

1.3 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับ *Heterorhabditis* sp.

สายพันธุ์ไทย

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. จากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้งที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอยเป็นเวลา 48 ชม. บนอาหาร NBTA ผลการศึกษาพบว่าแยกได้โคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร (Figure 5A) โคโลนีมีคุณสมบัติในการดูดสีเขียวของ bromthymol blue จากอาหาร NBTA สีเขียวของอาหารชัดเจนบริเวณที่มีโคโลนีกระจายอยู่ โคโลนีมีสีเขียวตรงกลาง มี clear zone ล้อมรอบ มีรูปร่างกลม-โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน (irregular) ระดับความหนของโคโลนีมีลักษณะค่อนข้างหนา เจริญสูงขึ้นจากผิวอาหารแต่ส่วนบนเรียบและด้านริมลาด ท่ามกับผิวอาหาร (raised) ที่บดแสง (opaque) ริมขอบเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (undulate)(Figure 5B) เมื่อนำมาแยกโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร nutrient agar (NA) ได้โคโลนีสีครีม มีการเจริญในอาหาร NA slant เป็นลักษณะเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ (filiform)

จากรูปร่างและลักษณะของโคโลนี และคุณสมบัติของการดูดสี bromthymol blue จากอาหาร NBTA สามารถจัดจำแนกได้เป็นแบคทีเรียในสกุล *Photorhabdus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบจัดอยู่ใน family Enterobacteriaceae มีความสัมพันธ์และเฉพาะเจาะจงกับไส้เดือนฝอยในสกุล *Heterorhabditis* spp. เท่านั้น (Akhurst, 1990) Gerritsen and Krasomil-Osterfeld (1994) พบว่า โคโลนีของ *Photorhabdus* sp. แบ่งออกเป็น 2 form คือ primary form และ secondary form โดยพิจารณาจากคุณสมบัติของการดูดและไมดูดสี bromthymol blue และโคโลนีชนิด primary form เท่านั้น ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม ที่มีสภาพการเพาะเลี้ยงที่มีแบคทีเรียร่วมด้วย (monoxenic culture) อย่างไรก็ตามการจำแนกแบคทีเรียในระดับ species ยังต้องมีการศึกษาในรายละเอียดอื่นๆ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ และเทคนิคทางอนุชีวโมเลกุล เป็นต้น

แบคทีเรียสกุล *Photorhabdus* sp. มีความสัมพันธ์และเฉพาะเจาะจงกับไส้เดือนฝอยในสกุล *Heterorhabditis* spp. ในลักษณะที่เรียกว่า symbiosis มีการพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน โดยไส้เดือนฝอยเป็นตัวนำแบคทีเรียเข้าสู่ลำเลือดของแมลงที่เป็นแหล่งอาหาร การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด จะพัฒนาภายในตัวแมลง โดยเซลล์ของแบคทีเรียมีผลต่อขบวนการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย (Akhurst, 1980) ความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้มีความสำคัญต่อการผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม ให้ประสบผลสำเร็จในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ monoxenic culture ซึ่งเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยโดยมีเซลล์ของแบคทีเรียร่วมด้วย ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จะสูงกว่าการเลี้ยงแบบ axenic culture ที่ไม่ใส่แบคทีเรีย ผลของงานวิจัยการแยกได้เชื้อบริสุทธิ์จากไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ได้ทำการเก็บรักษาในอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 4-10 °C เพื่อเป็น stock culture และนำไปสู่การขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมต่อไป

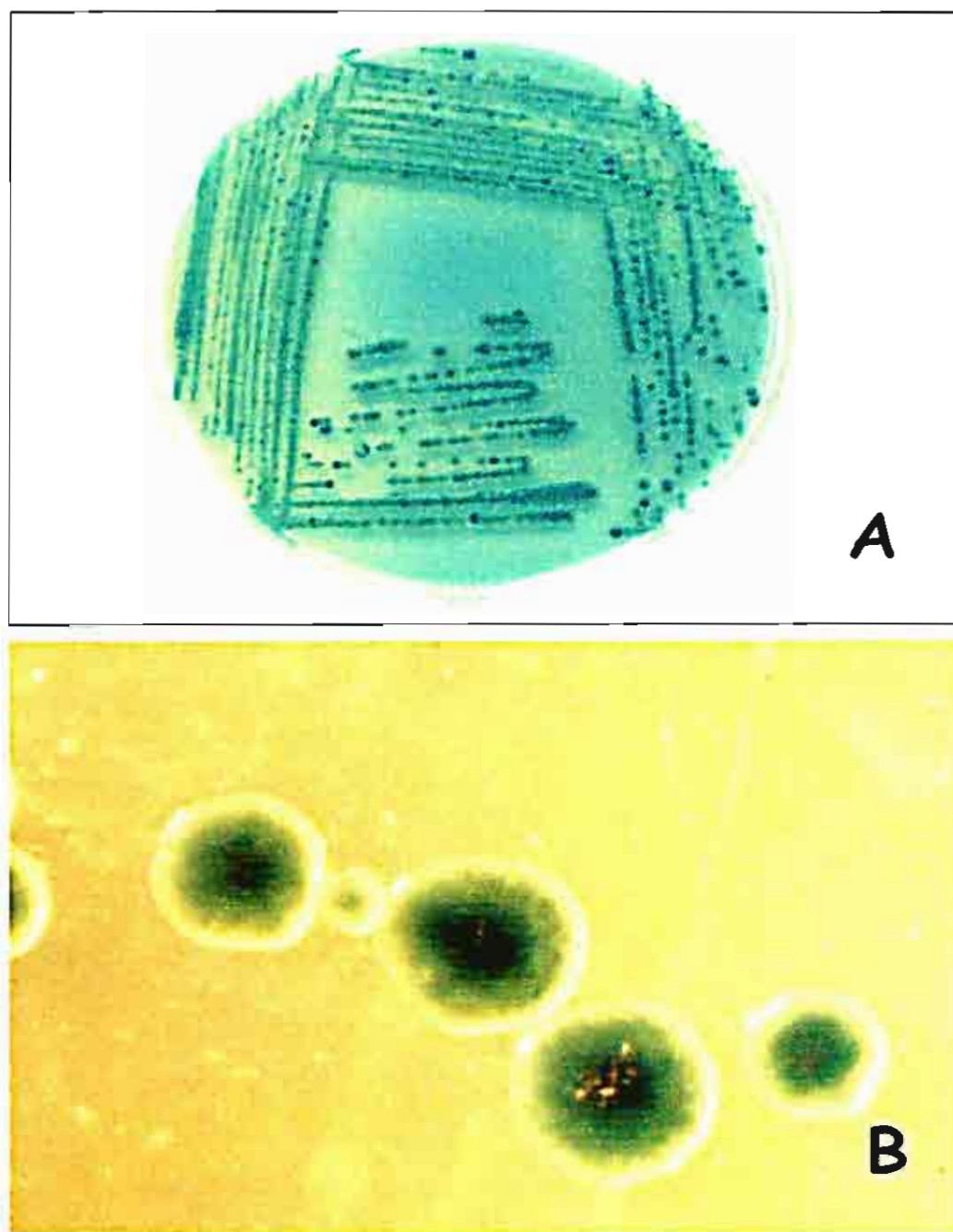


Figure 5 Colony of the symbiotic bacteria (*Photorhabdus* sp.) isolated from *Heterorhabditis* sp. Thai strain, A) absorbed BTB on NBTA medium; B) green colony, with clear zone around colony.

2. การศึกษาศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทยในการกำจัดแมลงศัตรูสำคัญ

2.1 ทดสอบความสามารถและความรุนแรงในการฆ่าแมลง

ผลการทดสอบความสามารถและความรุนแรงในการฆ่าแมลงของ *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย กับแมลงทดสอบระยะตัวหนอนวัยก่อนเข้าดักแด้ของหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) โดยการใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ ในอัตราตั้งแต่ 0 4 6 8 และ 10 ตัวต่อหนอนทดสอบ 1 ตัว และตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนในแต่ละอัตรา ที่เวลา 12 24 36 และ 48 ชม. หลังจากใส่ไส้เดือนฝอย พบว่าหนอนทดสอบในอัตราใส่ไส้เดือนฝอย 4 6 8 และ 10 ตัว มีการตายที่เวลาผ่านไป 36 ชม. เท่ากับ 6.67 13.33 36.67 และ 36.67 % และ ที่เวลา 48 ชม. หนอนทดสอบมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นตามอัตราของไส้เดือนฝอย เท่ากับ 33.4 66.6 80.0 และ 93.4 % ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การตายพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 1)

Table 1 Mortality of *Galleria mellonella* infected with *Heterorhabditis* sp. Thai isolate at different doses and times.

