รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

พฤติกรรมการผสมพันธุ์และการพัฒนาระยะตัวอ่อนของแมลงวันแตง, *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) (Diptera: Tephritidae), ที่ติดเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท PSUM02

Mating behavior and immature development of *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) (Diptera: Tephritidae) infected with *Metarhizium anisopliae* isolate PSUM02

คณะนักวิจัย

ดร.นริศ ท้าวจันทร์

รศ.ดร.อรัญ งามผ่องใส

T42

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2555 รหัสโครงการ NAT550364S

1. ชื่อโครงการ พฤติกรรมการผสมพันธุ์และการพัฒนาระยะตัวอ่อนของแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) (Diptera: Tephritidae) ที่ติดเชื้อรา *Metarhizium anisopliae*ไอโซเลท PSUM02

Mating behavior and immature development of *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) (Diptera: Tephritidae) infected with *Metarhizium anisopliae* isolate PSUM02

2. คณะนักวิจัย และหน่วยงานต้นสังกัด

ดร.นริศ ท้าวจันทร์ ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รศ.ดร.อรัญ งามผ่องใส ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนวิจัยดรุณาจารย์ สำนักวิจัยและพัฒนา และคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่สนับสนุนการวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ เพื่อให้อาจารย์รุ่นใหม่ที่มีประสบการณ์น้อยในการทำงานวิจัย และการนำผลงานวิจัยไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติ ได้พัฒนาตนเองให้มีศักยภาพในการทำงานวิจัยเพิ่มมากขึ้น สามารถนำผลงานวิจัยที่ได้ทำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารนานาชาติ ทำให้อาจารย์รุ่นใหม่มีประสบการณ์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งถือได้ว่าเป็นโครงการวิจัยที่ดีที่จุดประกายให้อาจารย์รุ่นใหม่สามารถพัฒนาโครงการวิจัยที่มีศักยภาพได้ในอนาคต สุดท้ายนี้ขอขอบคุณอีกครั้งที่ช่วยให้โครงการวิจัยชิ้นนี้ให้ดำเนินการจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

4. บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) ที่ติดเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ต่อพฤติกรรมการผสมพันธุ์และการพัฒนาระยะตัวอ่อน พบว่า ตัวเต็มวัยแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศเมียที่ติดเชื้อราเป็นระยะเวลามากกว่า 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงตัวเต็มวัยเพศเมียมากกว่า 83.3 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อพฤติกรรมการวางไข่และการพัฒนาระยะตัวอ่อนที่ลดลง ตัวเต็มวัยแมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียที่ติดเชื้อราสามารถถ่ายทอดเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ไปสู่แมลงวันแตงเพศตรงข้ามที่อยู่ภายในกรงเดียวกันได้จากพฤติกรรมการจับคู่ผสมพันธุ์ โดยพบว่าช่วงเวลาวันที่ 1 ถึง 3 แมลงวันแตงทั้งสองเพศที่ติดเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ติดเชื้อรา ส่วนในวันที่ 4 แมลงวันแตงทั้งสองเพศที่ติดเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ลดลง และไม่พบการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงทั้งสองเพศที่ติดเชื้อราในวันที่ 5 และ 6 นอกจากนี้แมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียที่ติดเชื้อรามีค่าการรอดชีวิตลี่ยต่ำคือ 6.2 ± 0.2 และ 5.4 ± 0.3 วัน ตามลำดับ แตกต่างจากกรงชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 130.56; df = 3; P < 0.05) ส่วนแมลงวันแตงเพศเมียและเพศผู้ที่ไม่ติดเชื้อราที่อยู่ภายในกรงเดียวกันกับแมลงวันแตงที่ติดเชื้อรามีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ย 11.1 ± 0.6 และ 12.1 ± 0.4 วันตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมของแมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียปกติมีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ย 14.3 ± 0.2 และ 14.5 ± 0.3 วัน ตามลำดับ

การแข่งขันจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรากับแมลงวันแตงเพศผู้ปกติ และ แมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อรากับแมลงวันแตงเพศเมียปกติ พบว่าในวันที่ 1 ถึง 4 หลังจากการสำรวจ แมลงวันแตงทั้งสองกรงมีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ไม่แตกต่างกัน ส่วนในวันที่ 3 แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ต่ำกว่าแมลงวันแตงเพศผู้ปกติ และไม่พบเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียที่ติดเชื้อราในวันที่ 4 และ 5 หลังจากการติดเชื้อ ส่วนชุดควบคุมเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ในกรงแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ยต่ำคือ 5.0 ± 0.1 วัน ส่วนแมลงวันแตงเพศเมียและเพศผู้ปกติที่อยู่ภายในกรงเดียวกันมีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ย 10.5 ± 0.6 และ 11.6 ± 0.4 วัน ตามลำดับ แตกต่างจากกรงชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 72.27; df = 5; P < 0.05) ส่วนแมลงวันแตงของกรงชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตเท่ากับ 12.8-14.8 วัน สำหรับกรงแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อรามีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ยต่ำคือ 4.4 ± 0.2 วัน ส่วนแมลงวันแตงเพศเมียและเพศผู้ปกติที่อยู่ภายในกรงเดียวกันมีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ย 13.8 ± 0.3 และ 13.9 ± 0.4 วัน ตามลำดับ แตกต่างจากกรงชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 191.93; df = 5; P < 0.05) ส่วนแมลงวันแตงของกรงชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตเท่ากับ 14.0-14.8 วัน

การเลือกจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรา พบว่าแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราจับคู่ผสมพันธุ์กับแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ไม่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์อยู่ระหว่าง 5-35 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 1-5 ของการสำรวจ และพบการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์พร้อมวางไข่อยู่ระหว่าง 1-9 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 2-5 ของการสำรวจแล้วมีแนวโน้มลดลง สำหรับชุดควบคุมแมลงวันแตงเพศผู้ที่แต้มสี พบเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ต่อ

แมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ไม่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์อยู่ระหว่าง 4-26 เปอร์เซ็นต์มากกว่าแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์พร้อมวางไข่อยู่ระหว่าง 2-8 เปอร์เซ็นต์ แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ยต่ำคือ 6.2 ± 0.3 วัน ซึ่งแตกต่างจากแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ไม่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์และแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์พร้อมวางไข่มีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ย 11.8 ± 0.5 และ 11.9 ± 0.3 วัน ตามลำดับ แตกต่างจากกรงชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 113.25; df = 5; $P < 0.05$) ส่วนกรงชุดควบคุมแมลงวันแตงมีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 13.9-14.1 วัน

การทดสอบในสภาพโรงเรือนเก็บจำนวนผลแตงจำนวนอย่างละ 50 ผลจากกรงที่ใช้เชื้อราและกรงชุดควบคุม พบจำนวนตัวหนอน 3,106 ตัว ดักแด้ 3,065 ดักแด้ และตัวเต็มวัย 3,022 ตัวในกรงที่ใช้เชื้อรา และพบจำนวนตัวหนอน 9,273 ตัว ดักแด้ 9,238 ดักแด้ และตัวเต็มวัย 9,238 ตัวในกรงชุดควบคุม แตกต่างจากกรงที่ใช้เชื้อราอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติยิ่ง (หนอน χ^2 = 3072.291; df = 1; P = 0.000, ดักแด้ χ^2 = 3097.288; df = 1; P = 0.000, ตัวเต็มวัย χ^2 = 3151.589; df = 1; P = 0.000) โดยคิดเป็นจำนวนเท่าของกรงที่ไม่ใช้เชื้อราต่อกรงที่ใช้เชื้อราของจำนวนตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยมากกว่ากรงที่ใช้เชื้อรามากถึง 2.97 3.01 และ 3.05 เท่า ตามลำดับ

คำสำคัญ: แมลงวันแตง, *Metarhizium anisopliae*, การผสมพันธุ์, การถ่ายทอดเชื้อรา

Abstract

Effects of infected cucumber fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Couquillett), with entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* PSUM02, on mating behavior and immature stages development were studied. The adult stage of female *B. cucurbitae* infected with *M. anisopliae* PSUM02 more than 48 h showed percentage mortality higher 83.3%. The infected female fly *B. cucurbitae* with the fungus was declined of an egg laying behavior and immature stages development. The infected adult male and female fly with *M. anisopliae* PSUM02 transmitted the fungus to opposite sex in the same cage by mating behavior. Both infected adult male and female fly *B. cucurbitae* with *M. anisopliae* PSUM02 showed similar value of mating percentage on day 1 to day 3 after treated. On day 4, infected adult male and female fly were decreased and did not detect of this value on day 5 and day 6 after treated. The average survival time (AST) of infected adult male and female *B. cucurbitae* with *M. anisopliae* PSUM02 were lower than un-infected female (11.1 ± 0.6 days) and male (12.1 ± 0.4 days) in the same cage and control cage of male (14.3 ± 0.2 days) and female (14.5 ± 0.3 days) with 6.2 ± 0.2 and 5.4 ± 0.3 days and significantly different (F = 130.56; df = 3; $P < 0.05$).

The mating competitiveness between infected adult male fly and un-infected adult male fly and vice versa were investigated. The fly from both testing cages showed similar of percentage of mating on day 1 to 2 after treated. The infected adult male fly showed percentage of mating lower than un-infected adult male fly in the same cage on day 3. The percentage of mating of mating of infected adult male and female fly was not detected on day 5 and 6 after treated. The percentage of mating of un-infected fly from control cages was not significantly different. The AST of infected adult male fly were 5.0 ± 0.1 days and significantly different (F = 72.27; df = 5; $P < 0.05$) from un-infected female (10.5 ± 0.6 days) and male (10.5 ± 0.6 days) in the same cage and the fly from control cage with 12.8-14.8 days, respectively. The AST of infected adult female fly were 4.4 ± 0.2 days and significantly different (F = 191.93; df = 5; $P < 0.05$) from un-infected female (13.8 ± 0.3 days) and male (13.9 ± 0.4 days) in the same cage and the fly from control cage with 14.0-14.8 days, respectively.

The mating selection of infected adult male fly with *M. anisopliae* PSUM02 on un-infected adult virgin and gravid female fly was studied. The infected adult male fly showed percentage of mating with un-infected adult virgin and gravid female fly with 5-35 and 1-9%, respectively. The control cage with un-infected adult male fly (dorsal marked) showed percentage of mating with un-infected adult virgin and gravid female fly with 4-26 and 2-8%, respectively. The AST of infected adult male fly was 6.2 ± 0.3 days and significantly different (F = 113.25; df = 5; $P < 0.05$) from un-infected adult virgin and gravid female fly with 11.8 ± 0.5 and 11.9 ± 0.3 days, respectively. The AST of the fly in control cage was 13.9-14.1 days.

In green house test, 50 cucumber fruits were collected from each fungal treated and control cage. The fungal treated cage showed 3,106 larvae, 3,065 pupae and 3,022 adults. The control cage showed 9,273 larvae, 9,238 pupae and 9,238 adults and significantly different from the fungal treated cage (larvae χ^2 = 3072.291; df = 1; P = 0.000, pupae χ^2 = 3097.288; df = 1; P = 0.000, adult χ^2 = 3151.589; df = 1; P = 0.000). The proportion of fruit fly in control cage and fungal treated cage were 2.97, 3.01 and 3.05 times, respectively.

Keywords: *Bactrocera cucurbitae*, *Metarhizium anisopliae*, mating, transmission

5. บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

บทนำ

แมลงวันแตงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bactrocera cucurbitae* (Coqillett) (Diptera: Tephritidae) มีการแพร่กระจายไปทั่วทุกแห่งของโลก ทั้งในเขตอบอุ่น เขตร้อน และเขตกึ่งร้อน แมลงชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดีย และสามารถเข้าทำลายพืชได้มากถึง 81 ชนิด (Dhillon *et al.*, 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชตระกูลแตงในวงศ์ Cucurbitaceae เช่น มะระ แตงไทย แตงโม ฟักทอง แตงกวา บวบงู และบวบเหลี่ยม เป็นต้น (Doharey, 1983; White and Elson-Harris, 1992; Allwood *et al.*, 1999; Weems *et al.*, 2001) แมลงชนิดนี้มีการแพร่ระบาดหลายประเทศ ได้แก่ อินเดีย ปากีสถาน เนปาล ศรีลังกา พม่า ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย จีน สิงคโปร์ ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน ซาลาวัก และติมอร์ (Christenson and Foote, 1960; White and Elson-Harris, 1992; Waterhouse, 1993; Clarke *et al.*, 2001; Weems *et al.*, 2001; Dhillon *et al.*, 2005) สำหรับประเทศไทยพบการแพร่ระบาดทั่วทุกแห่งของพื้นที่ (Clarke *et al.*, 2001) แมลงชนิดนี้สร้างความเสียหายแก่พืชโดยตัวเต็มวัยเพศเมียใช้อวัยวะวางไข่แทงเข้าไปในผลของพืชเพื่อวางไข่ หนอนที่ฟักออกมากัดกินอยู่ภายในผล นอกจากนี้รอยแผลที่เกิดขึ้นจากการวางไข่ยังส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชเข้าทำลาย ทำให้ผลเน่าและร่วงหล่นก่อนถึงระยะเก็บเกี่ยว (Collins and Collins, 1998)

การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเป็นวิธีการที่นิยมในปัจจุบัน เป็นวิธีการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ เกษตรกรผู้ใช้สารเคมี ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีมีหลายวิธี การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชถือเป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เชื้อราสาเหตุโรคของแมลงซึ่งสามารถใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดและบางชนิดสามารถควบคุมแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ ชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงที่นำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่น *Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana, Paecilomyces fumosoroseus* และ *Verticillium lecanii* โดยเฉพาะเชื้อรา *M. anisopliae* มีการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชและสัตว์อย่างแพร่หลาย (Boucias and Pendland, 1998) และมีการนำเชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* ควบคุมแมลงวันผลไม้ในหลายสกุล เช่น *Anastrepha ludens* (Loew), *Cerratitis capitata* (Wiedemann), *C. cosyra* (Walker), *C. fasciventris* (Bezzi) และ *Bactrocera papayae* (นริศ และ อนุชิต, 2551; นริศ และคณะ 2554; Toledo *et al.*, 2006; Quesada-Moraga *et al.*, 2008; Dimbi *et al.*, 2009)

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ศึกษาการใช้เชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* PSUM02 ที่มีผลต่อพฤติกรรมการวางไข่ และการพัฒนาระยะตัวอ่อน รวมทั้งพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของแมลงวันแตง *B. cucurbitae* ทั้งในห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนทดลอง เพื่อเป็นแนวทางเลือกในการควบคุมแมลงวันแตง และหลีกเลี่ยงการใช้สารฆ่าแมลงที่เป็นอันตรายต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และตลอดจนสิ่งแวดล้อม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ต่อการวางไข่และการพัฒนาระยะตัวอ่อนแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae*
2. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดเชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตง *B. cucurbitae*
3. เพื่อศึกษาผลของระยะการเจริญพันธุ์ของแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศเมียต่อการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae*
4. เพื่อประยุกต์ใช้เชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* ในการควบคุมแมลงวันแตง *B. cucurbitae* ในสภาพโรงเรือน

สรุป

การทดลองที่ 1 ผลของระยะเวลาการติดเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ในแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* เพศเมียต่อพฤติกรรมการวางไข่ และการสืบพันธุ์

การทดสอบผลของเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ต่อแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* ตัวเต็มวัยเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์และพร้อมวางไข่อายุ 20 วัน จำนวน 30 ตัว (ซ้ำ) ที่ติดเชื้อราในระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาการติดเชื้อราของแมลงวันแตงเพศเมียมีผลต่อจำนวนตัวเต็มวัยที่สามารถวางไข่ และการพัฒนาของไข่เป็นตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อราเป็นเวลามากกว่า 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงตัวเต็มวัยเพศเมียมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อราแต่ละช่วงเวลามีรายละเอียด ดังนี้

แมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากจำนวนแมลงเริ่มต้น 30 ตัว มีจำนวนแมลงวันแตงที่สามารถวางไข่ได้จำนวน 18 ตัว (60%) ตัวเต็มวัยที่ติดเชื้อราจำนวน 14 ตัว (40%) จากจำนวนแมลงวันแตงที่เหลือรอดพบว่าสามารถวางไข่และมีจำนวนตัวหนอนที่มีชีวิต 572 ตัว จำนวนตัวหนอนที่ตาย 15 ตัว จำนวนตัวหนอนที่เข้าดักแด้ 557 ตัว จำนวนดักแด้ที่ไม่ฟักเป็นตัวเต็มวัย 103 ดักแด้ และมีจำนวนตัวเต็มวัยที่เหลือรอด 454 ตัว (Table 1)

แมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากจำนวนแมลงเริ่มต้น 30 ตัว มีจำนวนแมลงวันแตงที่สามารถวางไข่ได้จำนวน 5 ตัว (16.7%) ตัวเต็มวัยที่ติดเชื้อราจำนวน 25 ตัว (83.3%) จากจำนวนแมลงวันแตงที่เหลือรอดพบว่าสามารถวางไข่และมีจำนวนตัวหนอนที่มีชีวิต 60 ตัว จำนวนตัวหนอนที่ตาย 12 ตัว จำนวน

ตัวหนอนที่เข้าดักแด้ 48 ตัว จำนวนดักแด้ที่ไม่ฟักเป็นตัวเต็มวัย 18 ดักแด้ และมีจำนวนตัวเต็มวัยที่เหลือรอด 30 ตัว (Table 1)

แมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากจำนวนแมลงเริ่มต้น 30 ตัว มีจำนวนแมลงวันแตงที่สามารถวางไข่ได้จำนวน 1 ตัว (3.3%) ตัวเต็มวัยที่ติดเชื้อราจำนวน 29 ตัว (96.7%) จากจำนวนแมลงวันแตงที่เหลือรอดพบว่าสามารถวางไข่และมีจำนวนตัวหนอนที่มีชีวิต 7 ตัว จำนวนตัวหนอนที่ตาย 1 ตัว จำนวนตัวหนอนที่เข้าดักแด้ 6 ตัว จำนวนดักแด้ที่ไม่ฟักเป็นตัวเต็มวัย 1 ดักแด้ และมีจำนวนตัวเต็มวัยที่เหลือรอด 5 ตัว (Table 1)

แมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากจำนวนแมลงเริ่มต้น 30 ตัว มีจำนวนแมลงวันแตงที่สามารถวางไข่ได้จำนวน 4 ตัว (13.3%) ตัวเต็มวัยที่ติดเชื้อราจำนวน 26 ตัว (86.7%) จากจำนวนแมลงวันแตงที่เหลือรอดพบว่าสามารถวางไข่และมีจำนวนตัวหนอนที่มีชีวิต 43 ตัว จำนวนตัวหนอนที่ตาย 7 ตัว จำนวนตัวหนอนที่เข้าดักแด้ 36 ตัว จำนวนดักแด้ที่ไม่ฟักเป็นตัวเต็มวัย 12 ดักแด้ และมีจำนวนตัวเต็มวัยที่เหลือรอด 24 ตัว (Table 1)

ส่วนชุดควบคุมคือแมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ติดเชื้อรา จากจำนวนแมลงเริ่มต้น 30 ตัว มีจำนวนแมลงวันแตงที่สามารถวางไข่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แมลงวันแตงทั้งหมดสามารถวางไข่และมีจำนวนตัวหนอนที่มีชีวิต 973 ตัว จำนวนตัวหนอนที่ตาย 11 ตัว จำนวนตัวหนอนที่เข้าดักแด้ 962 ตัว ดักแด้ทั้งหมดสามารถฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัยได้ทั้งหมด (Table 1)

Table 1. Percentage of gravid female laying egg, mortality and immature stages of *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) infected with *Metahizium anisopliae* PSUM02 with different latent infection times.

Latent infection time	No. of insect	% gravid female laying egg	% mortality of gravid female	Total No. of insect				
				Larvae	Dead larvae	Pupae	Dead pupae	Adult
24 hr	30	60.0	40.0	572	15	557	103	454
48 hr	30	16.7	83.3	60	12	48	18	30
72 hr	30	3.3	96.7	7	1	6	1	5
96 hr	30	13.3	86.7	43	7	36	12	24
control	30	100.0	0.0	973	11	962	0	962
χ^2-test[1/]		**	**	**	*	**	**	**

[1/]The number within columns are analyses with χ^2 test of goodness-of-fit; * = $P<0.05$; ** = $P<0.01$

การทดลองที่ 2 ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ผ่านการผสมพันธุ์ของแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae*

การศึกษาความสามารถจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศผู้ที่ติดเชื้อรากับเพศเมียปกติ เพศเมียที่ติดเชื้อรากับเพศผู้ปกติ และชุดควบคุม (เพศผู้และเพศเมียไม่ติดเชื้อรา) จำนวนทรีทเมนต์ละ 50 คู่ (ซ้ำ) พบว่าในวันที่ 1 กรงแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อรามีสัดส่วนการจับคู่ผสมพันธุ์สูงที่สุด คือ 20 รองลงมาคือกรงชุดควบคุมมีสัดส่วนการจับคู่ผสมพันธุ์เท่ากับ 16 ส่วนกรงแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีสัดส่วนการจับคู่ผสมพันธุ์เท่ากับ 8 (χ^2 = 7.204; df = 2; P = 0.027) วันที่ 2 กรงชุดควบคุมมีสัดส่วนการจับคู่ผสมพันธุ์สูงที่สุด คือ 20 รองลงมาคือกรงแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีสัดส่วนการจับคู่ผสมพันธุ์เท่ากับ 16 ส่วนกรงแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อรามีสัดส่วนการจับคู่ผสมพันธุ์เท่ากับ 8 (χ^2 = 7.204; df = 2; P = 0.027) วันที่ 3 แมลงวันแตงที่ติดเชื้อราทั้งสองเพศและแมลงวันแตงชุดควบคุมมีสัดส่วนการจับคู่ผสมพันธุ์ไม่แตกต่างกัน (χ^2 = 0.761; df = 2; P = 0.692) วันที่ 4 แมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียที่ติดเชื้อรามีสัดส่วนการจับคู่ผสมพันธุ์ลดลงเหลือเพียง 4 ส่วน แมลงวันแตงกรงควบคุมมีสัดส่วนการจับคู่ผสมพันธุ์เท่ากับ 12 (χ^2 = 7.385; df = 2; P = 0.036) หลังจากวันที่ 5 ไม่พบการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียที่ติดเชื้อรา ส่วนแมลงวันแตงเพศผู้ปกติมีสัดส่วนการจับคู่ผสมพันธุ์เท่ากับ 4 ในวันที่ 5 และเท่ากับ 8 ในวันที่ 6 ตามลำดับ (Fig. 1)

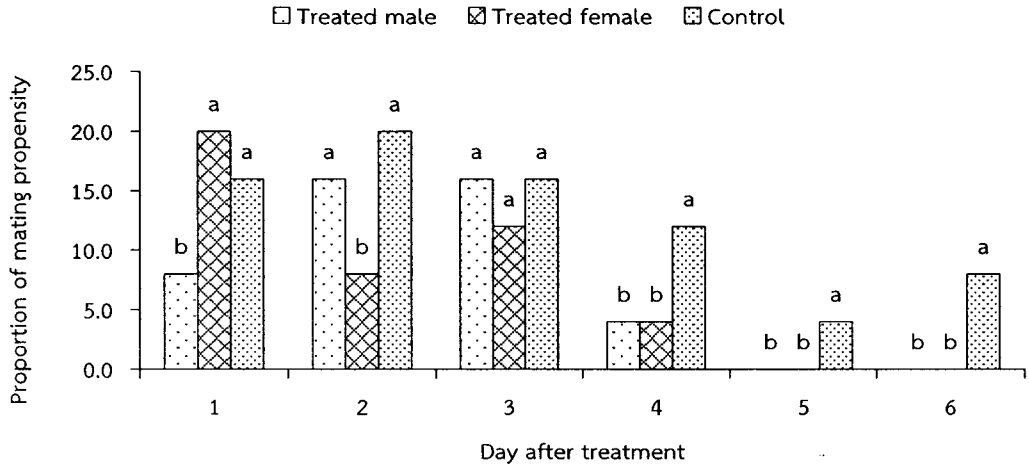


Figure 1. The mating propensities of *Metarhizium anisopliae* PSUM02 treated males, *M. anisopliae* PSUM02 treated females, and untreated *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) flies (control group). The different letter in each day was significantly different ($P<0.05$) by using the χ^2-test (assuming equal distributions as the null hypothesis) and significant differences between groups were also identified with Fisher's exact test.

แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิต (AST) เท่ากับ 6.2 ± 0.2 วัน ซึ่งแตกต่างจากแมลงวันแตงเพศเมียที่อยู่ภายในกรงเดียวกันเท่ากับ 11.1 ± 0.6 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 130.56; df = 3; $P < 0.05$) สำหรับแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อรามี AST เท่ากับ 5.4 ± 0.3 วันซึ่งแตกต่างจากแมลงวันแตงเพศผู้ที่อยู่ภายในกรงเดียวกันเท่ากับ 12.1 ± 0.4 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 130.56; df = 3; $P < 0.05$) ส่วนแมลงวันแตงเพศผู้ (14.3 ± 0.2 วัน) และเพศเมีย (14.5 ± 0.3 วัน) ของกรงชุดควบคุมที่อยู่ภายในกรงเดียวกันมีค่า AST ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2)

Table 2. Kaplan-Meier survival analysis of *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02. In treated cages the population was exposed by contact with infected males and females, while the untreated cages had unexposed healthy population. The significant difference in AST of healthy females indicates transmission of infection by contact.

