บทที่ 3
การศึกษาความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงต่อหนอนแมลงวันหัวเขียว ในสภาพห้องปฏิบัติการ

บทนำ

แมลงวันหัวเขียวสามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งตลาดสดที่มีเนื้อสัตว์จำหน่าย และพบได้มากตามแหล่งโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งแมลงวันหัวเขียวจัดเป็นแมลงวันที่มีความสำคัญทางการสาธารณสุขเนื่องจากแมลงวันชนิดนี้มักตอมสิ่งสกปรกเช่น มูลสัตว์ ซากสัตว์ และสิ่งปฏิกูลต่างๆ ซึ่งสามารถนำพาเชื้อโรคติดตามลำตัว ขา และปีก มาสู่มนุษย์ได้หลายโรค อีกทั้งยังเป็นพาหะนำโรคทางเดินอาหารที่สำคัญหลายชนิดได้แก่ โรคบิด โรคไข้ไทฟอยด์ และโรคอหิวาห์ตกโรค เป็นต้น นอกจากนี้หากพบแมลงวันตามแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญยังส่งผลทำให้เกิดความรำคาญและเกิดผลเสียต่อทัศนียภาพการท่องเที่ยวได้ การป้องกันกำจัดส่วนมากจึงนิยมใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดแมลงวัน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในเรื่องของสารพิษตกค้าง ดังนั้น จึงได้สนใจทำการศึกษาวิธีการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการควบคุมแมลงวันหัวเขียวในประเทศไทย เพื่อวิธีการควบคุมแมลงวันหัวเขียวแบบยั่งยืนและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสามารถเข้าทำลายแมลงได้โดยผ่านทางผนังลำตัวแมลง โดยเมื่อสปอร์ตกลงบนผนังลำตัวของแมลง สปอร์จะงอก germ tube แล้วแทงเข้าไปในแมลงผ่านทางผนังลำตัว แต่มีเชื้อราบางชนิดที่อาจต้องอาศัยเอนไซม์ในการย่อยสลายชั้นไขมันของแมลง จากนั้นเส้นใยจึงเจริญงอกผ่านเข้าไปในช่องว่างภายในลำตัวและเจริญเติบโตขึ้นภายในตัวแมลง เป็นเหตุทำให้แมลงตายในที่สุด Lohmeyer and Miller (2006) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในรูปแบบผงจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรา *Beauveria bassiana* (ไอโซเลท GHA), *Metarhizium anisopliae* (ไอโซเลท ESCI) และ *Paecilomyces fumosoroseus* (ไอโซเลท ARSEF 3581) กับแมลงวันคอกสัตว์สกุล *Hematobia irritants* (L.) (Diptera: Muscidae) พบว่า ที่ระยะเวลาภายใน 7 วัน มีค่าเฉลี่ยการตายของแมลงวันคอกสัตว์ด้วยเชื้อราสายพันธุ์ *Beauveria bassiana* สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ *Metarhizium anisopliae* และเชื้อราสายพันธุ์ *Paecilomyces fumosoroseus* มีค่าเฉลี่ยการตายที่ 73.3 และ 33.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ย LT_{50} ที่ระยะเวลา 2.70, 4.98 และ 7.97 วัน สำหรับเชื้อราสายพันธุ์ *B. bassiana, M. anisopliae* และ *P. fiumosoroseus*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ตามลำดับ ขณะที่ Mochi *et al*. (2010a) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับแมลงวันคอกสัตว์ Horn fly สกุล *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) ทั้งในระยะไข่และระยะตัวหนอน โดยใช้เชื้อราจำนวนทั้งสิ้น 4 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* และ *Paecilomyces farinosus* ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 10^7 และ 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ *M. anisopliae* ไม่ทำให้แมลงวันคอกสัตว์ในระยะไข่เกิดการติดโรค แต่ทำให้เกิดการตายในระยะตัวหนอนหลังจากการฟักไข่ โดยที่เชื้อราไอโซเลท E9 สามารถทำให้แมลงวันคอกสัตว์มีอัตราการตายได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร แต่สำหรับเชื้อราสายพันธุ์ *B. bassiana* ไม่ทำให้แมลงวันคอกสัตว์ทั้งในระยะไข่และระยะตัวหนอนเกิดการติดโรคแต่อย่างใด ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ *Paecilomyces fumosorosea* พบว่า มีผลต่อการตายของแมลงวันคอกสัตว์ในระยะไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยไอโซเลท CG195 สามารถทำให้อัตราการตายของระยะตัวหนอนและระยะดักแด้หลังฟักออกจากไข่เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่ามีเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวนหลายสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงวันชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญในการเป็นพาหะของการเกิดโรคที่สำคัญในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง อย่างไรก็ตามจากการค้นคว้าเอกสารยังไม่พบรายงานการศึกษาการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการควบคุมแมลงวันหัวเขียวในประเทศไทยแต่อย่างใด ซึ่งการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูง เป็นขั้นตอนแรกในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการควบคุมแมลงให้ประสบผลสำเร็จ ดังนั้น การทดลองในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบหาความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเพื่อการควบคุมแมลงวันหัวเขียวต่อไป

