Hirsutella thompsonii Fisher จากป่าเขตอำเภอทองผาภูมิ และผลของสารเมตาโบไลท์ของเชื้อราที่มีต่อหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius)

อังศุมาลย์ จันทราปัตย์

ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Abstract: ***Hirsutella thompsonii* Fisher Collected from Thong Pha Phum Forest and Effect of Fungal Metabolite on Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius)**

Angsumarn Chandrapatya

Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900

A total of 209 specimens of four-legged mites belonging to the families Eriophyidae and Diptilomiopidae and 5 specimens of spider mites from Tetranychidae infected with pathogenic fungi were collected from Amphoe Thong Pha Phum, Kanchanaburi Province, during November 2001 to November 2002. Out of all the specimens cultivated and isolated, 114 were identified as *Hirsutella thompsonii*.

The 114 isolates of *H. thompsonii* developed well on malt extract agar (MEA) with an average growth rate of 0.06 to 0.23 cm per day at 27±1 ^{o}C, 65±3% R.H. Colony formations were flat (38.60%), moderately elevated (43.86%) and highly elevated (17.54%). Some isolates produced a water droplet, a clear zone and a synnemata. *H. thompsonii* produced flask-shaped phialide perpendicular to the mycelia. The distance between phialides ranged from 8.15-20.20 μm. Conidia were lemon-shaped with a rough surface; the width and the length ranged from 2.03-3.89 μm and 2.11-4.27 μm, respectively.

Fungal isolate #2220 produced the highest number of conidia and CFU ($191.68x10^4$ conidia/cm^2 and $181.70x10^4$ CFU/cm^2) on MEA plates. After growing in MEB (pH 6.5) for 4 days, *H. thompsonii* fungus #2459 produced the most dry weight of fungal biomass at 0.93 g/50 ml MEB and made the pH of the MEB equal to 8.9.

Crude filtrates of all isolates except #2259 contained toxic metabolites inducing abnormal development of 4th instar cutworm larvae, *Spodoptera litura* (Fabricius). The toxic metabolites were found to cause mortality in the larval stages, incomplete pupation, incomplete adult emergence and abnormal adults. Toxic metabolites of 63 fungal isolates caused more than 50% abnormality in the cutworm with isolate #2444 causing 100% abnormality. Abnormalities of the cutworm larvae were increased when the concentration of crude filtrate was increased by protein precipitation with 90% saturated ammonium sulphate.

Key words: *Hirsutella thompsonii*, *Spodoptera litura* (Fabricius), growth, morphology, toxic metabolites

บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น จึงมีภูมิอากาศเหมาะสมต่อการทำเกษตรกรรมเป็นอย่างยิ่ง เพราะสามารถปลูกพืชได้ตลอดทั้งปี ประเทศไทยจึงอุดมไปด้วยพืช ผัก ผลไม้นานาชนิด ขณะเดียวกันสภาพแวดล้อมดังกล่าวก็เหมาะกับการระบาดของศัตรูพืชซึ่งเป็นไปอย่างต่อเนื่อง เพราะผลผลิตทางการเกษตรมีติดต่อกันเกือบตลอดทั้งปี แมลงและไรเป็นศัตรูพืชที่สำคัญและทำความเสียหายแก่พืชได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะการทำการเกษตรในเชิงธุรกิจมักได้รับความเสียหายจากศัตรูพืชเป็นอย่างมาก

เกษตรกรส่วนใหญ่แก้ปัญหาการระบาดของแมลงและไรด้วยการใช้สารเคมี เพราะเห็นผลอย่างรวดเร็วและทันท่วงที การใช้สารเคมีในปริมาณมากและบ่อยครั้ง ทำให้เกิดปัญหาต่างๆ ตามมา เช่น แมลงสร้างความต้านทาน เกิดปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิตซึ่งก่อให้เกิดอันตรายแก่เกษตรกร ผู้บริโภค และส่งผลกระทบต่อการส่งออกผลิตผล

เกษตร เกิดการปนเปื้อนของสารพิษในสภาพแวดล้อม ดิน น้ำ อากาศ และทำให้เกิดการระบาดของแมลงศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้นได้ (Meyer, 1981; Howarth, 1992; Kogan, 1998) นอกจากนั้นสารเคมียังทำลายศัตรูธรรมชาติ เช่น แมลงช้างปีกใส ด้วงปีกแข็ง เพลี้ยไฟ ไส้เดือนฝอย รวมทั้งไรตัวห้ำ และจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น ไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อราซึ่งช่วยควบคุมปริมาณประชากรของแมลงและไรศัตรูพืชให้อยู่ในภาวะสมดุลอีกด้วย (Jeppson et al., 1975; Perkins, 1982; McCoy, 1985; Howarth, 1991; Lockwood, 2000)

การนำเชื้อรามาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชเป็นการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี เชื้อราหลายชนิดควบคุมระดับประชากรของแมลงและไรให้อยู่ในระดับสมดุลได้ โดยเชื้อราที่ก่อโรคจะมีความเป็นอยู่แบบปรสิต (parasite) อาศัยอยู่ภายในลำตัวของสัตว์อาศัย ใช้เนื้อเยื่อภายในร่างกายเพื่อดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ (Carner, 1976; Hajek and Leger, 1994) เชื้อราที่เป็นสาเหตุทำให้แมลงและไรศัตรูพืชตายมีหลายสกุล เช่น *Entomophthora*, *Verticillium*, *Beauveria*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Cordyceps*, *Culicinomyces* และ *Paecilomyces* (Lewis et al., 1981; Samson et al., 1988; Ferron et al., 1991; Vey et al., 1993; Humber, 1997; Fuka, 1998; Inglis et al., 2001) นอกจากนี้เชื้อราบางชนิดจะสร้างสารเมตาโบไลท์ (toxic metabolite) ที่มีฤทธิ์รุนแรงและใช้ฆ่าแมลงได้ เช่น *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Metarhizium anisophiae* (Metschnikoff), *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas และ *Hirsutella thompsonii* Fisher เป็นต้น (Roberts, 1996; Boucias and Pendland, 1998; Vey et al., 2001) จึงได้มีการศึกษาและวิจัยเพื่อนำสารพิษจากเชื้อราเหล่านี้มาใช้ในการควบคุมแมลง

