

สัญญาเลขที่ RDG4120017
ชื่อโครงการเสริม การสำรวจเก็บรวบรวมและจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง
ในประเทศไทย
(ภายใต้โครงการหลัก การพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยควบคุมศัตรูพืชในระดับ
การค้า ระยะที่ 2)
ชื่อผู้วิจัย นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด
หน่วยงาน กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ระหว่างเดือนมิถุนายน 2539 ถึงมีนาคม 2541 จำนวน 306 ตัวอย่างดิน ในพื้นที่ 42 จังหวัด ครอบคลุมทุกภาคของประเทศไทย สามารถแยกได้ไส้เดือนฝอย steinernematid จากพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี (KB) พิจิตร (PC) อัญญา (AY) กาฬสินธุ์ (KS) มหาสารคาม (MK) ขอนแก่น (KK) หนองคาย (NK) และสระแก้ว (SK) รวม 8 ไอโซเลท และไส้เดือนฝอย heterorhabditid แยกได้จากจังหวัดร้อยเอ็ด (RE) 1 ไอโซเลท ไส้เดือนฝอย steinernematid นำมาแบ่งแยกชนิดในเบื้องต้นโดยการทดสอบ cross mating สามารถจัดแบ่งไส้เดือนฝอย Thai isolate เป็น 3 กลุ่ม คือ 1) KB KS MK KK และ NK 2) AY และ 3) SK

เมื่อนำไส้เดือนฝอยกลุ่มที่ 1 (KB isolate) มาจัดจำแนกชนิด (species) โดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่ามีรูปร่างลักษณะแตกต่างจากไส้เดือนฝอย *Steinernema* species 23 ชนิด โดยพิจารณาจากลักษณะสำคัญของไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะเข้าทำลายได้แก่ ขนาดของความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 432 (404-460) ไมครอน ค่า D% เฉลี่ยเท่ากับ 33 (30-37) ค่า E% เฉลี่ยเท่ากับ 83 (75-91) และมีเส้นข้างลำตัว 6 เส้น ในไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศผู้พบว่ามีติ่งที่บริเวณปลายหางในชั่วอายุที่ 1 และ 2 มีความยาว spicule และ gubernaculum เฉลี่ยเท่ากับ 94 (83-99) และ 67 (61-79) ไมครอน ตามลำดับ และในส่วนหัวของตัวเต็มวัยเพศเมียมีลักษณะกลมมน พบ double-flapped epitygma ที่บริเวณ vulva ของตัวเมียทั้งในชั่วอายุที่ 1 และ 2 จากการตรวจสอบ ribosomal DNA ด้วยเทคนิค PCR-RFLP เปรียบเทียบกับ *S. carpocapsae* (All strain)

คำหลัก : ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง สายพันธุ์ไทย การจัดจำแนกชนิด ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandensis* n. sp. ชีววิทยา ศักยภาพในการกำจัดแมลง

พบว่ามีความแตกต่างของดีเอ็นเอ ดังนั้น จึงสามารถจัดจำแนกเป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ที่แยกได้จากประเทศไทย ตั้งชื่อว่า *S. thailandensis* n. sp. ส่วนในไส้เดือนฝอย AY และ SK isolate นำมาตรวจสอบดีเอ็นเอ (PCR-RFLP) พบว่า ดีเอ็นเอมีความแตกต่างจาก *S. thailandensis* n. sp. และ *S. carpocapsae* ไส้เดือนฝอย steinemematid ที่แยกได้จากดินในประเทศ สามารถจัดจำแนกได้ 3 ชนิด คือ *S. thailandensis* n. sp., *Steinernema* sp. (AY isolate) และ *Steinernema* sp. (SK isolate) ส่วนไส้เดือนฝอย heterorhabditid มีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับ *Heterorhabditis indica* จากประเทศอินเดีย ทุกไอโซเลทจัดเก็บรวบรวมเป็น culture collection ในน้ำกลั่นให้คงสภาพความมีชีวิตในระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน โดยไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* spp. เก็บที่ 25 °ซ และ *Heterorhabditis* sp. เก็บที่ 15 °ซ สามารถมีชีวิตรอดได้นาน 3-4 เดือน และคงศักยภาพในการทำลายแมลง

การศึกษาชีววิทยาและการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. (KB isolate) ในห้องปฏิบัติการพบว่า มีวงจรชีวิต 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ระดับของอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย และความสามารถในการเข้าทำลายแมลงทดสอบ อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25 ถึง 35 °ซ การแยก symbiotic bacteria จากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) ที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย สามารถแยกได้แบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. phase I โดยพิจารณาการดูดสี bromthymol blue จากอาหาร NBTA การทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคในหนอนกินรังผึ้งพบว่า ไส้เดือนฝอยอัตรา 10 ตัวต่อแมลง 1 ตัว สามารถทำให้หนอนกินรังผึ้งตาย 53 % ในเวลา 24 ชม. และจัดเป็นไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ที่ร้อนที่มีศักยภาพในการฆ่าหนอนกินรังผึ้งตาย 100 % ในเวลา 22 ชม. ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 °ซ และคงศักยภาพในการเข้าทำลายแมลงได้ สูงที่อุณหภูมิ 38 °ซ เมื่อนำไส้เดือนฝอยมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมชนิดอื่น พบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบ โดยให้ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 6.4×10^5 ต่ออาหาร 20 กรัม ในเวลา 10 วัน การศึกษาศักยภาพในการกำจัดแมลงสำคัญ 12 ชนิด ได้แก่ หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera litura*) หนอนกระทู้ผัก (*S. exigua*) หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) หนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera*) หนอนเจาะดอกมะลิ (*Henedecasis duplifacialia*) หนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) หนอนในถุงเห็ด (unidentified) ตัวงหมัดกระโดด (*Phyllotreta sinuata*) หนอนตัวงกินรากสตรอเบอร์รี่ (unidentified) เพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) และปลวก (*Coptotermes* sp.) พบว่า *S. thailandensis* n. sp. มีศักยภาพในการฆ่าแมลง โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 56 60 89 92 100 100 100 33 20 44 และ 42 % ในเวลา 24 ชม. ตามลำดับ และในแมลงสาบ (*Periplaneta americana*) เท่ากับ 57 % ในเวลา 48 ชม.