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 เชื้อราที่ใช้ทดสอบ

เชื้อราที่นำมาใช้ทดสอบมี 4 สกุล 10 ชนิด จำนวน 20 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ไอโซเลทของเชื้อราที่ใช้ทดสอบความสามารถในการทำให้แมลงวันหัวเขียวเกิดโรคตาย

ลำดับที่	ไอโซเลท	ชนิด
1	Ba.2666	*Beauveria amorpha*
2	Bb.2637	*Beauveria bassiana*
3	Bb.4591	*Beauveria bassiana*
4	Bb.6241	*Beauveria bassiana*
5	Bb.1901	*Beauveria bassiana*
6	Ifa.2591	*Isaria farinosus*
7	Ifa.3517	*Isaria farinosus*
8	Ifu.2507	*Isaria fumosoroseus*
9	Il.6073	*Isaria liacinus*
10	Itp.6718	*Isaria tenuipes*
11	Ma.7965	*Metarhizium anisopliae*
12	Ma.4849	*Metarhizium anisopliae*
13	Ma.6071	*Metarhizium anisopliae*
14	Ma.6171	*Metarhizium anisopliae*
15	Mfl.5744	*Metarhizium flavoviride*
16	Mfl.1164	*Metarhizium flavoviride*
17	Mfl.7527	*Metarhizium flavoviride*
18	Mfl.6079	*Metarhizium flavoviride*
19	Vl.2321	*Verticillium lecanii*
20	Vh.3317	*Verticillium hemipterigenum*

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

3.2 แมลงที่ใช้ทดสอบ

3.2.1 การเลี้ยงและเตรียมแมลงวันหัวเขียวสำหรับทดสอบ

การเลี้ยงแมลงวันหัวเขียวเพื่อใช้สำหรับทดสอบเริ่มจากการจับแมลงวันหัวเขียวตัวเต็มวัยจากแหล่งตลาดสด โรงฆ่าสัตว์ และกองขยะ โดยการใช้เหยื่อล่อคือ เศษเนื้อ มาวางในภาชนะ แล้วใช้สวิงโฉบแมลงวันหัวเขียวที่บินมาเกาะ จากนั้นนำแมลงวันหัวเขียวมาเลี้ยงในกรงที่บุด้วยตาข่ายละเอียด และมีการให้แสงโดยใช้หลอดฟลูออเรสเซนต์ติดไว้บนเพดาน ให้อาหารโดยใช้เศษเนื้อชิ้นเล็กๆ วางลงบนจานแก้วใส (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร) เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนสำหรับการสร้างไข่ของแมลงวันหัวเขียวเพศเมียและเพื่อเป็นที่สำหรับวางไข่ เมื่อแมลงวันหัวเขียววางไข่และไข่ฟักออกเป็นหนอนระยะที่ 1 ย้ายหนอนลงไปในจานแก้วใสที่มีเศษเนื้อหั่นเป็นชิ้นบาง 3-5 ชิ้น เพื่อเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงหนอน นำจานแก้ววางลงในกล่องพลาสติกใส ความกว้าง 12 เซนติเมตร ความยาว 15 เซนติเมตร และความสูง 6 เซนติเมตร โดยพื้นที่ประมาณ 1 ใน 4 ของกล่องจะใส่ขี้เลื่อยเอาไว้สำหรับเป็นที่ให้เข้าดักแด้ และปิดฝากล่องซึ่งฝาดังกล่าวจะถูกเจาะเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดกว้างประมาณ 3 ใน 4 ของพื้นที่ฝากล่อง และปิดบริเวณที่เจาะด้วยตาข่ายชนิดละเอียด โดยทำการเลี้ยงแมลงวันหัวเขียวจนถึงอายุที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งในการทดสอบหาความสามารถของเชื้อราในการควบคุมแมลงวันหัวเขียวใช้ระยะหนอนที่มีอายุ 2 วัน