Doses (IJ : insect)	Mortality of <i>G. mellonella</i> (%)			
	12 hours	24 hours	36 hours	48 hours
0 : 1 (control)	0	0	0 c ^{1/}	0 d
4 : 1	0	0	6.7 bc	33.4 c
6 : 1	0	0	13.3 b	66.6 b
8 : 1	0	0	36.7 a	80.0 ab
10 : 1	0	0	36.7 a	93.4 a
CV. (%)			36.6	23.1

^{1/}Number with the same letters in the same column are not significantly different at 5 % level, according to Duncan's New Multiple Range Test (DMRT).

จากผลการทดสอบแสดงถึงความสามารถของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในการค้นหาช่องเปิดตามธรรมชาติของตัวหนอน อันได้แก่ เข้าทางปาก รูทวาร หรือช่องอากาศทางผิวหนัง (spiracles) เพื่อเคลื่อนตัวเข้าไปภายในตัวหนอนและไปยังกระแสเลือด ปลดปล่อยสารพิษและ symbiotic bacteria ไปมีผลทำให้หนอนเกิดโรคเลือดเป็นพิษ (septicemia) (Akurst, 1982) และตายภายในช่วงเวลา 48 ชม. ซึ่งการตายของหนอนนี้

หรือเร็ว จึงขึ้นอยู่กับจำนวนของไส้เดือนฝอยที่เข้าสู่ตัวหนอนและความรุนแรงของสารพิษที่ไส้เดือนฝอยร่วมกับแบคทีเรียปลดปล่อยออกมา การใส่ไส้เดือนฝอยจำนวน 10 ตัวต่อหนอนทดสอบ 1 ตัว จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุด (93.4 %) ที่เวลา 48 ชม. และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในสกุล *Steinernema* sp. พบว่า *S. thailandense* 10 ตัวต่อหนอน 1 ตัว มีความรุนแรงในการทำให้หนอนทดสอบตายได้ใกล้เคียงกัน (เท่ากับ 83.3 %) ในเวลาเท่ากัน (Tangchitsomkid, 2000)

2.2 ทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิในการเข้าทำลาย (heat tolerance)

ผลการทดสอบความทนทานของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ต่ออุณหภูมิระดับต่างๆ ในการเข้าทำลายแมลงระยะตัวหนอนของ *G. mellonella* โดยการวางหนอนที่ถูก infected ด้วยไส้เดือนฝอยระยะ IJ ไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 15 20 25 30 35 และ 40 °ซ และตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนทดสอบที่ เวลา 48 ชม. พบว่า การวางหนอนทดสอบที่ถูก infected ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °ซ ทำให้หนอนตายสูงที่สุดเท่ากับ 88 และ 98 % และที่อุณหภูมิ 20 และ 35 °ซ ตายเท่ากับ 44 และ 46 % ตามลำดับอุณหภูมิต่ำ (15 °ซ) และสูง (40 °ซ) หนอนทดสอบไม่ตาย ซึ่งจากการวิเคราะห์ข้อมูลพบที่มีความแตกต่างกันทางสถิติของระดับอุณหภูมิ (Table 2)

Table 2 Mortality of *Galleria mellonella* exposed to *Heterorhabditis* sp. Thai isolate at different temperatures.

Different temperatures (°C)	Mortality of <i>G. mellonella</i> (%)
15	0 c ¹
20	44 b
25	88 a
30	98 a
35	46 b
40	0 c

CV. (%) = 18.83

¹Number with the same letters in the same column are not significantly different at 5 % level, according to Duncan's New Multiple Range Test (DMRT).

จากข้อมูลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีความสำคัญและมีผลต่อความรุนแรงของไส้เดือนฝอยในการฆ่าแมลง รวมทั้งระดับของอุณหภูมิต่างๆ ยังขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยที่มีความหลากหลายของแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน โดยไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. แยกได้จากดินในพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ด ของประเทศไทยซึ่งตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น มีความทนทานต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 30 °ซ เช่นเดียวกับ *S. thailandense* ที่แยกได้จากดินในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี มีความทนทานต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 35 °ซ ในการเข้าทำลายแมลงเป้าหมาย (Tangchitsomkid, 2000) ซึ่งแตกต่างจากไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* DD-136 strain ที่แยกได้จากเขตอบอุ่น มีความทนทานต่ออุณหภูมิตั้งอยู่ในช่วงระหว่าง 25-27 °ซ (Kaya, 1977) จากผลการทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิในการเข้าทำลายแมลงของ *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ที่แยกได้ในประเทศ เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำไส้เดือนฝอยไปใช้ประโยชน์ ทั้งทางด้านการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียม และการนำไปใช้กำจัดแมลงเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.3 ทดสอบ Pathogenicity กับแมลงศัตรูสำคัญ

จากการทดสอบ Pathogenicity ของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทยกับแมลงศัตรูสำคัญรวม 5 อันดับ 15 ชนิด ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า แมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ (order Lepidoptera) จำนวน 10 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การตายระหว่าง 10-50 % หลังการใส่ไส้เดือนฝอยเป็นเวลา 24 ชม. โดยในหนอนกระทู้หอมมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุด 50 % และหนอนบุ้งชมพูและหนอนด้วงรูกี้ มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำที่สุด 10 % แต่เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชม. หนอนทดสอบทั้ง 10 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้น ซึ่งรวมตั้งแต่ใส่ไส้เดือนฝอยจนถึงเวลา 48 ชม. อยู่ระหว่าง 67-100 % ส่วนใน order Coleoptera ทำการทดสอบในหนอนนก มีเปอร์เซ็นต์การตาย 25 และ 55 % ที่เวลา 24 และ 48 ชม. ตามลำดับ หลังการใส่ไส้เดือนฝอยใน order Orthoptera ทดสอบกับแมลงกะซอน ซึ่งเป็นศัตรูสำคัญกัดกินรากหญ้าในสนามกอล์ฟ พบว่าไส้เดือนฝอยสามารถฆ่าแมลงกะซอนตายได้ 50 % ที่เวลา 48 ชม. เช่นเดียวกับแมลงสาบซึ่งอยู่ใน order Blattodea ไส้เดือนฝอยฆ่าได้ 30 % ที่เวลา 48 ชม. หลังการใส่ ส่วนใน order Homoptera ทดสอบในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยจักจั่นสีเขียว พบเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 19 และ 11 % ที่เวลา 48 ชม. ตามลำดับ หลังจากใส่ไส้เดือนฝอย (Table 3, Table 4)

การทดสอบการเกิดโรคในแมลงต่างๆ ของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย แสดงถึงความสามารถในการเข้าหาเหยื่อหนอนทดสอบ และความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคจนถึงหนอนตายของไส้เดือนฝอย ใช้เวลาตั้งแต่ 2 วันขึ้นไป หนอนเหยื่อจะตายในที่สุด เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ *S. thailandense* จากรายงานของ Tangchitsomkid (2000) พบว่า *S. thailandense* มีความสามารถในการเข้าหาเหยื่อและมีศักยภาพในการฆ่าได้รวดเร็วในเวลา 24 ชม. ในหนอนกิ้งมั่ง หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก ตายเท่ากับ 100 92 56 และ 60 % ตามลำดับ ซึ่งใน *Heterorhabditis* sp. ใช้เวลา 48 ชม. แต่อย่างไรก็ตาม

ตาม ความรุนแรงในการฆ่าเหยื่อของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยทั้งสองชนิดนี้ เป็นคุณสมบัติที่ดีเทียบได้กับ ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ที่ผลิตเป็นการค้าในปัจจุบัน (นุชนารถ, 2543)