จากการสำรวจพื้นที่ป่าในอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรีซึ่งยังคงสภาพป่าที่สมบูรณ์ พบว่า พืชหลายชนิดมีไรศัตรูพืชในวงศ์ Eriophyidae, Diptilomiopidae และ Tetranychidae ลงทำลายอยู่มาก นอกจากนั้นยังพบซากไรที่มีเชื้อรา *H. thompsonii* ลงทำลายอีกด้วย เชื้อราชนิดนี้เป็นศัตรูธรรมชาติที่สำคัญของไรศัตรูพืชหลายชนิด และยังหลั่งสารพิษซึ่งทำให้แมลงและไรเจริญเติบโตผิดปกติลงในอาหารเหลวอีกด้วย จึงได้รับความสนใจนำมาใช้กำจัดศัตรูพืชในปัจจุบัน

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บรวบรวมเชื้อราที่ทำลายไรศัตรูพืชตามหมู่บ้านต่างๆ และพื้นที่ป่า ในเขตอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี พร้อมทั้งศึกษาการเจริญเติบโต สัณฐานวิทยาของเชื้อรา และผลของสารเมตาโบไลท์ของเชื้อราที่มีต่อหนอนกระทู้ผัก เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดเลือกเชื้อราสำหรับพัฒนาเป็นสารกำจัดศัตรูพืชต่อไปในอนาคต

วิธีการ

เก็บตัวอย่างเชื้อราที่ทำลายไรศัตรูพืชในอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรีเดือนละ 1 ครั้งระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2544 ถึง เดือนพฤศจิกายน 2545 โดยแบ่งพื้นที่สำรวจออกเป็นเขตป่า บริเวณภูเขา หมู่บ้านที่อยู่ติดภูเขา และเขตที่อยู่อาศัยในหมู่บ้านต่างๆ นำไรมาตรวจหาเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า และแยกเชื้อราสาเหตุที่ทำให้ไรตายในห้องปฏิบัติการ นำไปขยายพันธุ์บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

นำเชื้อรามาเลี้ยงบนวุ้นอาหาร PDA 7 วัน เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะของโคโลนี โดยใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นบริเวณที่มีเส้นใยเจริญดีมาคว่ำลงบนจานอาหารบรรจุ malt extract agar (MEA) 30 มิลลิลิตร จานละ 1 แผ่น นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3% (15 จาน/สายพันธุ์) วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเมื่อเชื้อมีอายุ 7, 14, 21 และ 28 วัน บันทึกข้อมูลลักษณะของเชื้อ เช่น สี, รูปร่างลักษณะ, การเกิด clear zone, หยดน้ำ (water droplets) และการสร้าง synnemata

การศึกษาปริมาณ conidia ของเชื้อราทั้ง 114 ไอโลท ทำโดยเลี้ยงเชื้อราบน MEA ด้วยวิธีข้างต้น (3 จาน/สายพันธุ์) ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี และนับจำนวน conidia ด้วยวิธี direct count และ viable plate count เมื่อเชื้อมีอายุครบ 10 วัน

การศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยและ conidia ทำโดยเลี้ยงเชื้อราบนแผ่นสไลด์ซึ่งมีวุ้นอาหาร MEA ขนาด 1x1 เซนติเมตร หนาไม่เกิน 1 มิลลิเมตรและปิดทับด้วยแผ่นกระจกปิดสไลด์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27±1 องศา

เซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3% เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บเส้นใยของเชื้อราในวันที่ 4 และ 7 มาผนึกใน lactophenol ผสม methylene blue 0.1% และนำแผ่นสไลด์ไปตากที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาศึกษาลักษณะโครงสร้างของเส้นใยและ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อวัดระยะห่างระหว่าง phialide, ความยาวของ phialide และขนาดของ conidia โดยใช้โปรแกรม Scion Image

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราและผลของสารเมตาโบไลท์ต่อหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) ทำโดยเลี้ยงเชื้อราในขวดก้นชมพู่บรรจุอาหาร malt extract broth (MEB) 50 มิลลิลิตร (pH= 6.5) บ่มบนตู้เขย่าที่อุณหภูมิ 27±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65±3% เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นใช้กรวยกรองแยกมวลชีวภาพออกจาก MEB และนำไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อชั่งน้ำหนักแห้ง และวัดความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวภายหลังการเลี้ยงเชื้อรา

นำ crude filtrate ที่ผ่านการกรองเอามวลชีวภาพออกหมดแล้ว มากรองอีกรอบโดยใช้แผ่น cellulose acetate เพื่อป้องกันไม่ให้มีเส้นใยและ conidia ปะปนใน crude filtrate และนำ crude filtrate ฉีดที่บริเวณขาเทียมคู่แรกของหนอนกระทู้ผักวัย 4 ตัวละ 20 ไมโครลิตร (10 ตัว/ไอโซเลท) หนอนชุดควบคุมได้รับการฉีดอาหารเหลวในปริมาณเท่ากัน นำหนอนไปเลี้ยงในอาหารเทียม และบันทึกการเปลี่ยนแปลงของหนอนทุก 2 วันจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย

สุ่มเลือกเชื้อรา จำนวน 4 ไอโซเลทโดยอาศัยข้อมูลการทดสอบความเป็นพิษของสารเมตาโบไลท์ มาทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารพิษ โดยนำ crude filtrate มาตกตะกอนโปรตีนใน ammonium sulphate 90% และเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นลงบนตะกอนโปรตีนและแยกเกลือออกจากตะกอน (desalted) โดยวิธี dialysis เป็นเวลา 2 วัน นำสารละลายของโปรตีนและน้ำกลั่นไปกรองผ่านแผ่น cellulose acetate ก่อนทำการทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก วัย 4 ตามวิธีการข้างต้น (20 ตัว/ไอโซเลท)

การสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อราตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2544 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2545 พบไรศัตรูพืชที่มีเชื้อราเข้าทำลาย 212 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นไรสี่ขา 209 ตัวอย่าง และไรแมงมุม 5 ตัวอย่าง ไรสี่ขามักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ ซากไรส่วนใหญ่มีสีเหลืองเข้มจนถึงสีน้ำตาลแห้งติดอยู่ตามผิวใบ และมีเส้นใยแทงทะลุผนังลำตัวออกมาเป็นเส้นยาว ส่วนไรแมงมุมที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายมีทั้งระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย จากการสำรวจครั้งนี้พบตัวอ่อนของไรแมงมุมถูกเชื้อราเข้าทำลายมากกว่าตัวเต็มวัย เมื่อทำการแยกเชื้อราจากซากไรพบเฉพาะเชื้อรา *Hirsutella thompsonii* รวมทั้งสิ้น 114 ไอโซเลท (จากไรสี่ขา 109 ไอโซเลท และไรแมงมุม 5 ไอโซเลท)

เชื้อราชนิดนี้ทำลายไรสี่ขาบนพืชชนิดต่างๆ ในหลายประเทศ (Baker and Neunzig, 1968; McCoy and Selhime, 1977; Gerson et al., 1979; Samson and McCoy, 1982) ส่วนรายงานการค้นพบเชื้อราทำลายไรแมงมุมในธรรมชาตินั้นมีน้อยมาก สาเหตุที่พบเชื้อรา *H. thompsonii* ทำลายไรสี่ขามากกว่าไรแมงมุม อาจเนื่องจากไรสี่ขามีขาอยู่ทางด้านหน้าของลำตัว ขณะที่ไรเดินจะใช้วิธีลากลำตัวมาตามพื้นผิวใบหรือกิ่งก้านพืช ผนังลำตัวของไรจึงมีโอกาสสัมผัสกับ conidia ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการก่อโรคของเชื้อราชนิดนี้ (McCoy, 1985; Veen, 1966) ในทางตรงกันข้ามไรแมงมุมมีขนยาวตามลำตัวและมีขายาว ขณะที่เดินลำตัวจะถูกยกขึ้นสูงจากผิวใบ ทำให้ conidia ไม่มีโอกาสที่จะติดกับผนังลำตัวมากนัก ประกอบกับ conidia ของเชื้อราติดอยู่บนก้านชูสั้นๆ และไม่สูงพอที่จะช่วยให้ conidia เกาะติดผนังลำตัวไรแมงมุมได้สะดวก นอกจากจะเกาะติดตามปล้องขาซึ่งก็มีโอกาสน้อย ด้วยเหตุนี้จึงพบเชื้อราที่ทำลายไรแมงมุมในธรรมชาติน้อยกว่าไรสี่ขา

การวิเคราะห์ปริมาณตัวอย่างไรที่เก็บได้พบว่า ช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนมีนาคมพบไรที่ถูกทำลายมากที่สุด ซึ่งตรงกับการรายงานของ อังศุมาลย์ (2543) ที่สำรวจไรในภาคกลางและภาคตะวันออกของประเทศไทย และพบว่าเชื้อราชนิดเดียวกันนี้ระบาดมากในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนมกราคมของทุกปีที่ทำการสำรวจ แต่เนื่องจากพื้นที่ในจังหวัดกาญจนบุรีมีความชื้นสูงในช่วงฤดูหนาวและมีอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา จึงทำให้พบการระบาดของเชื้อราในเดือนกุมภาพันธ์และเดือนมีนาคมด้วย

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *H. thompsonii* บนวุ้นอาหาร MEA พบว่า โคโลนีอายุ 7 วันมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.07-1.36 เซนติเมตร เมื่อเชื้อรามีอายุ 14 และ 28 วันโคโลนีจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

0.64-2.99 และ 1.42-5.39 เซนติเมตรตามลำดับ ไอโซเลท 2296 เจริญเติบโตช้าที่สุดและไอโซเลท 2392 เจริญเติบโตเร็วที่สุด เชื้อรา *H. thompsonii* ทั้ง 114 ไอโซเลท มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันตั้งแต่ 0.06-0.23 เซนติเมตร โดยเชื้อรา 38 ไอโซเลทมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 0.15-0.17 เซนติเมตร ส่วนกลุ่มที่มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 0.13-0.14 และ 0.18-0.23 เซนติเมตร มีจำนวน 24 ไอโซเลทเท่ากัน

ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา ส่วนใหญ่เป็นแบบฟูปานกลาง (moderate) ซึ่งพบมากถึง 50 ไอโซเลท รองลงมาคือแบบแบนราบ (flat) 44 ไอโซเลทและพองฟู (elevate) 20 ไอโซเลท McCoy and Kanavel (1969) เลี้ยงเชื้อรา *H. thompsonii* ด้วยอาหาร Sabouraud dextrose agar, PDA, V-8 juice agar และ Modified soil fungus medium เป็นเวลา 12 วัน พบว่าโคโลนีมีลักษณะแบนราบแต่อาจมีการยกของโคโลนีเหนืออาหารเล็กน้อย ซึ่งตรงกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบเชื้อรามีลักษณะโคโลนีแบนราบถึง 44 ไอโซเลท

โคโลนีของเชื้อรา *H. thompsonii* มีหลายสี ได้แก่ ขาว เทา เหลืองอมเทา ขาวอมเหลือง เทาอมเขียว ขาวอมเขียว และขาวอมส้ม McCoy and Kanavel (1969) พบว่าโคโลนีของเชื้อรา *H. thompsonii* มีสีเทาอมเขียวซึ่งตรงกับสีของเชื้อราหลายไอโซเลท เช่น 2204, 2222, 2233, 2246, 2282, 2283 และ 2398 อังศุมาลย์ และอุไรวรรณ (2532) พบว่าเชื้อรา *H. thompsonii* ที่เลี้ยงบนอาหาร MEA มีตั้งแต่สีขาวอมเทาถึงสีเทาจนเกือบดำ ซึ่งใกล้เคียงกับผลการศึกษานี้