3.3 วิธีการทดสอบ

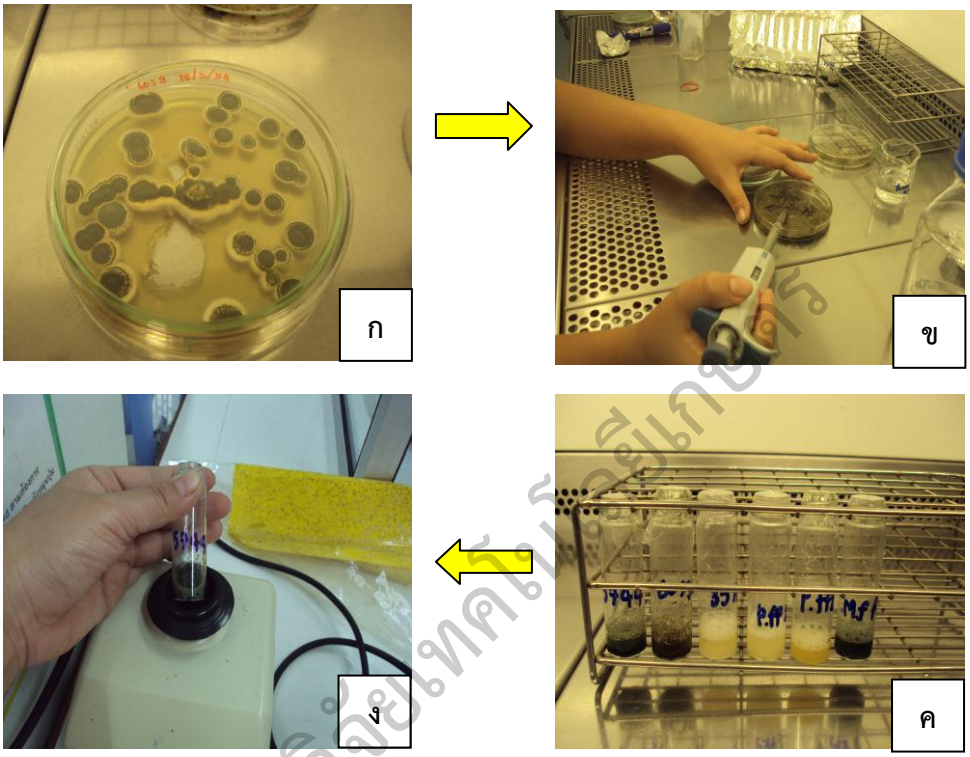
3.3.1 การเลี้ยงและเพิ่มปริมาณเชื้อรา

3.3.1.1 นำเชื้อราจำนวน 20 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ *Beauveria amopha*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoviride*, *Isaria farinosus*, *Isaria fumosoroseus*, *Isaria tenuipes*, *Isaria liacinus*, *Verticillium lecanii* และ *Verticillium hemiptergenum* จาก Stock culture มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Yeast Agar (SYA) ซึ่งเมื่อเชื้อราเจริญเติบโตแล้วทำการเพิ่มปริมาณเชื้อราด้วยอาหาร Malt Extract Peptone Agar (MEA)

3.3.1.2 การเตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อรา (ดังภาพที่ 3.1) โดยนำเชื้อราแต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MEA ในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-14 วัน จากนั้นนำเชื้อราแต่ละไอโซเลท มาล้างโคนิเดียด้วย tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วใช้ไมโครปิเปตต์ขูดให้โคนิเดียแขวนลอยในน้ำ นำไปใส่ในหลอดทดลอง กรองโคนิเดียของเชื้อราด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเพื่อให้โคนิเดียของเชื้อราแขวนลอยในน้ำ นำสารแขวนลอยโคนิเดียที่ได้ไปตรวจนับ

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร

ปริมาณโคนิเดียต่อปริมาตรด้วยเครื่องมือสำหรับนับจำนวนโคนิเดีย Hemacytometer เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของโคนิเดีย ปรับระดับความเข้มข้นให้ได้ $1x10^{8}$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ด้วย tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อนำไปทดสอบต่อไป



ภาพที่ 3.1 การเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อรา

(ก) เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร MEA อายุ 10-14 วัน

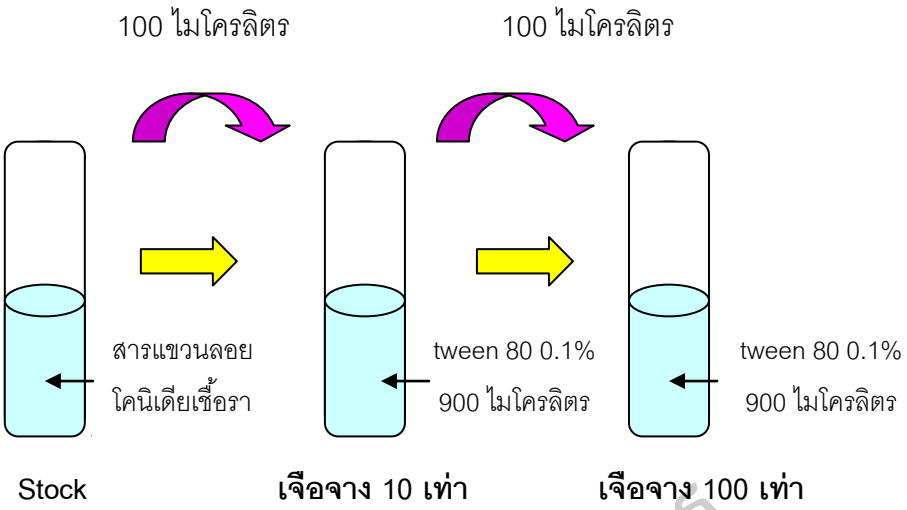
(ข) การล้างโคนิเดีย

(ค) สารแขวนลอยของโคนิเดียที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางและ

(ง) การเขย่าสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อราให้โคนิเดียกระจายแขวนลอยในน้ำ

3.3.1.3 **การคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อรา** โดยนำโคนิเดียของเชื้อราที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 3.3.1.2 มาคำนวณหาความเข้มข้นโดยดูดสารแขวนลอยของโคนิเดียจาก Stock ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 900 ไมโครลิตร (หลอดที่ 1 เจือจาง 10 เท่า) จากนั้นดูดสารแขวนลอยโคนิเดียจากหลอดที่ 1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุ tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตร 900 ไมโครลิตร (หลอดที่ 2 เจือจาง 100 เท่า) (ภาพที่ 3.2)

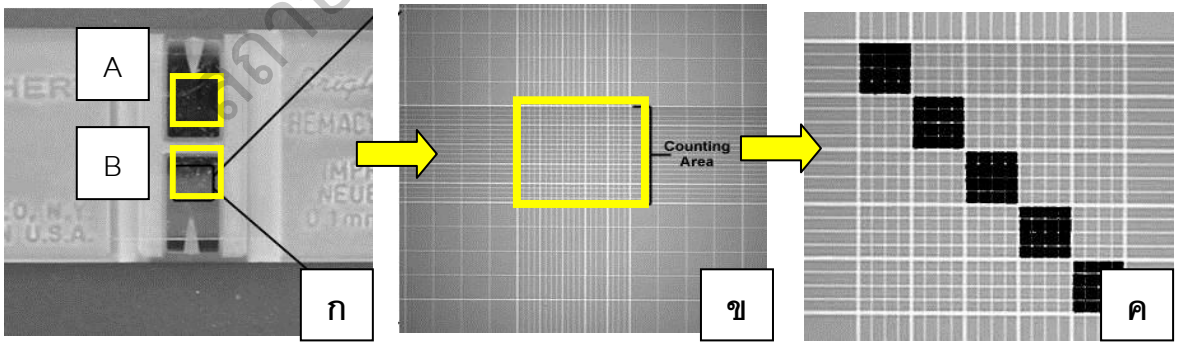
สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร



ภาพที่ 3.2 การเจือจางสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อรา

จากนั้นนำสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อราที่เจือจาง 100 เท่าไปนับจำนวนโคนิเดียโดยใช้เครื่องมือนับจำนวนโคนิเดีย Hemacytometer โดยจะทำการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์คอมเปาน์ที่กำลังขยาย 40X ทั้ง 2 ด้าน (A และ B) ดังภาพที่ 3.3 (ก) โดยนับตรงกลาง ภาพที่ 3.3 (ข) ในแต่ละด้านนับจำนวน 5 ช่อง แต่ละช่องมี 16 ช่องเล็ก และให้นับในแนวทแยงมุม ภาพที่ 3.3 (ค) นำค่าที่ได้จากนับทั้ง 2 ด้าน มาหาค่าเฉลี่ย และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อราจากสูตร

ความเข้มข้นของเชื้อรา = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคนิเดีย x ค่าคงที่ 2.5×10^5 x ระดับการเจือจางที่ใช้นับ



ภาพที่ 3.3 การนับโคนิเดียเชื้อราโดยใช้ Hemacytometer

(ก) พื้นที่สำหรับการนับโคนิเดียเชื้อราอยู่ 2 Chamber

(ข) บริเวณที่ใช้สำหรับนับ

(ค) การนับโคนิเดียของเชื้อรา จะนับในแบบแนวทแยง

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ตัวอย่าง

นับจำนวนโคนิเดียได้ = 33+39+29+25+36+40+39+31+28+25/10 = 32.5

โดยนับที่ระดับความเข้มข้น 10^2

ความเข้มข้นของเชื้อรา = $32.5x2.5x10^5x10^2$

= $81.25x10^7$

= $8.13x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

การทดลองใช้ความเข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงต้องปรับความเข้มข้นของเชื้อราที่นับได้ $8.13x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร โดยใช้สูตรดังนี้

สูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

โดย N_1 = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยโคนิเดียของ stock เชื้อรา

V_1 = ปริมาตรสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราจาก stock ที่ต้องการ

N_2 = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราที่นำไปใช้จริง

การปรับความเข้มข้น จะใช้ tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ

ตัวอย่าง

ต้องการเตรียมสารแขวนลอยโคนิเดีย 3 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

