็บเกี่ยวผลผลิต 7 วัน ตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร

กรรมวิธีที่ 6 ชุดควบคุม (พ่นน้ำเปล่า)

บันทึกข้อมูล โดยนับจำนวนด้วงหมัดผักในตอนเย็นที่พบบนต้นผักกวางตุ้งทุกต้นในพื้นที่ปลูก 3 ตารางเมตรต่อซ้ำในแต่ละกรรมวิธี ทุก 7 วัน จนเก็บผลผลิต ข้อมูลผลผลิต ได้แก่ จำนวนยอดต่อต้น และผลผลิตต่อตารางเมตร วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละกรรมวิธีโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดสอบอาหารสำหรับผลิตหัวเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3

จากการทดสอบเตรียมหัวเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 ในอาหาร 3 ชนิด (Figure 1) นำไปเก็บรักษาในตู้เย็น (อุณหภูมิ4±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า ชนิดของอาหารและระยะเวลาเก็บรักษามีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันทางสถิติ หัวเชื้อที่เก็บรักษาได้นาน 6 เดือน คือ หัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่าง และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บดหยาบ โดยมีปริมาณของเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ $4.67x10^{7}$ และ $5.67x10^{7}$ โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณของเชื้อที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับปริมาณก่อนเก็บรักษา แต่จะมีปริมาณมากที่สุดที่อายุเก็บรักษา 3-4 เดือน ขณะที่หัวเชื้อเมล็ดข้าวเปลือก มีอายุเก็บรักษาได้เพียง 5 เดือน และมีปริมาณเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 เพียง $1.53x10^{7}$ โคโลนีต่อกรัม น้อยกว่าหัวเชื้อทั้งสองชนิด (Table 1 Figure 2) และจากการทดสอบประสิทธิภาพควบคุมด้วงหมัดผัก พบว่า หัวเชื้อข้าวฟ่าง และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บดหยาบ ก่อนเก็บและหลังเก็บไว้ 6 เดือน แล้วนำมาผลิตขยายเป็นชีวภัณฑ์เชื้อสดในข้าวสวย มีประสิทธิภาพควบคุมด้วงหมัดผักได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีการติดเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 ในด้วงหมัดผักอยู่ระหว่าง 89 -100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่หัวเชื้อข้าวเปลือกมีประสิทธิภาพควบคุมด้วงหมัดผักได้เพียง 5 เดือน มีการติดเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 ในด้วงหมัดผักอยู่ระหว่าง 88 -100 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของเสาวนิตย์และคณะ (2556) (Table 2 Figure 3) โดยต้นทุนของเมล็ดข้าวฟ่าง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บดหยาบ และข้าวเปลือก ที่นำมาผลิตหัวเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 ปริมาณ 50 กรัมต่อขวด เท่ากับ 1.50 2.10 และ 0.75 บาท ตามลำดับ

Figure 1 *Metarhizium* DOA-M3 grew in sorghum grains, ground maize kernels and paddy grains for 10 days before being stored at the refrigerator temperature (4±2°C)

Table 1 The amount of *Metarhizium* DOA-M3 on PDA for 7 days after cultured in each medium stored at the refrigerator temperature (4±2°C) for 6 months

Treatment	The amount of *Metarhizium* DOA-M3 colonies (cfu/g)							CV (B)
	0	1 month	2 month	3 month	4 month	5 month	6 month	(%)
sorghum grains	$8.67x10^{7}$bBC	$2.93x10^{8}$aB	$1.30x10^{8}$bBC	$2.97x10^{9}$bA	$3.90x10^{9}$aA	$1.60x10^{8}$aBC	$4.67x10^{7}$aC	18.20
ground maize kernels	$3.90 x10^{8}$aB	$2.60x10^{8}$aBC	$6.83 x10^{8}$aB	$7.60x10^{9}$aA	$6.30x10^{9}$aA	$2.43x10^{9}$aBC	$5.67x10^{7}$aC	15.87
paddy grains	$4.00x10^{6}$cD	$2.33x10^{6}$bD	$7.00x10^{6}$cCD	$3.33x10^{7}$cA	$1.27x10^{7}$bBC	$1.53x10^{7}$bB	0.00bE	24.51
CV (A) (%)	13.46	15.57	14.96	12.18	20.52	13.99	22.85	

Means within the same column with a common lowercase letter are not significantly different by DMRT ($P < 0.05$)

Means within the same row with a common uppercase letter are not significantly different by DMRT ($P < 0.05$)

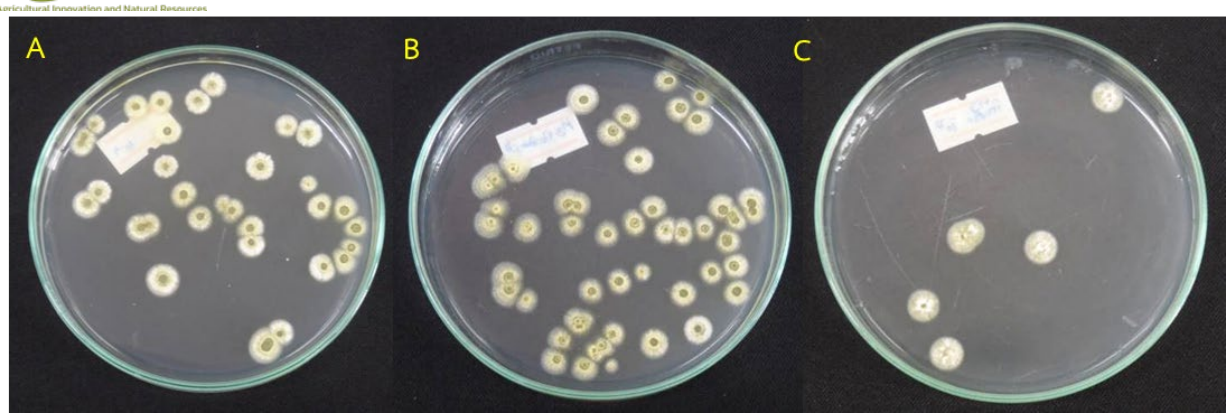

Figure 2 Colonies of *Metarhizium* DOA-M3 on PDA for 7 days after cultured in each medium stored at the refrigerator temperature (4±2°C) for 3 months. (A) sorghum grains (B) ground maize kernels and(C) paddy grains.

Table 2 Percent mortality of flea beetles after inoculated conidia suspension of *Metarhizium* DOA-M3 cultured in each medium preserved for 6 months

Treatment	% Mortality of flea beetles[1]							CV (B)
	0	1 month	2 month	3 month	4 month	5 month	6 month	(%)
sorghum grains	100.0a	95.3a	100.0a	100.0a	100.0a	100.0a	96.3a	3.1
ground maize kernels	100.0a	89.0a	100.0a	100.0a	91.7a	100.0a	100.0a	9.6
paddy grains	100.0aA	100.0aA	94.3aA	91.7aA	88.7bA	100.0aA	0.0bB	8.2
sterile water	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0c	0.0b	0.0b	0.0
CV (A) (%)	0.0	15.4	6.7	15.6	6.8	0.0	0.0	

Means within the same column with a common lowercase letter are not significantly different by DMRT ($P < 0.05$)

Means within the same row with a common uppercase letter are not significantly different by DMRT ($P < 0.05$)

[1]Mortality at day 7 after inoculation

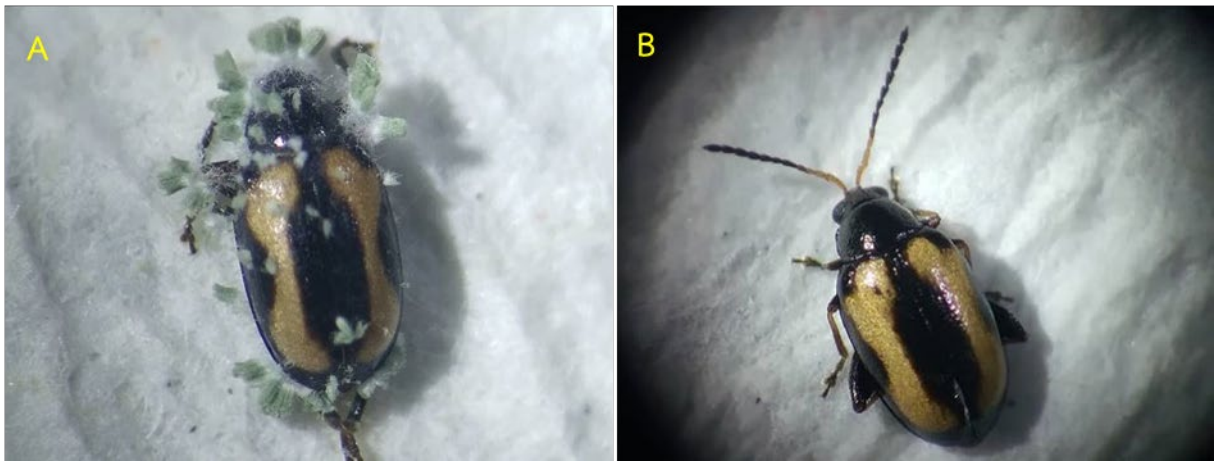

Figure 3 (A) *Metarhizium* DOA-M3 produced conidial on flea beetles after inoculation for 7 days compared with (B) control treatment (un-inoculated *Metarhizium* DOA-M3)

การทดสอบวิธีการใช้ชีวภัณฑ์เมตาไรเซียม DOA-M3 ควบคุมด้วงหมัดผักในผักกวางตุ้งสภาพแปลงทดลอง

การทดสอบครั้งที่ 1 เดือนเมษายน – มิถุนายน 2565 จากการทดสอบควบคุมด้วงหมัดผักในกวางตุ้งสภาพแปลงทดลองที่สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 จังหวัดขอนแก่น พบว่า กรรมวิธีฉีดพ่นสารเคมี fipronil 5% SC อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ทุกสัปดาห์ ควบคุมด้วงหมัดผักได้ดีที่สุด พบด้วงหมัดผักเข้าทำลายผักกวางตุ้งในสัปดาห์ที่ 6 เฉลี่ย 0.05 ตัวต่อตารางเมตร รองลงมา คือ การใช้ชีวภัณฑ์เมตาไรเซียม อัตรา 2,000 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง มีจำนวนด้วงหมัดผัก 0.35 และ 0.45 ตัวต่อตารางเมตร ตามลำดับ สำหรับผลผลิตของผักกวางตุ้ง พบว่า กรรมวิธีฉีดพ่นสารเคมี fipronil 5% ให้ผลผลิตต่อไร่มากที่สุด คือ 650 กรัมต่อตารางเมตร ขณะที่กรรมวิธีอื่นให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยผลผลิตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 262-434 กรัมต่อตารางเมตร (Table 3) เนื่องจากพบการระบาดของเพลี้ยอ่อนในทุกกรรมวิธีที่ทดสอบ ยกเว้นกรรมวิธีที่ฉีดพ่นสารเคมี fipronil 5% ซึ่งงานวิจัยของ Din และคณะ (2022) พบว่า สารเคมี fipronil 5% สามารถควบคุมเพลี้ยอ่อนได้เป็นอย่างมีประสิทธิภาพ จึงทำให้ผลผลิตของกวางตุ้งในกรรมวิธีใช้สารเคมีมากกว่ากรรมวิธีอื่น ขณะที่เชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 เป็นไอโซเลตที่มีความจำเพาะไม่สามารถก่อโรคในเพลี้ยอ่อน

การทดสอบครั้งที่ 2 เดือนตุลาคม– ธันวาคม 2565 พบว่า ด้วงหมัดผักเริ่มเข้าทำลายผักกวางตุ้งในสัปดาห์ที่ 8 หลังจากหยอดเมล็ด ช้ากว่าฤดูร้อน และกรรมวิธีฉีดพ่นสารเคมี fipronil 5% SC ชีวภัณฑ์เมตาไรเซียม อัตรา 2,000 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง สามารถควบคุมด้วงหมัดผักได้ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยพบจำนวนด้วงหมัดผักเฉลี่ย 0.34 1.50 และ 1.50 ตัวต่อตารางเมตร ตามลำดับ สำหรับผลผลิตของผักกวางตุ้ง พบว่าทุกกรรมวิธีให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยให้ผลผลิตอยู่ระหว่าง 1,349 - 1,519 กรัมต่อตารางเมตร (Table 4) แสดงว่าชีวภัณฑ์เมตาไรเซียม DOA-M3 ไม่มีผลต่อการเจริญและผลผลิตของกวางตุ้ง ไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช สอดคล้องกับงานวิจัยของ นาวิน และคณะ (2559)

Table 3 Number of flea beetles and yield of Chinese flowering cabbage in the 1st cropping (April-May 2022)

Treatment	Number of flea beetles/m^2 after sowing					Shoots/ plant	Yield (g/m^2)
	2 week	3 week	4 week	5 week	6 week		
Metarhizium DOA-M3 500 g	0.60c	0.40bc	0.20bc	0.20ab	0.75c	2.04^{ns}	434b
Metarhizium DOA-M3 1,000 g	0.65c	0.65cd	0.45c	0.60c	0.80c	1.85	362b
Metarhizium DOA-M3 2,000 g	0.30b	0.40bc	0.10ab	0.30b	0.35ab	1.75	360b
Steinernema siamkayai Thai strain	0.25b	0.25b	0.30c	0.15ab	0.45cb	1.65	342b
fipronil 5% SC	0.00a	0.00a	0.00a	0.00a	0.05a	1.89	650a
control	0.85c	0.80d	1.35d	0.80d	1.50d	1.66	262b
CV (%)	21.82	25.11	31.39	37.15	35.31	19.34	26.41

Means within the same column with a common lowercase letter are not significantly different by DMRT ($P < 0.05$)
ns= non-significant

Table 4 Number of flea beetles and yield of Chinese flowering cabbage in the 2nd cropping (October -November 2022)

Treatment	Number of flea beetles/m^2 after sowing		Shoots/ plant	Yield (g/m^2)
	8 week	9 week		
Metarhizium DOA-M3 500 g	2.11a	2.00b	1.51^{ns}	1,430^{ns}
Metarhizium DOA-M3 1,000 g	4.03b	2.61b	1.38	1,417
Metarhizium DOA-M3 2,000 g	1.48a	1.50ab	1.49	1,349
Steinernema siamkayai Thai strain	1.16a	1.50ab	1.56	1,436
fipronil 5% SC	1.27a	0.34a	1.44	1,519
control	4.24b	3.31c	1.82	1,453
CV (%)	18.66	36.91	12.29	9.00

Means within the same column with a common lowercase letter are not significantly different by DMRT ($P < 0.05$)
ns= non-significant

สรุปผล

อาหารที่เหมาะสมสำหรับเตรียมหัวเชื้อราเมตาไรเซียม DOA-M3 คือ เมล็ดข้าวฟ่าง สามารถเก็บรักษาในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส) ได้นาน 6 เดือน มีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บดหยาบ และง่ายต่อการนำไปเพิ่มปริมาณในข้าวสวยสำหรับผลิตเป็นชีวภัณฑ์เชื้อสดในการควบคุมด้วงหมัดผัก โดยอัตราและวิธีการใช้ พบว่า เชื้อสดอัตรา 2,000 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กรองแยกส่วนของข้าวสวยออก แล้วนำสปอร์แขวนลอยผสมสารจับใบตามคำแนะนำข้างฉลาก ฉีดพ่นตอนเย็น ลงบนต้นผักกวางตุ้งจนต้นเปียก หลังจากเมล็ดงอก และพ่นซ้ำทุก 7 วัน จนเก็บผลผลิต สามารถควบคุมด้วงหมัดผักได้ดีเช่นเดียวกับการใช้สารเคมี fipronil 5%

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ รษก.ผชช.เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อรา *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin ไอโซเลต M3 และ กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นาวิน สุขเลิศ, จิราพร กุลสาริน, ไสว บรูณพานิชพันธุ และวีรเทพ พงษ์ประเสริฐ. 2559. ประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์เชื้อรากำจัดแมลงในการควบคุมด้วงหมัดผักแถบลาย ในเบบี้ฮ่องเต้บนพื้นที่สูงของจังหวัดเชียงใหม่. วารสารเกษตร 32(2): 171 - 180

เบญจพร ชำนาญ, ขวัญฤดี สุวะไกร, ทิพย์สุคนธ์ อนุภาพ, ทัศนีย์ แจ่มจรรยา, นุชรีย์ ศิริ, ยุวธิดา ศรีพลแท่น, อุบล ตังควานิช และประกายจันทร์ นิ่มกิ่งรัตน์. 2565. การใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมด้วงหมัดผักแถบลาย (*Phyllotreta sinauta* Stephen) (Coleoptera: Chrysomelidae) ในกวางตุ้ง. แก่นเกษตร 50(4): 932-944.

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. ม.ป.ป. เมตาไรเซียม: ราเขียวกำจัดแมลงศัตรูพืช. เข้าถึงได้จาก: https://www.nstda.or.th/agritec/wp-content/uploads/2021/01/METARHZIUM.pdf [เข้าถึงเมื่อ 5 กรกฎาคม 2556].

สุลีวรรณ ตั้นชู่, วิสูตร หมัดหมีด และนิพวรรณ หมีทอง. 2560. การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. เข้าถึงได้จาก: http://www.pmc06.doae.go.th/training%20document/file%20document%20biocontrol.pdf [เข้าถึงเมื่อ 6 กรกฎาคม 2556].

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์, อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และอนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ. 2548. การวิจัยและพัฒนาการผลิตและ ใช้เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* เพื่อประโยชน์ทางการเกษตร. หน้า 1785-1808. ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2548 เล่ม 2. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์, อิศเรส เทียนทัด และวิไลวรรณ เวชยันต์. 2556. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา เมตาไรเซียม *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokinเพื่อป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก; *Phyllotreta sinuuta* (Stephens). หน้า 693 - 703. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจาปี 2556. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Din, M.ud, Khan, S. A., Shah, S. H. and Ullah, N. 2022. Efficacy of different pesticides against Mustard Aphid, *Lipaphis Erysimi* in selected Mustard cultivars. Pakistan Journal of Agricultural Research 35 (2):374-379.

Phillipine Rice Research Institue. 2022. *Metarhizium* Micobial control agent for rice black bug. Available from: https://www.pinoyrice.com/?wpdmdl=3296 [accessed on 12 May 2023].