การพยายามนำไส้เดือนฝอยไปใช้กำจัดแมลงศัตรูขนาดเล็ก เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียว เพลี้ยอ่อน และแมลงหวี่ขาว ซึ่งจัดเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคพืชที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ เพลี้ยอ่อนถ่ายทอด Tomato Mosaic Virus สาเหตุโรคใบด่างของมะเขือเทศ แมลงหวี่ขาวถ่ายทอด gemini virus สาเหตุโรคเส้นใบเหลืองในกระเจี๊ยบเขียว เป็นต้น (นิรนาม, 2544) ซึ่งการป้องกันกำจัดโรคพืชเหล่านี้คือการกำจัดแมลงพาหะเพื่อลดการถ่ายทอดโรคสู่ต้นพืช จากผลการทดสอบใช้ไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. ฆ่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แมลงพาหะถ่ายทอด Rice Ragged Stunt Virus โรคใบหงิก (โรคจู๋) ของข้าว และเพลี้ยจักจั่นสีเขียว แมลงพาหะถ่ายทอด Rice Gall Dwarf Virus สาเหตุโรคหูดของข้าว พบว่าแมลง 2 ชนิด ถูกฆ่าได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เนื่องจากแมลงมีขนาดเล็ก ไส้เดือนฝอยเข้าสู่ลำตัวของแมลงได้ทางรูทวารและทางปากเท่านั้น ซึ่งแตกต่างจากตัวหนอนของแมลงที่มีขนาดใหญ่ เช่น หนอนกระทู้หอม และหนอนกินใต้ผิวเปลือกลองกอง ไส้เดือนฝอยสามารถเข้าได้หลายทาง เช่น หนอนกินเข้าไปทางปาก เข้าทางรูทวาร และรูหายใจทางผิวหนังซึ่งมีหลายคู่และมีขนาดใหญ่กว่าไส้เดือนฝอย แต่อย่างไรก็ตาม ไส้เดือนฝอยสามารถฆ่าแมลงขนาดเล็กจำพวกเพลี้ยต่างๆ ได้ ซึ่งอาจต้องมีการศึกษาในเรื่องของการใช้อย่างเหมาะสม เพื่อให้ไส้เดือนฝอยเข้าสู่ตัวเพลี้ยได้อย่างน้อย 1 ตัว ก็สามารถทำให้เพลี้ยตายได้

สำหรับในแมลงสาบ ซึ่งจัดเป็นแมลงศัตรูเคหะสถานที่สำคัญ กัดกินอาหาร หนังสือ เสื้อผ้าทำให้เกิด ความเสียหายและกลิ่นสาบ นอกจากนั้นยังเป็นพาหะนำโรคบางชนิดติดมากับหนวดและขา ไปตกหล่นปะปนในอาหาร ทำให้อาหารบูดเน่า และยังเป็นตัวแพร่กระจายไข่ของพยาธิบางชนิดได้อีกด้วย (อินทวัฒน์, 2537) การป้องกันกำจัด นิยมใช้สารเคมีซึ่งมี Dose ค่อนข้างสูง เป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยง จากผลการทดสอบใช้ *Heterorhabditis* sp. ฆ่าแมลงสาบ แสดงผลการตายเท่ากับ 30 % ในเวลา 48 ชม. เช่นเดียวกับรายงานการใช้ *S. thailandense* ฆ่าแมลงสาบตาย 57 % ในเวลาเท่ากัน (Tangchitsomkid, 2000) แต่เมื่อทำการสังเกตการตายต่อเนื่องที่เวลา 72 และ 96 ชม. พบว่าแมลงสาบมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้น เป็นผลจากแมลงสาบมีความทนทานสูงกว่าแมลงชนิดอื่นๆ ซึ่งจากประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยดังกล่าว จึงน่าจะมีการพัฒนาใช้ไส้เดือนฝอยไปกำจัดแมลงสาบในเคหะสถานทดแทนการใช้สารเคมีต่อไป

Table 3 Mortality of various insect species when exposed to *Heterorhabditis* sp. Thai isolate with 24 hours.

Insect species	Treated			Control			Mortality (%) ^{1/}
	Tested (n)	Dead (n)	Alive (n)	Tested (n)	Dead (n)	Alive (n)	
order Lepidoptera							
1. <i>Trabala vishnou</i>	10	1	9	10	0	10	10.00
2. <i>Omphisa fuscidentalis</i>	10	2	8	10	0	10	20.00
3. <i>Galleria mellonella</i>	10	4	6	10	0	10	40.00
4. <i>Leucinodes orbonalis</i>	10	3	7	10	0	10	30.00
5. <i>Maruca testulalis</i>	10	2	8	10	0	10	20.00
6. <i>Hellula undalis</i>	10	3	7	10	0	10	30.00
7. <i>Spodoptera exigua</i>	10	5	5	10	0	10	50.00
8. <i>Heliothis armigera</i>	10	3	7	10	0	10	30.00
9. <i>Danaus genutia</i>	3	1	2	2	0	2	10.00
10. <i>Cossus</i> sp.	20	3	17	20	0	20	15.00
order Coleoptera							
11. <i>Tenebrio molitor</i>	20	5	15	20	0	20	25.00
order Orthoptera							
12. <i>Gryllotalpa africana</i>	5	0	5	5	0	5	0
order Homoptera							
13. <i>Nilaparvata lugens</i>	50	2	48	50	1	49	2.04
14. <i>Nephotettix virescens</i>	50	7	43	50	2	48	10.42
order Blattodea							
15. <i>Periplaneta americana</i>	10	0	10	10	0	10	0

^{1/}Percentage of mortality corrected by Abbott's formula (1925) which is $(X - Y) / X \times 100$, where X = % insect alive in the control treatment; Y = % insects alive in the nematode treatment; (n) = number of test insect.

Table 4 Mortality of various insect species when exposed to *Heterorhabditis* sp. Thai isolate with 48 hours.

Insect species	Treated			Control			Mortality (%) ^{1/}
	Tested (n)	Dead (n)	Alive (n)	Tested (n)	Dead (n)	Alive (n)	
order Lepidoptera							
1. <i>Trabala vishnou</i>	10	7	3	10	1	9	66.67
2. <i>Omphisa fuscidentalis</i>	10	8	2	10	0	10	80.00
3. <i>Galleria mellonella</i>	10	10	0	10	0	10	100.00
4. <i>Leucinodes orbonalis</i>	10	9	1	10	2	8	87.50
5. <i>Maruca testulalis</i>	10	8	2	10	3	7	71.43
6. <i>Hellula undalis</i>	10	9	1	10	1	9	88.89
7. <i>Spodoptera exigua</i>	10	9	1	10	1	9	88.89
8. <i>Heliothis armigera</i>	10	9	1	10	2	8	87.50
9. <i>Danaus genutia</i>	3	3	0	2	0	2	100.00
10. <i>Cossus</i> sp.	20	14	6	20	2	18	66.67
order Coleoptera							
11. <i>Tenebrio molitor</i>	20	11	9	20	0	20	55.00
order Orthoptera							
12. <i>Gryllotalpa africana</i>	5	3	2	5	1	4	50.00
order Homoptera							
13. <i>Nilaparvata lugens</i>	50	12	38	50	3	47	19.15
14. <i>Nephotettix virescens</i>	50	9	41	5	4	46	10.87
order Blattodea							
15. <i>Periplaneta americana</i>	10	3	7	10	0	10	30.00

^{1/}Percentage of mortality corrected by Abbott's formula (1925) which is $(X - Y) / X \times 100$, where X = % insect alive in the control treatment; Y = % insects alive in the nematode treatment; (n) = number of test insect.

3. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทยในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวสภาพ monoxenic

จากการทดสอบเพาะเลี้ยง *Heterorhabditis* sp. ในอาหารแข็งกึ่งเหลวสูตรดัดแปลง 4 สูตร (MM1-MM4) เปรียบเทียบกับสูตรอาหาร BDM ของ Bedding (1981) มีสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มี symbiotic bacteria ร่วมด้วย โดยวางเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 °C เป็นเวลา 15 วัน ผลการตรวจนับจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้ในแต่ละสูตรอาหารพบว่า สูตรอาหารดัดแปลง MM2 ให้ผลผลิตเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 8.9 ล้านตัว เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร BDM ที่ให้ผลผลิต 10.6 ล้านตัวต่ออาหาร 30 กรัม ผลผลิตรองลงมาคือ อาหารดัดแปลงสูตร MM3 MM1 และ MM4 เท่ากับ 6.2 5.8 และ 5.5 ล้านตัวต่ออาหาร 30 กรัม ตามลำดับ เมื่อพิจารณาต้นทุนอาหารดัดแปลงต่อลิตรและผลผลิตที่ได้พบว่า อาหารสูตร MM1 MM2 MM3 และ MM4 มีต้นทุนเท่ากับ 26 40 35 และ 40 บาท ตามลำดับ ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ยเท่ากับ 191 293 205 และ 182 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร ตามลำดับ โดยสูตรอาหาร BDM มีต้นทุนเท่ากับ 60 บาท ให้ผลผลิต 349 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร (Table 5)

Table 5 Number of infective juveniles of a new Thai strain of *Heterorhabditis* sp. after 15 days on 30 g of different media.