$N_1V_1 = N_2V_2$

$8.13x10^8 x\ V_1 = 1x10^8 x3$

$V_1 = \dfrac{1x10^8 x3}{8.13x10^8}$

= 0.369 มิลลิลิตร

= 0.369x1,000

= 369 ไมโครลิตร

ดังนั้น ต้องดูดสารแขวนลอยโคนิเดียจาก Stock เชื้อรามา 0.369 มิลลิลิตร และเติม tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 3,000-369 = 2,630 ไมโครลิตร จึงได้สารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ ในปริมาตร 3 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2 วิธีการทดสอบ

โดยนำหนอนแมลงวันหัวเขียวที่มีอายุ 2 วัน ซึ่งแต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ ที่อยู่ภายในกล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร โดย 1 กล่องจะใส่หนอนลงไปจำนวน 20 ตัว (ซ้ำ) จากนั้นนำเชื้อราแต่ละไอโซเลทจำนวน 20 ไอโซเลท ที่เตรียมไว้ที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาพ่นลงบนหนอนแมลงวันหัวเขียวอายุ 2 วัน โดยใช้หัวสเปรย์ (ดังภาพที่ 3.4)

ภาพที่ 3.4 การใช้หัวสเปรย์พ่นสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราลงบนหนอนแมลงวันหัวเขียว

สำหรับกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อผสม tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเปรียบเทียบ (Control) บันทึกการตายของหนอนแมลงวันหัวเขียว ทุกวันจนหนอนแมลงวันตายหมดหรือเข้าระยะดักแด้หมด และนำหนอนที่ตายมาตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเพื่อตรวจสอบเส้นใยและโคนิเดียเชื้อราที่ขึ้นปกคลุมว่าเป็นเชื้อราตัวเดียวกันกับที่ทดสอบ คำนวณเปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริงโดยใช้ Abbott' s formula (Abbott, 1925) ดังสูตร

$$\text{อัตราการตายที่แท้จริง} = \frac{(A-B) \times 100}{(100-B)}$$

A = อัตราการตายของกลุ่มทดลอง

B = อัตราการตายของกลุ่มควบคุม

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำเปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริงของหนอนแมลงวันหัวเขียว มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบอัตราการตายที่แท้จริงของแมลงวันหัวเขียวด้วยวิธี Ducan' s New Multiple Range Test (Steel and Torrie, 1980)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาความสามารถของเชื้อรา 4 สกุล 10 ชนิด 20 ไอโซเลท ที่ระดับความเข้มข้น $1x10^{8}$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตรในการทำให้หนอนระยะที่ 2 ของแมลงวันหัวเขียวเกิดโรคตาย พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลทที่นำมาทดสอบ มีความสามารถในการทำให้หนอนแมลงวันหัวเขียวระยะที่ 2 เกิดโรคตายได้ทุกไอโซเลท ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3.2)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ตารางที่ 3.2 เปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริงของแมลงวันหัวเขียว ระยะหนอนอายุ 2 วันเนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในแต่ละไอโซเลทที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

ไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริง (%±SE)
Beauveria amorpha: Ba.2666	66.67 ± 4.41bcd
Beauveria bassiana: Bb.2637	58.33 ± 1.67cdef
Beauveria bassiana: Bb.4591	73.33 ± 4.41abc
Beauveria bassiana: Bb.6241	83.33 ± 4.41ab
Beauveria bassiana: Bb.1901	53.33 ± 7.26cdefg
Isaria farinosus: Ifa.2591	63.33 ± 3.33cd
Isaria farinosus: Ifa.3517	61.67 ± 1.67cde
Isaria fumosoroseus: Ifu.2507	71.67 ± 1.67abc
Isaria liacinus: Il.6073	41.67 ± 7.26fghi
Isaria tenuipes: Itp.6718	45.00 ± 10.41defghi
Metarhizium anisoplia: Ma.7965	33.33 ± 3.33hi
Metarhizium anisopliae: Ma.4849	41.67 ± 7.26fghi
Metarhizium anisopliae: Ma.6071	66.67 ± 4.41bcd
Metarhizium anisopliae: Ma.6171	86.67 ± 4.41a
Metarhizium flavoviride: Mfl.5744	76.67 ±7.26abc
Metarhizium flavaviride: Mfl.1164	36.67 ± 6.01ghi
Metarhizium flavaviride: Mfl.7527	38.33 ± 1.67ghi
Metarhizium flavaviride: Mfl.6079	38.88 ± 7.26ghi
Verticillium lecanii: Vl.2321	51.67 ± 7.26defgh
Verticilliumhemipterigenum: Vh.3317	28.33 ± 6.01i

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ด้วยวิธี Duncan's multiple range test