Project No. RDG4120017
Project Title Survey, Collection and Identification of Entomopathogenic Nematodes
in Thailand
(Under the Project "The Research and Development for Commercial
Production of Entomopathogenic Nematodes Phase II")
Personal Mrs. NUCHANART TANGCHITSOMKID
Agency Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture

ABSTRACT

Surveys for entomopathogenic nematodes were conducted during June, 1996 to March, 1998 in 42 provinces of Thailand. Out of 306 soil samples collected from the surveys, eight isolates of steinernematid nematode were obtained from Kanchana Buri (KB), Phichit (PC), Ayutthaya (AY), Kalasin (KS), Maha Sarakham (MK), Khon Kaen (KK), Nong Khai (NK), and Sakaeo (SK) provinces. One isolate of heterorhabditid nematode was isolated from Roi-et (RE) province. The steinernematids were initially separated into three groups by the cross mating test : KB, KS, MK, KK and NK belonging to group 1; AY belonging to group 2; and SK belonging to group 3. The KB steinernematid of group 1 is a new entomopathogenic nematode. Based on morphological characters and DNA examinations, it can be distinguished from the other 23 *Steinernema* species. Diagnostic characteristics of the third-stage infective juvenile include : the body length of 404-460 (averaged 432) μm ; D% of 30-37 (averaged 33); E% of 75-91 (averaged 83) and lateral field pattern with 6 longitudinal ridges; the presence of mucronate tail tip in both first and second generation males; the size of spicules 83-99 (averaged 94) and gubernaculum 61-79 (averaged 67) μm . The vulva showed a double-flapped epitygma in both first and the second generation females and the head truncate to slightly round when observed through scanning electron microscope. The restriction fragment length polymorphism within the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA repeat unit is identified to a new species

Key words : entomopathogenic nematode, Thai isolate, identify, *Steinernema thailandensis* n. sp., biology and potential for biological control

when compared to that of *S. carpocapsae* (All strain). It is then proposed as a new species namely, *S. thailandensis* n. sp. The AY and SK nematode isolates were identified by PCR-RFLP technique. It was found that their DNAs were different from those of *S. thailandensis* n. sp. and *S. carpocapsae*. Thus, the Thai steinernematids were identified as *S. thailandensis* n. sp., *Steinernema* sp. (AY isolate), and *Steinernema* sp. (SK isolate). The Thai heterorhabditid (*Heterorhabditis* sp. RE isolate) was morphologically similar to *H. indica*, from India. All isolates have been preserved in tissue culture flasks containing distilled water. The steinernematids and heterorhabditid can be stored at 25 °C and 15 °C, respectively for 3-4 months.

Studies on biology and pathogenicity of *S. thailandensis* n. sp. were conducted in the laboratory and it was shown that its life cycle was four days at 30 °C. The temperature ranging from 25 to 35 °C also affected the growth rate, sex ratio and infection ability of infective juveniles. A symbiotic bacterium was isolated from a drop of haemolymph of an infected *Galleria mellonella* larva. *Xenorhabdus* sp. phase I bacterium was characterised by adsorption of bromthymol blue from NBTA medium. The nematodes at a dosage of 10 infective juveniles per insect caused 53 % mortality of test insect in 24 hours. This heat tolerant isolate could kill 100 % of *G. mellonella* in 22 hours at 30 and 35 °C and was still effective even at 38 °C. The pathogenic nematode could be mass produced *in vitro* on soybean culture medium. The yield of infective juveniles was approximately 6.4×10^5 per 20 g culture medium. Its potential as a biological control agent was tested against 12 insect pests. Those were common leafworm (*Spodoptera litura*), beet armyworm (*S. exigua*), diamond-back moth (*Plutella xylostella*), American bollworm (*Heliothis armigera*), jasmine flower borer (*Henedecasis duplifacialia*), wax moth (*G. mellonella*), mushroom beetle (unidentified), flea beetle (*Phyllotreta sinuata*), scarab beetle (unidentified), aphid (*Myzus persicae*), and wet wood termite (*Coptotermes* sp.). The results showed that *S. thailandensis* n. sp. caused 56, 60, 89, 92, 100, 100, 100, 33, 20, 44, and 42 % mortality in those test insects, respectively within 24 hours. The Thai steinernematid caused 57 % mortality in American cockroach (*Periplaneta americana*) within 48 hours.