Media	No. of infective juveniles/30 g media (Mean) ^v
BMD	10.6×10^6
MM1	5.8×10^6
MM2	8.9×10^6
MM3	6.2×10^6
MM4	5.5×10^6

^v N = 5

เมื่อพิจารณาจากผลผลิตไส้เดือนฝอยในแต่ละสูตรอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของแหล่งอาหารโปรตีน อันได้แก่ ไตหมู ไข่ เนื้อปลา และอาหารสุนัขสำเร็จรูป (รสตับ) มีผลต่อผลผลิตของไส้เดือนฝอย โดยพบว่า ไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงในสูตรอาหารโปรตีนสูง ผลผลิตไส้เดือนฝอยจะสูงขึ้นตามลำดับ โดยเฉพาะแหล่งโปรตีนจากสัตว์ให้ผลผลิตสูงกว่าแหล่งโปรตีนจากพืช ดังนั้น คุณค่าจากแหล่งอาหาร

โปรตีนที่ได้รับมีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dunphy and Webster (1989) ซึ่งทำการศึกษารองค์ประกอบของอาหาร (nutritional components) ในการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยพบว่า ผลผลิตไส้เดือนฝอยขึ้นกับสารอาหารโปรตีนที่เหมาะสม โดยองค์ประกอบของอาหารในการเพาะเลี้ยง *S. carpocapsae* DD 136 ได้จากแหล่งไนโตรเจน (15 % Tryptic soy broth และ 5 % yeast extract) แหล่งคาร์บอน (14 % D-glucose) และ lipid (1 % sunflower oil) อย่างไรก็ตาม สารอาหารชนิดต่างๆ ยังมีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย โดย culture ที่มี stearic acid จากน้ำมันดอกทานตะวันเพิ่มผลผลิต *S. carpocapsae* และน้ำมันตับปลาเพิ่มผลผลิตให้กับ *H. heliothidis*

การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Heterorhabditis* sp. ซึ่งเป็นสายพันธุ์ไทยชนิดใหม่นั้น มีพื้นฐานและเทคนิคจาก Bedding (1981) ซึ่งเป็นผู้ที่พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารแข็งกึ่งเหลวในสภาพ monoxenic culture เป็นผลสำเร็จและเทคนิคการผลิตนี้ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง โดย Bedding ได้ทดสอบเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยสกุล *H. heliothidis* (New Zealand) ในอาหารแข็งกึ่งเหลวที่มีองค์ประกอบของไขมัน 60 % ไชมันส์ตอร์ 20 % และน้ำ 20 % ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 210 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร เมื่อนำผลผลิตไส้เดือนฝอยมาเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ไทยในอาหาร 1 ลิตร ของสูตรอาหารเดียวกัน พบว่าสายพันธุ์ไทยให้ผลผลิตสูงกว่าเท่ากับ 139 (349-210) ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร ดังนั้น ผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม ยังขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยด้วย

จากการทดสอบศักยภาพ (quality control, QC) ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยที่ผลิตได้จากอาหารแข็งกึ่งเหลวดัดแปลง 4 สูตร พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนทดสอบระหว่าง 70-80 % ในเวลา 48 ชม. ซึ่งค่า QC มีความแตกต่างเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงจากหนอนของแมลงอาศัย (host) ซึ่งทำให้ หนอนทดสอบตายได้ 85-90 % ในเวลาเท่ากัน

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยจึงเป็นสิ่งสำคัญของกระบวนการผลิต นอกจากนั้น การพัฒนาสูตรอาหารยังต้องคำนึงถึงต้นทุนองค์ประกอบของอาหารที่มีราคาถูก หาได้ง่าย และการเตรียมไม่ยุ่งยาก เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ไทยให้สามารถขยายผลไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ในอนาคต ซึ่งสูตรอาหารดัดแปลง MM2 เตรียมจากไข่ไก่ผสมน้ำมันหมู เป็นสูตรอาหารหาง่ายและมีราคาถูกสามารถเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยได้ดี ดังนั้น การนำสายพันธุ์ไทยเข้าสู่กระบวนการผลิตให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม จึงควรพัฒนาอย่างต่อเนื่องต่อไป

สรุปผลการวิจัย

1. วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทยภายในตัวหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) ณ อุณหภูมิห้อง ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เริ่มจากตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (infective juvenile, IJ หรือ J3) เข้าสู่ตัวหนอน มีการเจริญเติบโตจาก J3 ลอกคราบเป็น J4 และพัฒนาเป็นตัวเมียชนิด hermaphroditic female (1st generation) ให้ลูกเป็น J1 J2 และ J3 ตามลำดับ ใช้เวลา 6 วัน (144 ชม.) และ J3 จากแม่รุ่นที่ 1 นี้ เจริญเติบโตเป็น J4 พัฒนาเป็นตัวเมียชนิด amphimictic female (2nd generation) ผสมพันธุ์กับตัวผู้ ให้ลูกเป็น J1 J2 และ J3 ตามลำดับ ใช้เวลาต่ออีก 4 วัน จากนั้น J3 ปรับสภาพเป็น IJ รวมเวลาการขยายพันธุ์ภายในตัวหนอน 2 ชั่วโมง เท่ากับ 10 วัน (240 ชม.) หลังจากนั้นไส้เดือนฝอย IJ ทะยอยเคลื่อนที่ออกจากซากของหนอนทดสอบ นับจำนวนเฉลี่ยเท่ากับ 213,300 ตัวต่อหนอน 1 ตัว

2. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของ *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ภายในตัวหนอนกินรังผึ้ง อยู่ระหว่าง $25-30^{\circ}\text{C}$ มีการเจริญเติบโตขยายพันธุ์ภายในตัวหนอนได้ครบ 2 ชั่วโมง ให้ลูกในปริมาณสูง โดยที่อุณหภูมิต่ำ (15°C) และสูง (35°C) ไส้เดือนฝอยไม่เจริญเติบโตและขยายพันธุ์ และที่อุณหภูมิ 20°C มีการเจริญเติบโต-พัฒนาช้า ให้ลูกเพียงรุ่นเดียวที่มาจาก hermaphroditic female เมื่อตรวจเป็นเวลา 10 วัน

3. แยกได้แบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอย (symbiotic bacteria) จากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้งที่ถูกเข้าทำลายโดย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย เป็นเวลา 48 ชม. บนอาหาร NBTA โดยแบคทีเรียมีคุณสมบัติของการดุดสี BTB และมีรูปร่างลักษณะของโคไลนี จัดอยู่ในสกุล *Photorhabdus* sp.

4. ไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย มีความสามารถในการเคลื่อนที่เข้าสู่ช่องเปิดตามธรรมชาติของตัวหนอนและความรุนแรงในการทำให้หนอนเกิดโรคและตาย ในอัตราไส้เดือนฝอย 4 6 8 และ 10 ตัวต่อหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว สามารถฆ่าได้ 33 67 80 และ 93 % ตามลำดับ ในเวลา 48 ชม. หลังใส่ไส้เดือนฝอย

5. ไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย มีความทนทานต่ออุณหภูมิในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้ง เมื่อวางที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C สามารถฆ่าหนอนได้สูงที่สุด 88 และ 98 % ที่เวลา 48 ชม. หลังใส่ไส้เดือนฝอย

6. ไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย มีศักยภาพในการฆ่าแมลงทั้งระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัยรวม 15 ชนิด คือ หนอนบู่ขมพู หนอนเยื่อไผ่ หนอนกินรังผึ้ง หนอนเจาะผลมะเขือ หนอนเจาะผักกาด หนอนเจาะยอดกะหล่ำ หนอนกระทุ้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนต้นรัก หนอนกินไต้ผิว เปลือกลองกอง หนอนนก และแมลงกะซอน เท่ากับ 67 80 100 88 71 89 88 100 67 55 และ 50 % รวมทั้งมีศักยภาพในการฆ่าแมลงสาบตาย 30 % ที่เวลา 48 ชม. หลังใส่ไส้เดือนฝอย และการทดสอบศักยภาพ

ของไส้เดือนฝอยกับแมลงขนาดเล็ก ได้แก่ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยจักจั่นสีเขียว สามารถฆ่าได้เพียง 20 และ 11 % ตามลำดับ เมื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายที่เวลาเดียวกันหลังใส่ไส้เดือนฝอย

7. ไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวสภาพ monoxenic culture ที่มีองค์ประกอบโปรตีนจากสัตว์ 60 % ผสมไขมันจากสัตว์ (น้ำมันหมู) 20 % และน้ำ 20 % ให้ผลผลิตเท่ากับ 349 293 205 และ 182 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร ของสูตรโปรตีนจากไตหมู ไข่ไก่ เนื้อปลา และอาหารสุนัขสำเร็จรูป (รสตับ) ตามลำดับ และการใช้สูตรอาหารโปรตีนจากพืช (นมถั่วเหลือง 90 %) ผสมน้ำมันหมู 10 % ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอย 191 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 15 วันเท่ากัน