เมื่อเชื้อรามีอายุ 2 สัปดาห์และอาหารใกล้หมดลง เชื้อราบางไอโซเลทจะเริ่มสร้าง synnemata โดยเกิดปุ่มนูนสีขาวขึ้นรอบๆ โคโลนี และเริ่มยาวขึ้นเรื่อยๆ ก่อนจะกลายเป็นมัดเส้นใยที่เรียงตัวกันอย่างแน่นหนา และจะอยู่ในสภาพนี้จนกว่าจะได้รับอาหารใหม่ ซึ่งเป็นกลไกในการรักษาตัวเองเพื่อให้อยู่รอด synnemata จะปรากฏเด่นชัดขึ้นเมื่อเชื้อรามีอายุประมาณ 3 อาทิตย์ ตรงกับการรายงานของ Rombach et al. (1986) ที่พบว่าเชื้อรา *H. thompsonii* เริ่มสร้าง synnemata เมื่อมีอายุ 3 สัปดาห์ ส่วนอังศุมาลย์ และอุไรวรรณ (2532) พบว่าเชื้อรา *H. thompsonii* เริ่มสร้าง synnemata เมื่อมีอายุ 7-14 วัน synnemata ของ *H. thompsonii* แต่ละไอโซเลทจะแตกต่างกัน เช่น เกิดเป็นกระจุกๆ หรือเกิดกระจายทุกทิศทาง และมีความยาวแตกต่างกันไป เชื้อราหลายไอโซเลทไม่สร้าง synnemata แม้จะเป็นสายพันธุ์ *H. thompsonii* var. *synnematosa* ด้วยกัน อังศุมาลย์ และอุไรวรรณ (2532) พบว่า 60-75% ของเชื้อราสายพันธุ์ synnemata ที่เลี้ยงบนอาหาร MEA จะสร้าง synnemata ส่วน Mains (1951) กล่าวว่า การสร้าง synnemata ขึ้นอยู่กับสภาพทางสรีรวิทยา และเชื้อจะสูญเสียประสิทธิภาพการสร้าง synnemata หากมีการถ่ายเชื้อหลายครั้ง

การศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อรา 58 ไอโซเลท (50.88%) สร้าง synnemata ได้ นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อรา 46 ไอโซเลท (40.35%) สร้างหยดน้ำบนโคโลนีซึ่งเกิดจากการคายน้ำของเชื้อรา หยดน้ำมีสีที่ต่างกัน เช่น เขียว แดง น้ำตาล เหลือง เนื่องจากเส้นใยเกิดการคายน้ำแล้วมารวมกับ pigment ที่เส้นใยผลิตออกมาจึงทำให้เกิดสีต่างๆ อันเป็นกระบวนการป้องกันตัวจากแสงแดด รังสีหรือสิ่งที่เป็นอันตรายกับเชื้อรา

เชื้อรา 47 ไอโซเลท (41.23%) สร้าง clear zone เป็นบริเวณใสรอบๆ โคโลนี เนื่องจากเชื้อราปล่อยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ เพื่อทำการสลายโปรตีนโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กแล้วทำการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ Chernin et al. (1997) ศึกษาการปลดปล่อยเอ็นไซม์ที่ย่อยโปรตีนในเชื้อรา *H. necatrix*, *H. kirchneri* และ *H. thompsonii* จำนวน 6 ไอโซเลท พบว่าเชื้อรา *H. thompsonii* 2 ไอโซเลท และ *H. necatrix* สามารถปลดปล่อยเอ็นไซม์ที่ย่อยโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะโครงสร้างของเชื้อราพบว่าลักษณะต่างๆ ได้แก่ สีและลักษณะของโคโลนี, การเกิด synnemata, clear zone และ water droplet มีความสัมพันธ์กันน้อยมากหรือเกือบจะไม่มีความสัมพันธ์กันเลย

การศึกษาปริมาณ conidia โดยวิธี direct count และ viable plate count พบว่า จำนวน conidia จาก direct count มีปริมาณ $0.44x10^4$-$191.68x10^4$ conidia/ตารางเซนติเมตร โดยมีเชื้อราเพียง 2 ไอโซเลทที่ผลิต conidia ได้มากกว่า $100x10^4$ conidia/ตารางเซนติเมตร เชื้อราที่สร้าง conidia ได้มากที่สุดคือไอโซเลท 2220 รองลงมาคือ ไอโซเลท 2196 ($115.91x10^4$ conidia/ตารางเซนติเมตร) ส่วนไอโซเลท 2528 สร้าง conidia ได้น้อยที่สุด เชื้อราที่ผลิต

conidia ได้เพียง $0.44x10^4$-$8.64x10^4$ conidia/ตารางเซนติเมตร มี 28 ไอโซเลท (24.56%) ส่วนกลุ่มที่ผลิต conidia ได้ $33.11x10^4$-$191.68x10^4$ conidia/ตารางเซนติเมตร มีจำนวนมากถึง 29 ไอโซเลท (25.44%)

การนับจำนวน conidia โดยวิธี viable plate count พบว่าเชื้อรามีปริมาณ conidia ที่สามารถเจริญบนวุ้นอาหารได้ $0.66x10^4$-$181.70x10^4$ CFU/ตารางเซนติเมตร ทั้งนี้จำนวน conidia ที่นับโดยวิธี direct count และ viable plate count มีความสัมพันธ์กันสูงมาก (r=0.956) และเป็นไปในทางเดียวกัน เชื้อรา 28 ไอโซเลท (24.56%) มีปริมาณ conidia ที่นับโดยวิธี viable plate count ต่ำสุด ($0.66x10^4$-$9.01x10^4$ CFU/ตารางเซนติเมตร) ส่วนเชื้อรา 29 ไอโซเลท (25.44%) มีปริมาณ conidia $30.73x10^4$-$181.70x10^4$ CFU/ตารางเซนติเมตร

ปริมาณการสร้าง conidia ของเชื้อราอาจมาจากความแตกต่างของโครงสร้างเส้นใย และการสร้าง conidia เช่น ไอโซเลท 2220 ที่ผลิต conidia ได้มากที่สุดมีโคโลนีแบน สีขาวอมเขียว โครงสร้างสืบพันธุ์เป็นแบบ polyphialidic มีรูเปิดออกจาก phialide 3 รูจึงสร้าง conidia ได้ 3 อัน และยังมีโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า polyblastic conidogenous cells ที่สามารถผลิต conidia ได้หลายอัน ส่วนไอโซเลท 2528 ซึ่งผลิต conidia ได้น้อยที่สุดมีโคโลนีฟูปานกลาง สีขาว phialide เป็นแบบ polyphialidic เช่นกัน แต่มีรูเปิดออกจาก phialide 2 รูทำให้มี conidia 2 อัน และไม่มี polyblastic conidogenous cells จากการที่เชื้อราไอโซเลท 2220 มีการสร้าง polyblastic conidogenous cells นี้เอง ทำให้ผลิต conidia ได้มากกว่าไอโซเลท 2528 ทั้งๆ ที่โครงสร้างสืบพันธุ์เป็นแบบ polyphialidic เช่นเดียวกัน