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะอาการ

หลังจากทำการพ่นเชื้อรา พบว่า เมื่อหนอนแมลงวันหัวเขียวสัมผัสกับโคนิเดียของเชื้อราเป็นระยะเวลา 2 วัน หนอนแมลงวันหัวเขียวจะเริ่มมีอาการไม่กินอาหาร และหนอนจะทยอยตายในที่สุด โดยซากหนอนที่ตายจะมีลักษณะแห้งและแข็ง โดยเมื่อให้ความชื้นแก่ซากหนอนที่ตาย พบว่าในระยะแรกบริเวณข้อปล้องจะเกิดลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวบางๆ ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นโคนิเดียสีขาวขึ้นปกคลุมทั่วลำตัวของหนอนแมลงวันหัวเขียว สำหรับเชื้อรา *B. bassaina* (ภาพที่ 3.5) และเชื้อรา *M. anisopliae* จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว (ภาพที่ 3.6)

สถาบันวิทยบริการเทคโนโลยีเกษตร

ภาพที่ 3.5 หนอนแมลงวันหัวเขียวในกลุ่มควบคุมและหนอนแมลงวันหัวเขียวที่ถูกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Beauveria bassiana* เข้าทำลาย

(ก) หนอนแมลงวันหัวเขียวในกลุ่มควบคุม

(ข) หนอนแมลงวันหัวเขียวที่ถูกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bb. 6241 เข้าทำลายหลังการสัมผัสเชื้อรานาน 4 วัน

(ค) หนอนแมลงวันหัวเขียวที่ถูกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bb.6241 เข้าทำลายหลังการสัมผัสเชื้อรานาน 8 วัน

ภาพที่ 3.6 หนอนแมลงวันหัวเขียวในกลุ่มควบคุมและหนอนแมลงวันหัวเขียวที่ถูกเชื้อรา สาเหตุโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* เข้าทำลาย

(ก) หนอนแมลงวันหัวเขียวในกลุ่มควบคุม

(ข) หนอนแมลงวันหัวเขียวที่ถูกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท Ma.6171 เข้าทำลายหลังการสัมผัสเชื้อรานาน 4 วัน

(ค) หนอนแมลงวันหัวเขียวที่ถูกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท Ma.6171 เข้าทำลายหลังการสัมผัสเชื้อรานาน 8 วัน

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร

ผลการทดลองครั้งนี้ พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ *Beauveria* spp. มีเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ระหว่าง 53.33-83.33 ในขณะที่เชื้อรา *Isaria* มีเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ระหว่าง 41.67-71.67 ส่วนเชื้อรา *Metarhizium* spp. มีเปอร์เซ็นต์การตายที่อยู่ระหว่าง 33.33-86.67 สำหรับเชื้อรา *Verticillium* spp. มีเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ระหว่าง 28.33-51.67 เป็นต้น และระหว่างเชื้อราสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกัน ความสามารถของเชื้อราในการทำให้แมลงวันหัวเขียวตายก็แตกต่างกัน โดยที่เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* พบเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดคือ 86.67 ส่วน *Metarhizium flavoviride* พบเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด 76.67 สำหรับเชื้อชนิดเดียวกัน แต่ต่างไอโซเลทกัน พบเปอร์เซ็นต์การตายที่แตกต่างกัน โดยเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท Ma.7965 มีอัตราการตายเท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์

ในขณะที่เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท Ma.6171 มีอัตราการตายเท่ากับ 86.67 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเปอร์เซ็นต์การตายมาจัดระดับความสามารถในการทำให้เกิดโรค พบว่า เชื้อราสายพันธุ์ *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท Ma.6171 ก่อให้เกิดโรคกับหนอนแมลงวันหัวเขียวได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เชื้อราสายพันธุ์ *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bb.6241 และเชื้อราสายพันธุ์ *Metarhizium flavoviride* ไอโซเลท Mfl.5744 โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 86.67 83.33 และ 76.67 ตามลำดับ