เอกสารอ้างอิง

- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2541 ก. ความก้าวหน้าของงานวิจัยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, น. 9-13. ใน จุลินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารประกอบการนิทรรศการ "งานเกษตรแฟร์" 31 มกราคม - 7 กุมภาพันธ์ 2541 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2541 ข. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทย *Steinernema thailandensis* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae). วารสารวิชาการเกษตร 16 (3) : 185-193.
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, พรพิมล อธิปัญญาคม และ สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช. 2543. งานวิจัยและพัฒนาไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. Thai isolate เพื่อควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี, หน้า 31-32. ใน ประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา ปี 2543 วันที่ 8-10 มีนาคม 2543 ณ โรงแรมลองบีช, เพชรบุรี.
- นิรนาม, 2544. คำแนะนำการป้องกันกำจัดโรคพืชด้วยสารเคมี. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 171 น.
- พากเพียร อรรถนารถ, นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิชิต ศิริสันธนะ และ สมคิด ดิสถาพร. 2543. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 10 (2) : 2-8.
- วัชรีย์ สมสุข. 2534. ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช, หน้า 182-197. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- อัจฉรา ตันติโชคก. 2534. แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช, หน้า 148-166. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- อินทวัฒน์ บุรีคำ. 2537. บทปฏิบัติการกีฏวิทยาทางการเกษตร. โรงพิมพ์รุ่งวัฒนา, กรุงเทพฯ. 243 หน้า.
- อุทัย เกตุนุติ. 2534. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส, หน้า 118-147. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

- Aguillera, M.M., N.C. Hodge, R.E. Stall and G.C. Smart Jr. 1993. Bacterial symbionts of *Steinernema scapterisci*. J. Invertebrate Pathol. 62 : 68-72.
- Akhurst, R.J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. J. Gen. Microbiol. 121 : 303-309.
- Akhurst, R.J. 1982. Bacterial Symbionts of Insect Pathogenic Nematodes of the Families Steinernematidae and Heterorhabditidae. Ph.D. thesis. University of Tasmania, Hobart.
- Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1988. A numerical taxonomy study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposal elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. J. Gen. Microbiol. 134 : 1835-1845.
- Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*, pp. 75-90. In R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Amarasinghe, L.D., W.M. Hominick, B.R. Briscoe and A.P. Reid. 1994. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in Sri Lanka. J. Helminthol. 68 : 277-286.
- Bedding, R.A. 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27 : 109-114.
- Bedding, R.A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. Ann. Appl. Biol. 104 : 117-120.
- Bedding, R.A. and A.S. Molyneux. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae : Nematoda). Nematologica 28 : 354-359.
- Bedding, R.A. and R.J. Akhurst. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematologica 21 : 109-110.

- Boemare, N.E. and R.J. Akhurst. 1988. Biochemical and hisiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). J. Gen. Microbiol. 134 : 751-761.
- Boemare, N.E., R.J. Akhurst and R.G. Mourant. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43 : 249-255.
- Bovien, P. 1937. Some types of association between nematodes and insects, p. 114. Cited by G.O. Poinar, Jr. Redescription of *Neoaplectana affinis* Bovien (Rhabditida : Steinernematidae). Revue de Nematologie Vol. 11. 5 p.
- Burman, M. 1982. *Neoaplectana carpocapsae* : toxin production by axenic insect parasitic nematodes. Nematologica 28 : 62-70.
- Burman, M., K. Abrahamsson, J. Ascard, A. Sjoberg and B. Eriksson. 1986. Distribution of insect parasitic nematodes in Sweden, p. 312. In R.A. Samson, J.M. Vlak and D. Peters (eds.). Proceedings, 4th International Colloquium of Invertebrate Pathology, Veldhoven, The Netherlands.
- Cabanillas, H.E., G.O. Poinar, Jr. and J.R. Raulston. 1994. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae) from Texas. Fundam. Appl. Nematol. 17 : 123-131.
- Campbell, J.F. and R. Gaugler. 1993. Nictation behavior and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). Behavior 126 : 155-169.
- Curran, J. 1991. Application of DNA Analysis to Nematode Taxonomy. Common wealth Scientific and Industrial Research Organization, Canberra, Australia. 215 p.
- Curran, J., D.L. Baille and J.M. Webster. 1985. Use of genomic DNA restriction fragment length differences to identify nematode species. Parasitol. 90 : 137-144.

- De Doucet, M.M.A. \ 1986. A new species of *Neoaplectana* Steiner, 1929 (Nematoda : Steinernematidae) from Cordoba, Argentina. *Revue de Nematologie* 9 : 317.
- De Doucet, M.M.A. and M. Doucet. 1990. *Steinernema ritteri* n.sp. (Nematoda : Steinernematidae) with a key to the species of the genus. *Nematologica* 36 : 257-265.
- Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1989. The monoxenic culture of *Neoaplectana carpocapsae* DD 136 and *Heterorhabditis heliothidis*. *Revue de Nematologie* 12 : 113-123.
- Dutky, S.R., J.V. Thompson, G.E. Cantwell. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *J. Insect Pathol.* 6 : 417-422.
- Ehlers, R.-U. 1995. Introduction of Non-endemic nematodes for biological control : scientific and regulatory policy issues. COST & OECD Workshop. Bruhnskoppel-Seminarhotel Malente, Germany. 17 p.
- Elawad, S.A., W. Ahmad and A.P. Reid. 1997. *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda : Steinernematidae) from the Sultanate of Oman. *Fundam. Appl. Nematol.* 20 (5) : 435-442.
- Elawad, S.A., S.R. Gowen and N.G.M. Hague. 1999. The life cycle of *Steinernema abbasi* and *S. riobrave* in *Galleria mellonella*. *Nematol.* 1 (7-8) : 762-764.
- Filipjev, I.N. 1934. Micellanea Nematologica 1. Eine neue Art der Gattung *Neoaplectana* Steiner nebst Bermerkungen uber die systematische Stellung der letzteren. (English translation from Russian). *Magazine de Parasitologie de l'Institut Zoologique de l'Academie de l'USSR* 4 : 229-239.
- Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development, pp. 153-172. In R. Gaugler and H.K.Kaya (eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Inc. Florida.

- Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Gardner, S.L., S.P. Stock and H.K. Kaya. 1994. A new species of *Heterorhabditis* from the Hawaiian islands. J. Parasitol. 80 : 100-106.
- Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 365 p.
- Georgis, R. 1981. Studies on *Neoaplectana carpocapsae* in the web-spinning larch sawfly, *Cephalcia lariciphila*. Ph.D. thesis, University of Reading, UK.
- Gerritsen, L.J.M. and K.C. Krasomil-Osterfeld. 1994. Characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* strains and form variants, pp. 194-203. In A.M. Burnell, R.U. Ehlers and J.P. Masson (eds.). COST 812 Biotechnology : Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes. Proceeding of symposium and workshop, St. Patrick's College, Manooth, Co. Kildare, Ireland.
- Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. Science 614.
- Glazer, I., H. Koltal, S. Zioni and D. Segal. 1994. Life cycle and reproduction in *Heterorhabditis*, pp. 80-89. In A.M. Burnell, R.U. Ehlers and J.P. Masson (eds.). Cost 812 Biotechnology, Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes. Maynooth, Co. Kildare, Ireland.
- Grewal, P.S., R. Gaugler, H.K. Kaya and M. Wusaty. 1993. Infectivity of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* (Nematoda : Steinernematidae). J. invertebrate Pathol. 62 : 22-28.
- Griffin, C.T., J.F. Moore and M.J. Downes. 1991. Occurrence of insect parasitic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in the Republic of Ireland. Nematologica 37 : 92-100.

- Hashmi, G., I. Glazer and R. Gaugler. 1996. Molecular comparisons of entomopathogenic nematodes using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Fundam. Appl. Nematol.* 19 (4) : 399-406.
- Haukeland, S. 1993. Entomopathogenic nematodes found in Norway. *Norwegian J. Agr. Sci.* 7 : 17-27.
- Jian, H., A.P. Reid and D.J. Hunt. 1997. *Steinernema ceratophorum* n. sp. (Nematoda : Steinernematidae) from north-east China. *Syst. Parasitol.* 37 : 115-125.
- Kaya, H.K. 1977. Development of DD-136 strain of *Neoaplectana carpocapsae* at constant temperature. *J. Nematol.* 9 : 346-349.
- Kaya, H.K. 1990. Soil ecology, pp. 93-115. In R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Klein, M.G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests, pp. 195-214. In R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Kozodoi, E.M. 1984. A new entomophagous nematode *Neoaplectana anomali* sp. n. (Rhabditida : Steinernematidae) and its biology. *Zoologicheskii Zhurnal* 63 : 1605-1909. (Abstract in English).
- Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol.1 Williams & Wilkins, Baltimore. 267 p.
- Liu, J. 1994. A new species of the genus *Heterorhabditis* from China (Rhabditida : Heterorhabditidae). *Acta Zootaxonomica Sinica* 19 : 268-272.