การศึกษาโครงสร้างของเส้นใยและ conidia ของเชื้อราทุกไอโซเลท พบว่าเป็นเชื้อ *Hirsutella thompsonii* ทั้งหมด เส้นใยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-3.4 ไมครอนและมีผนังกั้น โครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์เป็นแบบ phialide ลักษณะคล้ายขวดคอคอด (ยาว 8.15-20.20 ไมครอน) งอกตั้งฉากกับเส้นใย ซึ่งมีทั้งแบบ monophialidic และ polyphialidic แต่ละ phialide มีระยะห่างแตกต่างกันตั้งแต่ 16.45-70.32 ไมครอน เชื้อรา 30 ไอโซเลทมี phialide สั้นเพียง 8.15-8.95 ไมครอน ในขณะที่เชื้อรา 28 ไอโซเลทมี phialide ยาว 11.36-20.20 ไมครอน จำนวน conidia จะขึ้นอยู่กับจำนวนรูที่เปิดออกมาจาก phialide นั้น เชื้อราบางไอโซเลทสร้าง polyblastic conidiogenous cell (holoblastic) ซึ่ง conidiogenous cell 1 อัน จะสร้าง conidia ได้หลายอัน เชื้อราส่วนมากสร้าง chlamydospore เป็นกระเปาะอยู่ภายในเส้นใยเมื่ออาหารเริ่มขาดแคลน การสร้าง chlamydospore เป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยให้เชื้อราอยู่รอดในสภาวะที่อดอาหาร และพร้อมที่จะขยายพันธุ์ต่อไปได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมอีก

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราในอาหาร MEB เป็นเวลา 4 วัน พบว่า เชื้อรามีการเจริญเติบโตแตกต่างกันโดยให้น้ำหนักมวลชีวภาพอบแห้ง 0.38-0.93 กรัม/MEB 50 มิลลิลิตร ไอโซเลท 2565 เจริญเติบโตช้าที่สุด ส่วนไอโซเลท 2459 เจริญเติบโตได้ดีที่สุด เชื้อรา 30 ไอโซเลท (26.32%) เจริญเติบโตช้าและให้น้ำหนักมวลชีวภาพอบแห้งน้อย (0.38-0.67 กรัม/MEB 50 มิลลิลิตร) ส่วนกลุ่มที่เจริญเติบโตเร็วและมีน้ำหนักมวลชีวภาพมาก (0.79-0.93 กรัม/MEB 50 มิลลิลิตร) มี 26 ไอโซเลท (22.81%)

เชื้อราบางไอโซเลทสร้าง conidia ในอาหารเหลว ซึ่งตรงกับ McCoy et al. (1972) ที่พบว่าเชื้อรา *H. thompsonii* var. *synnematosa* สร้าง conidia ในอาหารเหลวได้ อังศุมาลย์ และอุไรวรรณ (2532) พบว่า เชื้อราสายพันธุ์นี้สร้าง chlamydospore ในอาหารเหลวเมื่อมีอายุ 20 วันขึ้นไป แต่จากการทดลองครั้งนี้ไม่พบ chlamydospore ในอาหารเหลว ซึ่งอาจเป็นเพราะเลี้ยงเชื้อราเพียง 4 วันเท่านั้น เชื้อรายังมีอาหารเพียงพอ จึงไม่พบ chlamydospore ในอาหารเหลว เชื้อราที่ศึกษาส่วนใหญ่ทำให้อาหารเหลวมีความเป็นด่างมากขึ้น โดยเชื้อรา 27 ไอโซเลท (23.68%) ทำให้อาหารเหลวมีความเป็นด่างระหว่าง 8.11-8.60 ส่วนกลุ่มเชื้อราที่ทำให้อาหารเหลวมีความเป็นด่างเพียงเล็กน้อย (7.61-7.90) มี 28 ไอโซเลท (24.56%) และเชื้อราที่ทำให้อาหารเหลวมีความเป็นด่างสูงสุด (pH 8.60) คือไอโซเลท 2459 น้ำหนักมวลชีวภาพอบแห้งมีความสัมพันธ์กับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลวน้อยมาก (r=0.382)

crude filtrate ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราทุกไอโซเลท ยกเว้น 2259 มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของหนอน เช่น ทำให้หนอนเติบโตผิดปกติหรือตาย ไม่เข้าดักแด้ ดักแด้ไม่สมบูรณ์ ไม่ลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย หรือตัวเต็มวัยที่ออกจากดักแด้อาจมีลักษณะผิดปกติ ไอโซเลท 2301 ทำให้หนอนตายมากที่สุด 50% รองลงมาคือไอโซเลท 2480 ซึ่งทำให้หนอนตาย 40% หนอนที่ตายเพราะสารพิษส่วนมากจะตายภายใน 1-2 วัน โดยตามผนังลำตัวของหนอนจะมีจุด

สีดำเป็นจุดๆ และกลายเป็นสีดำทั้งตัวในเวลาต่อมา หนอนที่ได้รับสารพิษจากเชื้อราบางไอโซเลท เช่น 2242, 2300, 2497 และ 2507 มีระยะหนอนยาวนานกว่าชุดควบคุมถึง 4-5 วัน เนื่องจากกินอาหารได้น้อยในวันแรกที่ได้รับสารพิษ ต่อมาเริ่มไม่กินอาหาร ทำให้ขนาดลำตัวเล็กลงเรื่อยๆ ไม่เจริญเติบโต ไม่ลอกคราบและตายไปในที่สุด ลักษณะอาการที่พบในหนอนกระทู้ผักตรงกับการรายงานของ Vey et al. (1993) และ Maimala et al. (2002) ซึ่งทำการทดลองกับหนอนผีเสื้อกินไขผึ้งวัยสุดท้าย *Galleria mellonella* (Linnaeus)

สารพิษจากเชื้อรา 86 ไอโซเลท ทำให้หนอนเข้าดักแด้ไม่สมบูรณ์ โดยไอโซเลท 2212 ทำให้หนอนเข้าดักแด้ไม่สมบูรณ์ถึง 70% รองลงมาคือไอโซเลท 2444 (60%) ส่วนสารพิษของเชื้อราอีก 28 ไอโซเลท เช่น ไอโซเลท 2191, 2209, 2259, 2271, 2293, 2301, 2428 และ 2429 ไม่มีผลต่อการเข้าดักแด้ (ตารางที่ 1) ดักแด้ที่ไม่สมบูรณ์ส่วนใหญ่ลอกคราบได้เพียงครึ่งตัว ลักษณะความผิดปกติอื่นๆ ที่พบได้แก่ ดักแด้ลอกคราบออกมาแล้วตาย มีสีดำทั้งตัว หรือผนังลำตัวตรงส่วนท้องของดักแด้เป็นสีขาวและไม่แข็งแรงเหมือนดักแด้ปกติ

ตารางที่ 1. ความผิดปกติของหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) วัย 4 หลังจากได้รับการฉีด crude extracts (20 ไมโครลิตร) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Hirsutella thompsonii* ใน malt extract broth เป็นเวลา 4 วัน

ไอโซเลทที่	% การตาย ของหนอน	% ดักแด้ ผิดปกติ	% ตัวเต็มวัย ผิดปกติ	% ดักแด้ ไม่ลอกคราบ	% ความผิดปกติ โดยรวม
ชุดควบคุม (MEB)	0	0	0	0	0
ชุดควบคุม (Water)	0	0	0	0	0
2191	0	0	10	10	20
2196	10	10	0	30	50
2198	10	0	20	30	60
2201	0	20	0	20	40
2203	0	30	0	10	40
2204	0	10	10	40	60
2205	10	20	0	20	50
2206	0	20	10	30	60
2208	10	30	0	20	60
2209	0	0	30	30	60
2210	0	40	0	10	50
2212	10	70	0	10	90
2214	10	30	0	0	40
2215	10	20	0	20	50
2217	20	10	20	0	50
2219	10	20	0	10	40
2220	20	30	10	10	70
2222	20	30	10	0	60
2223	0	0	0	50	50
2229	20	10	0	20	50
2230	0	20	0	20	40
2233	20	20	10	0	50
2241	20	10	20	10	60
2242	30	20	0	0	50
2246	30	10	0	10	50
2247	0	20	10	30	60
2259	0	0	0	0	0
2262	0	10	0	30	40
2271	20	0	10	30	60
2278	0	10	0	30	40

ตารางที่ 1. (ต่อ)

ไอโซเลทที่	% การตาย ของหนอน	% ดักแด้ ผิดปกติ	% ตัวเต็มวัย ผิดปกติ	% ดักแด้ ไม่ลอกคราบ	% ความผิดปกติ โดยรวม
2280	10	10	20	0	40
2282	0	20	10	30	60
2283	20	10	0	0	30
2284	10	20	0	40	70
2286	10	20	0	30	60
2291	0	30	0	30	60
2293	0	0	10	10	20
2294	20	50	20	0	90
2295	10	40	10	10	70
2296	20	20	0	10	50
2300	20	10	20	10	60
2301	50	0	10	0	60
2392	10	20	0	30	60
2397	0	10	20	0	30
2398	20	20	0	30	70
2399	20	30	10	10	70
2405	30	10	10	0	50
2409	0	20	0	30	50
2425	10	10	10	20	50
2428	30	0	10	20	60
2429	30	0	0	60	90
2430	0	10	10	10	30
2436	10	10	20	0	40
2437	10	40	0	0	50
2438	0	10	20	30	60
2443	20	0	20	10	50
2444	30	60	0	10	100
2450	30	30	0	10	70
2455	20	10	20	0	50
2456	0	20	0	40	60
2457	30	10	10	10	60
2458	0	10	0	30	40
2459	20	0	20	10	50
2461	10	10	0	0	20
2462	10	0	10	20	40
2464	10	0	0	50	60
2465	0	10	10	20	40
2466	0	0	10	30	40
2475	20	20	10	20	70
2476	0	20	10	40	70
2477	30	0	10	20	60
2479	0	10	10	0	20
2480	40	0	10	0	50
2482	0	30	20	20	70
2485	0	40	0	20	60
2487	10	0	0	20	30

ตารางที่ 1. (ต่อ)

ไอโซเลทที่	% การตาย ของหนอน	% ดักแด้ ผิดปกติ	% ตัวเต็มวัย ผิดปกติ	% ดักแด้ ไม่ลอกคราบ	% ความผิดปกติ โดยรวม
2490	30	20	10	20	80
2493	10	20	0	30	60
2494	10	10	0	50	70
2497	10	0	0	40	50
2502	20	30	0	20	70
2505	0	20	0	20	40
2507	40	20	10	20	90
2509	20	10	0	40	70
2510	0	0	0	40	40
2513	20	0	0	30	50
2515	10	0	0	40	50
2519	30	20	10	20	80
2524	10	0	10	10	30
2527	10	10	0	0	20
2528	0	0	20	20	40
2532	30	0	0	10	40
2533	0	10	20	10	40
2534	20	0	20	0	40
2535	40	10	20	20	90
2538	0	0	30	10	40
2540	20	10	10	10	50
2542	0	10	0	50	60
2544	0	20	0	20	40
2545	0	10	10	30	50
2551	0	20	0	10	30
2555	0	20	10	30	60
2557	20	20	10	0	50
2559	20	10	10	20	60
2560	0	10	10	20	40
2562	0	20	20	0	40
2563	20	30	10	0	60
2565	30	20	0	0	50
2566	10	10	10	10	40
2568	20	10	0	30	60
2569	30	10	0	20	60
2573	10	20	10	10	50
2575	10	30	10	10	60
2576	0	0	10	0	10

หนอนที่ได้รับสารพิษเข้าดักแด้นานกว่าชุดควบคุม 1-3 วัน สารพิษจากเชื้อรา 60 ไอโซเลททำให้ตัวเต็มวัยแสดงอาการผิดปกติ โดยไอโซเลท 2209 และ 2538 ทำให้ตัวเต็มวัยผิดปกติมากที่สุด 30% ตัวเต็มวัยที่ผิดปกติมีหลายลักษณะ เช่น ปีกหงิกงอ ปีกหดสั้น และออกจากดักแด้ได้เพียงครึ่งตัว เป็นต้น สารพิษของเชื้อราที่ทำให้ดักแด้ไม่สามารถออกเป็นตัวเต็มวัยได้มากที่สุดคือ ไอโซเลท 2429 (60%) ส่วนไอโซเลท 2223, 2464, 2494 และ 2542 ทำให้ดักแด้ไม่สามารถลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย 50%

ในภาพรวมเชื้อราที่ผลิตสารพิษทำให้หนอนแสดงอาการผิดปกติมากกว่า 50% มี 63 ไอโซเลท และอีก 51 ไอโซเลททำให้หนอนเกิดอาการผิดปกติน้อยกว่า 50% โดยไอโซเลท 2444 ทำให้หนอนทุกตัวที่ได้รับสารพิษแสดงอาการผิดปกติทั้งหมด (100%) และไอโซเลท 2212, 2294, 2429, 2507 และ 2535 ทำให้หนอนแสดงอาการผิดปกติ 90%

การเพิ่มความเข้มข้นของสารพิษมีผลทำให้ประสิทธิภาพของสารพิษในการทำลายแมลงเพิ่มขึ้น 10-40% ซึ่งพบทั้งระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย สารพิษเข้มข้นใน crude filtrate ไม่ได้ทำให้แมลงตายในระยะหนอนทั้งหมด ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Mazet and Vey (1995) ที่พบว่าสารพิษบริสุทธิ์ซึ่งสกัดจากเชื้อรา *H. thompsonii* var. *thompsonii* (สาร Hirsutellin A) จำนวน 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ทำให้หนอนกินไขผึ้งวัยสุดท้ายตายในระยะหนอน 100% หลังได้รับการฉีดสารพิษเข้าภายในลำตัวหนอนเป็นเวลา 30, 25 และ 15 ชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการวิจัย

ไรศัตรูพืชโดยเฉพาะไรสี่ขาในวงศ์ Eriophyidae และ Diptilomiopidae ในพื้นที่อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี ถูกเชื้อรา *Hirsutella thompsonii* ลงทำลายเป็นจำนวนมาก เชื้อราทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร malt extract agar โดยมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน 3 แบบคือ โคโลนีแบน (flat), ฟูปานกลาง (moderate) และพองฟู (elevate) เชื้อรา 58 ไอโซเลท (50.88%) สร้าง synnemata ในระหว่างการเจริญเติบโต โดยเฉพาะเมื่อโคโลนีมีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ จึงระบุได้ว่าเป็นสายพันธุ์ *Hirsutella thompsonii* var. *synnematosa* การสร้าง synnemata นี้ยังไม่พบในธรรมชาติ โคโลนีของเชื้อราบางสายพันธุ์จะสร้างหยดน้ำบนกลุ่มเส้นใย และอีกหลายสายพันธุ์ทำให้เกิด clear zone รอบๆ โคโลนีด้วย

สารเมตาโบไลท์ที่เชื้อรา *H. thompsonii* สร้างขึ้นในอาหารเหลว malt extract broth มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนอนโดยทำให้หนอนเจริญเติบโตผิดปกติ ไม่กินอาหาร หนอนบางตัวตายในระยะหดตัวก่อนเข้าดักแด้ หนอนที่รอดจากการตายบางตัวเข้าดักแด้ไม่สมบูรณ์ ส่วนหนอนที่เข้าดักแด้สมบูรณ์อาจไม่สามารถลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยได้ หรือเป็นตัวเต็มวัยที่มีลักษณะรูปร่างผิดปกติ เช่น ปีกหัก ปีกหดสั้น บินไม่ได้ สารเมตาโบไลท์ของเชื้อราไอโซเลท #2444 มีประสิทธิภาพในการทำให้หนอนกระทู้ผักเจริญเติบโตผิดไปจากปกติ 100%

ผลการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นพื้นฐานสำคัญในการคัดเลือกไอโซเลทของเชื้อรา *H. thompsonii* ที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาเป็น mycoacaricide ต่อไป และด้วยเหตุที่ conidia เป็น infective unit ที่สำคัญในการเข้าทำลายสัตว์อาศัยของเชื้อราชนิดนี้ ดังนั้นเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็วและมีแนวโน้มที่จะสร้าง conidia ได้มาก จะสมควรได้รับการคัดเลือกเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการก่อโรคกับไรศัตรูพืช และความเป็นไปได้ในการขยายพันธุ์ให้มีปริมาณมากเพื่อใช้กำจัดไรศัตรูพืชต่อไปในอนาคต นอกจากนั้นข้อมูลด้านผลของสารเมตาโบไลท์ที่มีต่อหนอนกระทู้ผัก สามารถนำไปใช้เป็นพื้นฐานในการตัดสินใจคัดเลือกไอโซเลทที่เหมาะสม เพื่อพัฒนาเป็นสารสกัดจากจุลินทรีย์ที่เป็นพิษต่อแมลงศัตรูพืชโดยเฉพาะกลุ่มหนอนผีเสื้อต่างๆ ต่อไป

การใช้สารกำจัดศัตรูพืชที่ได้จากธรรมชาตินอกจากจะช่วยให้เกษตรกรลดปริมาณการใช้สารเคมีลงแล้ว ยังช่วยรักษาสภาพแวดล้อม อีกทั้งช่วยให้เกษตรกรและผู้บริโภคมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรธรรมชาติในประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT R_644004 และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

อังศุมาลย์ จันทราปัตย์. 2543. รายงานการศึกษาชนิด ชีววิทยาและการแพร่กระจายของไรสี่ขาในภาคกลางและภาคตะวันออกของประเทศไทย เสนอต่อโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย. ภาควิชากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

อังศุมาลย์ จันทราปัตย์ และอุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. 2532. รายงานการวิจัยการใช้เชื้อรา *Hirsutella thompsonii* (Fissher) กับไรสนิมส้ม *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

Baker, J.R. and H.H. Neunzig. 1968. *Hirsutella thompsonii* as a fungus parasite of the blueberry bud mite. *Journal of Economic Entomology* 61: 1117-1118.