Assay	Insect	n	Average survival time (AST) (mean ± SE)*	95% Confidence interval	
				Lower	Upper
Treated cage	Infected male	50	6.2 ± 0.2[a]	5.8	6.6
	Healthy female	50	11.1 ± 0.6[b]	10.2	12.4
Treated cage	Healthy male	50	12.1 ± 0.4[b]	10.6	13.5
	Infected female	50	5.4 ± 0.3[a]	4.9	5.9
Control cage	Healthy male	50	14.3 ± 0.2[c]	13.6	14.9
	Healthy female	50	14.5 ± 0.3[c]	13.9	15.0

*Different superscripts in the AST column indicate statistical significance by Tukey's HSD test (P<0.01). AST observations were limited to 15 days, *i.e.*, the data are right censored.

สำหรับกรงแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรา พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมมากขึ้นตามจำนวนวันที่เพิ่มมากขึ้น โดยพบเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 2% ในวันที่ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์การตายสะสม 6% ในวันที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตายสะสม 42% ในวันที่ 5 และ 6 เปอร์เซ็นต์การตายสะสม 90% ในวันที่ 7 และเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 100% ในวันที่ 8 ตามลำดับ (Fig. 2) สำหรับกรงแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อรา พบว่าแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 100% ในวันที่ 9 ส่วนแมลงวันแตงเพศผู้ที่อยู่ภายในกรงเดียวกันกับแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อราพบเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 33.33% ในวันที่ 11 (Fig. 3) สำหรับกรงชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของแมลงวันเพศผู้และเพศเมียต่ำกว่า 14% (Fig. 4)

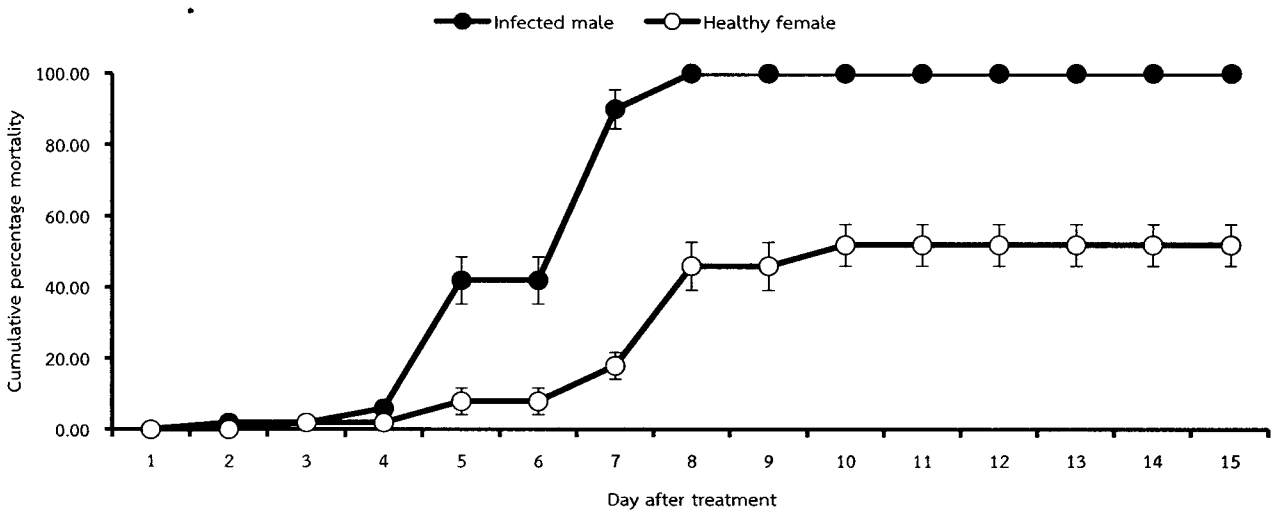


Figure 2. Cumulative percentage mortalities (mean ± S.E.) of healthy adult female and infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 adult male flies *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) in a mixed population.

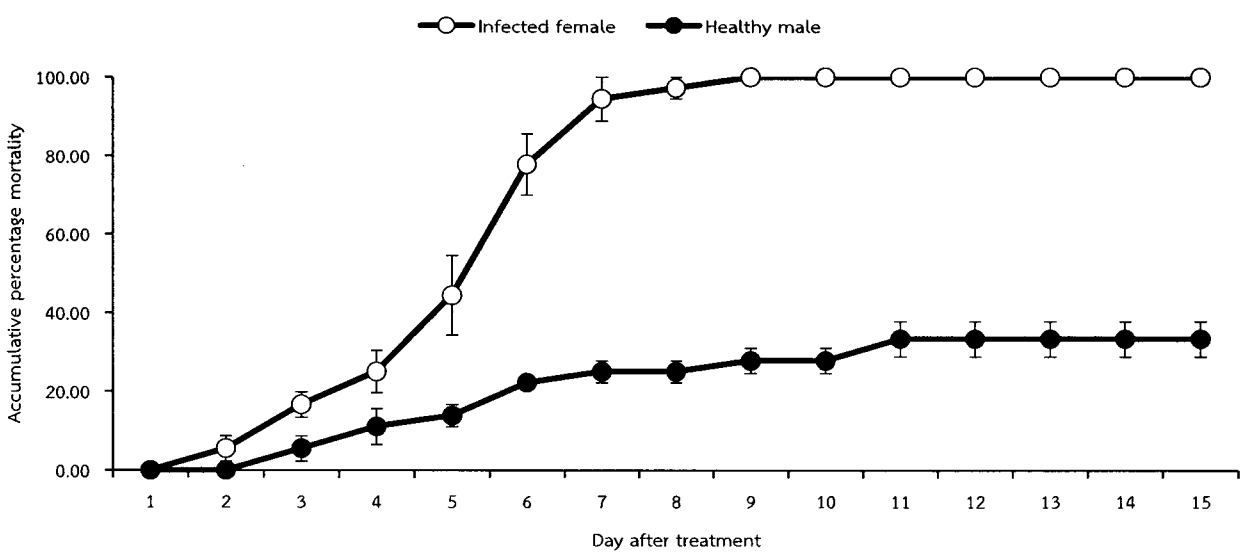


Figure 3. Cumulative mortalities (mean ± S.E.) of healthy adult male and infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 adult female flies *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) in a mixed population.

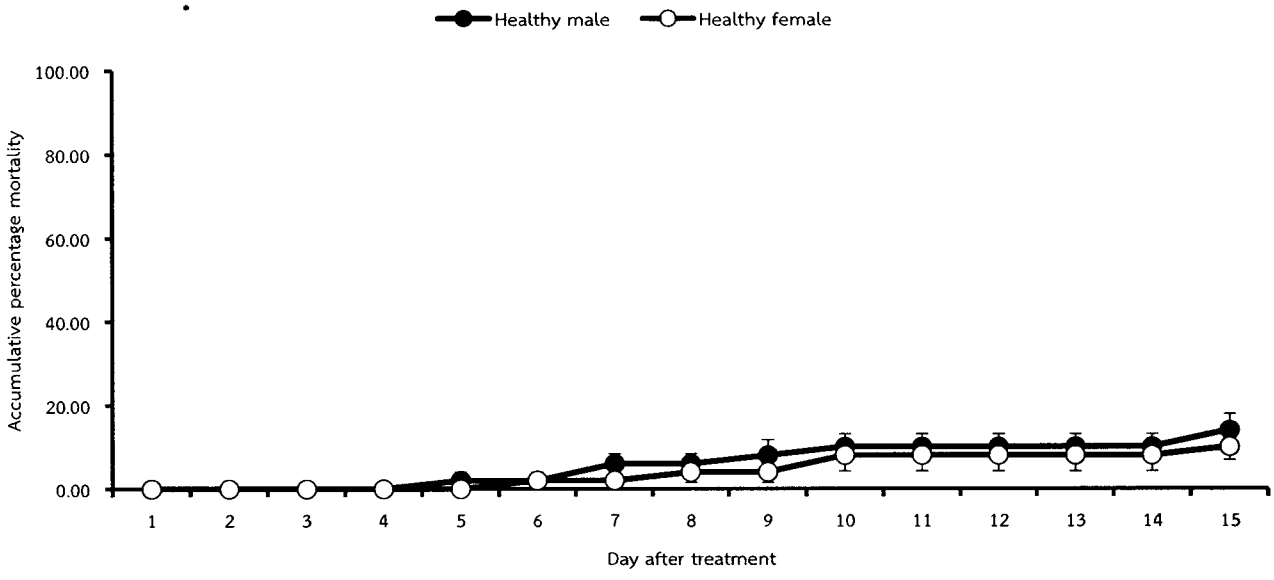


Figure 4. Cumulative percentage mortality (mean ± S.E.) of healthy adult male and female fly, *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett), uninfected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02.

การทดลองที่ 3 ผลของการติดเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ในแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* เพศผู้ต่อการแข่งขันผสมพันธุ์

การแข่งขันจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรากับแมลงวันแตงเพศผู้ปกติ และการแข่งขันจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อรากับแมลงวันแตงเพศเมียปกติ จำนวนชนิดละ 10 ตัวต่อกรง จำนวน 10 ซ้ำ พบว่าการแข่งขันจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรากับแมลงวันแตงเพศผู้ปกติ และในวันที่ 1 และ 2 หลังจากการสำรวจ แมลงวันเพศผู้ที่ติดเชื้อราและแมลงวันแตงเพศผู้ปกติมีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ไม่แตกต่างกัน ส่วนในวันที่ 3 แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ต่ำกว่าแมลงวันแตงเพศผู้ปกติ และไม่พบการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราในวันที่ 4 และ 5 หลังจากการติดเชื้อ (Fig. 5) สำหรับชุดควบคุมเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศผู้ที่แต้มสีกับแมลงวันแตงเพศผู้ปกติไม่มีความแตกต่างกันของทุกวันที่สำรวจ (Fig. 6)

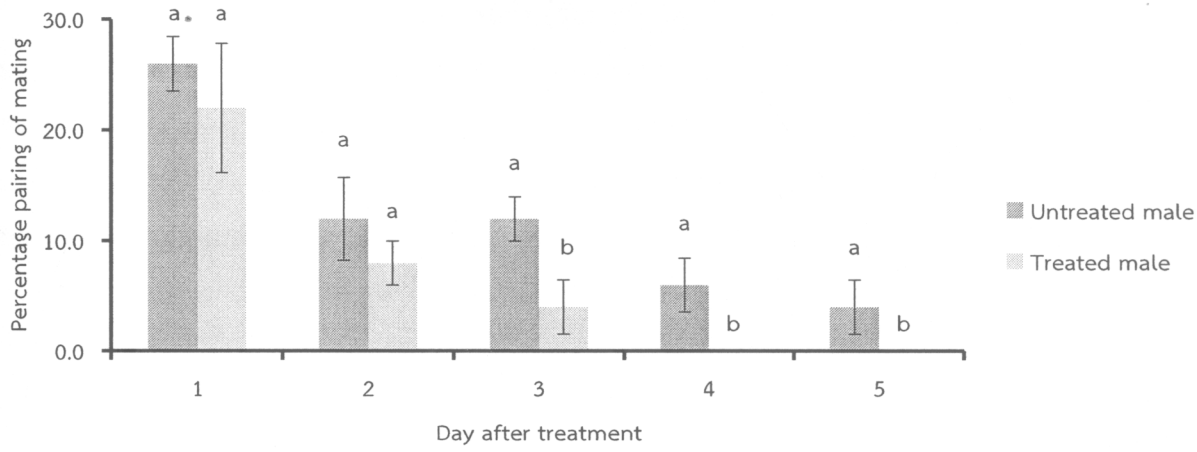


Figure 5. Percentages of mating success in pairing (mean ± S.E.) of *Metarhizium guizhouense* PSUM02 infected *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) adult male flies and untreated adult male flies. The different letter in each day was compared with independent sample *t*-test ($P<0.05$).

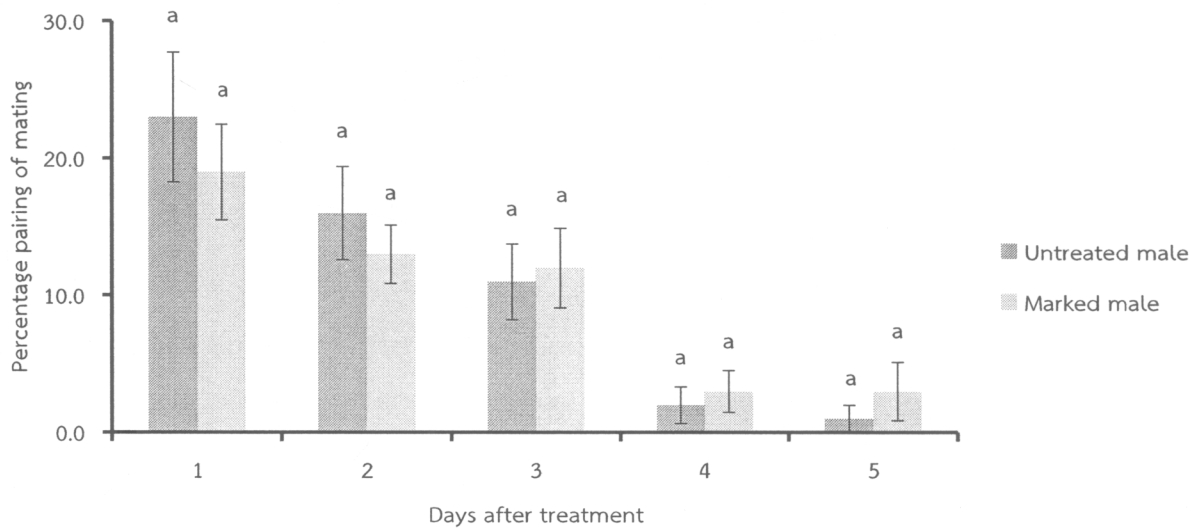


Figure 6. Percentages of mating success in pairing (mean ± S.E.) of marked and untreated adult male flies (control). The different letter in each day was compared with independent sample *t*-test ($P<0.05$).

สำหรับการทดสอบการแข่งขันจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อรากับแมลงวันแตงเพศเมียปกติ ในวันที่ 1 ถึง 4 แมลงวันแตงเพศผู้ปกติมีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ในแมลงวันแตงเพศเมียทั้งสองสถานะไม่แตกต่างกัน ส่วนในวันที่ 5 ไม่พบเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศผู้กับแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อรา (Fig. 7) สำหรับชุดควบคุมเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศเมียที่แต้มสีกับแมลงวันแตงเพศเมียปกติไม่มีความแตกต่างกันของทุกวันที่สำรวจ ยกเว้นวันที่ 2 ที่พบเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ในแมลงวันแตงเพศเมียที่แต้มสีสูงกว่าแมลงวันแตงเพศเมียที่คลุกด้วยน้ำเปล่า (Fig. 8)

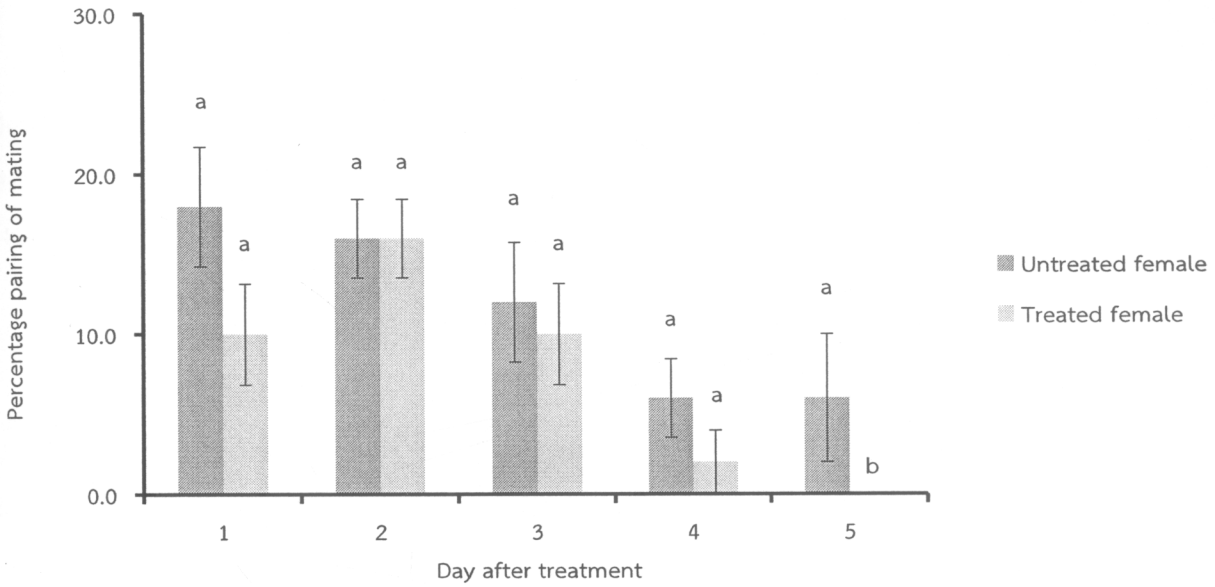


Figure 7. Percentages of mating success in pairing (mean ± S.E.) of *Metarhizium guizhouense* PSUM02 infected *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) adult female flies and untreated adult female flies. The different letter in each day was compared with independent sample *t*-test ($P<0.05$).

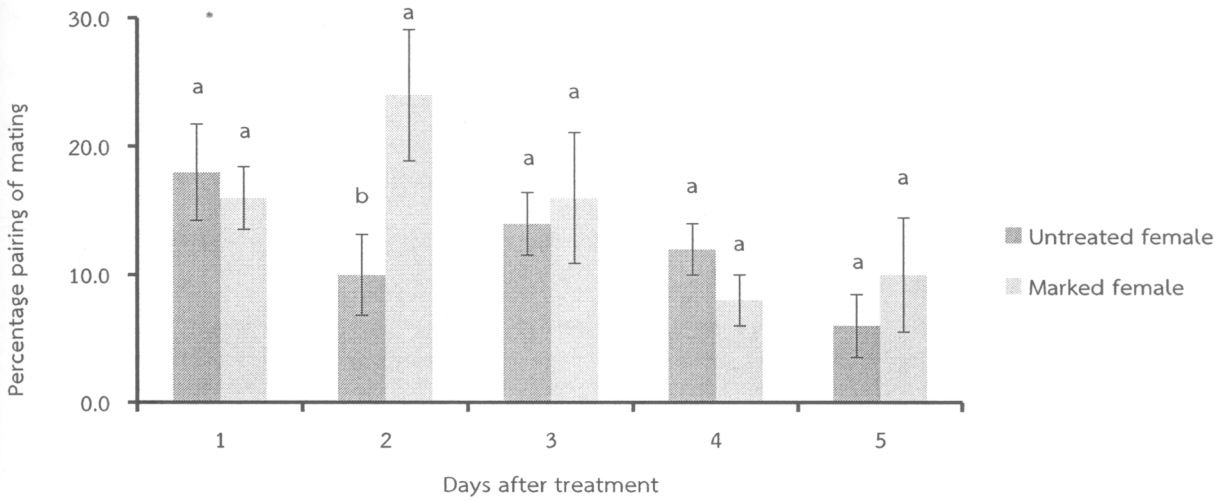


Figure 8. Percentages of mating success in pairing (mean ± S.E.) of marked and untreated adult female flies (control). The different letter in each day was compared with independent sample *t*-test ($P<0.05$).

แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิต (AST) น้อยที่สุด คือ 5.0 ± 0.1 วัน ซึ่งแตกต่างจากแมลงวันแตงเพศเมียปกติ (10.5 ± 0.6 วัน) และเพศผู้ปกติ (11.6 ± 0.4 วัน) ที่อยู่ภายในกรงเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F = 72.27$; df = 5; $P < 0.05$) ส่วนแมลงวันแตงเพศผู้แต้มสี เพศผู้ปกติ และเพศเมียปกติของกรงชุดควบคุมมีค่า AST ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 13.2 ± 0.4, 12.8 ± 0.1 และ 13.5 ± 0.3 วัน (Table 3)

Table 3. Kaplan-Meier survival analysis of adult male *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02, in data from the mating competitiveness bioassay.

Assay	Insect	Average survival time (AST) (mean ± SE)*	95% Confidence interval	
			Lower	Upper
Treated cage	Infected male	5.0 ± 0.1[a]	4.8	5.3
	Healthy male	11.6 ± 0.4[c]	10.8	12.4
	Healthy female	10.5 ± 0.6[b]	9.8	11.2
Control cage	Marked male	13.2 ± 0.4[d]	12.5	14.0
	Healthy male	12.8 ± 0.1[d]	11.7	13.9
	Healthy female	13.5 ± 0.3[d]	12.8	14.3

*Different superscripts in the AST column indicate significant differences by Tukey's HSD test ($P<0.05$). AST observations were right censored by limiting observations to 15 days, *i.e.*, the data are right censored. The number of insect in each cage was 10 flies and 10 replications.

แมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อรามีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิต (AST) น้อยที่สุด คือ 4.4 ± 0.2 วัน ซึ่งแตกต่างจากแมลงวันแตงเพศเมียปกติ (13.8 ± 0.3 วัน) และเพศผู้ปกติ (13.9 ± 0.4 วัน) ที่อยู่ภายในกรงเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 191.93; df = 5; $P < 0.05$) ส่วนแมลงวันแตงเพศเมียแต้มสี เพศเมียปกติ และเพศผู้ปกติของกรงชุดควบคุมมีค่า AST ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 14.8 ± 0.2, 14.7 ± 0.2 และ 14.0 ± 0.4 วัน (Table 4)

Table 4. Kaplan-Meier survival analysis of adult female *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02, in data from the mating competitiveness bioassay.

Assay	Insect	Average survival time (AST) (mean ± SE)*	95% Confidence interval	
			Lower	Upper
Infected cage	Infected female	4.4 ± 0.2[a]	3.9	4.9
	Healthy male	13.9 ± 0.4[b]	13.0	14.8
	Healthy female	13.8 ± 0.3[b]	12.9	14.7
Control cage	Marked female	14.8 ± 0.2[b]	13.1	14.9
	Healthy male	14.0 ± 0.4[b]	14.4	15.1
	Healthy female	14.7 ± 0.2[b]	14.4	15.1

*Different superscripts in the AST column indicate significant differences by Tukey's HSD test ($P<0.05$). AST observations were right censored by limiting observations to 15 days, *i.e.*, the data are right censored. The number of insect in each cage was 10 flies and 10 replications.

เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราพบ 100% ที่ 7 วันหลังจากการติดเชื้อ (Fig. 9) แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราสามารถถ่ายทอดเชื้อราไปสู่แมลงวันแตงเพศเมียและเพศผู้ปกติที่อยู่ภายในกรงเดียวกันได้ โดยพบเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเท่ากับ 84.0 ± 7.5% และ 72.0 ± 6.6% ในวันที่ 14 หลังจากการติดเชื้อ(Fig. 9) ส่วนชุดควบคุมพบเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของแมลงวันแตงเพศผู้แต้มสี แมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียปกติต่ำกว่า 36% (Fig. 10)

สำหรับเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อราพบ 100% ที่ 7 วันหลังจากการติดเชื้อ (Fig. 11) ส่วนแมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียปกติที่อยู่ภายในกรงเดียวกันได้พบเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเพียง 12.0 ± 4.5% และ 14.0 ± 2.5% ในวันที่ 9 และ 10 หลังจากการติดเชื้อ (Fig. 11) ส่วนชุดควบคุมพบเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของแมลงวันแตงเพศเมียแต้มสี แมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียปกติต่ำกว่า 16% (Fig. 12)

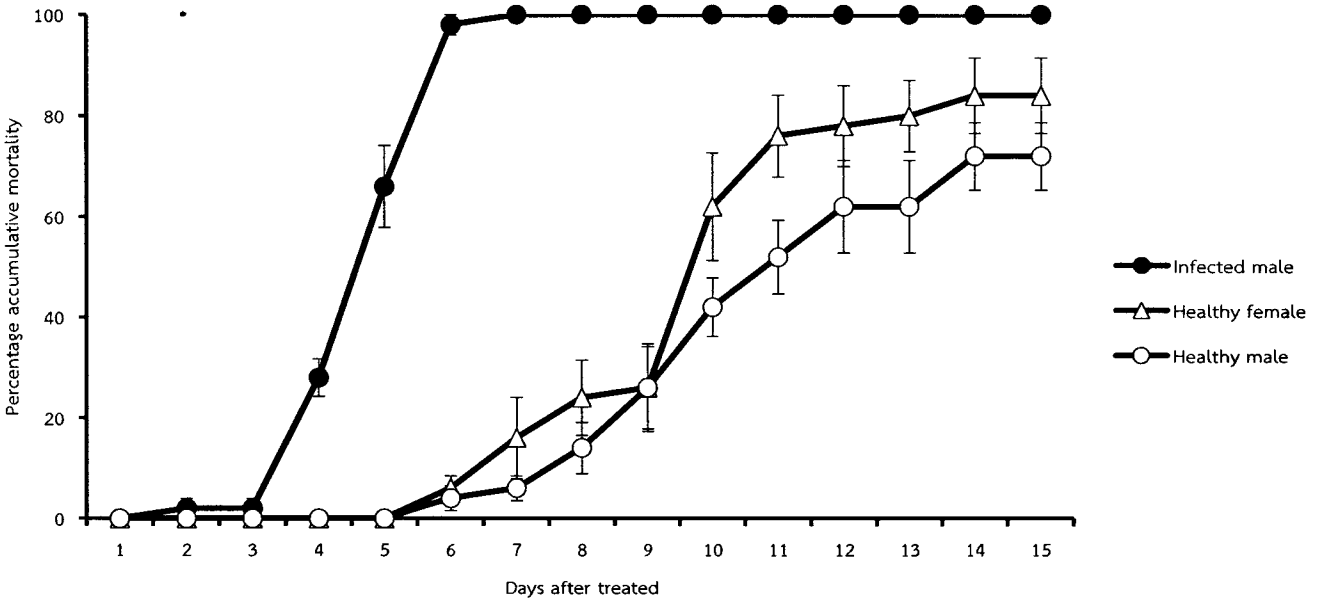


Figure 9. Accumulative percentage mortality of healthy adult male, female and adult male fly, *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett), infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02.