- Liu, J. and R.E. Berry. 1996 a. *Steinernema oregonensis* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae) from Oregon. Fundam. Appl. Nematol. 19 : 375-380.
- _____. 1996 b. *Heterorhabditis marelatus* n. sp. (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Oregon. J. Invertebrate Pathol. 67 : 48-54.
- Luc, P.V., K.B. Nguyen, A.P. Reid and S.E. Spiridonov. 2000. *Steinernema tami* sp. n. (Rhabditida : Steinernematidae) from Cat Tien Forest, Vietnam. Russian J. Nematol. 8 : 33-43.
- Mamiya, Y. 1988. *Steinernema kushidai* n.sp. (Nematoda : Steinernematidae) associated with scarabaeid beetle larvae from Shizuoka, Japan. Applied Entomol. Zool. 23 : 313-320.
- Mracek, Z. 1980. The use of "*Galleria traps*" for obtaining nematode parasites of insects in Czechoslovakia (Lepidoptera : Nematoda, Steinernematidae). Acta Entomologica Bohemoslovaca 77 : 378-382.
- Mracek, Z., E.A. Hernandez and N.E. Boemare. 1994. *Steinernema cubana* sp. n. (Nematoda : Rhabditida, Steinernematidae) and the preliminary characterisation of its associated bacterium. J. Invertebrate Pathol. 64 : 123-129.
- Nguyen, K.B. 1998. Taxonomy of entomopathogenic nematodes. [HTTP://GNV.IFAS.UFL.EDU/~KBN/stein.htm](http://GNV.IFAS.UFL.EDU/~KBN/stein.htm).
- Nguyen, K.B. and G.C. Smart. 1990. *Steinernema scapterisci* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae). J. Nematol. 23 : 187-199.
- _____. 1991. Mode of entry and sites of development of *Steinernema scapterisci* in mole crickets. J. Nematol. 23(2) : 267-268.
- Nguyen, K.B. and G.C. Smart. 1992 a. Life cycle of *Steinernema scapterisci* Nguyen & Smart, 1990. J. Nematol. 24(1) : 160-169.

- _____. 1992 b. *Steinernema neocurtillis* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae) and a key to the genus *Steinernema*. J. Nematol. 24(4) : 463-477.
- _____. 1994. *Neosteinerema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). J. Nematol. 26 : 162-174.
- _____. 1996. Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata : Rhabditida). J. Nematol. 28(3) : 286-300.
- Paul, V.J., S. Frautschy, W. Fenical and K.H. Neelson. 1981. Antibiotics in microbial ecology : Isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. J. Chem. Ecol. 7 : 589.
- Poinar, G.O., Jr. 1972. Nematodes as facultative parasites of insects. Ann. Rev. Entomol. 17 : 103-122.
- _____. 1976. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. fam.). Nematologica 21 : 463-470.
- _____. 1979. Nematodes for Biological Control of Insect Pests. CRC Press, Boca Raton., 143 p.
- _____. 1985. *Neoaplectana intermedia* n.sp. (Steinernematidae : Nematoda) from South Carolina. Revue de Nematologie 8 : 321.
- Poinar, G.O., Jr. 1986. Recognition of *Neoaplectana* species (Steinernematidae : Rhabditida). Proc. Helminthol. Soc. Wash. 53 : 121-129.

- _____. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae, pp. 23-61. In R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Poinar, G.O., Jr. and E.M. Kozodoi. 1988. *Necaplectana glaseri* and *N. anomali* : sibling species or parallelism. *Revue de Nematologie* 11 : 13-19.
- Poinar, G.O., Jr. and G.M. Thomas. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae : Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoplectana* sp. Steinernematidae). *Parasitol.* 56 : 385-390.
- _____. 1967. The nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen. *J. Invertebrate Pathol.* 9 : 510.
- Poinar, G.O., Jr., G.K. Karunakar and H. David. 1992. *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida : Nematoda) from India : separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. *Fundam. Appl. Nematol.* 15 : 467-472.
- Poinar, G.O., Jr., T. Jackson and M. Klein. 1987. *Heterorhabditis megidis* sp. n. (Heterorhabditidae : Rhabditida) parasitic in the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Scarabaeidae : Coleoptera), in Ohio. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 54 : 53-59.
- Reid, A.P. and W.M. Hominick. 1992. Restriction fragment length polymorphisms within the ribosomal DNA repeat unit of British entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae). *Parasitol.* 105 : 317-323.
- Roman, J. and W. Figueroa. 1994. *Steinernema puertoricensis* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Puerto Rico. *J. Agr. Univ. Puerto Rico* 78 : 167-175.

- Shen, C.P. 1992. Description of a entomopathogenic nematode, *Steinernema longicaudum* sp. nov. and its application, pp. 220-231. In Proceedings of the 19th International Congress of Entomology, Beijing, China.
- Siddiqi, M.R. 1986. Tylenchida : Parasites of Plants and Insects. Slough, United Kingdom, Common-wealth Agricultural Bureaux, London. 645 p.
- Steiner, G. 1923. *Aplectana kraussei* n.sp. der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematodenform, nebst Bemerkungen über das Steitenorgan der parasitischen Nematoden, p. 24. In R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- _____. 1929. *Neoaplectana glaseri*, n.g., n.sp. (Oxyuridae), a new nemtic parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.). J. Wash. Acad. Sci. 19 : 436.
- Steiner, W.A. 1994. Distribution of Entomopathogenic Nematodes in the Swiss Alps. CH-8820 Wadenswill. 268 p.
- Stock, S.P. 1993. A new species of the genus *Heterorhabditis* Poinar, 1975 (Nematoda : Heterorhabditidae) parasitizing *Graphognathus* sp. larvae (Coleoptera : Curculionidae) from Argentina. Research and Reviews in Parasitol. 53 : 103-107.
- Stock, S.P., H.Y. Choo and H.K. Kaya. 1997. An entomopathogenic nematode, *Steinernema monticolum* sp.n. (Rhabditida : Steinernematidae). Nematologica 43 : 15-30.
- Stock, S.P., V. Somsook and A.P. Reid. 1998. *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. Systematic Parasitol. 41 : 105-113.
- Stoll, N. 1953. Axenic cultivation of the parasitic nematode, *Neoaplectana glaseri*, in a fluid medium containing raw liver extract. J. Parasitol. 39 : 422.

- Tallosi, B., A. Peters and R.U. Ehlers. 1995. *Steinernema bicornutum* sp.n. (Rhabditida : Nematoda) from Vojvodina, Yugoslavia. Russian J. Nematol. 3(2) : 71-77.
- Tangchitsomkid, N. 2000. A new entomopathogenic nematode (Rhabditida : Steinernematidae) in Thailand : Taxonomy, biology and its potential for biological control. Ph.D. thesis, Kasetsart University, Bangkok.
- _____. 2002. *Steinernema thailandense* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae) in Thailand : taxonomy and biology. Nematol. (in press).
- Vanninen, I., G.B. Husberg and M.T. Hokkanen. 1989. Occurrence of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in cultivated soils in Finland. Acta Entomologica Fennica 53 : 65-71.
- Waturu, C.N., D.J. Hunt and A.P. Reid. 1997. *Steinernema kari* sp.n. (Nematoda : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Kenya. International J. Nematol. 7(1) : 68-75.
- Weiser, J. 1955. *Neoplectana carpocapsae* n.sp. (Anguillulata, Steinernematinae), nový cizopasník housenik obalece jablecneho. *Carpocapsa pomonella* L., Vestník Československe Zoologicke Spolecnosti 19 : 44-52.
- Wouts, W.M. 1979. The biology and life cycle of a New Zealand population of *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae). Nematologica 25 : 191-202.
- Xu, Z., G. Wang and X. Li. 1991. A new species of genus *Steinernema* (Rhabditida : Steinernematidae). Zoological Research 12 : 17-20.
- Yoshida, M., A.P. Reid, B.R. Briscoe and W.M. Hominick. 1998. Survey of entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Japan. Fundam. Appl. Nematol. 21 (2) : 185-198.