Boucias, D.G. and J.C. Pendland. 1998. Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers, Boston.

Carner, G.R. 1976. A description of the life cycle of *Entomophthora* sp. in the two-spotted spider mite. *Journal of Invertebrate Pathology* 28: 245-254.

Chernin, L., A. Gafni, R. Mozes-Koch, U. Gerson and A. Sztejnberg. 1997. Chitinolytic activity of the acaropathogenic fungi *Hirsutella thompsonii* and *Hirsutella necatrix*. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 440-446.

Ferron, P., J. Fargues and G. Riba. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. *In* Arora, D.K., L. Ajello and K.G. Mukerji (eds.), Handbook of Applied Mycology, pp. 665-706. Marcel Dekker, New York.

Fuka, J.R. 1998. Enviromental manipulation for microbial control of insects. *In* Barbosa, P. (ed.), Conservation Biological Control, pp. 255-267. Academic Press, USA.

Gerson, U., R. Kenneth and T.I. Muttath. 1979. *Hirsutella thompsonii*, a fungal pathogen of mites. II. Host-pathogen interactions. *Annal of Applied Biology* 91: 29-40.

Hajek, A.E. and R.J. St. Leger. 1994. Interaction between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39: 293-322.

Howarth, F.G. 1991. Environmental impacts of classical biological control. *Annual Review of Entomology* 36: 485-509.

Howarth, F.G. 1992. Environmental impacts of species purposefully introduced for biological control of pests. *Pacific Science* 46: 388-389.

Humber, R.A. 1997. Fungi: identification. *In* Lacey, L.A. (ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology, pp. 153-185. Academic Press, London.

Inglis, G.D., M.S. Goettel, T.M. Butt and H. Strasser. 2001. Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pest. *In* Butt, T.M., C.W. Jackson and N. Magan (eds.), Fungi as Biocontrol Agents Progress, Problems and Potential, pp. 23-29. CABI Publishing, UK.

Jeppson, L.R., H.H. Keifer and E.W. Baker. 1975. Mites Injurious to Economic Plants. University of Califonia Press, Berkeley, USA. 614 p.

Kogan, M. 1998. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary development. *Annual Review of Entomology* 43: 243-270.

Lewis, G.C., A.J. Heard, B.L. Bredy and D.W. Minter. 1981. Fungal parasitism of the eriophyid mite vector of ryegrass mosaic virus. Proceedings 1981 British Crop Protection Conference-Pests and Diseases. pp. 101-111.

Lockwood, J.A. 2000. Nontarget effects of biological control: what are we trying to miss?. *In* Follett, P.A. and J.J. Duan (eds.), Nontarget Effects of Biological Control, pp. 14-30. Kluwer Academic Publishers, USA.

Maimala, S., A. Tartar, D. Boucias and A. Chandrapatya. 2002. Detection of the toxin Hirsutellin A from *Hirsutella thompsonii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 80: 112-126.

Mains, E.B. 1951. Entomogenous species of *Hirsutella, Tilachlidium* and *Synematium*. *Mycologia* 43: 691-717.

Mazet, I. and A. Vey. 1995. Hirsutelin A, a toxin protein produced *in vitro* by *Hirsutella thompsonii*. *Microbiology* 141: 1343-1348.

McCoy, C.W. 1985. Citrus: current status of biological control in Florida. *In* Hoy, M.A. and D.C. Herzog (eds.), Biological Control in Agricultural IPM System, pp. 481-499. Acad. Press, Inc., Orlando, Florida.

McCoy, C.W. and R.F. Kanavel. 1969. Isolation of *Hirsutella thompsonii* from the citrus rust mite, *Phyllocoptruta oleivora*, and its cultivation on various sythetic media. *Journal of Invertebrate Pathology* 14(3): 386-390.

McCoy, C.W. and A.G. Selhime. 1977. The fungus pathogen, *Hirsutella thompsonii* and its potential use for control of citrus rust mite in Florida. Proceedings of International Citrus Congress 2: 521-527. Murcia, Spain.

McCoy, C.W., A.J. Hill and R.F. Kanavel. 1972. A liquid medium of the large scale production of *Hirsutella thompsonii* in submerged culture. *Journal of Invertebrate Pathology* 19: 370-374.

Meyer, M.K.P. 1981. Mite pest of crops in Southern Africa. Scientific Bulletin of Department of Agriculture and Fisheries, Republic of South Africa. No. 397: 1-92.

Perkins, J.A. 1982. Insects, Experts and the Insecticide Crisis: the Quest for New Pest Management Strategies. Plenum Press, New York. 320 p.

Roberts, D.W. 1996. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. II. Symptoms and detection in moribund hosts. *Journal of Invertebrate Pathology* 8: 222-227.

Rombach, M.C., D.W. Roberth and B.M. Shepard. 1986. *Hirsutella thompsonii* Fisher infecting phytophagous mites in the Phillippines. *Phillippines Entomologist* 6: 620-622.

Samson R.A., H.C. Evans and J.P. Latge. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag, Berlin. 187 p.

Samson R.A. and C.W. McCoy. 1982. A new fungal pathogen of the scavenger mite, *Tydeus gloveri*. *Journal of Invertebrate Pathology* 40: 216-220.

Veen, K.H. 1966. Oral infection of 2nd instar nymphs of *Schistocerca gregaria* by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 8: 254-256.

Vey, A., R.E. Hoagland and T.M. Butt. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. *In* Butt, T.M., C. Jackson and N. Magan (eds.), Fungi as Biocontrol Agents Progress, Problems and Potential, pp. 311-346. CABI Publishing, UK.

Vey, A., J.M. Quiot, I Mazet and C.W. McCoy. 1989. Toxicity and pathology of a macromolecule metabolite produced by *Hirsutella thompsonii*. *Journal Invertebrate Pathology* 61: 131-137.

Vey, A., J.M. Quiot, I. Mazet and C.W. McCoy. 1993. Toxicity and pathology of crude broth filtrate produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii* in shake culture. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 131-137.