ขณะที่ Mythili *et al*. (2007) ได้ศึกษาและทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสายพันธุ์ *Beauveria bassiana* ในรูปแบบน้ำมัน พบว่า สามารถทำให้ระยะตัวหนอนของแมลงวันหัวเขียวสกุล *Chrysomya megacephala* ตายได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Wright *et al*. (2004) รายงานว่า เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในรูปแบบน้ำมันสามารถทำให้ตัวเต็มวัยเพศเมียของแมลงวันหัวเขียวสกุล *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) ตายได้เพียง 64 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษาผลของเชื้อราในการควบคุมแมลงวันหัวเขียวในประเทศไทย จากการศึกษาค้นคว้าเอกสารอ้างอิงไม่พบรายงานการศึกษาแต่อย่างใด พบเพียงการศึกษาของศิริพร (2541) ที่รายงานผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสายพันธุ์ *Metarhizium anisopliae* ในการควบคุมแมลงวันบ้านสกุล *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) ระหว่างเชื้อรา *Metarhizium anisopliae var*. *anisopliae* และ *Metarhizium anisopliae var*. *majus* พบว่า เชื้อรา *Metarhizium anisopliae var*. *anisopliae* มีจำนวนการตายของแมลงวันบ้านเท่ากับ 65.36 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อรา *Metarhizium anisopliae var*. *majus* มีจำนวนการตายของแมลงวันบ้านเท่ากับ 43.92 เปอร์เซ็นต์ และ Darwish and Zayed (2002); Mishra *et al*. (2011); Sharififard *et al*. (2011) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพระหว่างเชื้อราสายพันธุ์ *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* และ *Verticillium lecanii* พบว่าอัตราการตายของแมลงวันบ้านมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ Mwamburi (2010) ได้ทดสอบความสามารถของเชื้อรา 36 ไอโซเลท จากเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Paecilomyces lilacinus* กับแมลงวันบ้าน พบว่า เชื้อรา *Beauveria bassiana* ทุกไอโซเลททำให้แมลงวันบ้านตาย และจากการค้นคว้ายังพบว่า Streenberg and Humber (1999) ได้ทดสอบเชื้อรา *Verticillium fusisporum, Verticillium psalliotae* และ *Verticillium lamellicol* ในการควบคุมแมลงวันบ้านซึ่งพบว่า มีเฉพาะเชื้อราสายพันธุ์ *V. lamellicol* ที่ไม่สามารถทำให้แมลงวันบ้านเกิดโรคตายได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสายพันธุ์ต่างๆ ที่พบว่า สามารถใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสำหรับการควบคุมแมลงวันชนิดต่างๆ อย่างไรก็ตาม จากรายงานของ Sharififard *et al*. (2011) ได้ทำการศึกษาโดยทดสอบเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับแมลงวันบ้านสกุล

สถาบันเทคโนโลยีแห่งชาติ

Musca domestica โดยใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรา *Beauveria bassiana* และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* พบว่า เชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถควบคุมแมลงวันบ้านได้ทั้งในระยะตัวหนอนและระยะตัวเต็มวัย แต่มีอัตราการตายที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเมื่อทดสอบที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เชื้อราสายพันธุ์ *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท Ma.437C สามารถควบคุมแมลงวันบ้านในระยะตัวหนอนได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bb.187C มีเปอร์เซ็นต์การตายที่ 89 ส่วนแมลงวันบ้านระยะตัวเต็มวัย พบว่า เชื้อราไอโซเลท Bb.187C มีเปอร์เซ็นต์การตายที่สูงที่สุดคือ 99 รองลงมา ได้แก่ เชื้อราไอโซเลท Ma.437C มีเปอร์เซ็นต์การตาย 95.8 ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Mishra *et al*. (2011) ได้ทำการทดสอบเชื้อราจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* ในรูปแบบแห้งที่ระดับความเข้มข้น $1x10^8$ โคนิเดียต่อกรัม พบว่า เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถควบคุมแมลงวันบ้านได้ทั้งในระยะตัวหนอนและระยะตัวเต็มวัย โดยระยะหนอนแมลงวันบ้านมีเปอร์เซ็นต์การตายที่ 43 และ 63 ตามลำดับ

การทดลองของ Darwish and Zayed (2002) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง กับแมลงวันบ้านระยะตัวหนอน จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อราสายพันธุ์ *Beauveria bassiana* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ Bb.2 และ Bb.108 และ เชื้อราสายพันธุ์ *Metarhizium anisopliae* จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ Ma.23 ที่ระดับความเข้มข้น $1x10^7$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร พบว่า เชื้อราสาเหตุโรคแมลง ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถควบคุมแมลงวันบ้าน ระยะตัวหนอนได้แต่มีอัตราการตายที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.05$) โดยที่เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสายพันธุ์ *M. anisopliae* ไอโซเลท Ma.23 มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุดคือ 93.80 รองลงมาคือ เชื้อราสายพันธุ์ *B. bassiana* ไอโซเลท Bb.2 และ Bb.108 มีเปอร์เซ็นต์การตายที่ 61.30 และ 49.00 ตามลำดับ

ส่วนการทดลองของ Barson *et al*. (1994) ได้ทำการทดสอบเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ได้แก่ *Metarhizium anisopliae* และ *Tolypocladium cylindrosporum* ในการควบคุมแมลงวันบ้านระยะหนอนและตัวเต็มวัย พบว่า เชื้อรา *M. anisopliae* สามารถควบคุมแมลงวันบ้านได้ โดยเมื่อใช้เชื้อราที่ระดับความเข้มข้น $1x10^5$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตรในรูปแบบน้ำมัน มีอัตราการตายของแมลงวันบ้านได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 3 วัน และเมื่อใช้เชื้อราที่ระดับความเข้มข้น $1x10^3$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สามารถควบคุมแมลงวันได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน แต่ใช้ระยะเวลาถึง 6 วันภายหลังการติดเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับ Mwamburi *et al*. (2010) ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อรา