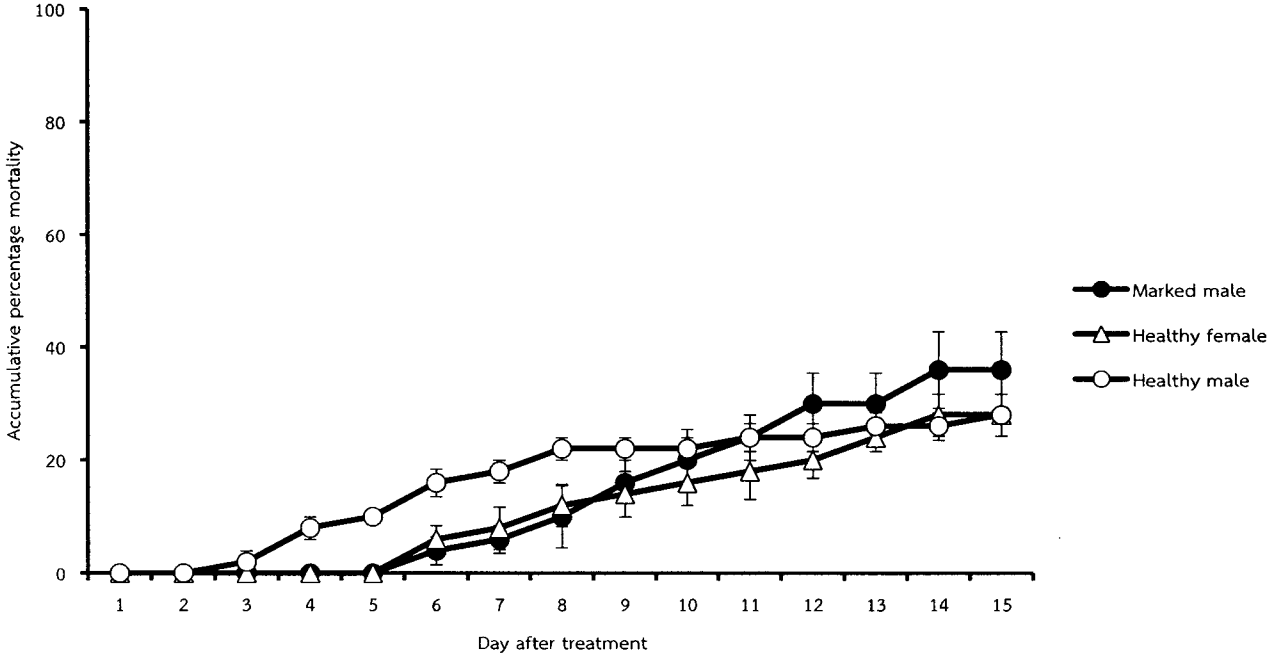


Figure 10. Accumulative percentage mortality of healthy adult male, female and marked adult male fly, *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett), uninfected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02.

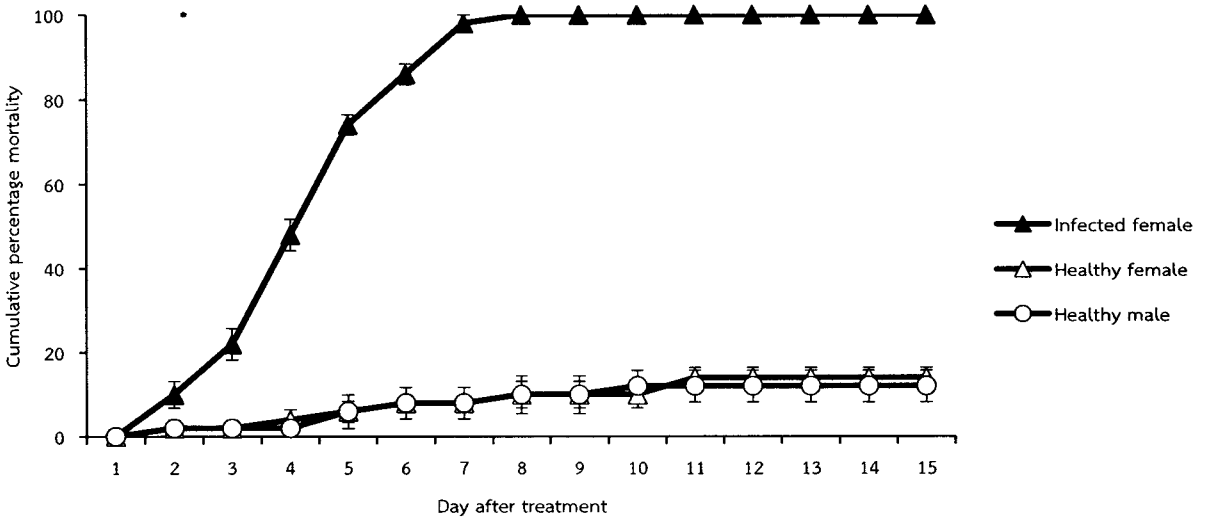


Figure 11. Cumulative mortalities of healthy adult male, female and infected with *Metarhiziumanisopliae* PSUM02 adult female flies *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett).

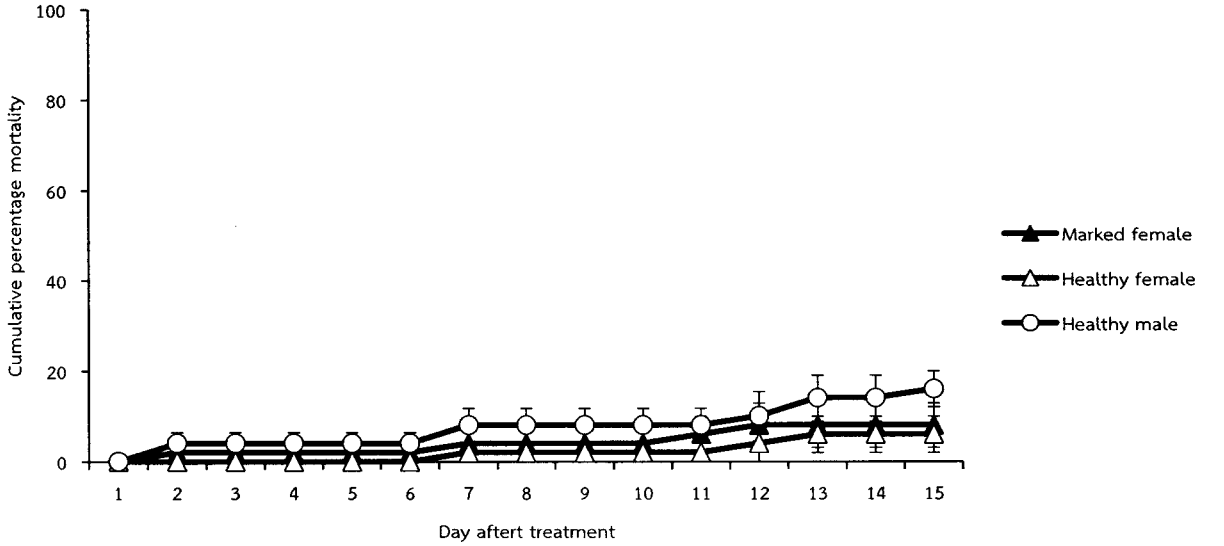


Figure 12. Cumulative mortalities of healthy adult male, female and marked adult female flies un-infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 of *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett).

สำนักหอสมุดกลาง การเรียนรู้คุณค่าเพื่อพัฒนา อรรถกระวีวิทยา

การทดลองที่ 4 ผลของการถ่ายทอดเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* โดยแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* เพศผู้ต่อแมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์

การเลือกจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราต่อแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ไม่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์ (virgin) และผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์พร้อมวางไข่ (gravid) จำนวนชนิดละ 10 ตัวต่อกรง จำนวน 10 ซ้ำ พบว่าแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราจับคู่ผสมพันธุ์กับแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์พร้อมวางไข่ในวันที่ 1-5 ของการสำรวจ และพบการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ไม่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์ในวันที่ 2 ของการสำรวจแล้วมีแนวโน้มลดลง (Fig. 13) สำหรับชุดควบคุมแมลงวันแตงเพศผู้ที่แต้มสี พบเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ต่อแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ไม่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์มากกว่าแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์พร้อมวางไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 1 และ 2 ส่วนในวันที่ 3-5 มีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fig. 14)

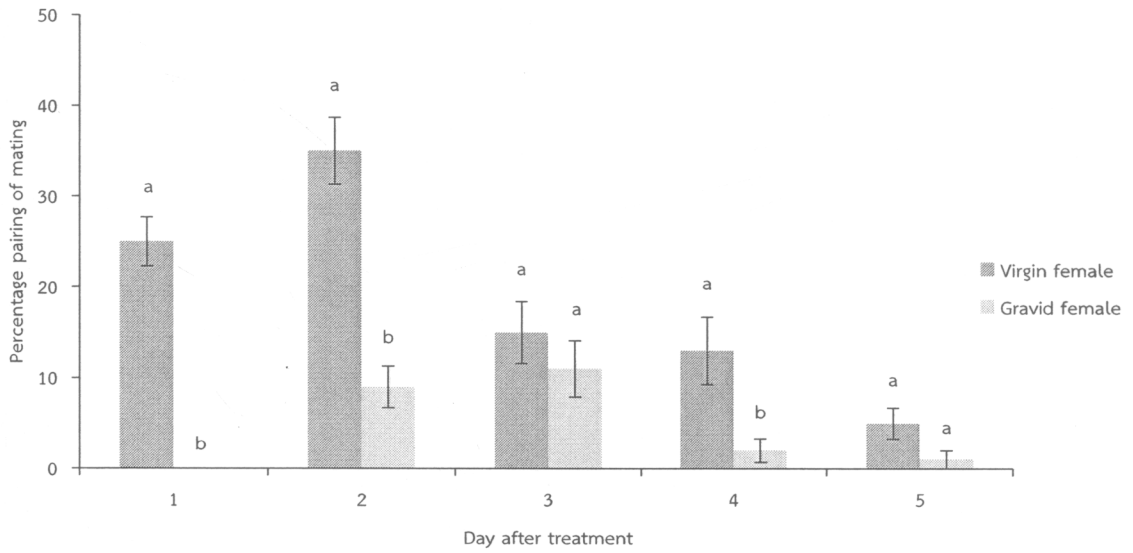


Figure 13. Percentage of mating (mean ± S.E.) of infected adult male *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 on virgin and gravid female flies. The different letter in each day was compared with independent sample *t*-test ($P<0.05$).

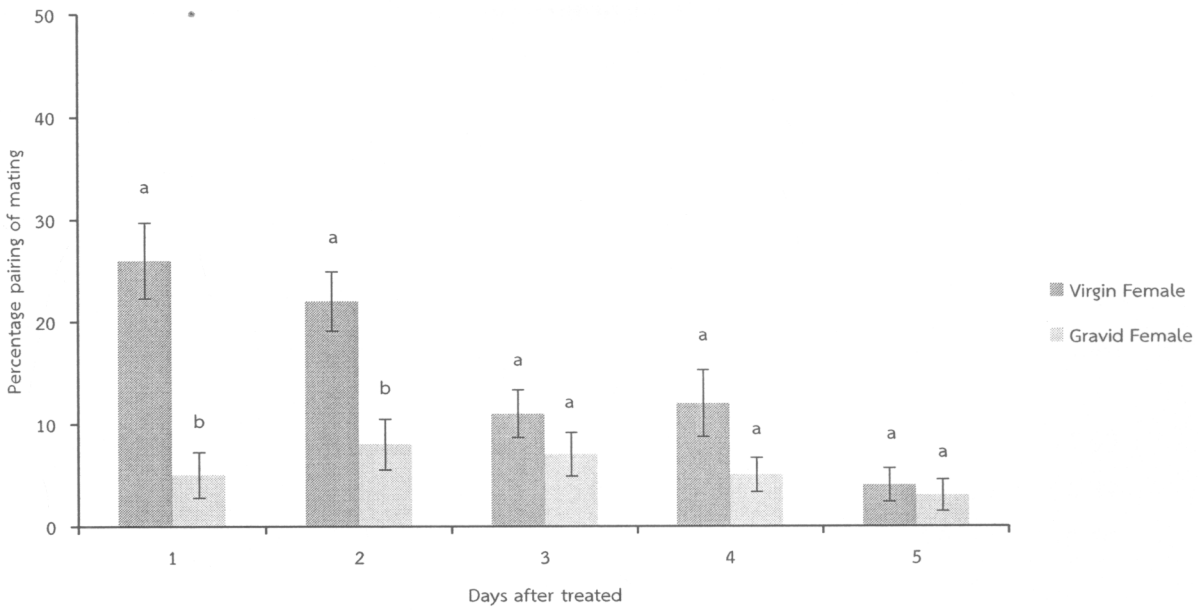


Figure 14. Percentage of mating (mean ± S.E.) of uninfected adult male *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 on virgin and gravid female flies. The different letter in each day was compared with independent sample *t*-test ($P<0.05$).

แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิต (AST) น้อยที่สุด คือ 6.2 ± 0.3 วัน ซึ่งแตกต่างจากแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ไม่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์ (11.8 ± 0.5วัน) และแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์พร้อมวางไข่ (11.9 ± 0.3 วัน) ที่อยู่ภายในกรงเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (F = 113.25; df = 5; $P < 0.05$) ส่วนในกรงควบคุมแมลงวันแตงเพศผู้แต้มสี แมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ไม่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์ และผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์พร้อมวางไข่มีค่า AST ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า AST อยู่ระหว่าง 13.9 - 14.1 วัน (Table 5)

Table 5. Kaplan-Meier survival analysis of adult male *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) infected and uninfected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 on virgin and gravid female flies.

Assay	Insect	Average survival time (AST) (mean ± SE)*	95% Confidence interval	
			Lower	Upper
Treated cage	Infected male	6.2 ± 0.3[a]	5.79	6.51
	Virgin female	11.8 ± 0.5[b]	10.90	12.47
	Gravid female	11.9 ± 0.3[b]	11.09	12.67
Control cage	Healthy male	14.1 ± 0.1[c]	13.62	14.50
	Virgin female	13.9 ± 0.1[c]	13.41	14.39
	Gravid female	13.9 ± 0.2[c]	13.40	14.40

*Different superscripts in the AST column indicate significant differences by Tukey's HSD test ($P<0.05$). AST observations were right censored by limiting observations to 15 days, *i.e.*, the data are right censored. The number of insect in each cage was 10 flies and 10 replications.

เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราพบ 100% ที่ 8 วันหลังจากการติดเชื้อ (Fig. 15) แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราสามารถถ่ายทอดเชื้อราไปสู่แมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ไม่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์และแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์พร้อมวางไข่ที่อยู่ภายในกรงเดียวกันได้ โดยพบเปอร์เซ็นต์การตายสะสมเท่ากับ 38.0 ± 6.9% และ 48.0 ± 4.6% (Fig. 15) ส่วนชุดควบคุมพบเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของแมลงวันแตงเพศผู้แต้มสี แมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ไม่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์ และแมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์พร้อมวางไข่ต่ำกว่า 22% (Fig. 16)

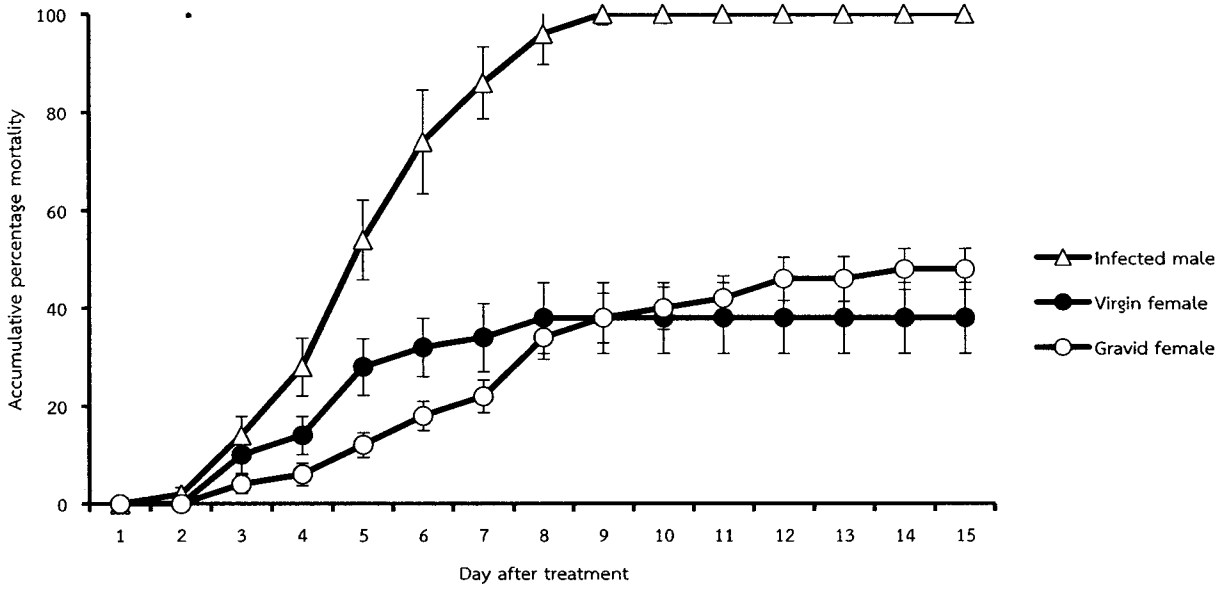


Figure 15. Accumulative percentage mortality of infected adult male with *Metarhizium anisopliae* PSUM02, virgin female and gravid female fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett).

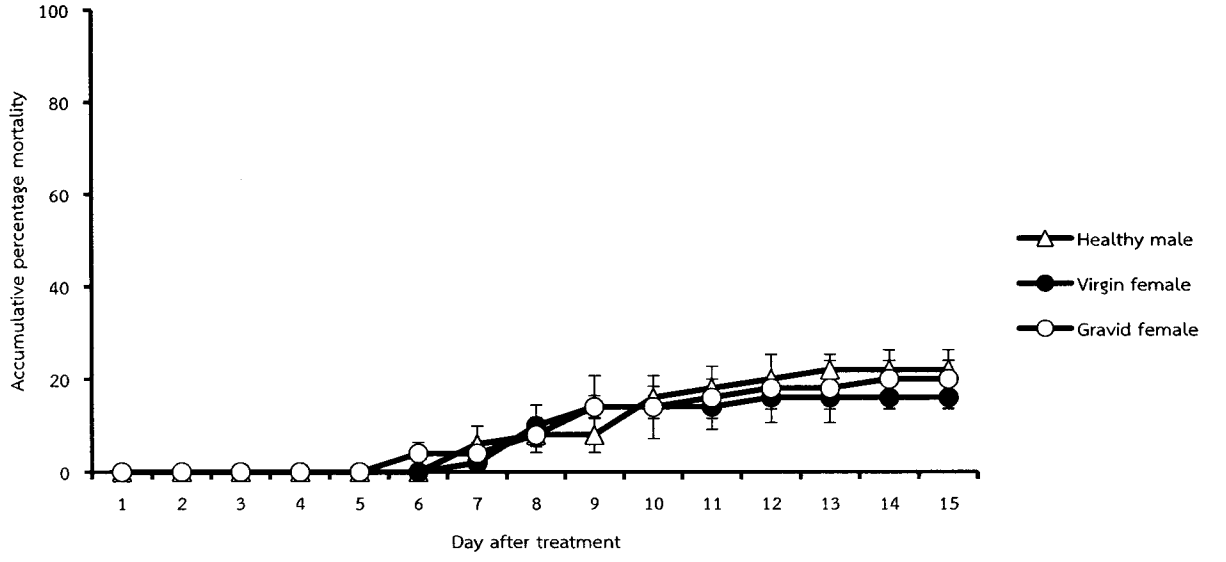


Figure 16. Accumulative percentage mortality of uninfected adult male with *Metarhizium anisopliae* PSUM02, virgin female and gravid female fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett).

การทดลองที่ 5 การควบคุมแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* เพศเมียโดยอาศัยแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ในสภาพโรงเรือน

จากการทดสอบการใช้เชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ควบคุมแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศเมียโดยอาศัยแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราในสภาพโรงเรือนขนาด 1×2×2.5 เมตร จำนวน 8 โรงเรือน แต่ละโรงเรือนปลูกต้นแตงกวาจำนวน 8 ต้น สี่โรงเรือนแรกใช้แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราแพร่กระจายไปสู่เพศเมีย สี่โรงเรือนหลังเป็นชุดควบคุม เมื่อต้นแตงกวาออกผลที่มีขนาดความยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตรและพร้อมสำหรับการวางไข่ของแมลงวันแตงเพศเมีย ปล่อยแมลงวันแตงเพศเมียที่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์และพร้อมวางไข่อายุ 15-20 วันจำนวน 150 ตัว และแมลงวันแตงเพศผู้ที่คลุกเชื้อราจำนวน 150 ตัว ส่วนชุดควบคุมใช้แมลงวันแตงทั้งสองเพศที่ไม่คลุกเชื้อรา หลังจากปล่อยแมลงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สองโรงเรือนแรกของชุดที่ใช้เชื้อราและชุดควบคุมสุ่มเก็บผลแตงกวาจำนวน 3 ผลต่อโรงเรือน ส่วนสองโรงเรือนหลังของชุดที่ใช้เชื้อราและชุดควบคุมสุ่มเก็บผลแตงกวาจำนวน 2 ผลต่อโรงเรือน (จำนวนผลแตงกวาแต่ละโรงเรือนมีจำนวนไม่เท่ากัน จึงวางแผนการเก็บตัวอย่างผลแตงกวาแตกต่างกัน) และเก็บต่อเนื่องทุกวันเป็นเวลา 5 วัน พบว่าโรงเรือนที่ใช้เชื้อราทั้งสี่โรงเรือนเก็บจำนวนผลแตงทั้งหมดจำนวน 50 ผล พบจำนวนตัวหนอน 3,106 ตัว ดักแด้ 3,065 ดักแด้ และตัวเต็มวัย 3,022 ตัว นอกจากนี้ยังพบตัวหนอนที่ตายจำนวน 41 ตัวและดักแด้ที่ตาย 35 ดักแด้ (Table 6) ส่วนโรงเรือนที่ไม่ใช้เชื้อราสุ่มเก็บจำนวนผลแตง 50 ผลพบจำนวนตัวหนอน 9,273 ตัว ดักแด้ 9,238 ดักแด้ และตัวเต็มวัย 9,238 ตัว (Table 6) แตกต่างจากโรงเรือนที่ใช้เชื้อราอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติยิ่ง (หนอน χ^2 = 3072.291; df = 1; P = 0.000, ดักแด้ χ^2 = 3097.288; df = 1; P = 0.000, ตัวเต็มวัย χ^2 = 3151.589; df = 1; P = 0.000) สำหรับโรงเรือนที่ไม่ใช้เชื้อรา พบจำนวนตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยมากกว่าโรงเรือนที่ใช้เชื้อรามากถึง 2.97 3.01 และ 3.05 เท่าตามลำดับ (Table 6) ส่วนค่าเฉลี่ยจำนวนตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยในการเก็บผลแตงกวาที่ถูกแมลงวันแตงเข้าทำลายในการทดสอบสภาพโรงเรือนแต่ละครั้ง (จำนวน 5 ครั้ง) พบว่าโรงเรือนที่ใช้แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีจำนวนรุ่นลูกระยะตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย น้อยกว่าโรงเรือนชุดควบคุมที่ไม่ใช้เชื้อรา (Fig. 17)

Table 6. Total number of each stage of *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) from *Metarhizium anisopliae* PSUM02 treated and control cage in experimental greenhouse test

	# of fruits	# of larvae	# of pupae	# of adults
Fungi	50	3,106	3,065	3,022
Control	50	9,273	9,238	9,238
χ^2 test		**[1/]	**	**

[1/]** = highly significant different (P<0.01) according to χ^2 test of goodness-of-fit

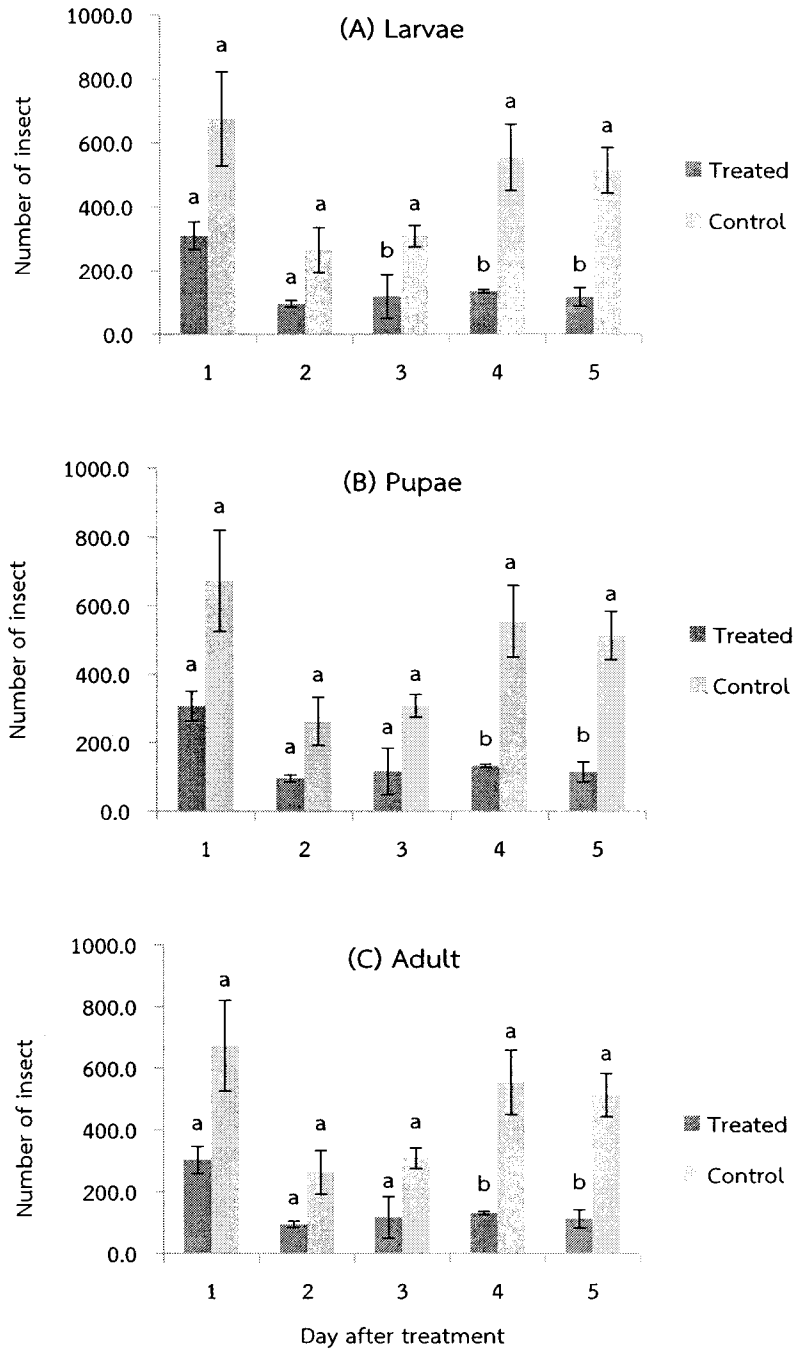


Figure 17. Average number (mean ± S.E.) of larvae (A), pupae (B) and adult (C) from treated adult male fly with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 and un-treated (control) adult male fly, *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) from infested cucumber in greenhouse test. The different letter in each day was compared with independent sample *t*-test ($P<0.05$).

เอกสารอ้างอิง

นริศ ท้าวจันทร์ และอนุชิต ชินาจริยวงศ์. 2551. ประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae). วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) 39(3): 21-25.

นริศ ท้าวจันทร์ อนุชิต ชินาจริยวงศ์ และ วิวัฒน์ เสือสะอาด. 2554. ผลของเชื้อราโรคแมลง *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* ต่อพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera papayae* (Diptera: Tephritidae). วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (ฉบับพิเศษ) 42(3/1): 339-342.

Allwood, A.J., Chinajariyawong, A., Drew, R.A.I., Hamacek, E.L., Hancock, D.L., Hengsawad, C., Jinapin, J.C., Jirasurat, M., Kong Krong, C., Kritsaneepaiboon, S., Leong, C.T.S., and Vijaysegaran, S. 1999. Host plant records for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in South-East Asia. The Raffles Bulletin of Zoology 7: 1-99.

Boucias, D.G. and Pendland, J.C. 1998. Principle of Insect Pathology. Klewer Academic Publishers, Boston 537 p.

Christenson, L.D. and Foote, R.H. 1960. Biology of fruit flies. Annual Review of Entomology 5: 171-192.

Clarke, A.R., Allwood, A., Chinajariyawong, A., Drew, R.A.I., Hengsawad, C., Jirasurat, M., Kong Krong, C., Kritsaneepaiboon, S. and Vijaysegaran, S. 2001. Seasonal abundance and host use patterns of seven *Bactrocera* Macquart species (Diptera; Tephritidae) in Thailand and Malaysia. The Raffles Bulletin of Zoology 49: 207-220.

Collins, D.J. and Collins, B.A. 1998. Fruit fly in Malaysia and Thailand 1985-1993. ACIAR Projects Canberra, Australia.

Dhillon, M.K., Singh, R., Naresh, J.S. and Sharma, H.C. 2005. The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. Journal of Insect Science 5(40): 1-16.

Dimbi, S., Maniania, N.K. and Ekesi, S. 2009. Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on the mating behavior of three species of African Tephritid fruit flies, *Ceratitis capitata*, *Certitis cosyra* and *Ceratitis fasciventris*. Biological Control 50: 111-116.

Doharey, K.L. 1983. Bionomics of fruit flies (*Dacus* spp.) on some fruits. Indian Journal of Entomology 45: 406-413.

Quesada-Moraga, E., Martin-Carballo, I., Garrido-Jurado, I. and Santiago-Alvarez, C. 2008. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Biological Control 47: 115-124.

Toledo, J., Liedo, P., Flores, S., Campos, S.E., Villasenor, A. and Montoya, P. 2006. Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for fruit fly control: A novel approach.

Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance. 127-132.

Waterhouse, D.F. 1993. The major arthropod pests and weeds of agriculture in Southeast Asia. *In*: ACIAR Monograph 21, pp. 141. Australian Center of International, Canberra, Australia.

Weems, H.V. Jr., Heppner, J.B. and Fasulo, T.R. 2001. Melon fly, *Bactrocera cucurbitae* Coquillett (Insect: Diptera: Tephritidae). Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry University of Florida. University of Florida Publication EENY-199.

White, I. M., and Elson-Harris, M. 1992. Fruit flies of economic importance their identification and bionomics. CAB International Oxon, UK.

6. ภาคผนวก

6.1 สำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว

เอกสารแนบหมายเลข 1

ปาณิศา ธรรมเสวตร และ **นริศ ท้าวจันทร์. 2557**. ผลของระยะเวลาการติดเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ต่อการวางไข่และระยะตัวอ่อนแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae*. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 1(1): 54-58.

เอกสารแนบหมายเลข 2

ปาณิศา ธรรมเสวตร และ **นริศ ท้าวจันทร์. 2557**. ผลของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ต่อการจับคู่ผสมพันธุ์และการรอดชีวิตของแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). วารสารแก่นเกษตร (ฉบับพิเศษ) 42(3): 629-633.

เอกสารแนบหมายเลข 3

ปาณิศา ธรรมเสวตร และ **นริศ ท้าวจันทร์. 2558.** การถ่ายทอดเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ในแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) เพศผู้ต่อเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการผสมพันธุ์. วารสารแก่นเกษตร (ฉบับพิเศษ) 43(1): 769-774.

เอกสารแนบหมายเลข 4

Thaochan, N. and Ngampongsai, A. **2015**. Effects of autodisseminated *Metarhizium guizhouense* PSUM02 on mating propensity and mating competitiveness of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). Biocontrol Science and Technology. 25(6): 629-644.

6.2 ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์หรือตีพิมพ์ไม่ได้ แต่อยู่ในวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ไม่มี

6.3 ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

ควรขยายการทดสอบลงไปในแปลงของเกษตรกร เพื่อศึกษาผลของการใช้เชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ในการควบคุมแมลงวันแตง *B. cucurbitae* และอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมภายนอกต่อประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา รวมทั้งศึกษาถึงปริมาณ คุณภาพ และมูลค่าของผลผลิตที่ได้จากการใช้วิธีการดังกล่าว

6.4 บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ (Proceeeding) (ถ้ามี)

ไม่มี

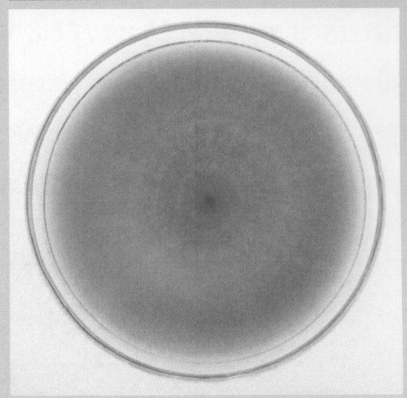
เอกสารแนบหมายเลข 1

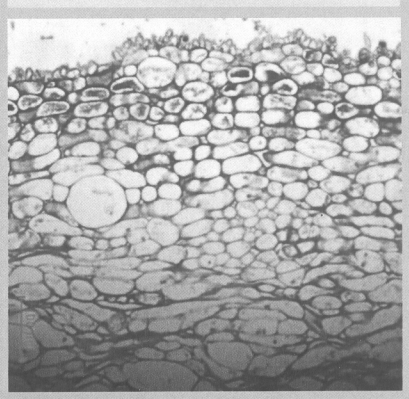
วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์

Songklanakarin Journal of Plant Science

ปีที่ 1 ฉบับที่ 1
มกราคม-มีนาคม 2557
Volume 1 No. 1
January-March 2014

ISSN 2351-0846





ภาควิชาพืชศาสตร์
คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 1, No. 1 (January-March): 54-58, 2014

Research article

ผลของระยะเวลาการติดเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ต่อการวางไข่และระยะตัวอ่อนแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae*

Effect of Latent Infection Period of *Metarhizium anisopliae* PSUM02 on Egg Laying and Immature Stages of *Bactrocera cucurbitae*

ปาณิศา ธรรมเสวตร[1,2] และ นริศ ท้าวจันทร์[1,2*]

Thamsawet, P.[1,2] and Thaochan, N.[1,2*]

[1]ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

[1]Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

[2]สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

[2]Center of Excellence in Agricultural and Natural Resources in Biotechnology , Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

*Corresponding author: narit_taochan@yahoo.com

Received 16 August 2013; Revised 14 October 2013; Accepted 31 October 2013

บทคัดย่อ

แมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) (Diptera : Tephritidae) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง พบการแพร่ระบาดทั่วประเทศ การควบคุมด้วยเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เป็นวิธีการหนึ่งที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและให้ประสิทธิภาพในการควบคุมสูง ผลจากการศึกษาแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศเมีย อายุ 15-20 วัน ที่ผ่านการผสมพันธุ์และพร้อมวางไข่ คลุกด้วยเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ความหนาแน่น 1X106 สปอร์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำไปบ่มให้แมลงติดเชื้อราเป็นเวลา 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมคลุกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ พบว่าแมลงวันแตงเพศเมียมีเปอร์เซ็นต์การวางไข่ลดลงเมื่อระยะเวลาการติดเชื้อราเพิ่มมากขึ้น คือ 60.00 16.67 3.33 และ 13.33% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเปอร์เซ็นต์การวางไข่ 100% ส่วนเปอร์เซ็นต์อัตราการตายของแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อราเมื่อระยะเวลาการติดเชื้อราเพิ่มมากขึ้นแมลงมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น 40.00 83.33 96.67 และ 86.67% ตามลำดับ ส่วนรุ่นลูก (F1) พบระยะตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย มีจำนวนลดลงตามระยะเวลาที่ตัวเต็มวัยแมลงวันแตงเพศเมียติดเชื้อราเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน

คำสำคัญ: แมลงวันแตง, ระยะเวลาการติดเชื้อ, *Metarhizium anisopliae*

Abstract

Melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) (Diptera: Tephritidae), is type of insect which is distributed throughout the country and had a major impact on the economy. Control in this type of insect pests with *Metarhizium anisopliae* is a method which is environmentally friendly and high efficient. The gravid female *B. cucurbitae*, age 15-20 day old, was inoculated with *M. anisopliae* PSUM02 (1x106 spore/ml, 3 min) and incubated with different latent infection at 24, 48, 72 and 92 hr was investigated. The control was treated with sterile distilled water. Egg laying percentage of infected gravid female fly decreased when the time of latent infection increased with 60.00, 16.67, 3.33 and 13.33%, respectively. The control treatment showed 100% of egg laying activity. The mortality percentage of gravid female fly was increased with the increment of latent infection at 40.00, 83.33, 96.67 and 86.67%, respectively. The number of *B. cucurbitae* offsprings (F1)

Published by Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.

(larvae, pupae and new emerged adults) was reduced when the latent infection of their mother increased.

Keywords: *Bactrocera cucurbitae*, latent infection period, *Metarhizium anisopliae*

บทนำ

แมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) จัดเป็นแมลงวันผลไม้ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลก สามารถเข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตรได้มากกว่า 81 ชนิด ได้แก่ แตงร้าน แตงไท แตงโม แตงแคน ตาลูป มะระ บวบ ตำลึง ฟักแฟง ฟักเขียว และฟักทอง เป็นต้น (Dhillon *et al.*, 2005) แมลงวันแตงสามารถสร้างความเสียหายของผลผลิตอยู่ระหว่าง 30-100% โดยขึ้นอยู่กับชนิดของพืชตระกูลแตง การควบคุมแมลงวันแตงสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้กับดักหรือเหยื่อล่อ (Economopoulos and Haniotakis, 1994) การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Ros *et al.*, 2002) และการควบคุมโดยชีววิธีซึ่งมีอยู่หลายวิธีการ สำหรับการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมแมลงถือได้ว่าเป็นวิธีการหนึ่งที่ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงและเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เชื้อรา *M. anisopliae* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงที่อาศัยอยู่ในดิน เป็นเชื้อราที่มีวงจรชีวิตไม่สมบูรณ์ ไม่พบระยะการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศ สามารถเข้าทำลายแมลงได้หลายชนิด เช่น ตั๊กแตน (Peng *et al.*, 2008), แมลงวัน (Dinalva *et al.*, 2010), หนอนกระทู้ผัก (พัชรินทร์, มปป.) และแมลงวันผลไม้ (Evangelos *et al.*, 2012) นอกจากนี้เชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* สามารถเข้าทำลายแมลงได้ทุกระยะการเจริญ ทั้งไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และรวมถึงตัวเต็มวัย Destéfano และคณะ (2005) ได้นำเชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* มาทดสอบในแมลงวันผลไม้ *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) ในระยะตัวอ่อน พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถเข้าทำลายแมลงได้ดี จากคุณสมบัติดังกล่าวของเชื้อรา *M. anisopliae* จึงได้นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อทดสอบผลของระยะการติดเชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* ต่อการวางไข่ของตัวเต็มวัยแมลงวันแตงเพศเมีย *B. cucurbitae* และผลกระทบต่อระยะตัวอ่อนของแมลง

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันแตง

เก็บรวบรวมผลบวบและแตงกวาที่ถูกแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เข้าทำลายจากแปลงปลูกเกษตรกร ในเขตอำเภอบางกล่ำ จังหวัดสงขลา ใส่ในกล่องพลาสติกใสขนาด 10×20×15 เซนติเมตร ที่บริเวณฝาเจาะรูและปิดด้วยผ้าขาวบางเพื่อระบายอากาศ ด้านล่างของกล่องรองพื้นด้วยขี้เลื่อยอบฆ่าเชื้อสูงประมาณ 2 เซนติเมตร เพื่อให้หนอนออกมาเข้าดักแด้ เพาะดักแด้ในกล่องประมาณ 8-10 วัน เพื่อรอให้แมลงฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย ย้ายตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียไปเลี้ยงในกรงผ้ามุ้งขนาด 30×30×30 เซนติเมตร ภายในกรงมีน้ำตาลก้อน ยีสต์ และน้ำ เป็นแหล่งอาหาร เลี้ยงแมลงตัวเต็มวัยจนมีอายุประมาณ 15-20 วัน หรือแมลงวันแตงเพศเมียผ่านการผสมพันธุ์และพร้อมวางไข่ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ต่อด้วยผลแตงกวา โดยให้แมลงวันแตงเพศเมียเข้ามาวางไข่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำผลแตงที่แมลงวันแตงวางไข่ไปบ่มในกล่องพลาสติกใสขนาด 10×20×15 เซนติเมตร ที่บริเวณฝาเจาะรูและปิดด้วยผ้าขาวบางเพื่อระบายอากาศเป็นเวลา 2 วัน เพื่อรอให้ตัวหนอนระยะที่ 1 ออกจากไข่ จากนั้นย้ายผลแตงกวาที่มีตัวหนอนไปเลี้ยงบนอาหารเทียม ภายในกล่องพลาสติกใสขนาด 10×20×15 เซนติเมตร ที่รองพื้นด้วยขี้เลื่อยอบฆ่าเชื้อเพื่อให้หนอนเข้าดักแด้ จากนั้นเก็บรวบรวมดักแด้ใส่ในกรงเลี้ยงแมลงจนกระทั่งกลายเป็นตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ให้อาหารตัวเต็มวัยด้วยน้ำตาลก้อน ยีสต์ และน้ำ เพื่อใช้ในการทดลอง

การเตรียมเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae*

นำเชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* PSUM02 ที่ได้รับจากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ศูนย์ภาคใต้ (นริศ, 2554) มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Sabouraud Dextrose Agar plus Yeast Extract (SDAY) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร บ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 27.0 ± 2.0 องศาเซลเซียสในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หรือจนกว่าเชื้อราสร้างสปอร์ได้สมบูรณ์

ผลของระยะเวลาการติดเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ต่อการวางไข่และระยะตัวอ่อนแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae*

นำแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศเมียอายุ 15-20 วัน ที่ผ่านการผสมพันธุ์และพร้อมวางไข่จำนวน 150 ตัว โดย

แบ่งแมลงวันเพศเมียจำนวน 120 ตัว คลุกด้วยสปอร์เชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ที่มีความหนาแน่น 1×106 สปอร์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที แล้วย้ายใสกล่องพลาสติกใสขนาด 10×20×7 เซนติเมตร ที่บริเวณฝาเจาะรูและปิดด้วยผ้าขาวบางเพื่อระบายอากาศ จำนวน 4 กล่องๆ ละ 30 ตัว วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) จำนวน 30 ซ้ำ (แมลง 1 ตัว/ซ้ำ) แต่ละกรรมวิธีประกอบด้วย กรรมวิธีที่ 1 แมลงวันแตงที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ 2 แมลงวันแตงที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ 3 แมลงวันแตงที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กรรมวิธีที่ 4 แมลงวันแตงที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 96 ชั่วโมง และชุดควบคุมแมลงวันแตงที่ไม่ติดเชื้อราโรคแมลงโดยคลุกแมลงด้วยน้ำกลั่นนึ่งปลอดเชื้อ ภายในกล่องมีน้ำตาลก้อน ยีสต์ และน้ำ เป็นแหล่งอาหารให้กับแมลง จากนั้นนำแมลงวันแตงแต่ละกรรมวิธีแยกใส่กล่องขนาด 10×20×7 เซนติเมตร จำนวน 1 ตัวต่อกล่องต่อซ้ำ ทั้งหมด 30 กล่อง ที่บริเวณฝาเจาะรูและปิดด้วยผ้าขาวบางเพื่อระบายอากาศ ภายในกล่องใส่แตงกวา 1 ผล ขนาดยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร จากนั้นปล่อยให้แมลงวันแตงวางไข่ที่ผลแตงกวาเป็นเวลา 5 วัน นำผลแตงกวามาบ่มในกล่องพลาสติกใสขนาดข้างต้น บันทึกจำนวนตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยในแต่ละกรรมวิธี เปรียบเทียบกันโดยใช้แผนการทดลองข้างต้น

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาเชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* PSUM02 ต่อการวางไข่และระยะตัวอ่อนของแมลงวันแตง *B. cucurbitae* ที่ระยะเวลาต่างๆ ได้แสดงไว้ใน Table 1 โดยพบว่า แมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การวางไข่อยู่ที่ 60.00% พบระยะตัวหนอนจำนวน 572 ตัว ระยะดักแด้ 557 ดักแด้ และจำนวนตัวเต็มวัย 454 ตัว แมลงวันแตงที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การวางไข่อยู่ที่ 16.67% พบระยะตัวหนอนจำนวน 60 ตัว ระยะดักแด้ 48 ดักแด้ และจำนวนตัวเต็มวัย 30 ตัว แมลงวันแตงที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การวางไข่อยู่ที่ 3.33% พบระยะตัวหนอนจำนวน 7 ตัว ระยะดักแด้ 6 ดักแด้ และจำนวนตัวเต็มวัย 5 ตัว และแมลงวันแตงที่ติดเชื้อราเป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การวางไข่อยู่ที่ 13.33% พบระยะตัวหนอนจำนวน 43 ตัว ระยะดักแด้ 36 ดักแด้ และจำนวนตัวเต็มวัย 24 ตัว ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การวางไข่อยู่ที่ 100.00% พบระยะตัวหนอนจำนวน 973 ตัว ระยะดักแด้และตัวเต็มวัย เท่ากับ 962 ตัว สำหรับเปอร์เซ็นต์การตายของตัวเต็มวัยแมลงวันแตงเพศเมียที่ติดเชื้อราระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุด คือ 96.67% รองลงมาคือแมลงวันแตงที่ติดเชื้อรา 96 48 และ 24 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์การตาย 86.67 83.33 และ 40.00% ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมไม่พบเปอร์เซ็นต์การตายของแมลง (Table 1)

สำหรับการตายในระยะตัวหนอนของแมลงวันแตง B. cucurbitae พบว่าเมื่อแมลงวันแตงติดเชื้อราเป็นเวลา 48–96 ชั่วโมง พบเปอร์เซ็นต์การตายในระยะตัวหนอนเท่ากับ 20.00, 14.29 และ 16.28% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการติดเชื้อราเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (2.62%) และชุดควบคุม (1.13%) ตามลำดับ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การตายในระยะดักแด้ของแมลงวันแตงพบว่าแมลงวันแตงที่ติดเชื้อราเป็นระยะเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง พบเปอร์เซ็นต์การตายในระยะดักแด้สูงถึง 37.50 และ 33.33% ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์การตายในระยะดักแด้ของแมลงวันแตงพบว่าแมลงวันแตงที่ติดเชื้อราเป็นระยะเวลา 24 และ 72 ชั่วโมงพบเปอร์เซ็นต์การตายในระยะดักแด้เท่ากับ 18.49 และ 16.67% ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมไม่พบเปอร์เซ็นต์การตายในระยะดักแด้ สำหรับสัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของรุ่นลูกที่ออกมา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (Figure 1)

วิจารณ์

จากการศึกษาผลของระยะเวลาการติดเชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* PSUM02 ต่อการวางไข่และระยะตัวอ่อนแมลงวันแตง *B. cucurbitae* พบว่าแมลงวันแตงเพศเมียที่มีระยะเวลาการติดเชื้อราที่เพิ่มมากขึ้นมีผลกระทบต่อการลดจำนวนประชากรในระยะตัวอ่อนของแมลงวันแตง (F1) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Destéfano และคณะ (2005) ที่ทดสอบเชื้อรา *M. anisopliae var. anisopliae* สายพันธุ์ E9 ในแมลงวันผลไม้ *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) ในระยะตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย พบว่าเชื้อราดังกล่าวมีผลต่ออัตราการตายของตัวเต็มวัยที่ออกจากดักแด้ถึง 86% นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำเชื้อรา *M. anisopliae* มาทดลองกับแมลงวันผลไม้ สกุล *Ceratitis capitata* และ *C. rosa var. fasciventris* พบว่าสามารถก่อให้เกิดโรคกับแมลงทั้ง 2 ชนิดหลังจากการปลูกเชื้อ 4 วัน มีอัตราการตายอยู่ที่ 7-100% และ 11.4-100% ตามลำดับ (Dimbi *et al.*, 2003) จากนี้นริศและอนุชิต (2551) รายงานการทดสอบเชื้อรา *M. anisopliae* กับตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ *B. papayae* พบว่าความเข้ม

Table 1 Percentage of egg laying, mortality of gravid female and total number of larvae, pupae and adult of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 at different latent infection times.

Latent infection times	No. of insect	% gravid female laying egg	% mortality of gravid female	Total No. of insect				
				Larvae	Dead larvae[2/]	Pupae	Dead pupae[2/]	Adult
24 hr	30	60.00	40.00	572	15(2.62%)	557	103(18.48%)	454
48 hr	30	16.67	83.33	60	12(20.00%)	48	18(37.50%)	30
72 hr	30	3.33	96.67	7	1(14.29%)	6	1(16.67%)	5
96 hr	30	13.33	86.67	43	7(16.28%)	36	12(33.33%)	24
control	30	100.00	0.00	973	11(1.13%)	962	0(0.00%)	962
χ^2-test[1/]		**	**	**	*	**	**	**

[1/]* = significantly different at the $p<0.05$ level according to χ^2 test of goodness of fit; ** = high significantly different at the $p<0.01$ level according to χ^2 test of goodness of fit

[2/] the value in bracket showed percentage of dead insect in each stage calculated from the total larvae or pupae of each treatment.

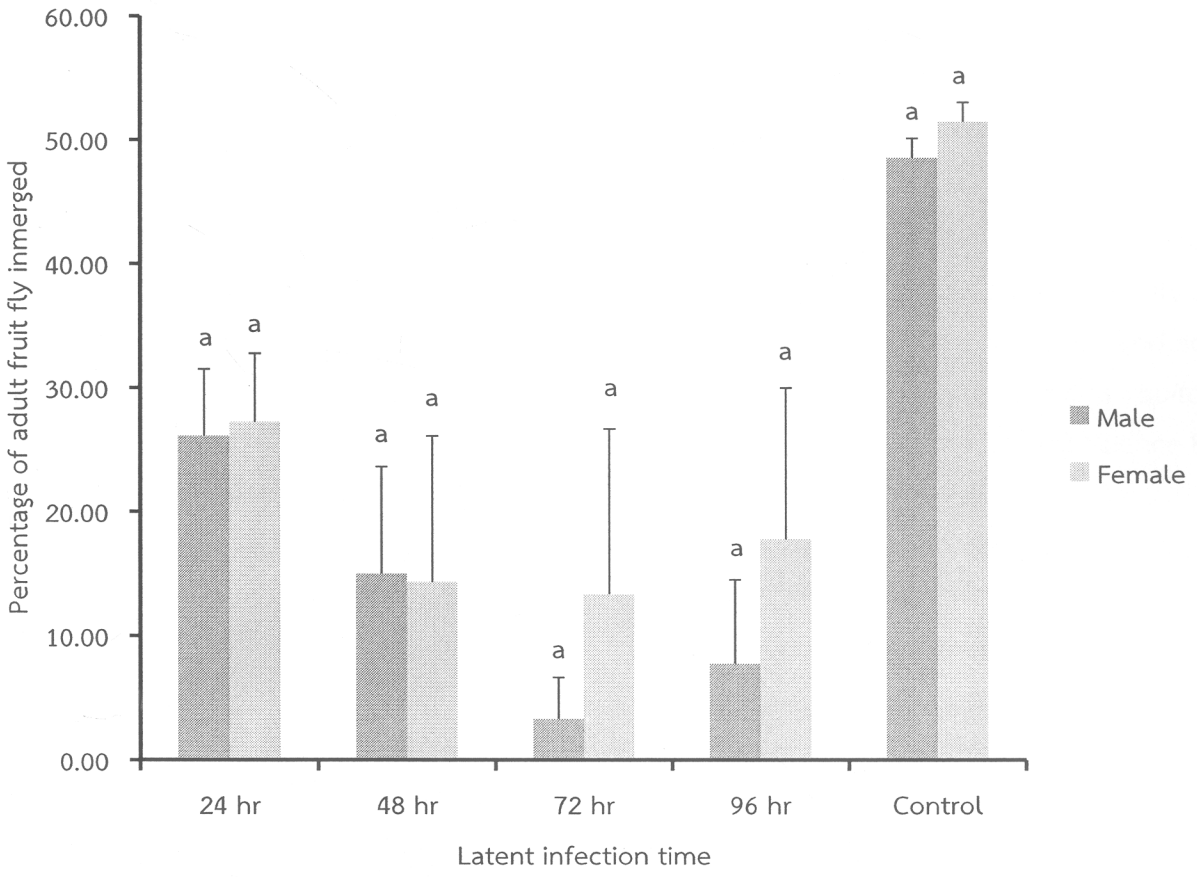


Figure 1 Average percentage (mean ± S.E.) of sexes (male and female) of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Dipterara: tephridae) infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 at different latent infection time.

ข้นของเชื้อราที่ 1x106 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เชื้อราสามารถฆ่าแมลงวันผลไม้ได้ภายในระยะเวลา 4-5 วัน

สรุป

จากการศึกษาผลของการใช้เชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* PSUM02 ควบคุมแมลงวันแตง *B. cucurbitae* พบว่าระยะเวลาการติดเชื้อราส่งผลต่อการวางไข่ของแมลงวันแตงเพศเมียและการเจริญเติบโตของระยะตัวอ่อน ซึ่งเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 สามารถควบคุมแมลงวันแตงได้อย่างมีประสิทธิภาพ และช่วยลดจำนวนประชากรของแมลงให้มีจำนวนลดลง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้การสนับสนุนจากสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ขอขอบคุณศูนย์ควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ศูนย์ภาคใต้ และภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ และสถานที่ ตลอดการดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นริศ ท้าวจันทร์ และอนุชิต ชินาจริยวงศ์. 2551. ประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae). วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร(พิเศษ) 39: 21-25.

นริศ ท้าวจันทร์. 2554. การคัดกรองเชื้อราโรคแมลงท้องถิ่นในเขตจังหวัดภาคใต้ตอนกลางเพื่อการควบคุมแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae). รายงานการวิจัย. สงขลา: ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พัชรินทร์ ครุฑเมือง. ม.ป.ป. การพัฒนาต้นการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ในการกำจัดแมลงศัตรูผัก. เชียงใหม่: ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Destéfano, R., Bechara, I.J., Messias, C.L. and Piedrabuena, A.E. 2005. Effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against immature stages of *Anastrepha fraterculus* fruit fly (Diptera: Tephritidae). Brazilian Journal of Microbiology 36: 94-99.

Dhillon, M.K., Singh, R., Naresh, J.S. and Sharma, H.C. 2005. The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and managemant. Journal of Insect Science 5: 1-16.

Dimbi, S., Maniania, N.K., Luk, S.A., Ekesi, S. and Mueke, J.K. 2003. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin and *Beaveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa var fasciventris* (Karsch) and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). Mycopathologia 156: 375-382.

Dinalva, A.M., Antonio, C.M., Ana, C.R.M. and Luciana, Y. 2010. Entomopathogenic fungal activity against pupae and adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). Veterinary Parasitology 168: 105-110.

Economopoulus, A.P. and Haniotakis, G.E. 1994. Advances in attractant and trapping technologies for Tephritids, pp. 57-66. *In*: Calkins, C.O., Klassen, W. and Liedo, P. (eds.) Fruit Flies and the Sterile Insect Technique. CRC Press, Florida. 258 pp.

Evangelos I.B., Dimitrios P.P., Anastasia F., Spyridon A.A. and Dimitrios C.K. 2013. Pathogenicity of three entomopathogenic fungi on pupae and adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Dip tera: Tephritidae). Journal of Pest Science 86: 275-284.

Peng, G., Wang, Z., Yin, Y., Zeng, D. and Xia, Y. 2008. Field trial of *Metarhizium anisopliae var. acridum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migatroia manilensis* (Meyen) in Northern China. Crop Protection 27: 1244-1250.

Ros, J., Wong, E., Olivero, J. and Castillo, E. 2002. Mejora de los mosqueros, atrayentesy sistemas de retención contra la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata* Wied. Como hacer de la técnica del trampeo masivo una Buena herrami enta para controlar esta plaga. Boletin de Sani dad Vegetal, Plagas 28: 591-597.

เอกสารแนบหมายเลข 2

The 13th National Horticultural Congress
'Hort. Innovation for Long Life & Happiness'

29-31 July 2014

Centara Hotel & Convention Center, Khon Kaen, Thailand

13th NHC 2014 Khon Kaen

แก่นเกษตร ปีที่ 42 ฉบับพิเศษ 3 2557 Khon Kaen Agriculture Journal Vol.42 SUPPLEMENT 3 2014

50 ปี คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2557

แก่นเกษตร
KHON KAEN AGRICULTURE JOURNAL

ปีที่ 42 ฉบับพิเศษ 3 2557 Vol.42 SUPPLEMENT 3 2014

13th NHC 2014 Khon Kaen

การประชุมวิชาการ
พืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 13
'นวัตกรรมพืชสวน เพื่อชีวิตที่ยืนยาวอย่างเป็นสุข'

29-31 กรกฎาคม 2557

โรงแรมเซ็นทาราแอนด์คอนเวนชั่นเซ็นเตอร์ จังหวัดขอนแก่น

ISSN 0125-0485

ผลของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ต่อการจับคู่ผสมพันธุ์และการรอดชีวิตของแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae)

Effects of *Metarhizium anisopliae* PSUM02 on mating and surviving of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae)

ปาณิศา ธรรมเสวตร[1] และ นริศ ท้าวจันทร์[1*]

Panisa Thamsawet[1] and Narit Thaochan[1*]

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของเชื้อราก่อโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ที่ความหนาแน่น 1X10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อการจับคู่ผสมพันธุ์และการรอดชีวิตของแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) พบว่า ตัวเต็มวัยแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเพศผู้ปกติในวันที่ 4 หลังจากการติดเชื้อ ตัวเต็มวัยของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราสามารถถ่ายทอดเชื้อราไปสู่แมลงวันแตงเพศเมียปกติได้ และมีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ยอยู่ที่ 6.16 ± 0.19 และ 11.10 ± 0.55 วัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมของตัวเต็มวัยของแมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียมีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอยู่ที่ 14.26 ± 0.24 และ 14.48 ± 0.26 วัน ตามลำดับ เชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 มีผลให้การจับคู่ผสมพันธุ์และการรอดชีวิตของแมลงที่ติดเชื้อราลดลง

คำสำคัญ: *Bactrocera cucurbitae*, *Metarhizium anisopliae*, แมลงวันแตง, การผสมพันธุ์

ABSTRACT: The effects of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* PSUM02 at spore concentration at 1×10^6 spore/ml, on mating and surviving of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) were studied. The infected adult male flies showed percentage of mating lower than healthy male flies at day four after treated. The infected ones transmitted the fungus to healthy adult female flies via their mating behaviour and gave average survival time (AST) value 6.16 ± 0.19 and 11.10 ± 0.55 days, respectively. While the healthy adult male and female flies in the control showed not significantly different in AST value 14.26 ± 0.24 and 14.48 ± 0.26 days, respectively. *M. anisopliae* PSUM02 reduced mating and surviving of infected flies.

Keywords: *Bactrocera cucurbitae*, *Metarhizium anisopliae*, melon fruit fly, mating

บทนำ

แมลงวันแตง (melon fruit fly) *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) เป็นแมลงวันผลไม้ชนิดหนึ่งที่ทำความเสียหายอย่างหนักให้กับผักและผลไม้ในเอเชีย (Nagappan *et al.*, 1971) แมลงวันแตงสามารถเข้าทำลายพืชผักได้มากกว่า 81 ชนิด (Dhillon *et al.*, 2005) โดยเฉพาะพืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา แตงโม ตำลึง ฟัก แคนตาลูป และ บวบเหลี่ยม เป็นต้น (Shah *et al.*, 1948) ในประเทศไทยพบการแพร่กระจายของแมลงวันแตงทั่วทุกภาคของประเทศ (มนตรี, 2544; Allwood *et al.*, 1999) การป้องกันกำจัดแมลงวันแตง

[1] ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University

* Corresponding author: narit.t@psu.ac.th

มีอยู่หลายวิธี ซึ่งการควบคุมโดยชีววิธี เช่น การใช้เชื้อราก่อโรคแมลง เป็นวิธีการหนึ่งที่ไม่ส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย และสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เชื้อราก่อโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืช ปัจจุบันมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย (Shan and Pell, 2003) ซึ่งเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นเชื้อราก่อโรคแมลงและสามารถฆ่าแมลงวันผลไม้ได้ (นริศ, 2554) และความหนาแน่นที่เหมาะสมต่อการใช้เชื้อราโรคแมลงในการแพร่กระจายเชื้อราในประชากรของแมลงวันผลไม้ควรพิจารณาถึงความรุนแรงและสายพันธุ์ของเชื้อราด้วย (Toledo *et al.*, 2006) วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ต่อการจับคู่ผสมพันธุ์และการรอดชีวิตของแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพื่อลดความเสียหายของผลผลิตจากการเข้าทำลายของแมลงวันแตง

วิธีการศึกษา

การเตรียมเชื้อราโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท PSUM02

นำเชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* PSUM02 ที่ได้จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ศูนย์ภาคใต้ (นริศ, 2554) มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Sabouraud Dextrose Agar plus Yeast (SDAY) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร บ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 27.0±2.0 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ หรือจนกว่าเชื้อราสร้างสปอร์ จากนั้นเตรียมสปอร์เชื้อราแขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ผสมสาร Tween 80 เข้มข้น 0.05% แล้วนับสปอร์ด้วย haemacytometer ให้ได้ความหนาแน่น 1×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีการของ นริศ และอนุชิต (2551)

การเตรียมแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae*

เก็บผลแตงที่ถูกแมลงวันแตงเข้าทำลายตามธรรมชาติมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการศูนย์ควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ จากนั้นนำแมลงวันแตงรุ่นลูก F1 ตัวเต็มวัยเพศผู้ และเพศเมีย อายุ 1 วัน หลังออกจากดักแด้ แยกใส่กรงผ้าขนาด 30×30×30 เซนติเมตร จำนวนเพศละ 50 ตัว ภายในกรงมีน้ำตาลก้อน ยีสต์ และน้ำเป็นแหล่งอาหารของแมลง เลี้ยงแมลงวันให้ได้อายุ 10-15 วัน จึงนำไปทำการทดลอง

การถ่ายทอดเชื้อราผ่านการผสมพันธุ์ของแมลง

นำแมลงวันแตงเพศผู้ อายุ 10-15 วัน ที่ไม่ผ่านการผสมพันธุ์ จำนวน 50 ตัว คลุกด้วยสปอร์เชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ที่มีความหนาแน่น 10^{9} สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปใส่ในกล่องพลาสติกใสขนาด 11×11×6 เซนติเมตร ที่บริเวณฝาเจาะรูระบายอากาศ กล่องละ 1 ตัว จากนั้นนำแมลงวันแตงเพศเมีย จำนวน 1 ตัว ใส่เข้าไปในกล่องเดียวกับแมลงวันแตงเพศผู้ที่ผ่านการคลุกด้วยเชื้อรา ภายในกล่องมีน้ำตาลก้อน ยีสต์ และน้ำ เป็นแหล่งอาหารให้กับแมลง ส่วนชุดควบคุมคลุกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

สังเกตการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงช่วงเวลา 18.00 - 21.00 น. (Dimbi *et al.*, 2009) โดยการใช้ไฟฉายหลอดฮาโลเจนแสงสีส้มในการส่องดูแมลงจับคู่ผสมพันธุ์ เป็นเวลา 5 วัน หลังจากปล่อยแมลงเข้ากล่องพลาสติก ในแต่ละวันบันทึกจำนวนแมลงวันแตงที่จับคู่ผสมพันธุ์กันอย่างสมบูรณ์ โดยต้องจับคู่ผสมพันธุ์นานอย่างน้อย 10 นาที (Dimbi *et al.*, 2009) และบันทึกการตายของแมลงทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน สำหรับซากแมลงที่ตายนำไปฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 1% sodium hypochlorite ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อสามครั้งและซับด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ วางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ที่รองด้วยกระดาษกรอง (Whatman® No. 1) ชิ้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อยืนยันว่าแมลงที่ตายมีสาเหตุมาจากเชื้อรา

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรากับแมลงวันแตงเพศผู้ปกติด้วยวิธี independent-samples *t* - test วิเคราะห์ค่า Kaplan-Meier analysis และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการศูนย์ควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เดือนกันยายน ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2556

ผลการศึกษา

จากการเปรียบเทียบผลของเชื้อราก่อโรคแมลง *M. anisopliae* PSUM02 ต่อการจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศผู้ที่ติดเชื้อรากับแมลงวันแตงเพศผู้ปกติ (Figure 1) พบว่า ในวันที่ 1 หลังจากการทดสอบ แมลงวันแตงเพศผู้ปกติมีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ที่แตกต่างจากแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในวันที่ 2 แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราและแมลงวันเพศผู้ปกติมีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ในวันที่ 3 แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ที่มากกว่าแมลงวันแตงเพศผู้ปกติ ($P<0.05$) สำหรับวันที่ 4 แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ที่ลดลงและไม่พบการจับคู่ผสมพันธุ์ในวันที่ 5 และ 6 หลังการทดสอบ แต่พบการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตงเพศผู้ปกติในวันดังกล่าว (Figure 1)

การวิเคราะห์ Kaplan-Meier ของค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรา พบว่า มีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตต่ำที่สุด คือ 6.16 ± 0.19 วัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับชุดการทดลองอื่น ($P<0.05$) (Table 1) รองลงมาคือ แมลงวันแตงเพศเมียที่อยู่ในกรงเดียวกับแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรา มีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตเท่ากับ 11.10 ± 0.55 วัน ส่วนชุดควบคุมแมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียมีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) เท่ากับ 14.26 ± 0.24 และ14.48 ± 0.26 วัน ตามลำดับ โดยจำกัดจำนวนวันที่ทำการสำรวจ 15 วัน (Table 1)

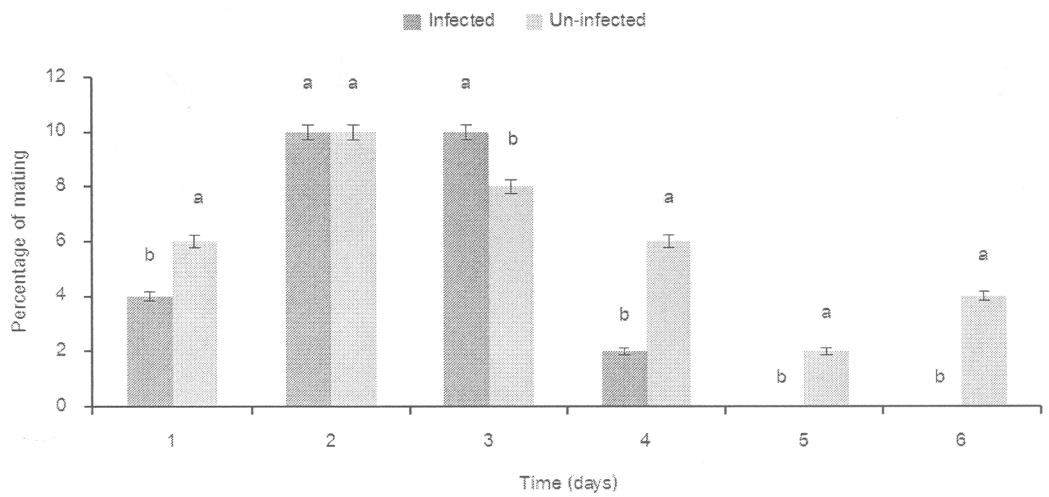


Figure 1 Percentage of mating (mean ± SEM) adult male fly, *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett), infected and un-infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02. The percentage of mating in each day was compared with independence sample *t*-test.

Table 1 Kaplan-Meier analysis of average survival time (AST) of adult male and female *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) infected and un-infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 in laboratory.

Assay	Insect	Average survival time (AST) (day) (mean ± SEM)[1/]	95% Confidence interval	
			Lower	Upper
Treated cage	infected male	6.16 ± 0.19[a]	5.82	6.54
	un-infected female	11.10 ± 0.55[b]	10.19	12.40
Control cage	un-infected male	14.26 ± 0.24[c]	13.56	14.95
	un-infected female	14.48 ± 0.26[c]	13.93	15.03

[1/]Data follow the same letter are not significantly different (DMRT test, α=0.05). AST limited to 15 days

กราฟสัดส่วนอัตราการรอดชีวิตของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรา พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตลดลงตามระยะเวลาการติดเชื้อราที่เพิ่มมากขึ้น โดยไม่พบการรอดชีวิต ในวันที่ 8 หลังการติดเชื้อรา (Figure 2) ส่วนแมลงวันแตงเพศเมียที่อยู่ในกรงเดียวกับแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรา พบว่าแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราสามารถถ่ายทอดเชื้อราไปสู่แมลงวันแตงเพศเมียได้ ทำให้แมลงวันแตงเพศเมียมีอัตราการรอดชีวิตลดลง โดยมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 48% หลังการสำรวจเป็นเวลา 15 วัน ส่วนแมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียในชุดควบคุม มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันเท่ากับ 86% และ 90% หลังจการสำรวจ 15 วัน ตามลำดับ (Figure 2)

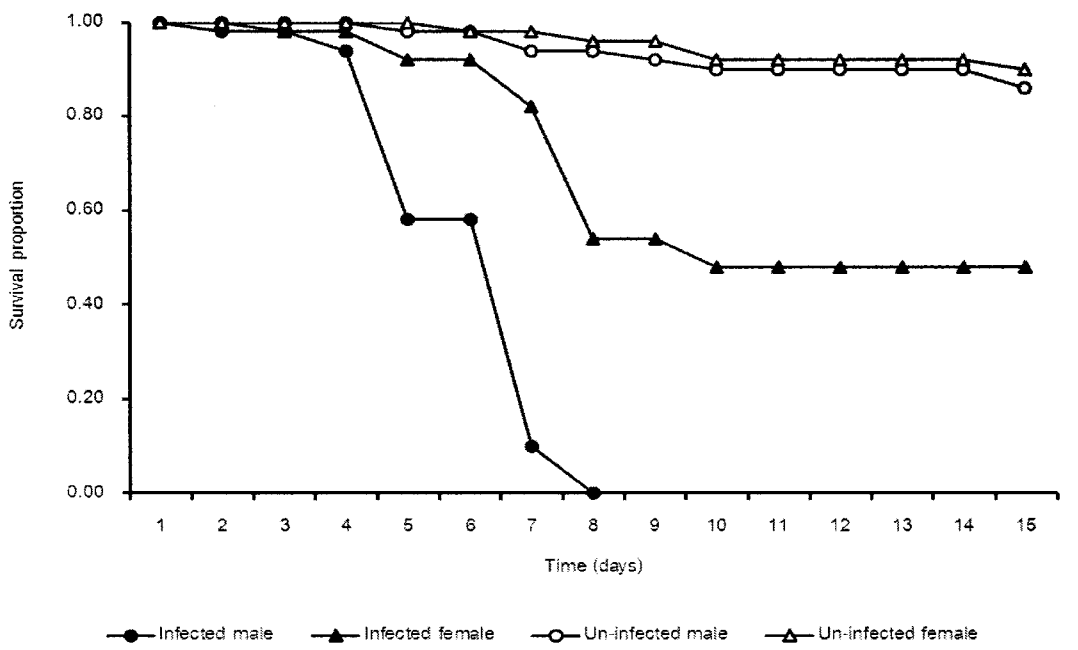


Figure 2 Kaplan-Meier curves analysis of adult male and female *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) infected and un-infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 in laboratory.

วิจารณ์

เชื้อราก่อโรคแมลง *M. anisopliae* PSUM02 มีผลทำให้แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Dimbi *et al.* (2009) ที่รายงานว่าแมลงวันผลไม้เพศผู้ที่ติดเชื้อราเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์ช้ากว่าแมลงวันผลไม้เพศผู้ปกติและมีผลต่อการจับคู่ผสมพันธุ์ที่ลดลง นอกจากนี้เชื้อราส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราและแมลงวันแตงเพศเมียที่อยู่ภายในกรงเดียวกันมีอัตราการรอดชีวิตลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ นริศ และคณะ (2554) พบว่าแมลงวันผลไม้ *B. papayae* เพศผู้ที่ติดเชื้อราโรคแมลง *M. anisopliae* มีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ลดลง นอกจากนี้พบแมลงวันผลไม้เพศผู้ที่ผ่านการติดเชื้อรา 6 วัน มีเปอร์เซ็นต์การตาย 100% ส่วนแมลงวันผลไม้เพศเมียและเพศผู้ปกติที่อยู่ภายในกรงเดียวกันมีเปอร์เซ็นต์การตาย 84% และ 72% ตามลำดับ ในวันที่ 15 หลังการทดสอบ

สรุป

เชื้อราก่อโรคแมลง *M. anisopliae* PSUM02 มีผลทำให้แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์และอัตราการรอดชีวิตของแมลงลดลง นอกจากนี้แมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรา สามารถถ่ายทอดเชื้อราไปสู่แมลงวันแตงเพศเมีย โดยผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์และทำให้แมลงวันแตงเพศเมียมีอัตราการรอดชีวิตลดลงเช่นกัน

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถานีวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ และบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ขอขอบคุณศูนย์ควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคใต้ และภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ และสถานที่ ตลอดการดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นริศ ท้าวจันทร์ และอนุชิต ชินาจริยวงศ์. 2551. ประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae). วิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) 39: 21-25.

นริศ ท้าวจันทร์ อนุชิต ชินาจริยวงศ์ และ วิวัฒน์ เสือสะอาด. 2554. ผลของเชื้อราโรคแมลง *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* ต่อพฤติกรรมการผสมพันธุ์ของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera papayae* (Diptera: Tephritidae). วิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) 42: 339-342.

นริศ ท้าวจันทร์. 2554. การคัดกรองเชื้อราโรคแมลงท้องถิ่นในเขตจังหวัดภาคใต้ตอนกลางเพื่อการควบคุมแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae). รายงานการวิจัย ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มนตรี จิรสุรัตน์. 2544. แมลงวันผลไม้ที่สำคัญของประเทศไทยและการแพร่กระจาย. ใน: แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองกีฏและสัตววิทยา. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพ ฯ.

Allwood, A.J., A. Chinajariyawong, R.A.I. Drew, E.L. Hamacek, D.L. Hancock, C. Hengsawad, J.C. Jinapin, M. Jirasurat, C. Kong Krong, S. Kritsaneepaiboon, C.T.S. Leong and S. Vijaysegaran. 1999. Host plant records for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in South-East Asia. Raffles B. Zool. 7: 1-99.

Dhillon, M.K., R. Singh, J.S. Naresh and H.C. Sharma. 2005. The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. J. Insect Sci. 5: 1-16.

Dimbi, S., N.K. Maniania and S. Ekesi. 2009. Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on the mating behavior of three species of African Tephritid fruit flies, *Ceratitis capitata*, *Certitis cosyra* and *Ceratitis fasciventris*. Biol. Control. 50: 111-116.

Nagappan, K,. S. Kamalnathan, T. Santharaman and M.K. Ayyasamy. 1971. Insecticidal trials for the control of the melon fruit fly, *Dacus cucurbitae* Coq. infesting snake gourd, *Trichosanthes anguina*. Madras Agric. J. 58: 688-690.

Shah, M.I., H.N. Batra and P.L. Ranjhen. 1948. Notes on the biology of *Dacus* (*Strumeta*) *ferrugineus* Fab. and other fruit flies in the North-West Frontier Province. Indian J. Entomol. 10: 249-266.

Shan, P.A. and J.K. Pell. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61: 413-423.

Toledo, J., P. Liedo, S. Flores, S.E. Campos, A. Villaseñor and P. Montoya. 2006. Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for fruit fly control: A novel approach. Proceeding of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance 127-132.

เอกสารแนบหมายเลข 3

ประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 16
The 16th Agricultural Conference

วันที่ ๒๖ – ๒๗ มกราคม ๒๕๕๘
26 – 27 January 2015

แก่นเกษตร ปีที่ 43 ฉบับพิเศษ 1 2558 Khon Kaen Agriculture Journal Vol.43 SUPPLEMENT 1 2015

50 ปี คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

แก่นเกษตร
KHON KAEN AGRICULTURE JOURNAL

ปีที่ 43 ฉบับพิเศษ 1 2558 VOL 43 SUPPLEMENT 1 2015

ประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 16
The 16th Agricultural Conference
วันที่ ๒๖ – ๒๗ มกราคม ๒๕๕๘
26 – 27 January 2015

http://ag2.kku.ac.th/conference16/

ISSN 0125-0485

การถ่ายทอดเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ในแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) เพศผู้ต่อเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการผสมพันธุ์

Autodissemination of *Metarhizium anisopliae* PSUM02 of infected male melon fly *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) to virgin and gravid female fly

ปาณิศา ธรรมเสวตร[1] และ นริศ ท้าวจันทร์[1*]

Panisa Thamsawet[1] and Narit Thaochan[1*]

บทคัดย่อ: ผลของการถ่ายทอดเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ของแมลงวันแตงเพศผู้ *Bactrocera cucurbitae* ที่ติดเชื้อราต่อแมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการผสมพันธุ์ พบว่าแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราสามารถจับคู่ผสมพันธุ์กับแมลงวันแตงเพศเมียทั้งสองสถานะและยังสามารถถ่ายทอดเชื้อราไปสู่แมลงวันแตงเพศเมียดังกล่าวได้ โดยพบค่าการรอดชีวิตเฉลี่ยของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรา แมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการผสมพันธุ์ของกรงทดสอบเท่ากับ 6.15 ± 0.29 11.82 ± 0.51 และ 11.88 ± 0.26 วันตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกรงชุดควบคุมที่ไม่ใช้เชื้อราที่มีค่าการรอดชีวิตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 13.90 ± 0.21 – 14.06 ± 0.12 วัน

คำสำคัญ: *Bactrocera cucurbitae*, *Metarhizium anisopliae*, แมลงวันแตง, การผสมพันธุ์, ค่าเฉลี่ยการรอดชีวิต

ABSTRACT: Effects of autodissemination on mating behavior of male melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, infected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 to uninfected virgin and gravid female melon fly were investigated. The infected male *B. cucurbitae* could mate with uninfected virgin and gravid female melon fly and transmitted the fungal pathogen to both female fly. The average survival time (AST) of infected male melon fly, uninfected virgin and gravid female melon fly in treated cage were 6.15 ± 0.29, 11.82 ± 0.51 and 11.88 ± 0.26 days, respectively. The control cage showed significantly different from treated cage with AST between 13.90 ± 0.21 – 14.06 ± 0.12 days.
Keywords: *Bactrocera cucurbitae*, *Metarhizium anisopliae*, melon fruit fly, mating, average survival time

[1] ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University

* Corresponding author: narit.t@psu.ac.th

บทนำ

พืชตระกูลแตงหลายชนิดจัดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและสร้างมูลค่าให้กับประเทศ ได้แก่ แตงกวา แคนตาลูป และบวบเหลี่ยม เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, มปป.) สำหรับปัญหาสำคัญที่สร้างความเสียหายในการปลูกพืชตระกูลแตง คือ การเข้าทำลายของโรคและแมลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเข้าทำลายของแมลงวันแตง (melon fruit fly) *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae) โดยสร้างความเสียหายทางตรงกับผลผลิต อีกทั้งยังพบว่ามีการแพร่กระจายในหลายประเทศ (Dhillon et al., 2005) รวมทั้งประเทศไทย (มนตรี, 2544; Clarke et al., 2001) ปัจจุบันวิธีการควบคุมแมลงวันแตงสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งการใช้เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมและมีคุณสมบัติที่ดีในการควบคุมแมลงวันแตงได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท PSUM02 มีคุณสมบัติในการเป็นเชื้อราก่อโรคแมลงสามารถเข้าทำลายกลุ่มแมลงวันผลไม้ได้ (นริศ, 2554) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้เพศผู้ที่ติดเชื้อราสามารถถ่ายทอดเชื้อราไปสู่แมลงวันผลไม้เพศเมียปกติโดยผ่านพฤติกรรมการจับคู่ผสมพันธุ์ได้ (ปาณิศา และนริศ, 2557; Dimbi et al., 2009)

ดังนั้นการนำเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 มาประยุกต์ใช้ในการควบคุมตัวเต็มวัยแมลงวันแตงเพศเมียโดยผ่านพฤติกรรมการจับคู่ผสมพันธุ์เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถช่วยลดจำนวนประชากรของแมลงวันแตงในธรรมชาติได้ ซึ่งในธรรมชาตินั้นมีทั้งตัวเต็มวัยเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการผสมพันธุ์ วัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาการถ่ายทอดเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราต่อแมลงวันแตงเพศเมียสถานะต่างๆ โดยผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์

วิธีการศึกษา

การเตรียมเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02

ได้รับความอนุเคราะห์เชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 (นริศ, 2554) จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ศูนย์ภาคใต้ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Sabouraud Dextrose Agar plus Yeast (SDAY) โดยเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27.0±2.0 องศาเซลเซียส ในสภาพไร้แสงเป็นเวลา 14 วัน หรือจนกว่าเชื้อราสร้างสปอร์จนสมบูรณ์ จากนั้นเตรียมสปอร์เชื้อราแขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อและผสมสาร Tween 80 เข้มข้น 0.05% แล้วนับสปอร์ด้วย haemacytometer ให้ได้ความหนาแน่น 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ตามวิธีการของ นริศ และอนุชิต (2551)

การเตรียมแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae*

การเตรียมแมลงวันแตงเพศผู้และเพศเมียที่ไม่ผ่านการผสมพันธุ์ โดยนำผลแตงที่ถูกแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เข้าทำลายตามธรรมชาติมาบ่มในห้องปฏิบัติการศูนย์ควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ศูนย์ภาคใต้ จากนั้นนำรุ่นลูก F1 หลังออกจากดักแด้อายุ 1 วัน ทำการแยกตัวเต็มวัยระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ใส่กรงผ้ามุ้งขนาด 30×30×30 เซนติเมตร จำนวนอย่างละ 100 ตัว ภายในกรงมีน้ำตาลก้อน ยีสต์ และน้ำเป็นแหล่งอาหารของแมลง เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิห้อง แสงธรรมชาติ เลี้ยงแมลงวันให้มีอายุ 10-15 วัน แล้วนำไปทำการทดลอง

สำหรับการเตรียมแมลงวันแตงเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์และพร้อมวางไข่ นำแมลงวันแตงรุ่นลูก F1 เพศผู้และเพศเมียจำนวนเพศละ 200 ตัว ใส่ในกรงผ้ามุ้งเดียวกัน (30×30×30 เซนติเมตร) ปล่อยให้แมลงจับคู่ผสมพันธุ์กันอย่างสมบูรณ์ จนมีอายุ 15-20 วัน แล้วคัดแยกแมลงวันแตงเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์จำนวน 100 ตัวใส่กรงผ้าขนาดข้างต้น ซึ่งเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์แล้วส่วนท้องจะขยายใหญ่และมีสีขาวขุ่น

เพราะมีการพัฒนาการของไข่ที่สมบูรณ์อยู่ภายในภายในกรงมีน้ำตาลก้อน ยีสต์ และน้ำเป็นแหล่งอาหารของแมลง เลี้ยงในสภาพอุณหภูมิห้อง แสงธรรมชาติ แล้วนำไปใช้ในการทดลอง

การทดสอบการถ่ายทอดเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02

นำแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์จำนวน 10 ตัว ไปใส่ในกรงผ้ามุ้งขนาด 30×30×30 เซนติเมตร จากนั้นนำแมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ผ่านการผสมพันธุ์จำนวน 10 ตัว แต้มสีที่ด้านหลังด้วยน้ำยาลบคำผิดสีขาวแบบพู่กันสูตรน้ำ เพื่อแยกความแตกต่างจากแมลงวันแตงเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์ (นริศ, 2554) จากนั้นนำแมลงวันแตงเพศผู้ที่ไม่ผ่านการผสมพันธุ์จำนวน 10 ตัว คลุกด้วยสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ที่ความหนาแน่น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที ใส่เข้าไปภายในกรงเดียวกัน ภายในกรงมีน้ำตาลก้อน ยีสต์ และน้ำ เป็นแหล่งอาหารให้กับแมลง ชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่คลุกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทำการทดลองจำนวน 10 ซ้ำ

สำหรับการบันทึกการจับคู่ผสมพันธุ์ ทำการเฝ้าสังเกตการณ์การจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลงวันแตง *B. cucurbitae* ในช่วงพลบค่ำ ในช่วงระยะเวลา 18.00 - 21.00 น. (Dimbi et al., 2009) สังเกตการจับคู่โดยใช้ไฟฉายแสงสีส้มในการส่องดูการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลง โดยเฝ้าสังเกตเป็นระยะเวลา 5 วัน หลังจากปล่อยแมลงเข้าไปในกรงผ้ามุ้ง โดยแมลงต้องจับคู่ผสมพันธุ์นานอย่างน้อย 10 นาที จึงถูกนับว่าจับคู่ผสมพันธุ์กันอย่างสมบูรณ์ (Dimbi et al., 2009) และบันทึกจำนวนการตายของแมลงทุกวันเป็นเวลา 15 วัน สำหรับซากแมลงที่ตายนำไปยืนยันสาเหตุการตายจากเชื้อราด้วยวิธีการของ ปาณิศาและนริศ (2557)

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรากับแมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการผสมพันธุ์ด้วยวิธี independent-samples *t* - test วิเคราะห์ค่า Kaplan-Meier analysis และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Tukey's HSD test

สถานที่และระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการศูนย์ควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ศูนย์ภาคใต้ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา ทำการทดลองระหว่างเดือนมกราคม ถึง เมษายน พ.ศ. 2557

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 ในแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศผู้ที่ติดเชื้อราต่อแมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการพันธุ์ พบว่าในวันที่ 1 2 และ 4 มีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ของเพศผู้ต่อเพศเมียที่ไม่ผ่านการผสมพันธุ์มากกว่าเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยในวันที่ 2 พบเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ในแมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์สูงถึง 35.0 ± 3.7% ส่วนแมลงวันแตงเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์พบเพียง 9.0 ± 2.3% ส่วนในวันที่ 3 และ 5 มีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ของเพศผู้ต่อเพศเมียที่ไม่ผ่านและเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์ที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) (Figure 1) ส่วนชุดควบคุมในวันที่ 1 และ 2 มีเปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ของเพศผู้ต่อเพศเมียที่ไม่ผ่านการผสมพันธุ์มากกว่าเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในวันที่ 3 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์การจับคู่ผสมพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) ของแมลงวันแตงเพศผู้ต่อเพศเมียที่ไม่ผ่านและเพศเมียที่ผ่านการผสมพันธุ์ (Figure 2)

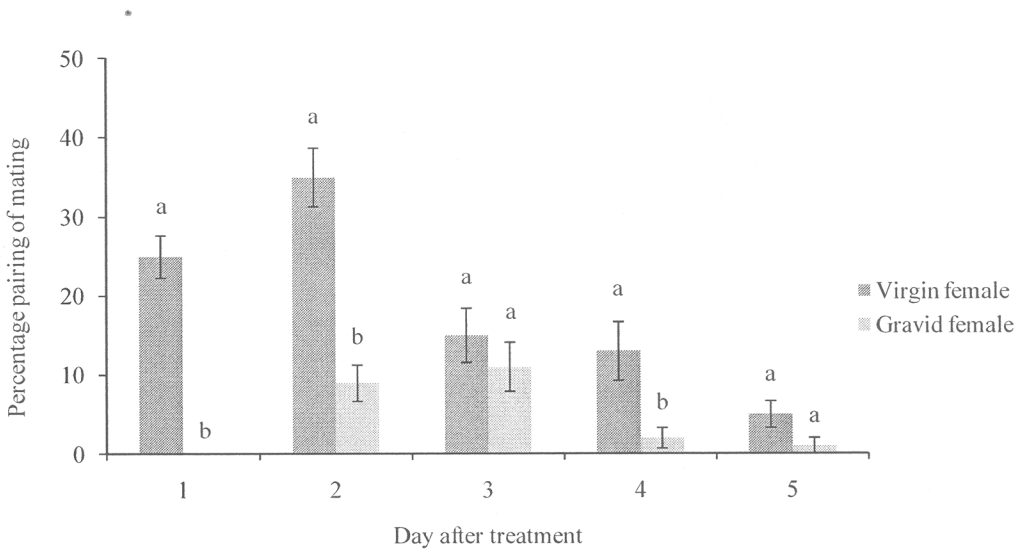


Figure 1 Percentage of mating (mean ± S.E.) of infected adult male *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 on virgin and gravid female flies.

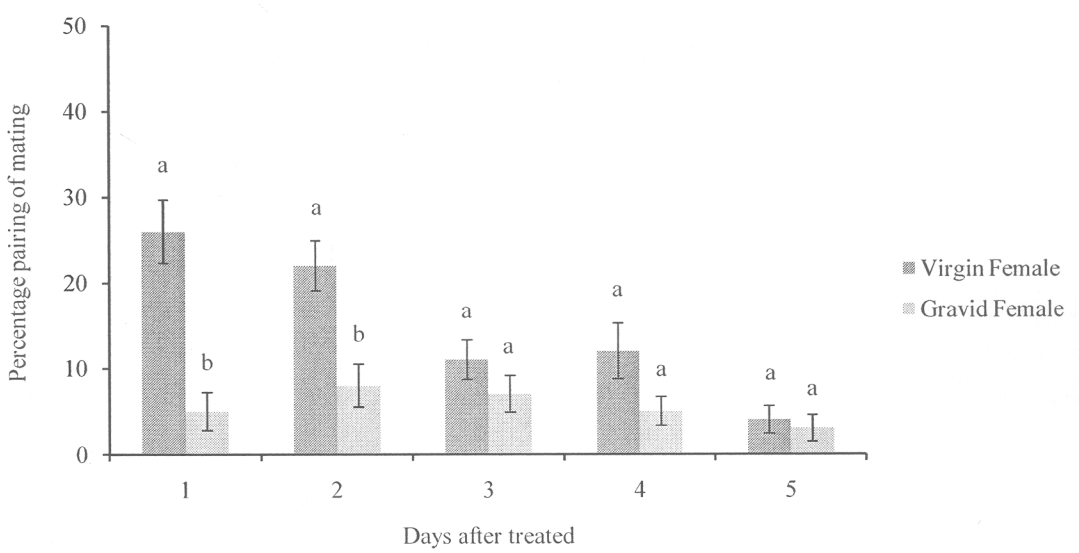


Figure 2 Percentage of mating (mean ± S.E.) of uninfected adult male *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 on virgin and gravid female flies.

การวิเคราะห์ Kaplan-Meier ของค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรา พบว่ามีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตต่ำที่สุด คือ 6.15 ± 0.29 วัน ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (Table 1) รองลงมาคือ แมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการผสมพันธุ์ที่อยู่ในกรงเดียวกับแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อรามีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตเท่ากับ 11.82 ± 0.51 และ 11.88 ± 0.26 วัน ส่วนชุดควบคุมแมลงวันแตงเพศผู้ แมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการผสมพันธุ์มีค่าเฉลี่ยการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เท่ากับ 14.06 ± 0.12 13.90 ± 0.14 และ 13.90 ± 0.21 วัน ตามลำดับ โดยมีจำนวนวันที่ทำการสำรวจจำกัดที่ 15 วัน (Table 1)

Table 1 Kaplan-Meier survival analysis of adult male *Bactrocera cucurbitae* (Couqillett) infected and uninfected with *Metarhizium anisopliae* PSUM02 on virgin and gravid female flies.

Assay	Insect	Average survival time (AST) (mean ± SE)*	95% Confidence interval	
			Lower	Upper
Treated cage	Infected male	6.15 ± 0.29[a]	5.79	6.51
	Virgin female	11.82 ± 0.51[b]	10.90	12.47
	Gravid female	11.88 ± 0.26[b]	11.09	12.67
Control cage	Healthy male	14.06 ± 0.12[c]	13.62	14.50
	Virgin female	13.90 ± 0.14[c]	13.41	14.39
	Gravid female	13.90 ± 0.21[c]	13.40	14.40

*Different superscripts in the AST column indicate significant differences by Tukey's HSD test (P<0.05). AST observations were right censored by limiting observations to 15 days, *i.e.*, the data are right censored.

แมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศผู้ที่ติดเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 สามารถถ่ายทอดเชื้อราไปสู่แมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการผสมพันธุ์ได้ โดยแมลงวันแตงเพศผู้สามารถจับคู่ผสมพันธุ์กับแมลงวันแตงเพศเมียทั้งสองสถานะได้ นอกจากนี้ยังส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตที่ลดลงของแมลงวันแตงเพศเมียทั้งสองสถานะ ซึ่งจากการทดลองของ Dimbi et al. (2013) ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อรา *M. anisopliae* กับแมลงวันผลไม้เพศผู้สกุล *Ceratitis cosyra*, *C. fasciventris* และ *C. capitata* โดยผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์ พบว่าแมลงวันผลไม้เพศผู้ที่ติดเชื้อรามีค่า LT_{50} เท่ากับ 2.6 ± 0.1, 2.9 ± 0.2 และ 2.9 ± 0.1 ตามลำดับ และแมลงวันผลไม้เพศเมียปกติที่ได้รับเชื้อรามีค่า LT_{50} เท่ากับ 8.1 ± 0.4, 10.4 ± 0.4 และ 10.5 ± 0.4 ตามลำดับ นอกจากนี้ Sookar et al. (2014) รายงานว่าแมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศผู้ที่ติดเชื้อราสามารถแพร่กระจายเชื้อราไปสู่แมลงวันแตงเพศเมียปกติและทำให้แมลงวันแตงเพศมีเปอร์เซ็นต์การตายถึง 69 ± 5% และสอดคล้องกับการทดลองของปาณิศาและนริศ (2557) พบว่าตัวเต็มวัยของแมลงวันแตงเพศผู้ที่ติดเชื้อราสามารถถ่ายทอดเชื้อราไปสู่แมลงวันแตงเพศเมียปกติที่ไม่ผ่านการผสมพันธุ์ได้และลดอัตราการรอดชีวิตของแมลงลงด้วย

สรุป

แมลงวันแตง *B. cucurbitae* เพศผู้ที่ติดเชื้อรา *M. anisopliae* PSUM02 สามารถถ่ายทอดเชื้อราไปสู่

แมลงวันแตงเพศเมียที่ไม่ผ่านและผ่านการผสมพันธุ์ได้โดยพฤติกรรมการจับคู่ผสมพันธุ์ของแมลง และทำให้แมลงวันแตงเพศเมียทั้งสองสถานะมีอัตราการรอดชีวิตที่ลดลง

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่ NAT550364S ขอขอบคุณสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติคณะทรัพยากรธรรมชาติ บัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ศูนย์ควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ศูนย์ภาคใต้ และภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่เอื้อเฟื้อเงินวิจัย อุปกรณ์ และสถานที่ ตลอดการดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. มปป. ผักเศรษฐกิจของไทย. http://www.doa.go.th/th/dmdocuments/01eco_vegetable.pdf. ค้นเมื่อ 29 ธันวาคม 2557.

นริศ ท้าวจันทร์ และอนุชิต ชินาจริยวงศ์. 2551. ประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae). วิทยาศาสตร์เกษตร. 39(พิเศษ): 21-25.

นริศ ท้าวจันทร์. 2554. การคัดกรองเชื้อราโรคแมลงท้องถิ่นในเขตจังหวัดภาคใต้ตอนกลางเพื่อการควบคุมแมลงวันผลไม้ (Diptera: Tephritidae). รายงานการวิจัย ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 49 หน้า

ปาณิศา ธรรมเสวตร และนริศ ท้าวจันทร์. 2557. ผลของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ต่อการจับคู่ผสมพันธุ์และการรอดชีวิตของแมลงวันแตง *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae). แก่นเกษตร. 42(พิเศษ):629-633.

มนตรี จิรสุรัตน์. 2544. แมลงวันผลไม้ที่สำคัญของประเทศไทยและการแพร่กระจาย. หน้า 13-18. ใน: แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองกีฏและสัตววิทยา. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพ ฯ.

Clarke, A.R., A. Allwood, A. Chinajariyawong, R.A.I. Drew, C. Hengsawad, M. Jirasurat, C. Kong Krong, S. Kritsaneepaiboon and S. Vijaysegaran. 2001. Seasonal abundance and host use patterns of seven *Bactrocera* Macquart species (Diptera; Tephritidae) in Thailand and Malaysia. Raffles B. Zool. 49:207-220.

Dhillon, M.K., R. Singh, J.S. Naresh and H.C. Sharma. 2005. The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and managemant. J. Insect Sci. 5:1-16.

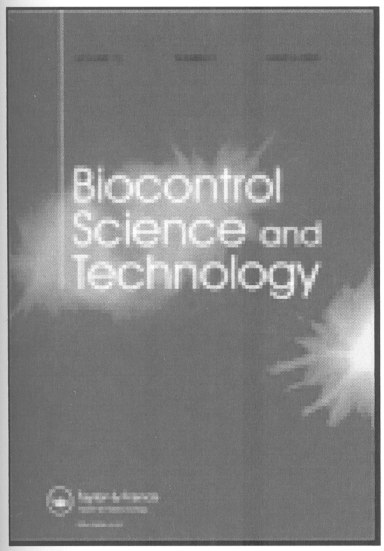
Dimbi, S., N.K. Maniania and S. Ekesi. 2009. Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on the mating behavior of three species of African Tephritid fruit flies, *Ceratitis capitata*, *Certitis cosyra* and *Ceratitis fasciventris*. Biol. Control 50:111-116.

Dimbi, S., N.K. Maniania and S. Ekesi. 2013. Horizontal Transmission of *Metarhizium anisopliae* in Fruit Flies and Effect of Fungal Infection on Egg Laying and Fertility. Insects 4:206-216.

Sookar, P., S. Bhagwant and M.N. Allymamo. 2014. Effect of *Metarhizium anisopliae* on the fertility and fecundity of two species of fruit flies and horizontal transmission of mycotic infection. J. Insect Sci. 14(100), Available: http://www.insectscience.org/14.100.

เอกสารแนบหมายเลข 4

This article was downloaded by: [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan]
On: 10 March 2015, At: 00:13
Publisher: Taylor & Francis
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Biocontrol Science and Technology
Publication details, including instructions for authors and subscription information:
http://www.tandfonline.com/loi/cbst20

Effects of autodisseminated Metarhizium guizhouense PSUM02 on mating propensity and mating competitiveness of Bactrocera cucurbitae (Diptera: Tephritidae)

N. Thaochan[a] & A. Ngampongsai[a]
[a] Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand
Accepted author version posted online: 18 Dec 2014.Published online: 06 Mar 2015.

CrossMark
Click for updates

To cite this article: N. Thaochan & A. Ngampongsai (2015) Effects of autodisseminated Metarhizium guizhouense PSUM02 on mating propensity and mating competitiveness of Bactrocera cucurbitae (Diptera: Tephritidae), Biocontrol Science and Technology, 25:6, 629-644, DOI: 10.1080/09583157.2014.1000265

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2014.1000265

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms &

Conditions of access and use can be found at http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions

Downloaded by [Prince of Songkla University]. [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

Biocontrol Science and Technology, 2015
Vol. 25, No. 6, 629–644, http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2014.1000265

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

RESEARCH ARTICLE

Effects of autodisseminated *Metarhizium guizhouense* PSUM02 on mating propensity and mating competitiveness of *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae)

N. Thaochan* and A. Ngampongsai

Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand

(*Received 4 September 2014; returned 23 October 2014; accepted 15 December 2014*)

We investigated the effects of inoculation by *Metarhizium guizhouense* PSUM02 on mating propensity and mating competitiveness of *Bactrocera cucurbitae*, with a view on pest management. On day 4 postinoculation, the *M. guizhouense*-treated male flies had significantly lowered mating propensity and mating competitiveness, while the treated female flies had reduced mating propensity on day 4 and reduced mating competitiveness on day 5. The mating propensity and competitiveness of treated male and female flies then further declined until death. Kaplan–Meier survival analysis of treated male and female flies gave average survival times (AST) of 6.2 ± 0.2 and 5.4 ± 0.3 days in the mating propensity assay, and about 5.0 ± 0.1 and 4.4 ± 0.2 days in the mating competitiveness assay. The AST of untreated flies ranged from 12.8 ± 0.1 to 14.7 ± 0.2 days for comparison (observation up to 15 days). Untreated flies had decreased AST and mating characteristics when exposed to contact with treated male flies, indicating transmission of the fungal infection by such contact also to untreated male flies. Surprisingly, contact with treated female flies did not affect the AST of untreated males or females in the same cage. These results corroborate the potential for pest control by autodissemination with treated male flies, which transmit the fungus to a healthy population better than the treated female flies.

Keywords: autodissemination; *Metarhizium guizhouense*; mating propensity; mating competitiveness; *Bactrocera cucurbitae*

Introduction

The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae), is an economically important insect pest in the tropical areas (Dhillon, Singh, Naresh, & Sharma, 2005; Shah, Batra, & Ranjhen, 1948). Its preferable host range covers over 81 plant species of the family Cucurbitaceae (Dhillon et al., 2005). This fly is distributed in Asia and Southeast Asia (Allwood et al., 1999), particularly throughout Thailand (Clarke et al., 2001). The damage caused by melon fruit flies impact negatively the quality and quantity of fruits (Lall, 1975; Mote, 1975; Rabindranath & Pillai, 1986; Srinivasan, 1959). The fruits attacked in their early stages might fail to develop properly and drop off or rot on the plant. Since the damaging fruit fly maggots are internal within the fruit, they are difficult to control with insecticides. The management of a wide range of fruit fly pests with entomopathogenic fungi, such as

*Corresponding author: narit.t@psu.ac.th

© 2015 Taylor & Francis

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

Metarhizium anisopliae and *Beauveria bassiana*, has been studied (Dimbi, Maniania, Luk, Ekesi, & Mueke, 2003; Ekesi, Maniania, & Lux, 2002; Mochi, Monteiro, De Bortoli, Doria, & Barbosa, 2006; Quesada-Moraga, Ruiz-Garcia, & Santiago-Alvarez, 2006; Toledo et al., 2006; Yee & Lacey, 2005). Especially *M. anisopliae* has effectively controlled tephitid flies (Dimbi, Maniania, & Ekesi, 2009; Lezama-Gutierrez et al., 2000; Quesada-Moraga, Martin-Carballo, Garrido-Jurado, & Santiago-Alvarez, 2008; Yousef, Lozano-Tovar, Garrido-Jurado, & Quesada-Moraga, 2013). *Metarhizium guizhouense* Q.T. Chen & H.L. Guo as well as *Metarhizium pingshaense* and *Metarhizium taii* are, entomopathogenic fungi that belonging to the *M. anisopliae* complex, are currently recognised as varieties of *M. anisopliae* (Bischoff, Rehner, & Humber, 2009). These strains caused mortality of the flies similarly to *M. anisopliae*. Direct application by spraying fungal propagules onto adult stage fruit flies is difficult in practice, because the adult flies are fast and mobile, so that autodissemination (horizontal transmission) is an alternative strategy to be considered (Furlong & Pell, 2001; Quesada-Moraga et al., 2008). The target fruit fly population is infected by contact with contaminating devices that expose to entomopathogenic fungi (Dimbi et al., 2003; Ekesi, Dimbi, & Maniania, 2007; Maniania, 2002; Maniania, Ekesi, Odulaja, Okech, & Nadel, 2006; Vega, Dowd, & Bartelt, 1995). These devices attract the insects, contaminate them and allow them to escape so they can transmit the disease further by mating or by other contact (Dimbi et al., 2003; Ekesi et al., 2007; Maniania et al., 2006; Quesada-Moraga et al., 2008). The success of this technique depends on the ability of the contaminated flies to transfer fungal conidia to healthy flies, in particular during mating (Sookar, Bhagwant, & Allymamod, 2014; Toledo et al., 2007). Clearly, such contacting behaviour can contribute to the fly-to-fly transmission of the fungus pathogen.

Fungal pathogen infections can modify behaviour and reduce mating competitiveness and attractiveness of the fly (Dimbi et al., 2009). In the current study, we investigated the effects of fungal inoculation on the mating behaviour, namely both mating propensity and mating competitiveness of male and female *B. cucurbitae* under laboratory conditions. The control of *B. cucurbitae* with *M. guizhouense* PSUM02 might contribute to successful management of this pest in cucurbits, and this motivated the current laboratory study on the transmission and reproduction effects of such infection.

Materials and methods

Insect collection and culture

Infested cucurbit fruit (*Cucumis sativa* L.) with fruit fly larvae were collected from an orchard at Khor Hong district, Songkhla province, Thailand, were kept in clear plastic boxes (20 cm × 25 cm × 15 cm) with perforations on the lid for ventilation. The bottom of each box was covered with a 1 cm layer of sterile sawdust for pupation. Pupae were sieved and kept in a clear plastic box (10 cm × 10 cm × 10 cm). After eclosion, adult fruit flies were transferred to a gauze cage (30 cm × 30 cm × 30 cm) and reared with cube sugar, water and yeast hydrolysate. *Bactrocera cucurbitae* were identified when they were 10 days old based on the morphological characters described by Hardy (1973), White and Elson-Harris (1992) and Drew and Hancock (1994).

After identification, the *B. cucurbitae* were reared in a cage (30 cm × 30 cm × 30 cm) and provided with cube sugar, a water-soaked sponge cloth and yeast hydrolysate, which were changed daily. The flies were maintained at 12:12 h light: dark photoperiod at 75–80% relative humidity (RH) and 27 ± 2°C. The male and female flies were kept together in the same cage until they mated. The female flies were reproductively mature at 15–20 days old.

Fungal strain

Metarhizium guizhouense strain PSUM02 (accession number AB981657) was obtained from the culture collection at the Natural Biological Control Research Center (NBCRC), Southern Region, Department of Natural Resources, Prince of Songkla University. It was originally isolated from an insect cadaver (*Tibicen* sp. [Hemiptera: Cicadidae]) at Nakhon Si Thammarat province (Thaochan, 2011). This strain was selected in a prior study as the most virulent among various candidates against adult *Bactrocera papayae* (Thaochan, Chinajariyawong, & Suasa-Ard, 2011). Slant monoconidial cultures of the strain were grown on Sabouraud dextrose agar plus yeast extract (SDAY; 10 g/l dextrose, 2.5 g/l peptone, 2.5 g/l yeast extract and 20 g/l agar) for 15 days at 27 ± 2°C in darkness. Before inoculation, the viability of conidia was assessed by spreading 500 µl of 1×10^6 spore/ml suspension on SDAY and incubating at 27 ± 2°C in complete darkness (Dimbi, Maniania, Lux, & Mueke, 2004). At 24 h, the percentage germination was determined by assessing 100 spores at 400x magnification. A spore with a germ tube longer than its width was considered viable, and the viability was higher than 95%.

Effect of M. guizhouense *PSUM02 on the mating propensity of adult males and females of* B. cucurbitae

To evaluate the mating propensity of *M. guizhouense*-treated male flies, 50 adult male flies (10 days old after eclosion) were exposed to fungal inoculums by placing them into a cylindrical glass bottle (5 cm × 10 cm) that contained 3 ml of the spore suspension (1×10^6 spore/ml), and keeping them exposed in this manner for 1 min (modified from Dimbi et al., 2004). Then, each *M. guizhouense*-treated male was placed in a clear plastic box (10 cm × 10 cm × 10 cm) with the air ventilation hole of the lid (5 cm) covered with gauze. One untreated virgin female fly (10 days old after eclosion) was then introduced into the same plastic box. The flies were provided with cube sugar, a water-soaked sponge cloth and yeast hydrolysate. Thereafter, the flies were observed daily from 18.00 to 21.00 h. Mating was considered successful if pairing of the male and female lasted more than 10 min (Dimbi et al., 2009). For evaluation of mating propensity, the *M. guizhouense*-treated female flies were observed similarly as above, with each *M. guizhouense*-treated female held in the company of an untreated virgin male fly (10 days old after eclosion). The control group pairings were of untreated male and female flies (10 days old after eclosion). These experiments were replicated with 50 pairs per treatment.

The bioassay was conducted with a 12:12 h light:dark photoperiod at 75–80% RH and 27 ± 2°C. The mortality was monitored for 15 days and dead flies were removed daily, immediately surface sterilised with 1% sodium hypochlorite followed by three rinses with sterile distilled water, then placed on sterile wet filter paper in sterile Petri

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

dishes. The latter were sealed with parafilm and kept at room temperature, and the development of mycosis on the cadavers was monitored for 5 days.

Effects of M. guizhouense *PSUM02 infection on the mating competitiveness of adult male and female of* B. cucurbitae

The *M. guizhouense*-treated male flies were inoculated as described earlier. Ten *M. guizhouense*-treated male flies and 10 untreated virgin female flies (10 days old after eclosion) together with 10 untreated male flies (10 days old after eclosion) were released in one and the same gauze cage (30 cm × 30 cm × 30 cm). For visual distinction, the untreated males were marked with a small dot of a white correction fluid in water base (Liquid Paper®) on the notum of their thorax, before the beginning of the 24 h experiment. Such marking has no effect on the mating competitiveness of males (Thaochan et al., 2011). The flies were observed daily from 18.00 to 21.00 h. Mating was considered successful if the male–female pairing lasted more than 10 min (Dimbi et al., 2009). The mating competitiveness of treated and untreated males, with virgin female flies, was determined by comparing the numbers of successful matings using a *t*-test with 10 replications. In the control cage, 10 marked male flies with a small dot of a white correction fluid on the notum, and 10 each of untreated male and female flies were released in the same gauze cage (30 cm × 30 cm × 30 cm). The observation of mating competitiveness and number of replications were as above.

For the evaluation of *M. guizhouense*-treated female flies, 10 *M. guizhouense*-treated female flies and 10 untreated virgin male flies (10 days old after eclosion) together with 10 untreated female flies (10 days old after eclosion) were released in the same gauze cage (30 cm × 30 cm × 30 cm). The flies were provided with cube sugar, a water-soaked sponge cloth and yeast hydrolysate. For visual distinction, the untreated females were marked with a small dot of a white correction fluid on the notum before the beginning of the 24 h experiment. The observation was similar to the other competition experiments above. In the control cage, 10 marked female flies with a small dot of a white correction fluid, and 10 each of untreated male and female flies were released the same gauze cage (30 cm × 30 cm × 30 cm). The observation of mating competitiveness and number of replications were as above.

Temperature, RH and photoperiods were the same as for the previous experiments.

Statistical analysis

The mating propensity data for *M. guizhouense*-treated males, *M. guizhouense*-treated female and untreated flies (control group) were analysed using the χ^2-test (assuming equal distributions as the null hypothesis) and significant differences between groups were also identified with Fisher's exact test (Ruther, McCaw, Böcher, Pothmann, & Putz, 2014).

The relative mating competitiveness of treated/untreated males/females were analysed using an unpaired *t*-test. The average survival times (AST) were determined with Kaplan–Meier survival analysis. The data were subjected to multiple analysis of variance, and Tukey's honestly significant difference test ($\alpha = 0.05$) was used to compare means. All analyses were carried out using the SPSS 11.0 programme for Windows (SPSS, 2001).

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

Downloaded by [Prince of Songkla University]. [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

Results

Effects of M. guizhouense *PSUM02 on the mating propensity of adult male and female* B. cucurbitae

The mating propensities of *M. guizhouense*-treated males, *M. guizhouense*-treated female and untreated flies (control group) were different (Figure 1). On day 1, *M. guizhouense*-treated female and untreated flies were significantly different from *M. guizhouense*-treated male flies (χ^2-test, χ^2 = 7.204; df = 2; P = 0.027). On day 2, the *M. guizhouense*-treated males showed the lowest mating propensity (χ^2-test, χ^2 = 7.204; df = 2; P = 0.027). On day 3, the mating propensities were not significantly different between the three treatments (χ^2-test, χ^2 = 0.761; df = 2; P = 0.692). On day 4, the mating propensities of *M. guizhouense*-treated males and females were significantly lower than for untreated flies (χ^2 = 7.385; df = 2; P = 0.036). No successful mating was observed on days 5 or 6 in the *M. guizhouense*-treated groups.

Kaplan–Meier survival analysis and cumulative mortality of B. cucurbitae *infected with* M. guizhouense *PSUM02*

The *M. guizhouense*-treated male and female flies had 100% mortality with mycosis, and the lowest AST at 6.2 ± 0.2 and 5.4 ± 0.3 days that significantly differed from the 11.1 ± 0.6 and 12.1 ± 0.4 survival times for untreated females and males in the same cage (F = 130.56; df = 5; $P < 0.05$; Table 1). In the control cages with only untreated flies, the AST exceeded 14 days with no significant difference between males and females.

The *M. guizhouense*-treated male and female flies had 100% mortality by days 8 and 9 after inoculation, respectively (Figures 2 and 3). The *M. guizhouense*-treated male flies transmitted the fungus to untreated female flies in the same cage, so the latter had a 52 ± 5.8% mortality by day 10 (Figure 2). The *M. guizhouense*-treated female

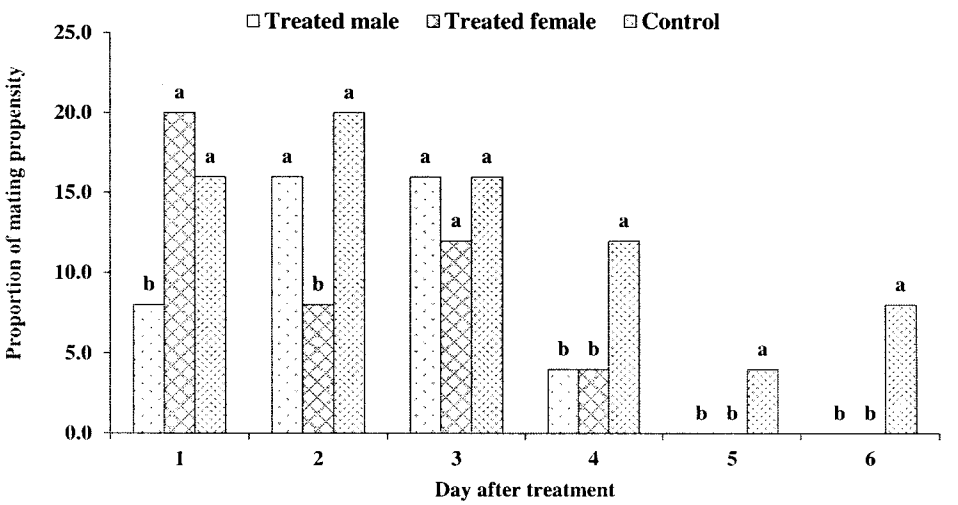


Figure 1. The mating propensities of *Metarhizium guizhouense* PSUM02-treated males, *Metarhizium guizhouense* PSUM02-treated females and untreated *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) flies (control group).

Table 1. Kaplan–Meier survival analysis of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) infected with *Metarhizium guizhouense* PSUM02.

Assay	Insect	AST (mean ± SE)*	95% Confidence interval	
			Lower	Upper
Treated cage	Treated male	6.2 ± 0.2[a]	5.8	6.6
	Untreated female	11.1 ± 0.6[b]	10.2	12.4
Treated cage	Untreated male	12.1 ± 0.4[b]	10.6	13.5
	Treated female	5.4 ± 0.3[a]	4.9	5.9
Control cage	Untreated male	14.3 ± 0.2[c]	13.6	14.9
	Untreated female	14.5 ± 0.3[c]	13.9	15.0

In treated cages, the population was exposed by contact with infected (treated) males and females, while the untreated cages had unexposed healthy population. The significant differences in the ASTs of healthy females indicate transmission of infection by contact.
*Different superscripts in the AST column indicate statistical significance by Tukey's HSD test ($P < 0.01$). AST observations were limited to 15 days, i.e., the data are right censored.

flies transmitted the fungus to untreated male flies whose mortality was 33.3 ± 4.5% by day 11 (Figure 3). In the control cages, the untreated male and female flies had 14 ± 4 and 10 ± 3.2% mortalities based on 15 observation days (Figure 4).

Effects of M. guizhouense *PSUM02 infection on the mating competitiveness of adult male and female* B. cucurbitae

The mating competitiveness was not significantly different between *M. guizhouense*-treated and untreated male flies on days 1 and 2 of observation, when in a shared cage (Figure 5A). On day 3, however, the number of matings by untreated flies was significantly greater than the number of matings by *M. guizhouense*-treated males. *M. guizhouense*-treated males did not mate after day 4. In control cages, the marking of healthy male flies had no significant effect on mating, on any of the observed days 1–5 (Figure 5B).

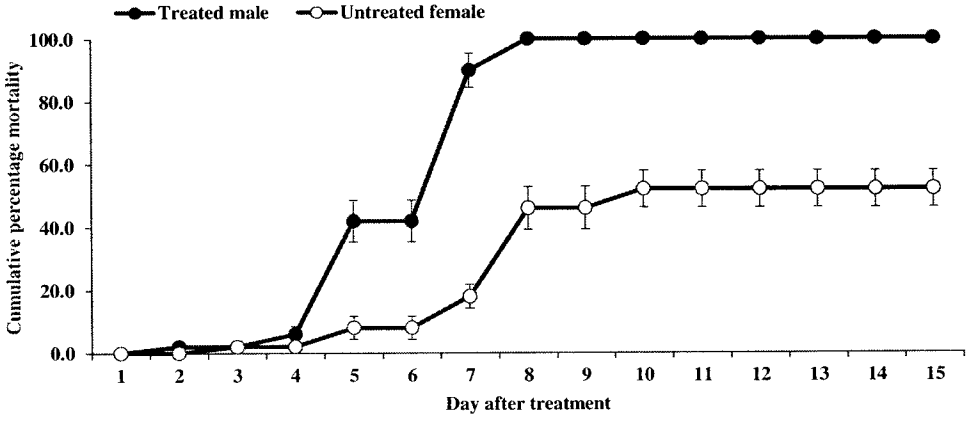


Figure 2. Cumulative mortalities (mean ± SE) of untreated adult female and infected adult male flies. A mixed population of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) with exposure to *Metarhizium guizhouense* PSUM02.

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

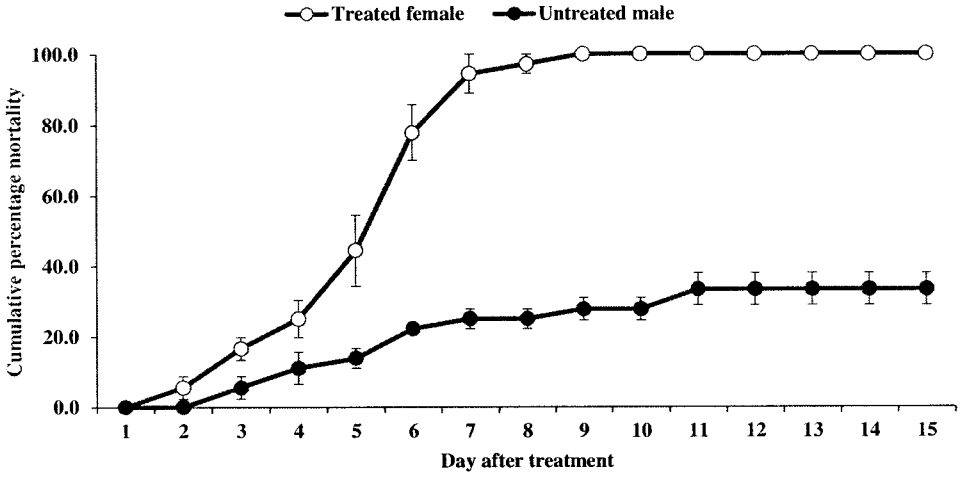


Figure 3. Cumulative mortalities (mean ± SE) of untreated adult male and infected adult female flies. A mixed population of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) with exposure to *Metarhizium guizhouense* PSUM02.

The mating competitiveness of *M. guizhouense*-treated female flies was not significantly different from that of untreated females on days 1–4 (Figure 6A). On day 5, *M. guizhouense*-treated females did not mate at all. In control cages, the marking of healthy female flies had no significant effect on mating, on any of the observed days 1–5, except on day 2 the marked healthy female flies showed more mating than the unmarked female flies (Figure 6B).

Kaplan–Meier survival analysis of B. cucurbitae *infected with* M. guizhouense *PSUM02 in the mating competitiveness bioassay*

The *M. guizhouense*-treated male flies had 100% mortality with mycosis, and the lowest 5 ± 0.1 days AST, which was significantly different from the untreated flies ($F = 72.27$; df = 5; $P < 0.05$; Table 2). The initially untreated male and female flies,

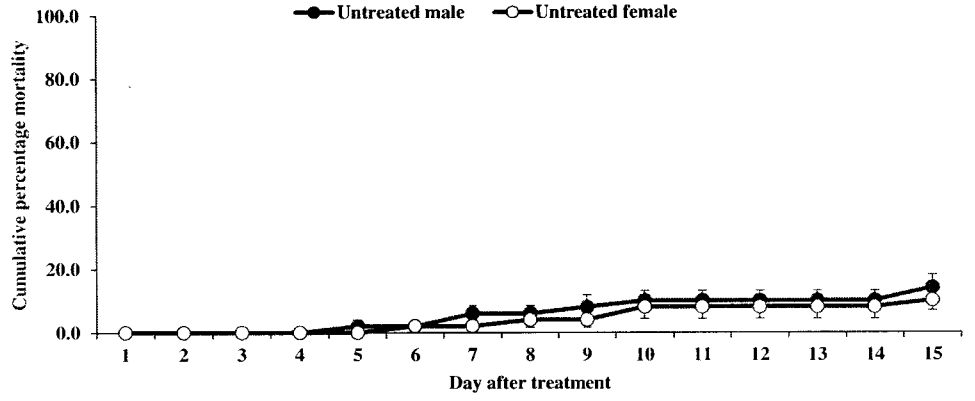


Figure 4. Cumulative mortalities (mean ± SE) of untreated adult male and female flies of species *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett).

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

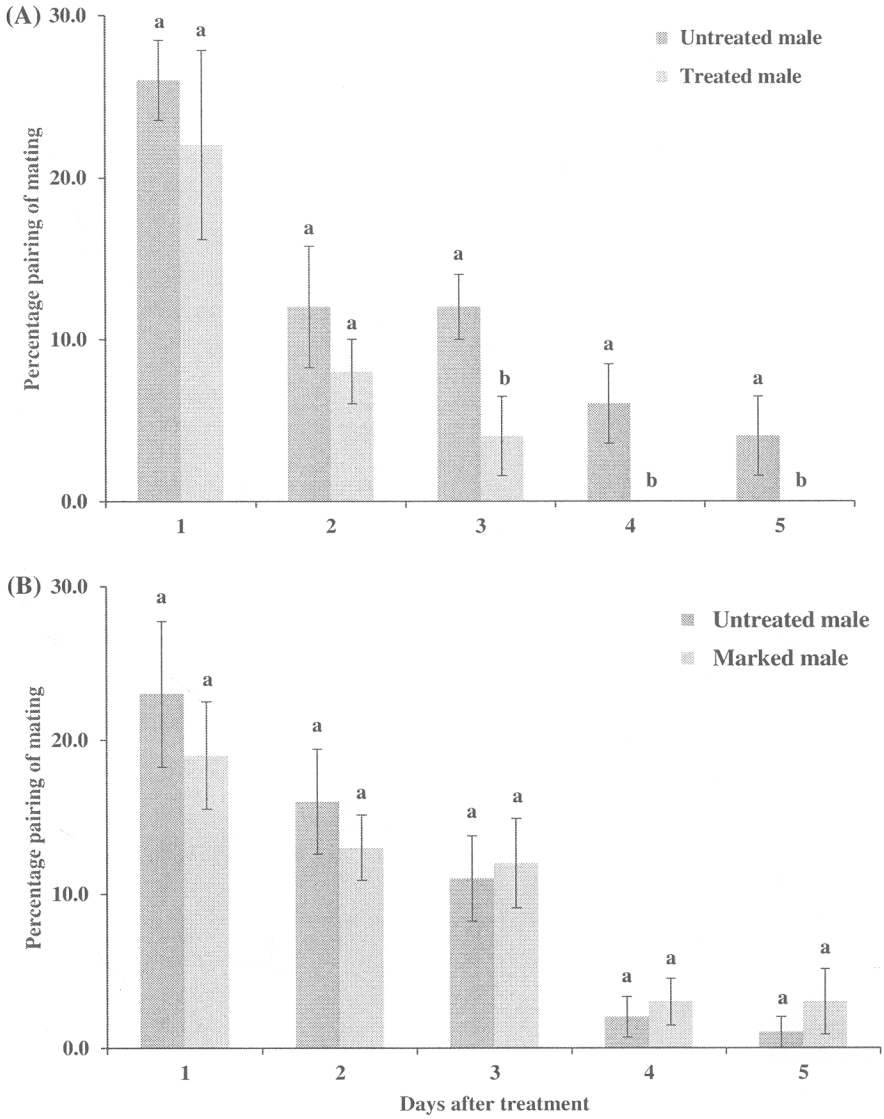


Figure 5. Percentages of mating success in pairing (mean ± SE) were affected by infection but not by marking used for observation purposes. *Metarhizium guizhouense* PSUM02 infected *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). (A) Infected and untreated adult male flies and (B) marked and untreated adult male flies (control).

exposed only by contact with inoculated male flies in the same cage, had 11.6 ± 0.4 and 10.5 ± 0.6 day AST values, respectively. These values were still significantly lower than the values for flies in control cages without exposure (Table 2). In the control cages, the marked males, unmarked males and females, all untreated and without exposure, had about 13-day AST values without significant differences (Table 2).

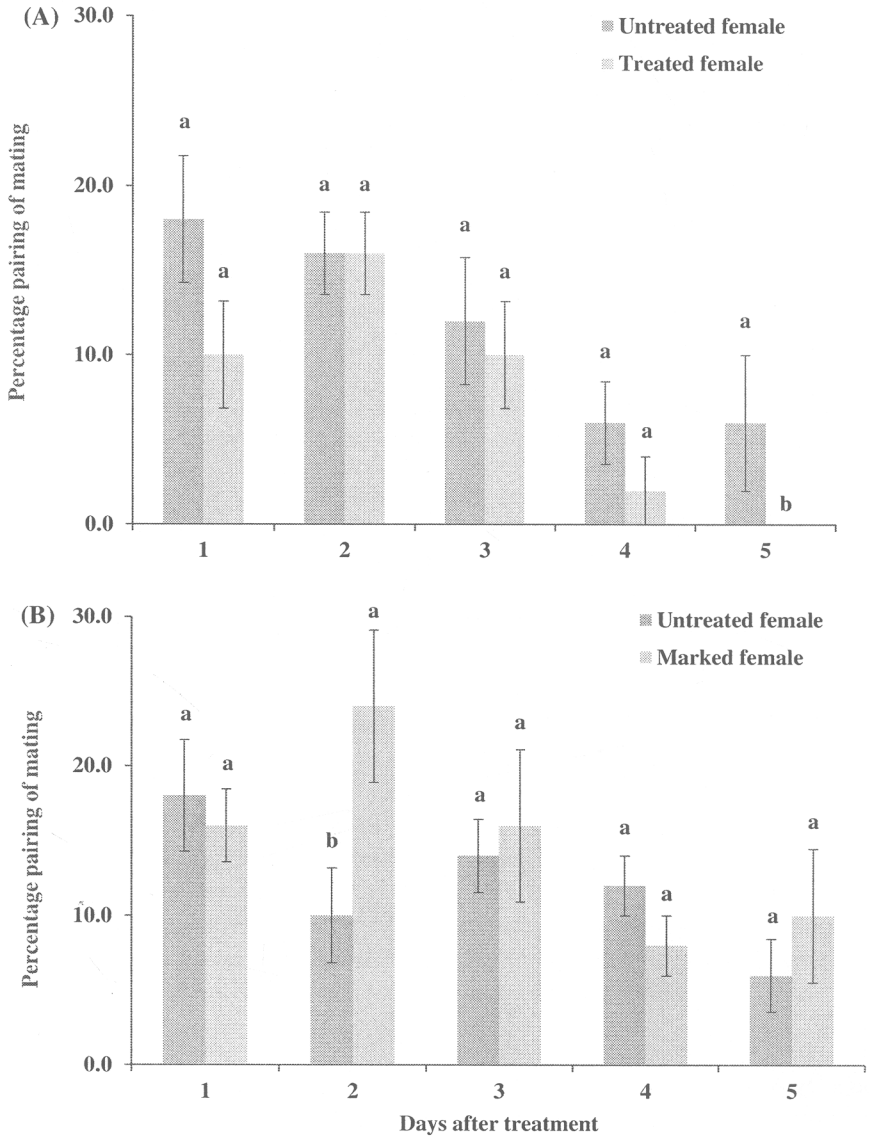


Figure 6. Percentages of mating success on pairing (mean ± SE) were affected by infection but not by marking used for observation. Infection with *Metarhizium guizhouense* PSUM02 of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). (A) Infected and untreated adult female flies and (B) marked and untreated adult female flies (control).

The *M. guizhouense*-treated female flies had 100% mortality with mycosis, and had the lowest 4.4 ± 0.2 days AST, which was significantly different from the untreated flies (F = 191.93; df = 5; $P < 0.05$; Table 3). The initially untreated male and female flies, exposed only by contact with inoculated female flies in the same cage, had 13.9 ± 0.4 and 13.8 ± 0.3 day AST values, respectively. These values were not significantly different from the flies in control cages that were not exposed

Table 2. Kaplan–Meier survival analysis of adult male *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) infected with *Metarhizium guizhouense* PSUM02, in data from the mating competitiveness bioassay.

			95% Confidence interval	
Assay	Insect	AST (mean ± SE)*	Lower	Upper
Treated cage	Treated male	5.0 ± 0.1^{a}	4.8	5.3
	Untreated male	11.6 ± 0.4^{bc}	10.8	12.4
	Untreated female	10.5 ± 0.6^{b}	9.8	11.2
Control cage	Marked male	13.2 ± 0.4^{d}	12.5	14.0
	Untreated male	12.8 ± 0.1^{cd}	11.7	13.9
	Untreated female	13.5 ± 0.3^{d}	12.8	14.3

*Different superscripts in the AST column indicate significant differences by Tukey's HSD test ($P < 0.05$). AST observations were right censored by limiting observations to 15 days, i.e., the data are right censored.

at all (Table 3). In the control cages, the marked females, unmarked males and females, all untreated without any exposure, had about 14-day AST values without significant differences (Table 3).

The inoculated *M. guizhouense*-treated male flies had a 100% mortality by day 7 (Figure 7A), and transmitted the fungus to initially untreated male and female flies in the same cage by contact. This caused 72 ± 6.6 and 84 ± 7.5% mortalities by day 14 to males and females, respectively (Figure 7A). In the control cages with no exposure, marked and unmarked males, and untreated females had clearly lower about 30% mortalities by day 14 (Figure 7B).

The inoculated *M. guizhouense*-treated female flies showed complete mortality by day 7 (Figure 8A), and transmitted the fungus to initially unexposed male and female flies in the same cage by contact. This caused 12 ± 4.5 and 14 ± 3.2% mortalities by days 9 and 10, to males and females, respectively (Figure 8A). In the control cage without exposure, marked and unmarked females, and untreated males had clearly lower about 16% mortalities by day 14 (Figure 8B).

Table 3. Kaplan–Meier survival analysis of adult female *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) infected with *Metarhizium guizhouense* PSUM02, in data from the mating competitiveness bioassay.

			95% Confidence interval	
Assay	Insect	AST (mean ± SE)*	Lower	Upper
Infected cage	Treated female	4.4 ± 0.2^{a}	3.9	4.9
	Untreated male	13.9 ± 0.4^{b}	13.0	14.8
	Untreated female	13.8 ± 0.3^{b}	12.9	14.7
Control cage	Marked female	14.8 ± 0.2^{b}	13.1	14.9
	Untreated male	14.0 ± 0.4^{b}	14.4	15.1
	Untreated female	14.7 ± 0.2^{b}	14.4	15.1

*Different superscripts in the AST column indicate significant differences by Tukey's HSD test ($P < 0.05$). AST observations were right censored by limiting observations to 15 days, i.e., the data are right censored.

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

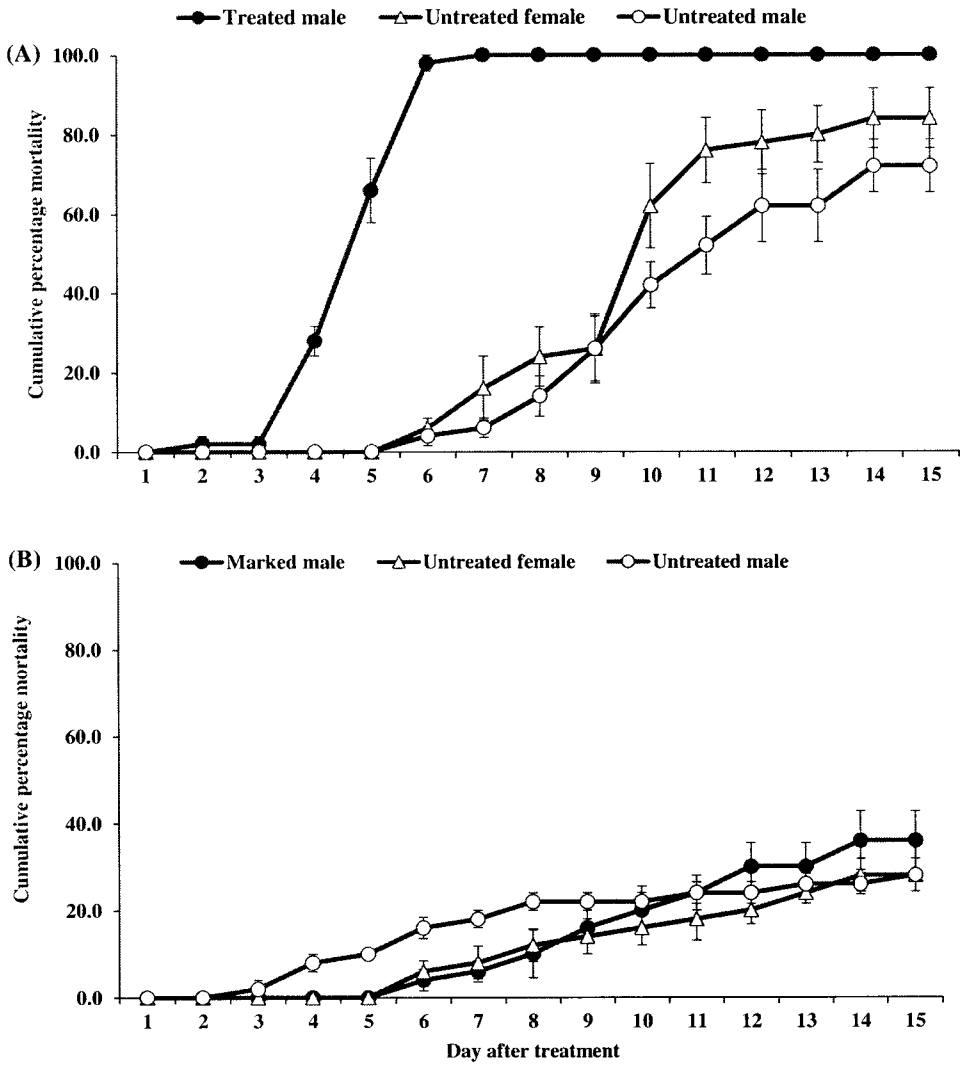


Figure 7. Cumulative mortalities of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) exposed to *Metarhizium guizhouense* PSUM02. (A) Infected adult males, untreated males and untreated females and (B) marked adult males (control) with untreated male and female flies.

Discussion

The mating propensities were similar for *M. guizhouense*-treated and untreated flies during the first 3 days after inoculation (Figure 1). Similar observations have been reported for other Diptera: Toledo et al. (2007) in *Anastrepha ludens* (Loew), Dimbi et al. (2009) in *Ceratitis* spp. and Maniania, Okech, Adino, Opere, and Ekesi (2013) in *Glossina morsitans morsitans* Westwood, have reported similar frequencies of successful mating over the first few days after infection, for both treated male and female flies and untreated flies. However, Watson and Petersen (1993) reported that treated flies have a lower mating frequency than untreated flies, for the house flies,

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

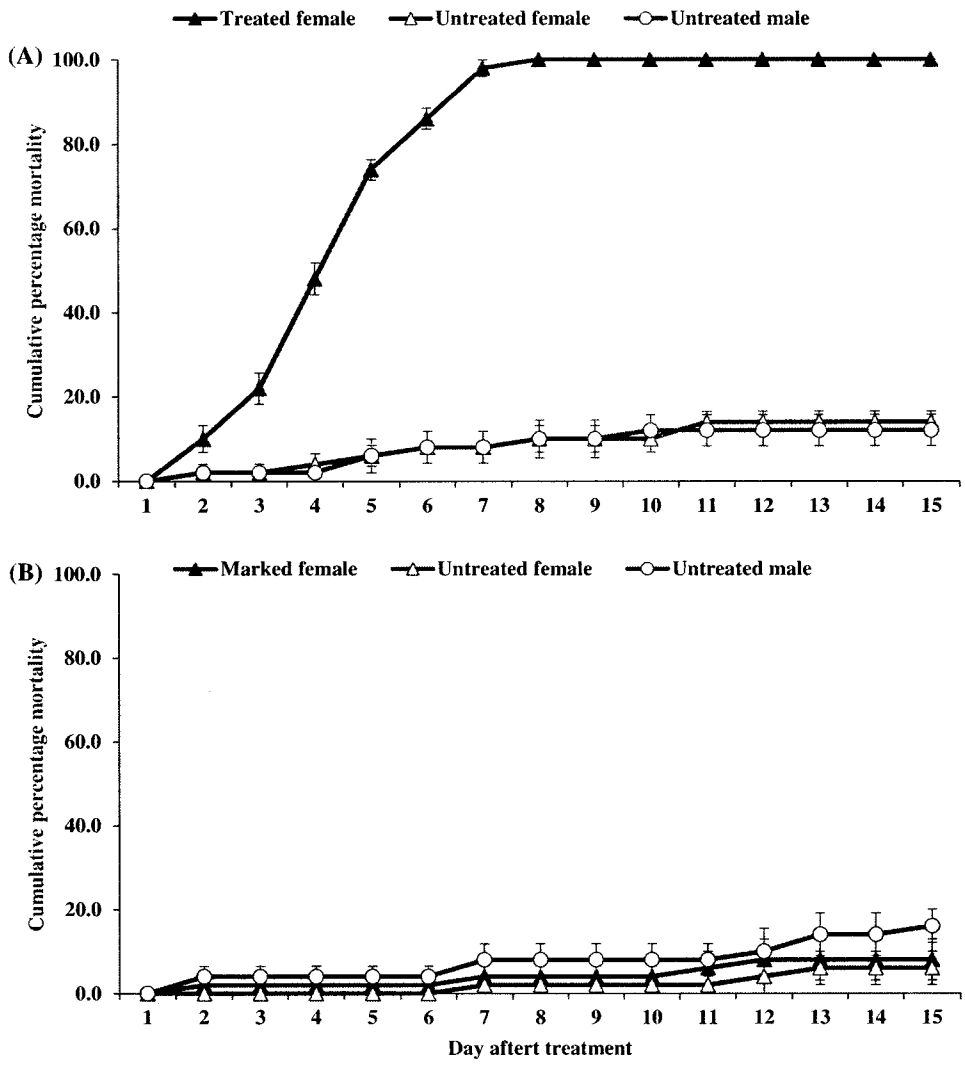


Figure 8. Cumulative mortalities of *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) exposed to *Metarhizium guizhouense* PSUM02. (A) Infected adult females with untreated male and female flies and (B) marked adult females (control) with untreated male and female flies.

Musca domestica Linnaeus. These differing observations could be due to varying effects of fungal pathogens on different insect host species, and even variation by isolate within species. The changes in insect behaviour resulting from a fungal infection are normally observed within the last few hours before death of the insect host (Eilenberg, 1987; Müller-Kögler, 1965). In our experiments though the *M. guizhouense*-treated male and female flies mated less than the untreated ones on the fourth day of infection, with no observed mating on days 5 and 6 while the untreated continued mating (Figure 1).

The mating competitiveness of the *M. guizhouense*-treated male and female flies (Figures 5A and 6A) was similar to that of the untreated male and female flies on the

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

first 2 days after infection (Figures 5B and 6B). This agrees with Novelo-Rincón, Montoya, Hernández-Ortíz, Liedo, and Toledo (2009) and Sookar, Bhagwant, Khayrattee, Chooneea, and Ekesi (2013) who reported no significant difference in the sexual compatibility between fungal treated and untreated flies, indicating that the presence of conidia did not significantly reduce mating propensity or the mean time of copulation during the first days after inoculation. Moreover, our results indicate that the *M. guizhouense*-treated male flies were capable of transmitting the pathogen to untreated females through copulation (Sookar et al., 2014) and to untreated male flies with lekking behaviour (Haq et al., 2010). Similar transmission of fungi through sexual copulation has been demonstrated before, by the inoculation of treated male passed the fungi to uninfected female flies (Dimbi et al., 2009; Maniania et al., 2013; Novelo-Rincón et al., 2009; Sookar et al., 2014; Thaochan et al., 2011; Toledo et al., 2007). However, in our investigation the *M. guizhouense*-treated female flies did mate with untreated male flies, but this path of transmission had only a small mortality effect.

Our findings are different from those by Sookar et al. (2014), who found that females were capable of transmitting fungal conidia from treated females to untreated flies. We found that the male flies preferred to mate with untreated female rather than treated female flies, in the mating competitiveness assay. This phenomenon could be related to the number of conidia on the body of an untreated fly, after it has mated with an infected fly. Prior research suggests that untreated female flies that had paired with fungus-treated male flies, showed an increased density of conidia in the dorsal thoracic sclerites and a high mortality (Quesada-Moraga et al., 2008). In this case, the higher efficacy of treated male flies to horizontally transmit the fungus is of great practical importance, as the treated female flies are mainly monogamous or oligogamous, which highly limits their horizontal transmission efficacy and their potential to spread the inoculum in the fly population (Quesada-Moraga et al., 2008).

The AST of *M. guizhouense*-treated male and female flies were comparatively low (Tables 1–3), and male and female flies treated with *M. guizhouense* PSUM02 could transmit the fungus to untreated flies in the same cage, causing relatively low AST values (Tables 1–3). The transmission may have been indirect, as Dimbi et al. (2009) observed untreated male flies receiving a fungus by attempting to mate with sick, dying or even dead female flies. Such behaviour enhances the transmission of infection in the fly population, and this is supported by the low AST values that we observed for untreated flies. However, the ASTs of untreated male and female flies mixed with *M. guizhouense*-treated female flies were not significantly different from controls (Table 3). The rate of fungal transmission to healthy population from treated female flies was lower than from treated male flies. Quesada-Moraga et al. (2008) reported the rate of fungal transmission from treated male flies to untreated female flies as 90–100%, and from treated female to untreated male flies as 60–90%. On the other hand, it has been reported that males are better transmission vectors of a fungal inoculum than females (Quesada-Moraga et al., 2008).

We have demonstrated that, under laboratory conditions, the male flies inoculated with the entomopathogenic fungus, *M. guizhouense* PSUM02, could transmit the infection to both female and male healthy flies by mating and contact, but the treated female flies showed less effective fungal pathogen transmission. Based on these experimental results, an autodissemination technique should be feasible in

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

the management of *B. cucurbitae* and potentially other tephitid fly species. The practical application of these results may be pursued by a scale-up of the studies to field cage and open field conditions.

Acknowledgements

We would like to thank the Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University; and the Natural Biological Control Research Center, Southern Region, for their facilities and equipment. Additionally, we would like to thank the Research and Development Office, Prince of Songkla University, and Associate Professor Dr. SeppoKarrila, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, for helping improve the draft manuscript.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The research was supported by a grant from Prince of Songkla University, contract no. NAT550364S.

References

Allwood, A. J., Chinajariyawong, A., Drew, R. A. I., Hamacek, E. L., Hancock, D. L., Hengsawad, C., ... Vijaysegaran, S. (1999). Host plant records for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in South-East Asia. *The Raffles Bulletin of Zoology*, *7*, 1–99.

Bischoff, J. F., Rehner. S. A., & Humber R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, *101*, 512–530. doi:10.3852/07-202

Clarke, A. R., Allwood, A., Chinajariyawong, A., Drew, R. A. I., Hengsawad, C., Jirasurat, M., ... Vijaysegaran, S. (2001). Seasonal abundance and host use patterns of seven *Bactrocera* Macquart species (Diptera: Tephritidae) in Thailand and Malaysia. *The Raffles Bulletin of Zoology*, *49*, 207–220.

Dhillon, M. K., Singh, R., Naresh, J. S., & Sharma, H. C. (2005). The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. *Journal of Insect Science*, *5*, 40. doi:10.1093/jis/5.1.40

Dimbi, S., Maniania, N. K., & Ekesi, S. (2009). Effect of *Metarhizium anisopliae* inoculation on the mating behavior of three species of African tephritid fruit flies, *Ceratitis capitata*, *Certitis cosyra* and *Ceratitis fasciventris*. *Biological Control*, *50*, 111–116. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.04.006

Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., Ekesi, S., & Mueke, J. K. (2003). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Beaveria bassiana* (Balsamo) vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitis capitata* (Weidemann), *C. rosa* var. *fasciventris* Karsch and *C. cosyra* (Walker) (Diptera: Tephritidae). *Mycopathologia*, *156*, 375–382. doi:10.1023/B:MYCO.0000003579.48647.16

Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., & Mueke, M. (2004). Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl*, *49*, 83–94. doi:10.1023/B:BICO.0000009397.84153.79

Drew, R. A. I., & Hancock, D. L. (1994). The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. *Bulletin of Entomological Research*, *2*, 1–68.

Eilenberg, J. (1987). Abnormal egg-laying behaviour of female carrot flies (*Psilarosae*) induced by the fungus *Entomophthoramuscae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *52*, 17–24.

Ekesi, S., Dimbi, S., & Maniania, N. K. (2007). The role of entomopathogenic fungi in the integrated management of tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae) with emphasis on species occurring in Africa. In S. Ekesi & N. K. Maniania (Eds.), *Use of entomopathogenic fungi in biological pest management* (pp. 239–274). Kerala: Research Signpost.

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

Ekesi, S., Maniania, N. K., & Lux, S. A. (2002). Mortality in three African tephritid fruit fly puparia and adults caused by the entomophathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, *12*, 7–17. doi:10.1080/09583150120093077

Furlong, M. J., & Pell, J. K. (2001). Horizontal transmission of entomopathogenic fungi by the diamondback moth. *Biological Control*, *22*, 288–299. doi:10.1006/bcon.2001.0981

Haq, I., Cáceres, C., Hendrichs, J., Teal, P. E. A., Stauffer, C., & Robinson, A. S. (2010). Methoprene modulates the effect of diet on male melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, performance at mating aggregations. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *136*, 21–30. doi:10.1111/j.1570-7458.2010.00999.x

Hardy, D. E. (1973). The fruit flies (Tephritidae-Diptera) of Thailand and bordering countries. *Pacific Insects Monographs*, *31*, 1–353.

Lall, B. S. (1975). Studies on the biology and control of fruit fly, *Dacus cucurbitae* coq. *Pesticides*, *9*, 31–36.

Lezama-Cutiérrez, R., Trujillo-De-La Luz, A., Molina-Ochoa, J., Rebelledo-Dominguez, O., Pescador, A. R., Lopez-Edwards, M., & Aluja, M. (2000). Virulence of *Metarhizium anisopliae* (deuteromycotina: hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae): laboratory and field trails. *Journal of Economic Entomology*, *93*, 1080–1084.

Maniania, N. K. (2002). A low-cost contamination device for infecting adult tsetse flies, *Glossina* spp., with the Entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the field. *Biocontrol Science and Technology*, *12*, 59–66. doi:10.1080/09583150120110662

Maniania, N. K., Ekesi, S., Odulaja, A., Okech, M. A., & Nadel, D. J. (2006). Prospects of a fungus-contamination device for the control of tsetse fly *Glossina fuscipes fuscipes*. *Biocontrol Science and Technology*, *16*, 129–139. doi:10.1080/09583150500258503

Maniania, N. K., Okech, M. A., Adino, J. O., Opere, J. O., & Ekesi, S. (2013). Transfer of inoculum of *Metarhizium anisopliae* between adult *Glossina morsitans morsitans* and effects of fungal infection on blood feeding and mating behaviors. *Journal of Pest Science*, *86*, 285–292. doi:10.1007/s10340-012-0473-7

Mochi, D. A., Monteiro, A. C., De Bortoli, S. A., Dória, H. O. S., & Barbosa, J. C. (2006). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tepritidae) in soil with different pesticides. *Neotropical Entomology*, *35*, 382–389. doi:10.1590/S1519-566X2006000300014

Mote, U. N. (1975). Control of fruit fly (*Dacus cucurbitae*) on bitter gourd and cucumber. *Pesticides*, *9*, 36–37.

Müller-Kögler, E. (1965). *Pilzkrankenheiten bei Insekten* [Fungal diseases in insects]. Berlin: Paul Parey.

Novelo-Rincón, L. F., Montoya, P., Hernández-Ortíz, V., Liedo, P., & Toledo, J. (2009). Mating performance of sterile Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Dipt.,Tephritidae) males used as vectors of *Beauveria bassiana* (Bals.) vuill. *Journal of Applied Entomology*, *133*, 702–710.

Quesada-Moraga, E., Martin-Carballo, I., Garrido-Jurado, I., & Santiago-alvarez, C. (2008). Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, *47*, 115–124. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.07.002

Quesada-Moraga, E., Ruiz-García, A., & Santiago-álvarez, C. (2006). Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against puparia and adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, *99*, 1955–1966. doi:10.1603/0022-0493-99.6.1955

Rabindranath, K., & Pillai, K. S. (1986). Control of fruit fly of bitter gourd using synthetic pyrethroids. *Entomon*, *11*, 269–272.

Ruther, J., McCaw, J., Böcher, L., Pothmann, D., & Putz, I. (2014). Pheromone diversification and age-dependent behavioural plasticity decrease interspecific mating costs in *Nasonia*. *PLoS One*, *9*, e89214. doi:10.1371/journal.pone.0089214

Shah, M. I., Batra, H. N., & Ranjhen, P. L. (1948). Notes on the biology of *Dacus* (Strumeta) *ferrugineus* fab. and other fruit flies in the north-west frontier province. *Indian Journal of Entomology*, *10*, 249–266.

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015

Sookar, P., Bhagwant, S., & Allymamod, M. N. (2014). Effect of *Metarhizium anisopliae* on the fertility and fecundity of two species of fruit flies and horizontal transmission of mycotic infection. *Journal of Insect Science*, *14*(100). Retrieved from http://www.insectscience.org/14.100

Sookar, P., Bhagwant, S., Khayrattee, F. B., Chooneea, Y., & Ekesi, S. (2013). Mating compatibility of wild and sterile melon flies, *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) treated with entomopathogenic fungi. *Journal of Applied Entomology*, doi:10.1111/jen.12049

SPSS. (2001). *SPSS for windows 11*. Chicago, IL: Author. Retrieved from http://www.spss.com

Srinivasan, P. M. (1959). Guard your bitter gourd against the fruit fly. *Indian Farming*, *9*, 8.

Thaochan, N. (2011). Screening of entomopathogenic fungi in the middle-south provinces for fruit fly (Diptera: Tephritidae) control. Research Report. Songkhla: Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, p. 49.

Thaochan, N., Chinajariyawong, A., & Suasa-Ard, W. (2011). Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mating behavior of *Bactrocera papayae* (Diptera: Tephritidae). *Agricultural Science Journal (Suppl.)*, *42*, 339–342.

Toledo, J., Campos, S. E., Flores, S., Liedo, P., Barrera, J. F., Villasenor, A., & Montoya, P. (2007). Horizontal transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) under laboratory and field cage conditions. *Biological and Microbial Control*, *100*, 291–297.

Toledo, J., Liedo, P., Flores, S., Campos, S.E., Villasenor, A., & Montoya, P. (2006). Use of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for fruit fly control: A novel approach. Proceedings of the 7th International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, Salvador, Brazil, 10–15 September, pp. 127–132.

Vega, F. E., Dowd, P. F., & Bartelt, R. J. (1995). Dissemination of microbial agents using an autoinoculating device and several insect species as vectors. *Biological Control*, 5, 545–552. doi:10.1006/bcon.1995.1064

Watson, D. W., & Petersen, J. J. (1993). Seasonal activity of *Entomophthora muscae*, (Zygomycetes: Entomophthorales) in *Musca domestica* L., (Diptera: Muscidae) with reference to temperature and relative humidity. *Biological Control*, *3*, 182–190. doi:10.1006/bcon.1993.1026

White, I. M., & Elson-Harris, M. (1992). *Fruit flies of economic importance their identification and bionomics*. Wallingford: CAB International.

Yee, W. L., & Lacey, L. A. (2005). Mortality of different life stages of *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) exposed to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Entomological Science*, *40*, 167–177.

Yousef, M., Lozano-Tovar, M. D., Garrido-Jurado, I., & Quesada-Moraga, E. (2013). Biocontrol of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) with *Metarhizium brunneum* and its extracts. *Journal of Economic Entomology*, *106*, 1118–1125. doi:10.1603/EC12489

Downloaded by [Prince of Songkla University], [Narit Thaochan] at 00:13 10 March 2015