Outputs ที่ได้จากโครงการ

1. ได้องค์ความรู้ใหม่ทางด้านชีววิทยาและศักยภาพของไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ซึ่งประกอบด้วยองค์ความรู้ในเรื่อง ระยะเวลาเจริญเติบโตและลักษณะการขยายพันธุ์ของตัวเต็มวัย ครบวงจรชีวิตภายในตัวแมลง เริ่มตั้งแต่ไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายจนถึงออกจากตัวแมลงอาศัยรวม 10-11 วัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเข้าทำลายแมลงและขยายพันธุ์อยู่ระหว่าง 25-30 °ซ แยกได้แบคทีเรีย *Photorhabdus* sp. ซึ่งเป็น symbiotic bacteria ร่วมกับไส้เดือนฝอย นำไปเก็บเป็น stock culture เพื่อการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมสภาพ monoxenic ไส้เดือนฝอยมีความสามารถในการค้นหาช่องเปิดตามธรรมชาติของแมลง และมีความรุนแรงในการฆ่าแมลงในเวลา 48 ชม. ตายสูงสุด 93 % ในอัตราไส้เดือนฝอย 10 ตัวต่อหนอนทอดสอบ 1 ตัว มีศักยภาพในการกำจัดแมลงศัตรูสำคัญได้หลายชนิดโดยเฉพาะในกลุ่มหนอนผีเสื้อตาย 67-100 % ในเวลา 48 ชม. ความรู้พื้นฐานทางด้านชีววิทยาและศักยภาพของไส้เดือนฝอย เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญต่อการพิจารณาตัดสินใจนำไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ไปพัฒนาขยายผลสู่ภาคเกษตรและอุตสาหกรรม ซึ่งจากผลงานวิจัยดังกล่าว ได้นำไส้เดือนฝอยชนิดนี้ไปขยายผลต่อเนื่องในโครงการ "การพัฒนาระบบการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่ายเพื่อถ่ายทอดสู่เกษตรกร" โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากฝ่ายเกษตร (สกว.) ในปี 2544-2547

2. ไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สามารถเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยได้ในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว สูตรที่มีส่วนผสมจากแหล่งอาหารโปรตีน 60 % ไขมันสัตว์ 20 % และน้ำ 20 % ใช้เวลาเพาะเลี้ยง 15 วัน เป็นข้อมูลการพัฒนาไส้เดือนฝอยให้ขยายปริมาณเพียงพอในการนำไปใช้ในสภาพไร่นา เกิดประโยชน์ต่อการพัฒนางานไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงของประเทศไทยทั้งในดานองค์ความรู้ทางวิชาการและการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อภาคเกษตร ซึ่งในอนาคตมีแนวโน้มสูงในการนำไปขยายผลในภาคอุตสาหกรรม ให้สามารถผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ bio-pesticide จำหน่ายเป็นการค้าได้

3. การตีพิมพ์เผยแพร่ จำนวน 2 เรื่อง คือ

เรื่องที่ 1 Life Cycle of Entomopathogenic Nematode, *Heterorhabditis* sp.,

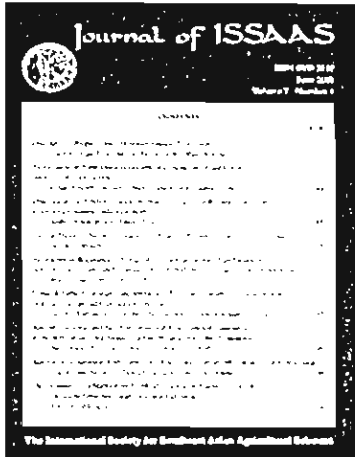
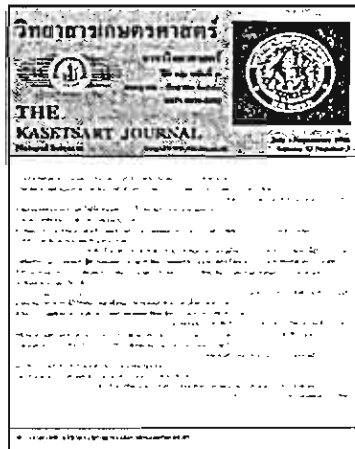
Isolated from Thailand ใน **Journal of ISSAAS**

เรื่องที่ 2 Mass Rearing in Semi-solid Culture of an Entomopathogenic Nematode,

Heterorhabditis sp. Thai Isolate ใน **Kasetsart Journal**

הכנתה

แผนการส่งผลงานวิจัยลงตีพิมพ์ในวารสาร

ต้นฉบับเรื่อง	ชื่อวารสาร	ส่งต้นฉบับเมื่อ
Life cycle of entomopathogenic nematode, <i>Heterorhabditis</i> sp., isolated from Thailand (manuscript จำนวน 14 หน้า)		มีนาคม 2545
Mass rearing in semi-solid culture of an entomopathogenic nematode, <i>Heterorhabditis</i> sp. Thai isolate (manuscript จำนวน 8 หน้า)		สิงหาคม 2545

**LIFE CYCLE OF ENTOMOPATHOGENIC
NEMATODE, *HETERORHABTIDIS* SP., ISOLATED
FROM THAILAND**

Nuchanart Tangchitsomkid and Somkid Disthaporn

Nematology Section, Plant Pathology and Microbiology Division,
Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900, THAILAND

ABSTRACT

Heterorhabditis sp., a Thai nematode isolate was developed for use in controlling insect pests of plants. The nematode was isolated from the soil collected at Roi Et province. Its biological characters were studied including its life cycle within the host insect (*Galleria mellonella*), and influence of temperature on its growth and reproduction within the insect. Results from studying on its life cycle at room temperature ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) revealed that the juveniles molted four times successively to be 1-, 2-, 3-, and 4- stage juveniles, then to be the male/female adult. The female adult could be either hermaphroditic or amphimictic female. The first generation infective juvenile (IJ) produced from the hermaphroditic female completed its life cycle in 6 days (144 hours) within the host insect. The amphimictic female then produced the second generation IJ which

could complete its life cycle in 4 days. After ten days, the IJs gradually moved out of the dead body of the host insect. The average number of reproduced IJ in one insect was 213,300. Low and high temperatures at 15°C and 35°C caused the nematode to stop growing and reproducing. It slowly developed at 20°C and produced only one generation of IJ from hermaphroditic female within ten days. The optimum temperature for its growth and reproduction was between 25°C and 30°C.

key words - entomopathogenic nematode, life cycle, *Heterorhabditis* sp., biological control

INTRODUCTION

Entomopathogenic nematodes in the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* are associated with the symbiotic bacteria in the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* which are obligate parasites of the insects (Akhurst and Boemare, 1990). *Steinernema* and *Heterorhabditis* are becoming accepted as biological control agents, especially against insects in the soil environment. They have survived the tests of production, application, field efficacy, and safety standards. A number of commercial enterprises worldwide are now producing them (Poinar, 1990). The searching of new

entomopathogenic nematodes have been conducted in many parts of the world. Several species are currently under evaluation for mass production and field efficacy for biological control of insect pests. The ability of nematodes which differ among species or strain, leads to the beginning of the bio-control. Thailand is situated in the tropical region of the world and the insects are of the most damaging pests causing losses in many crops. The control of insect is undertaken by using hazardous chemicals which adversely affects human and environments. Consequently, the search for indigenous strains of entomopathogenic nematodes in Thailand has been commenced in 1996 under a financial support of the Thailand Research Fund (TRF). The entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis* sp. is one of several isolates obtained from the soil surveys during June 1996 - March 1998. It was isolated from the soil collected from eastern Thailand. The soil containing the nematode was maintained at the temperatures of 26°C (at 10-15 cm deep from the soil surface) and 34 °C (at the soil surface) (Tangchitsomkid and Sontirat, 1998). A comprehensive knowledge of the nematode's life cycle and pathogenicity in the insect is needed as a prerequisite for genetic studies aiming at enhancing the nematode's performance under field conditions. The objectives of this study were to describe the life cycle of *Heterorhabditis* sp. isolated from Thailand, and to determine the influence of temperature on its life cycle.

MATERIALS AND METHODS

Life cycle

A piece of 1 x 1.5 cm filter paper (Whatman # 2) was placed into a 1.5 ml microtube which is later covered with a center-punctured lid. One hundred infective juveniles of *Heterorhabditis* sp. -Thai isolate in 25 μ l of water were inoculated onto the filter paper. A wax moth larva, *Galleria mellonella* was placed in the microtube on the filter paper and then incubated at 26 ± 2 °C. The growth development of the nematode was observed at 24 hours intervals by dissecting 5 insect larvae daily and measuring the body length of all stages of the nematode under the microscope until the nematode's life cycle was completed.

Influence of temperature on the life cycle

To determine the influence of temperature on the life cycle, five larvae of *G. mellonella* were placed in a Petri dish (100 x 15 mm) and exposed to 300 infective-stage juveniles of the nematode. Five Petri dishes containing wax moths infected with the nematode were placed in the incubation chambers at 15, 20, 25, 30 and 35°C. After 24 hours, 3 insect larvae from each treatment were dissected daily and the life stages of the nematode were determined.

RESULTS

Life cycle

Heterorhabditis sp. -Thai isolate killed the insect larva within 24-48 hours after the insect was infected and the color of the insect's body changed from the typical grey to brick-red.