สถาบันวิจัยและพัฒนาโลจิสติกส์

จำนวน 34 ไอโซเลท จากเชื้อราสายพันธุ์ *Beauveria bassiana* และเชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลทจากเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* กับแมลงวันบ้านทั้งในระยะตัวหนอนและระยะตัวเต็มวัย พบว่าเชื้อรา *Beauveria bassiana* สามารถควบคุมแมลงวันบ้านได้ทั้งในระยะตัวหนอนและระยะตัวเต็มวัย โดยมีอัตราการตายอยู่ระหว่าง 30-100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 6 วัน หลังการทดสอบ โดยที่เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสายพันธุ์ *Beauveria bassiana* มีจำนวนถึง 4 ไอโซเลท ที่ทำให้แมลงวันบ้านมีอัตราการตายที่มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 2 วัน ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ *Paecilomyces lilacinus* ไม่สามารถทำให้แมลงวันบ้านในระยะตัวเต็มวัยเกิดการติดโรคแต่อย่างใด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Carswell *et al*. (2007) ได้ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อราสายพันธุ์ *Metarhizium anisopliae* กับแมลงวันจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ แมลงวันบ้านสกุล *Musca domestica* และแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera tryoni* โดยใช้เชื้อราในรูปแบบของเหลว พบว่า แมลงวันทั้ง 2 ชนิด สามารถทำให้เกิดโรคได้และตายได้ภายในระยะเวลา 4-5 วัน หลังการทดสอบ และแมลงวันทั้ง 2 ชนิดจะมีเปอร์เซ็นต์การตายถึง100 ภายในระยะเวลา 7-9 วัน หลังการทดสอบ

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Lecuona *et al*. (2005) ได้ทำการทดสอบเชื้อราสายพันธุ์ *Beauveria bassiana* จำนวน 19 สายพันธุ์ พบว่า สามารถควบคุมแมลงวันบ้านสกุล *Musca domestica* ทั้งระยะหนอน ระยะดักแด้ และระยะตัวเต็มวัยได้ โดยมีอัตราการตายมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 15 วัน ($P<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Siri *et al*. (2004) ทำการสำรวจในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2002-2003 พบว่า แมลงวันบ้านสกุล *M. domestica* มีการติดเชื้อโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราสายพันธุ์ *B. bassiana* ตามธรรมชาติระหว่าง 0.4-1.45 เปอร์เซ็นต์ ณ เมือง La Plata จังหวัด Buenos Aires ประเทศอาร์เจนติน่า และเมื่อนำเชื้อราสายพันธุ์ *B. bassiana* ไปทำการทดสอบภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า สามารถควบคุมแมลงวันบ้านระยะตัวเต็มวัยได้ถึง 94 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 14 วัน และจากการศึกษาของ Wright *et al*. (2004) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสายพันธุ์ *M. anisopliae* กับ แมลงวันหัวเขียวสกุล *Lucilia sericata* ระยะตัวเต็มวัยที่ระดับความเข้มข้น $1x10^7$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร พบว่า มีอัตราการตายเท่ากับ 64 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดลองของ Renn *et al*. (1999) ได้ทำการศึกษาการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสายพันธุ์ *M. anisopliae* ในการควบคุมแมลงวันบ้านระยะตัวเต็มวัย พบว่า หลังการทดสอบภายในระยะเวลา 8 วัน สามารถทำให้แมลงวันบ้านเพศเมียและเพศผู้มีเปอร์เซ็นต์การตายคิดเป็น 97.3 และ 100 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปผลการทดลอง

การหาความสามารถของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงต่อแมลงวันหัวเขียวในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า เชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 20 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อรา *Metarhizium* spp. จำนวน 8 ไอโซเลท *Beauveria* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท *Isaria* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท และ *Verticillium* spp. จำนวน 2 ไอโซเลท มีความสามารถในการทำให้หนอนระยะที่ 2 ของแมลงวันหัวเขียวเกิดโรคและตายได้แต่มีเปอร์เซ็นต์การตายที่แตกต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับ สกุล ชนิด และไอโซเลท โดยที่เชื้อราสายพันธุ์ *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลท Ma.6171 เชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bb.6241 และเชื้อรา *Metarhizium flavoviridae* ไอโซเลท Mfl.5744 สามารถทำให้หนอนของแมลงวันหัวเขียวเกิดโรคตายได้ในอัตราที่สูงกว่าเชื้อราไอโซเลทอื่นๆ จึงจะได้นำเชื้อรา 3 ไอโซเลทไปทดสอบในขั้นตอนต่อๆ ไป

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร