รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี

   กิจกรรมที่ 2 : การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

   กิจกรรมย่อยที่ 2.3 : การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมแมลงศัตรูพืช

3. **ชื่อการทดลอง** : การศึกษาวิธีการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) สายพันธุ์ชุมพร

   : Development on techniques for mass production of *Beauveria bassiana* (Balsamo); Chumphon isolate

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

ชื่อหัวหน้าโครงการ	สาทิพย์ มาลี	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ชื่อ หัวหน้าการทดลอง	เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ชื่อผู้ร่วมงาน	อิศเรส เทียนทัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	วิไลวรรณ เวชยันต์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	เมธาสิทธิ์ คนการ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ**

เชื้อราบิวเวอเรีย *Beauveria bassiana* (Balsamo) ที่ใช้ศึกษาในห้องปฏิบัติการเป็นเชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ซึ่งทำการแยกเชื้อจากมอดเจาะเมล็ดกาแฟ และได้เริ่มนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ ตั้งแต่ปี 2555 ต่อมาในปีงบประมาณ 2557 – 2558 ได้ศึกษาถึงวิธีการเลี้ยงเชื้อราบิวเวอเรียสายพันธุ์ชุมพร โดยอาศัยพื้นฐานวิธีการเลี้ยงเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin การศึกษาในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อการคัดเลือกเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสม การศึกษาความชื้นในอาหาร แหล่งคาร์โบไฮเดรต และไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยการศึกษาเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมได้ใช้เมล็ดธัญพืชต่าง ๆ 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพดบดหยาบ ข้าวฟ่าง ข้าวเปลือก และปลายข้าว พบว่า เชื้อบิวเวอเรียสามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดีย ได้มากที่สุดบนข้าวโพดบดหยาบ โดยจะให้โคนิเดียประมาณ 18.35 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 9.46 X 10^8 cfu/มล. การศึกษาหาความชื้นที่เหมาะสมของข้าวโพดบดหยาบที่ใช้เลี้ยงเชื้อบิวเวอเรีย โดยการใช้สัดส่วนของข้าวโพดบดหยาบ (50 กรัม/ ถุง) ต่อปริมาณน้ำที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 10, 30, 50, 70 และ 90 มล. พบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมอยู่ที่ข้าวโพดบดหยาบ 50 กรัม ต่อปริมาณน้ำ 50 มล. หรือ 1: 1 จะให้เปอร์เซ็นต์ความชื้นประมาณ 54% ซึ่งทำให้เชื้อราสร้างโคนิเดียได้ 28.55 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมี

เปอร์เซ็นต์การงอก 11.37 X 10^8 cfu/มล. การศึกษาปริมาณโมลาสที่เหมาะสม มีการศึกษาที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10% และไม่ใส่โมลาส พบว่าไม่ใส่โมลาส เชื้อสามารถสร้างโคนิเดียได้ดีที่ 14.58 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีการงอกของโคนิเดียที่ 8.27 X 10^8 cfu/มล. ส่วนการศึกษาปริมาณยูเรียที่เหมาะสม มีการทดสอบยูเรียที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2 และไม่ใส่ยูเรีย พบว่า การไม่ใส่ยูเรียเชื้อบิวเวอเรียสามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียได้ดีที่ 34.07 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีการงอกของโคนิเดียที่ 10.14 X 10^8 cfu/มล.

Abstract

Beauveria bassiana (Balsamo) in this study received from chumphon Horticultural Research Center. This fungus isolated from coffee berryborer: *Hypothenemus hampei* (Ferrari) and conducted of bioassay test with insect pests since 2012. Techniques for mass production of *Beauveria bassiana* (Balsamo); Chumphon isolate were developed in the laboratory during October 2013 – September 2015 refer from basic study of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. The objective in this study for investigate the suitable cereal grains and suitable conditions for example moisture content, suitable volume of molasses and urea for producing the highest numbers of fungal conidia and higher number of viable population. *B. bassiana* was cultured on four different types of cereal grains: ground corn, sorghum, paddy and ground rice. The results showed that ground corn produced higher number of fungal conidia and higher number of viable population of 18.35 X 10^8 conidia/ml. and 9.46 X 10^8 cfu/ml respectively. Moisture content (MC) of ground corn was tested at the rate of ground corn 50 gram reared on 5 diferrent volume of water 10, 30, 50, 70 and 90 ml. and found that the suitable ratio of ground corn and water was1: 1 (w/v) which gave 54% MC and a higher number of conidia 28.55 X 10^8 conidia/ml. and higher number of viable population of 11.37 X 10^8 cfu/ml. The suitable volume of molasses at 6 different volume 0, 2, 4, 6, 8 and 10% found that cultured *B. bassiana* without molasses produced the higher number of fungal conidia and higher number of viable population at 14.58 X 10^8 conidia/ml. and 8.27 X 10^8 cfu/ml. respectively. Identically, the suitable volume of urea studied at 5 different level of urea 0, 0.5, 1, 1.5, 2 found that the fungus produced the higher number of conidia without urea, 34.07 X 10^8conidia/ml. and revealed viable population 10.14 X 10^8cfu/ml.

6. คำนำ

ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจงานด้านการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพมากขึ้น วิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจคือการนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ซึ่งนอกจากมีความปลอดภัยต่อ

สุขภาพของตัวเกษตรกรผู้ใช้รวมทั้งผู้บริโภคแล้ว ยังไม่ทำให้เกิดพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในสภาพแวดล้อม เชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) เป็นจุลินทรีย์ ที่นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota ซึ่งเชื้อราในกลุ่มนี้มักจะเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรค " muscadine" ในแมลง โดยใน *B. bassiana* มีการเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า "white muscadine" พบแพร่กระจายได้ทั่วไป สามารถใช้ควบคุมแมลงในกลุ่ม Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera และ Hymenoptera และ (Rosa และคณะ 2000; Tanada and Kaya, 1993) ในเมืองไทยมีการศึกษาการนำเชื้อราบิวเวอเรียมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชมากมาย จากรายงานผลงานค้นคว้าวิจัยตั้งแต่ปี 2525 -2539 โดยมลิวัลย์ ปันยารชุน กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา ได้ทำการศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราดังกล่าวกับแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ พบว่าสามารถนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดได้แก่ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และหนอนเจาะขั้วผลเงาะ เป็นต้น ในปัจจุบันเชื้อรา *B. bassiana* ได้รับความสนใจจากเกษตรกรกลุ่มผู้ทำการเกษตรปลอดสารพิษเป็นจำนวนมาก เนื่องจากสามารถใช้ได้กับแมลงหลายประเภททั้งกลุ่มแมลงปากกัด ได้แก่ หนอนผีเสื้อศัตรูพืชชนิดต่างๆ และกลุ่มแมลงปากดูดได้แก่ เพลี้ยกระโดด, เพลี้ยไฟ, เพลี้ยแป้ง ฯลฯ ซึ่งศัตรูพืชเหล่านี้ทำความเสียหายให้กับพืชผลเกษตรเป็นจำนวนมาก

สืบเนื่องจากงานวิจัยในปีงบประมาณ 2554 ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลงได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราบิวเวอเรีย *B. bassiana* จากคุณประภาพร ฉันทานุมัติ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ซึ่งได้แยกเชื้อราชนิดนี้จากมอดเจาะเมล็ดกาแฟพันธุ์อาราบิก้า ต. เทพเสด็จ อ. ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ และได้ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพดีในการควบคุมมอดเจาะเมล็ดกาแฟ ดังนั้นในปีงบประมาณ 2555 - 2556 ทางห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีววิธี จึงได้นำเชื้อราดังกล่าวมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ เพลี้ยแป้งสีชมพู หนอนกระทู้ผัก, หนอนกระทู้หอม ด้วงหมัดผัก ตั๊กแตนผี และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยพบว่า เชื้อราชนิดนี้มีแนวโน้มที่ดีในการใช้ควบคุมตั๊กแตนผี เพลี้ยแป้งสีชมพู ด้วงหมัดผัก และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

จากข้อมูลเดิมของมลิวัลย์ และสุรพล (2525) ได้ทำการศึกษาและพัฒนาการผลิตเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* โดยการเลี้ยงเชื้อราเขียวในเมล็ดธัญพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวโพด, ข้าวเปลือก, ข้าวฟ่าง, ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ซึ่งจากผลการทดลองได้สรุปว่า อาหารทั้ง 5 ชนิด สามารถผลิตราเขียวได้ปริมาณมากทุกชนิด แต่เนื่องจากข้าวโพด, ข้าวเปลือก และข้าวฟ่าง มีราคาประหยัดกว่าจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้มากกว่าถั่วเขียว และถั่วเหลือง จากนั้นได้ทดลองเลี้ยงราเขียวเพื่อเปรียบเทียบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของอาหารและน้ำ โดยใช้เมล็ดธัญพืช ได้แก่ ข้าวโพด, ข้าวเปลือก, ข้าวฟ่าง, ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ในปริมาณอย่างละ 40 กรัม จำนวน 5 ซ้ำ บรรจุในถุงพลาสติกทนร้อน แล้วจึงเติมน้ำประปาในอัตรา 40, 50, 60 และ 70 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเขี่ยเชื้อราเขียวลงไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองได้สรุปว่าราเขียวเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอัตราส่วน

ของ อาหารต่อน้ำประปา 40: 40 การใส่อัตราส่วน 40: 60 และ 40: 70 จะทำให้อาหารที่ได้แฉะเกินไปซึ่งจะมีผลทำให้เชื้อราอื่นๆ ขึ้นปะปนได้ง่าย จากข้อมูลการศึกษาการเลี้ยงเชื้อราเขียวที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าเชื้อราเขียวสามารถเจริญเติบโตได้บนเมล็ดธัญพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวโพด, ข้าวเปลือก, ข้าวฟ่าง, ถั่วเขียว และถั่วเหลือง แต่เนื่องจากข้อมูลเดิมยังไม่มีการชี้ชัดว่าเมล็ดธัญพืชชนิดใดทำให้เชื้อราเขียวสามารถสร้างโคนิเดียได้สูงสุด ต่อมาเสาวนิตย์ และคณะ (2548) ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยใช้ ข้าวเปลือก, ข้าวโพดบดหยาบ, ข้าวฟ่าง และปลายข้าว แทนการใช้ถั่วเขียว และถั่วเหลือง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28 – 30 องศาเซลเซียส พบว่าข้าวโพดบดหยาบมีความเหมาะสมต่อราเขียวมากที่สุดเนื่องจากทำให้ราเขียวสร้างโคนิเดียได้มากที่สุด 8.13 X 10^{11} โคนิดีย/กรัม และเกิดการงอกของเชื้อได้ดีที่สุดที่ 6.04 X 10^{10}(cfu/กรัม) การศึกษาความชื้นในอาหารโดยใช้ข้าวโพดบดหยาบต่อปริมาณน้ำในอัตรา (1: 1) ทำให้อาหารมีความชื้น 54% ราเขียวสร้างโคนิเดียได้ดีที่ 8.50 X 10^{11} โคนิดีย/กรัม นอกจากนี้ได้ศึกษาการใช้โมลาสและยูเรียเพื่อกระตุ้นการสร้างโคนิเดียและพบว่าการเติมโมลาส 4% กระตุ้นให้สร้างโคนิเดียได้สูงสุดที่ 5.00 X 10^{11} โคนิดีย/กรัม ส่วนการใส่ยูเรียไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

ในปีงบประมาณ 2557 – 2558 ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลงจะได้ศึกษาถึงวิธีการเลี้ยงเชื้อราบิวเวอเรีย โดยใช้สายพันธุ์ของ ศวส.ชุมพร ที่ได้ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชแล้ว โดยอาศัยพื้นฐานของวิธีการเลี้ยงเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดเลือกเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสม การศึกษาความชื้นในอาหาร แหล่งคาร์โบไฮเดรตและไนโตรเจนที่เหมาะสม ต่อเชื้อราบิวเวอเรียสายพันธุ์ชุมพร ผลที่ได้จากการศึกษาจะนำมาเป็นองค์ความรู้ของหน่วยงาน และเป็นพื้นฐานในการต่อยอดงานวิจัยเพื่อประโยชน์ในเชิงพานิชย์ต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อราบิวเวอเรีย *B. bassiana* สายพันธุ์ชุมพร
2. เมล็ดธัญพืชต่างๆ ได้แก่ ข้าวเปลือก, ปลายข้าว, ข้าวโพดบดหยาบ และข้าวฟ่าง
3. กากน้ำตาล (โมลาส)
4. ยูเรีย
5. Potato Dextrose Agar (PDA)
6. Potato Dextrose Broth (PDB)
7. กล่องเลี้ยงแมลง
8. ที่ดูดสปอร์ (Micropipet)
9. เครื่องนับสปอร์ (Hemacytometer)
10. ตู้เขี่ยเชื้อ
11. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

12. กล้องจุลทรรศน์
13. เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex)
14. บีกเกอร์ ขนาด 250, 500, 1000 มล.
15. กระบอกตวง ขนาด 250, 500, 1000 มล.
16. ฟลาสก์ ขนาด 250, 500 มล.
17. tween 80 (0.5%)

วิธีการ

<u>วิธีการเตรียมหัวเชื้อ</u>

นำเชื้อ *B. bassiana* มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ประมาณ 7 วัน ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อขึ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสกว้าง x ยาว = 1 x 1 ซม. ใส่ลงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 200 มล./ฟลาสก์ ในอัตรา 1 ชิ้น/1 ฟลาสก์ นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (Rotary Shaker) ความเร็วรอบประมาณ 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 27-28°C เป็นเวลาประมาณ 4 วัน เมื่อครบกำหนด นำเชื้อที่ได้มาตรวจหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย จากนั้น ดูดเชื้อจากขวดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อน ถ่ายใส่ลงในขวดอาหาร PDB ใหม่ ปริมาตร 2 มล./ ฟลาสก์ แล้วนำไปเลี้ยงซ้ำบนเครื่องเขย่าต่ออีก 4 วัน วิธีการนี้ จะได้หัวเชื้อที่มีปริมาณตั้งต้นใกล้เคียงกันในแต่ละฟลาสก์

<u>วิธีการตรวจนับการงอกของเชื้อ</u>

- โดยการเตรียมน้ำปริมาตร 100 มล. ผสม tween 80 (0.5%) 5 หยด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาเทใส่ถุงเลี้ยงเชื้อที่จะทำการตรวจสอบในอัตรา เชื้อรา 1 ถุง/น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มล. เขย่าประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้โคนิเดียหลุดออกจากเส้นใย แล้วจึงเทสารแขวนลอยโคนิเดียที่ได้ใส่ฟลาสก์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อเก็บเชื้อที่ได้เป็นสารแขวนลอยตั้งต้น (stock solution) สำหรับการตรวจสอบในขั้นต่อไป
- เตรียมน้ำซึ่งผสม tween (0.5%) ใส่หลอดทดลองปริมาตร 9 มล./หลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้น เขย่าฟลาสก์สารแขวนลอยตั้งต้น เพื่อให้โคนิเดียกระจายตัวทั่วทั้งฟลาสก์ แล้วจึงดูดสารแขวนลอยดังกล่าวปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ เขย่าหลอดทดลองโดยใช้เครื่อง vortex เพื่อทำให้โคนิเดียเจือจางลง (dilution) โดยถือว่า ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-1} ทำการเจือจางในลักษณะนี้จนถึงค่าที่ต้องการนับ
- ใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอยสุดท้ายที่ต้องการนับ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้สารแขวนลอยโคนิเดียกระจายทั่วทั้งจานเลี้ยงเชื้อทำ 10 ซ้ำ (1 ซ้ำ = 10 จานเลี้ยงเชื้อ) ปิดฝาและวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3 วัน เชื้อราจะเริ่มงอกเส้นใย
- ตรวจนับโคโลนีเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาชนิดธัญพืชที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ชุมพร

แบบและวิธีการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 4 กรรมวิธี

โดยใช้เมล็ดธัญพืชในการเพาะเลี้ยงเชื้อราบิวเวอเรีย 4 ชนิด ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ข้าวเปลือก

กรรมวิธีที่ 2 ปลายข้าว

กรรมวิธีที่ 3 ข้าวโพดบดหยาบ

กรรมวิธีที่ 4 ข้าวฟ่าง

ชั่งเมล็ดธัญพืชต่าง ๆ 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวเปลือก, ปลายข้าว, ข้าวโพดบดหยาบ และข้าวฟ่าง ใส่ในถุงพลาสติกทนความร้อน ชนิดละ 10 ถุง ถุงละ 50 กรัม แต่ละถุงเติมน้ำในปริมาตร 50 มล. ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ถ่ายใส่ในอัตรา 1 มล./ถุง คลุกเชื้อให้กระจายทั่วทั้งถุงอาหาร นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27 $\pm$ 3 °C) เป็นเวลา 7-14 วัน จึงนำเชื้อที่ขึ้นมาตรวจนับจำนวนโคนิเดีย โดยนับทั้ง 10 ซ้ำๆ ละ 10 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย และนำสารแขวนลอยโคนิเดียมาตรวจหาการงอกของเชื้อ บันทึกข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบความเหมาะสมของธัญพืชในการเป็นอาหารเพาะเลี้ยง โดยนับจำนวนโคนิเดีย และการงอกของเชื้อ

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ชุมพรบนเมล็ดธัญพืช

แบบและวิธีการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 5 กรรมวิธี

โดยเลือกเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 1 ชั่งใส่ถุงปริมาตร 50 กรัม เติมน้ำในอัตราต่างๆ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำปริมาตร 10 มล.

กรรมวิธีที่ 2 น้ำปริมาตร 30 มล.

กรรมวิธีที่ 3 น้ำปริมาตร 50 มล.

กรรมวิธีที่ 4 น้ำปริมาตร 70 มล.

กรรมวิธีที่ 5 น้ำปริมาตร 90 มล.

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เลือกเมล็ดธัญพืชที่ดีที่สุดจากขั้นตอนที่ 1 นำมาชั่งปริมาตร 50 กรัม/ถุง เติมน้ำในปริมาณที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 10, 30, 50, 70 และ 90 มล. ตามลำดับ (10 ถุง/กรรมวิธี) ปิดถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น แบ่งอาหารที่เตรียมได้ออกเป็น 2 ส่วน

- ส่วนที่ 1 (5 ถุง/กรรมวิธี) นำอาหารในแต่ละถุงมาแบ่งชั่งน้ำหนักสดถุงละ 50 กรัม จากนั้นนำไปอบในตู้ที่อุณหภูมิ 103 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง แล้วเข้าสูตรเพื่อคำนวนหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของอาหารในแต่ละทรีทเมนต์

- ส่วนที่ 2 (5 ถุง/กรรมวิธี) นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้มาถ่ายใส่ในอัตรา 1 มล./ถุง คลุกให้เชื้อกระจายทั่วอาหาร นำไปวางบนชั้นที่เตรียมไว้แบบสุ่ม ทิ้งไว้ 7 วัน นำเชื้อที่ได้มาตรวจนับปริมาณโคนิเดียเพื่อเปรียบเทียบหาความชื้นที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากความชื้นของอาหาร และปริมาณโคนิเดียที่ได้

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาความเข้มข้นโมลาสที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ชุมพร

แบบและวิธีการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 6 กรรมวิธี

โดยใช้โมลาสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 โมลาส 2%

กรรมวิธีที่ 2 โมลาส 4%

กรรมวิธีที่ 3 โมลาส 6%

กรรมวิธีที่ 4 โมลาส 8%

กรรมวิธีที่ 5 โมลาส 10%

กรรมวิธีที่ 6 ไม่ใส่โมลาส (control)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ทำการทดลองโดยเลือกวิธีการที่ดีที่สุดจากขั้นตอนที่ 2 คือการเตรียมอาหารธัญพืช 50 กรัม ต่อน้ำอัตราที่เหมาะสม และเติมโมลาสในอัตราความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังกล่าว 6 กรรมวิธี ทำการทดลอง 10 ซ้ำ คลุกให้โมลาส กระจายทั่วเมล็ดธัญพืช ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในอัตรา 1 มล./ถุง คลุกให้เชื้อ กระจายทั่วอาหาร นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27 – 30 °C) เป็นเวลา 7-14 วัน จึงนำเชื้อที่ได้มานับปริมาณโคนิเดีย และการงอกของเชื้อ จากนั้นบันทึกข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์ผลต่อไป

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาปริมาณยูเรียที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ชุมพร

แบบและวิธีการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 5 กรรมวิธี

โดยใช้ความเข้มข้นยูเรียในระดับต่างๆ กัน ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ยูเรีย 0.5%

กรรมวิธีที่ 2 ยูเรีย 1.0%

กรรมวิธีที่ 3 ยูเรีย 1.5%

กรรมวิธีที่ 4 ยูเรีย 2.0%

กรรมวิธีที่ 5 ไม่ใส่ยูเรีย (control)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เลือกวิธีการที่ดีที่สุดจากขั้นตอนที่ 3 มาศึกษาต่อเนื่อง คือการเตรียมอาหารธัญพืช 50 กรัม ต่ออัตราน้ำและโมลาสที่เหมาะสม จากนั้นเติมยูเรียตามกรรมวิธีต่างๆ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% เตรียมอาหารใส่ถุงพลาสติกทนร้อนปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในอัตรา 1 มล./ถุง คลุกให้เชื้อกระจายทั่วอาหาร นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27 – 30 °C) เป็นเวลา 7-14 วัน จึงทำการตรวจนับปริมาณโคนิเดีย และการงอกของเชื้อ บันทึกข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์

การบันทึกข้อมูล

- เก็บข้อมูลโดยการนับจำนวนโคนิเดียของเชื้อที่ผลิตได้ในอาหารแต่ละวิธีการเพื่อเปรียบเทียบปริมาณโคนิเดีย
- วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

เวลาและสถานที่

: เริ่มต้น ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558
ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาหาเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสม โดยใช้เมล็ดธัญพืช 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพดบดหยาบ ข้าวฟ่าง ข้าวเปลือก และปลายข้าว พบว่า เชื้อบิวเวอเรียสามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดีย ได้มากที่สุดบนข้าวโพดบดหยาบ โดยจะให้โคนิเดีย 18.35 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 9.46 X 10^8 cfu/มล. รองลงมาคือ ข้าวฟ่าง ให้จำนวนโคนิเดีย 12.04 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 8.15 X 10^8 cfu/มล. ส่วนข้าวเปลือก และปลายข้าว พบว่าให้จำนวนโคนิเดีย และมีเปอร์เซ็นต์การงอกไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยข้าวเปลือกให้จำนวนโคนิเดีย 8.48 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 5.84 X 10^8 cfu/มล. ส่วนปลายข้าว พบว่าให้จำนวนโคนิเดีย 8.67 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 5.77 X 10^8 cfu/มล. (Table 1) ผลการเลี้ยงเชื้อราบิวเวอเรียด้วยเมล็ดธัญพืชพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ เสาวนิตย์ และคณะ (2548) ที่ทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมบนเมล็ดธัญพืชต่างๆ พบว่า เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียได้ดีบนข้าวโพดบดหยาบ ส่วนข้าวฟ่าง ข้าวเปลือก และปลายข้าว เชื้อราเขียวมีการเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาหาความชื้นที่เหมาะสมของข้าวโพดบดหยาบที่ใช้เลี้ยงเชื้อบิวเวอเรีย โดยการใช้สัดส่วนของข้าวโพดบดหยาบ (50 กรัม/ถุง) ต่อปริมาณน้ำที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 10, 30, 50, 70 และ 90 มล. พบว่าอาหารที่เตรียมมีความชื้นในอาหารอยู่ที่ 25, 43, 54, 61 และ 66% ตามลำดับ อัตราส่วนที่เหมาะสมในการสร้างโคนิเดียอยู่ที่ข้าวโพดบดหยาบ 50 กรัม ต่อปริมาณน้ำ 50 มล. หรือ 1: 1 และข้าวโพดบดหยาบ 50 กรัม ต่อปริมาณน้ำ 70 มล. โดยจะให้เปอร์เซ็นต์ความชื้นประมาณ 54% และ 61% ตามลำดับ ซึ่งทำให้เชื้อราสร้างโคนิเดียได้ 28.55 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และ 28.15 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 11.37 X 10^8 cfu/มล. และ 11.21 X 10^8 cfu/มล. ตามลำดับ การเพิ่มอัตราส่วนน้ำที่มากเกินไปคือ 90 มล. หรือน้อยเกินไป คือ 30 และ 10 มล. มีผลให้จำนวนโคนิเดีย และเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อราบิวเวอเรียลดลง (Table 2) ผลการทดลองสอดคล้องกับ เสาวนิตย์ และคณะ (2548) ที่ทดสอบการเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมโดยใช้ปริมาณน้ำที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 10, 30, 50, 70 และ 90 มล. และพบว่า อาหารที่เตรียมมีความชื้นประมาณ 25, 43, 54, 62 และ 69% ตามลำดับ และเชื้อราเขียวเจริญได้ดี เมื่อใส่อัตราน้ำที่ 50 - 90 โดยความชื้นในช่วงดังกล่าวให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยการทดลองครั้งนั้นเลือกใช้น้ำที่ปริมาตร 50 มล. ซึ่งวัดความชื้นได้ 54% แทนปริมาณน้ำที่ 70 และ 90 มล. เนื่องจากคำนึงถึงต้นทุนการผลิต การประหยัดน้ำและประหยัดพลังงานในการทำเป็นผงแห้ง นอกจากนี้ ยังคำนึงถึงการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ การเลี้ยงเชื้อราที่ความชื้นสูงเกินไปมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่า ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับกับงานวิจัยของมลิวัลย์ และสุรพล (2525) ซึ่งมีการใช้เมล็ดธัญพืช และน้ำในอัตราส่วนต่างๆกัน คือ 40: 40, 40:50, 40:60 และ 40:70 ผลการทดลองสรุปว่าการใช้อัตราส่วน 40: 40 มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราเขียวมากที่สุด นอกจากนี้ยังคล้ายกับงานวิจัยของทรงศักดิ์ (2543) ที่ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* บนกากมันสำปะหลังที่ระดับความชื้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80% โดยน้ำหนัก และผลการทดลอง สรุปว่าตัวอย่างที่มีความชื้น 50% ทำให้มีการเจริญเติบโตของเชื้อราดีที่สุด

การศึกษาปริมาณโมลาสที่เหมาะสม มีการศึกษาที่ความเข้มข้นโมลาสที่ 2, 4, 6, 8 และ 10% และไม่ใส่โมลาส พบว่าการไม่ใส่โมลาส เชื้อสามารถสร้างโคนิเดียได้ดีที่ 14.58 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีการงอกของโคนิเดียเชื้อที่ 8.27 X 10^8 cfu/มล. จาก Table 3 แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณโมลาสมีผลทำให้จำนวนโคนิเดีย และเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อลดลง แสดงว่าการใช้โมลาสไม่สามารถกระตุ้นการสร้างโคนิเดียของเชื้อราบิวเวอเรียให้เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งผลการทดลองมีความแตกต่างจาก เสาวนิตย์ และคณะ (2548) ที่ทดสอบการเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมโดยใช้โมลาสเป็นตัวแทนของคาร์โบไฮเดรตเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคนิเดีย โดยใช้ในอัตราความเข้มข้น ต่างกัน 6 ระดับ ตั้งแต่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10% ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าที่ความ

เข้มข้นของโมลาส ที่ 4% สามารถกระตุ้นให้เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมสร้างโคนิเดียได้สูงสุด การใส่โมลาสที่ความเข้มข้นมากเกินไป จะทำให้ปริมาณการสร้างโคนิเดียลดลง

การศึกษาปริมาณยูเรียที่เหมาะสม มีการทดสอบยูเรียที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2 และไม่ใส่ยูเรีย พบว่า การใส่ยูเรียในปริมาณน้อยคือที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1% และการไม่ใส่ยูเรียทำให้เชื้อราบิวเวอเรียสามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียได้ใกล้เคียงกันที่ 32.27×10^8, 31.83×10^8 และ 34.07×10^8 โคนิเดีย/มล. ตามลำดับ และมีการงอกของโคนิเดียที่ 9.94×10^8, 9.63×10^8 และ 10.14×10^8 cfu/มล. ตามลำดับ (Table 4) ผลการทดลองสอดคล้องกับ เสาวนิตย์ และคณะ (2548) ที่ทดสอบการเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมโดยใช้ปริมาณยูเรียในอัตราเข้มข้นแตกต่างกัน โดยทำการทดสอบ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใช้ยูเรียในอัตราเข้มข้นตั้งแต่ 0, 1, 2, 3, 4, และ 5% ตามลำดับ และครั้งที่ 2 ใช้ยูเรียในอัตราเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ตามลำดับ ผลการทดลองครั้งที่ 1 พบว่าเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมสามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียได้ดีในการใส่ยูเรียในช่วง 0 - 1% และผลการทดลองครั้งที่ 2 พบว่าการไม่ใส่ยูเรีย หรือการเติมยูเรียเพียง 0.5% ให้ปริมาณโคนิเดียที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งการทดลองครั้งนั้นสรุปว่าเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมมีความต้องการยูเรียในปริมาณที่น้อยมาก หรืออาจจะไม่จำเป็นเลยในการเจริญเติบโต การเติมยูเรียมากเกินไป ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราลดลง เช่นเดียวกับงานวิจัยของทรงศักดิ์ (2543) ที่ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* บนกากมันสำปะหลัง พบว่า หากเติมยูเรียสูงกว่า 2.5% จะมีผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อราลดลงอย่างเห็นได้ชัด

การศึกษาวิธีการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราบิวเวอเรีย *B. bassiana* (Balsamo) สายพันธุ์ชุมพร โดยอาศัยพื้นฐานของวิธีการเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม *M. anisopliae* ในปี 2548 โดยมีการคัดเลือกเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสม การศึกษาความชื้นในอาหาร แหล่งคาร์โบไฮเดรต และไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าผลที่ได้มีความใกล้เคียงกัน โดยเชื้อราบิวเวอเรียเลี้ยงได้ดีบนข้าวโพดบดหยาบ และใช้น้ำในอัตราส่วน 1: 1 เหมือนกัน แต่ต่างกันในเรื่องของการใช้โมลาส และยูเรีย

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เชื้อราบิวเวอเรีย *B. bassiana* (Balsamo) สายพันธุ์ชุมพร สามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียได้ดีบนข้าวโพดบดหยาบ 50 กรัม ต่อปริมาณน้ำ 50 มล. (อัตราส่วน 1: 1) โดยไม่มีความจำเป็นต้องใส่โมลาสหรือยูเรียเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต หรือสร้างโคนิเดีย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 เพื่อพัฒนาต่อ

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาวประภาพร ฉันทานุมัติ นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อราบิวเวอเรีย ซึ่งทำการแยกเชื้อจากมอดเจาะเมล็ดกาแฟพันธุ์อาราบิก้า ต. เทพเสด็จ อ. ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่

12. เอกสารอ้างอิง

ทรงศักดิ์ วัฒนชัยเสรีกุล. 2543. อาหารสัตว์จากกากมันสำปะหลังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มลิวัลย์ ปันยารชุน และ สุรพล ตรุยานนท์ .2525. ศึกษาการพัฒนาการผลิตเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เพื่อใช้ควบคุมด้วงแรดมะพร้าว, หน้า 1-6. *ใน* รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยประจำปี 2525 กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์, อภิรัชต์ สมฤทธ์ และอนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ. 2548. การวิจัยและพัฒนาการผลิตและใช้เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* เพื่อประโยชน์ทางการเกษตร, น. 1785-1808. *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2548 เล่มที่ 2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ISBN: 374-436-561-7

Rosa, W. DE LA, R. Alatorre, J.F. Barrera and C. Toriello. 2000. Effect of Beauveria bassiana and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. J. Econ. Entomol. 93: 1409-1414.

Tanada, Y and H.K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic press, Inc. 666 p.

Table 1 Number of conidia and viable population of *Beauveria bassiana* (Balsamo) on 4 different grains at room temperature for 7 days.

Grains	No. of conidia[1/] (conidia /ml.)	Viable population (cfu/ml.)
ground corn	18.35×10^8 a[2/]	9.46×10^8 a
sorghum	12.04×10^8 b	8.15×10^8 b
paddy	8.48×10^8 c	5.84×10^8 c
ground rice	8.67×10^8 c	5.77×10^8 c
CV (%)	26.3	5.0

[1/] Average of 10 replications.

[2/] In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

Table 2 Number of conidia produced by *Beauveria bassiana* (Balsamo) at different percent moisture content of ground corn at the rate 50 gram reared on 5 diferrent volume of water.

water (ml.)	% Moisture content (MC)	No. of conidia[1/] (conidia /ml.)	Viable population (cfu/ml.)
10	25	7.66×10^8 d[2/]	6.81×10^8 c
30	43	22.22×10^8 b	10.48×10^8 ab
50	54	28.55×10^8 a	11.37×10^8 a
70	61	28.15×10^8 a	11.21×10^8 a
90	66	16.17×10^8 c	9.68×10^8 b
CV (%)	-	28.4	11.2

[1/] Average of 10 replications.

[2/] In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

Table 3 Number of conidia and viable population of *Beauveria bassiana* (Balsamo) on ground corn at 54%MC and 6 different volume of molasses.

% Molasses	No. of conidia[1/] (conidia /ml.)		Viable population (cfu/ml.)	
0	14.58×10^8	a[2/]	8.27×10^8	a
2	13.44×10^8	ab	7.12×10^8	ab
4	11.68×10^8	abc	6.47×10^8	bc
6	12.46×10^8	abc	7.14×10^8	ab
8	9.05×10^8	bc	5.16×10^8	cd
10	7.59×10^8	c	4.03×10^8	d
CV (%)	47.0		23.4	

[1/] Average of 10 replications.

[2/] In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

Table 4 Number of conidia and viable population of *Beauveria bassiana* (Balsamo) on ground corn at 54%MC and 5 different level of urea.

% Urea	No. of conidia[1/] (conidia /ml.)		Viable population (cfu/ml.)	
0	34.07×10^8	a[2/]	10.14×10^8	a
0.5	32.27×10^8	a	9.94×10^8	a
1	31.83×10^8	a	9.63×10^8	ab
1.5	20.84×10^8	b	9.03×10^8	b
2	1.15×10^8	c	0.02×10^8	c
CV (%)	36.8		10.0	

[1/] Average of 10 replications.

[2/] In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.