The life cycle of *Heterorhabditis* sp. -Thai isolate was initiated *in vivo* from infective-stage juveniles. At room temperature ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$), it revealed that the infective juveniles molted four times successively and became to be 1-, 2-, 3-, and 4- stage juveniles, then to be male/female adults. The female adult could be either hermaphroditic or amphimictic female. The first generation infective juvenile (IJ) which was produced from the hermaphroditic female completed its life cycle in 6 days within the host insect. The amphimictic female then produced the second generation IJ which could complete its life cycle in 4 days. After ten days, the IJ gradually moved out of the dead body of the host insect. The average number of reproduced IJ in one insect was 213,300.

Description of life cycle (Figure 1)

At 24 hours, the IJs invaded the host insect through the mouth or spiracles of the insect, and penetrated into the haemocoel. The average number of IJs in one insect was 37. The insect infected with IJs appeared to be weak and moved slowly.

At 48 hours, IJs molted to the fourth-stage juveniles (J4s). The body length and width of J4s were 1,279 and 70 μ l, respectively. The average numbers of IJs and J4s in one insect were 25 and 21, respectively.

At 72 hours, J4s developed to the young females within 48-72 hours. Then the young females developed to be the first generation adult females or hermaphroditic females in 72 hours after entering the host. The body length and width of the adult females were 1,776 and 160 μ l, respectively.

At 96 hours, hermaphroditic females developed the reproductive system. An individual female consisted of both functional male and female reproductive organs. The female adult laid eggs initially, but later the eggs were retained and hatched in her body.

At 120 hours, the first-stage juveniles (J1s) appeared in the mother's body. Their average body length and width were 335.4 and 15.7 μ l, respectively. Then the J1s molted, broke out of the female's body and moved into the haemocoel of the insect. Some of the J1s molted to the second-stage juveniles (J2s). Their average body length and width were 507.0 and 21.6 μ l, respectively.

At 144 hours, in the body of the host insect, dead bodies of the hermaphroditic female were found and the living J1s moved out of the dead body. At this time, the number of J1, J2 and J3 were numerous in the insect's body.

At 168 hours or during 144-168 hours, all stages of the nematode were rapidly developed. J4 developed to become the young and adult amphimictic female. Second generation adult was much smaller than the first generation one. At this times the first male appeared, the male and female mated, and then the female laid eggs.

At 192 hours, the eggs hatched within the female's body. The J1 broke out of it's dead mother and moved into the haemocoel of the insect. Then the J1 molted to the J2 which later became preinfective and the preinfective J2 molted to the IJ.

At 216 and 240 hours, J3s were found inside the insect's body. The IJs left the insect cadaver and sought for the new hosts.

Influence of temperature on the life cycle

Temperature was found influencting the growth rate and maturation of *Heterorhabditis* sp. in *G. mellonella*. Low and high temperatures at 15°C and 35°C caused the nematode to stop growing and reproducing. It slowly developed at 20°C and produced only one generation of IJ from the hermaphroditic female within ten days. The optimum temperature for its growth and reproduction was between 25°C and 30°C.

At 15°C, the average number of IJs entering the insect's body was 2 %. Results from daily dissections of the host insects showed

that growth and development to the adult stage was not found. The IJ could survive in the insect but could not develop further.

At 20°C, the average number of IJs entering the insect's body was 15 %. The nematode was poorly developed. The J4 first appeared at 2 days after infection and developed to hermaphroditic female in the fourth day. The hermaphroditic female produced the first generation IJ in 7 days and the first generation IJ was slowly developed to J1, J2, J3 and J4. In ten days, the amphimictic male and female were not observed.

At 25°C, the average number of IJs entering the insect's body was 38 %. The IJ developed to be J4 within 2-3 days. The hermaphroditic female first appeared in 3 - 4 days. The first generation juveniles including J1, J2, J3 and J4 appeared on the fifth day. On the 6th, 7th and 8th days, four juvenile stages and amphimictic adults were observed and the adults mated and laid eggs. On the 9th and 10th days after infection, the IJ left the insect cadaver.

At 30°C, the average number of IJs entering the insect's body was 22 %. At this temperature, the nematodes developed well. The IJs molted to J4s and then developed into hermaphroditic females in 3 days after exposure to the hosts. J1, J2 and J3 from the first-generation females first appeared on the 4th and 5th days. On the 6th day, the second generation juveniles were observed. The IJs moved out of the insect cadaver since the 8th day.

At 35°C, the average number of IJs entering the insect's body was 5 %. IJs molted to J4s in 2 days. But the J4s did not develop to adults on the 3rd, 4th, and 5th days. On the 6th day, every stages of the nematode was not observed in the insect. This temperature affected the development cycle of the nematode.

It was shown from the results that optimum temperature ranging from 25°C to 30°C could enhance the growth and maturation of *Heterorhabditis* sp. -Thai isolate

DISCUSSIONS

The life cycle of *Heterorhabditis* sp. -Thai isolate is similar to those of all other *Heterorhabditis* sp. already described (Glazer *et al.*, 1994). The adult females are hermaphroditic in the first generation and amphimictic female in the second generation. The third-stage infective juveniles enter the haemocoel of the insect to deliver the associated bacterium and complete at least two generations before emerging from the cadaver as infective juveniles. *Heterorhabditis* sp. -Thai isolate is one of the heterorhabditids so far isolated from the tropical region. The results from the present experiments revealed that the parasitic period lasted 11 days from the moment IJs entered the insect to the time when new IJs were formed. During this phase, there was a succession of two generations : the first generation with hermaphrodites (3-4 days after the death of the insect);

the second generation with females and males (6-7 days) and amphimictics. This is the shortest life cycle of heterorhabditids so far reported. The comparable short-life cycled heterorhabditid is *H. bacteriophora*. It was reported in Oliva, Argentina that the IJs of *H. bacteriophora* developed to be the new generation of IJs with 15 days after the death of *G. mellonella* (Koltai *et al.*, 1995).

Although entomopathogenic nematodes were found to be natural enemies of more than 200 species of the insects, the infection severity, growth and development, and multiplication of the nematodes still depend on their species and subspecies (Poinar, 1979). The period of time to complete the life cycle of the entomopathogenic nematode depends also upon the species of the host insect because it provides nutritions for growth, development and multiplication of the parasitic nematode. Studying on the life cycle of the potential entomopathogenic nematode in the targeted insect pest is essential for the development of practical and efficient control of the pest.

In this experiment, the effect of different temperatures on infection ability of infective juveniles of *Heterorhabditis* sp. -Thai isolate was determined. It was found that the temperature affected the number of infecting nematodes as well as the mortality of the test insect. The numbers of infective juveniles found in the test insects at 15, 20 and 35°C were less than those found at 25 and 30°C. The greatest average number of infective juveniles in one insect was 114 at

25°C. Its life cycle was shown to be completed at the temperature ranging from 25°C to 30°C. The optimum temperature was approximately 30°C, particularly in the insect where it developed to hermaphroditic female within 3 days and completed its life cycle in 4-5 days after initial infection. Its life cycle was not completed at lower temperature (15°C) or at higher temperature (35°C) due to survival in capability of the invading IJs.

The understudied *Heterorhabditis* sp. –Thai isolate from Roi Et province is not as heat tolerable as *Steinernema* sp. isolated from Kanchanaburi province which was reported to be still infective at 38°C (Tangchitsomkid, 2000). However, these two reported Thai entomopathogenic nematodes are biologically different. It is fundamental to study on the biological characteristics of any potential entomopathogenic nematode isolates to be able to develop them further for practical and efficient control applications.

ACKNOWLEDGEMENT

The author is grateful to the Thailand Research Fund (TRF) for financial support.

REFERENCES

- Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*, pp. 75-90. In R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Glazer, I., H. Koltai, S. Zioni and D. Segal. 1994. Life cycle and reproduction in *Heterorhabditis*, pp. 80-89. In A.M. Burnell, R.U. Ehlers and J.P. Masson (eds.). Cost 812 Biotechnology, Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes. Maynooth, Co. Kildare, Ireland.
- Koltai, H., I. Glazer and D. Segal. 1995. Reproduction of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976 : hermaphroditism vs amphimixis. Fundam. Appl. Nematol. 18(1) : 55-61.
- Poinar, G.O., Jr. 1979. Nematodes for Biological Control of Insect Pests. CRC Press, Boca Raton., 143 p.
- Poinar, G.O., Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae, pp. 23-61. In R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Tangchitsomkid, N. 2000. A new entomopathogenic nematode (Rhabditida : Steinernematidae) in Thailand : Taxonomy,

biology and its potential for biological control. Ph.D. thesis,
Kasetsart University, Bangkok.

Tangchitsomkid, N. and S. Sontirat. 1998. Occurrence of
entomopathogenic nematodes in Thailand. Kasetsart J.
(Nat. Sci.) 32 : 347-354.

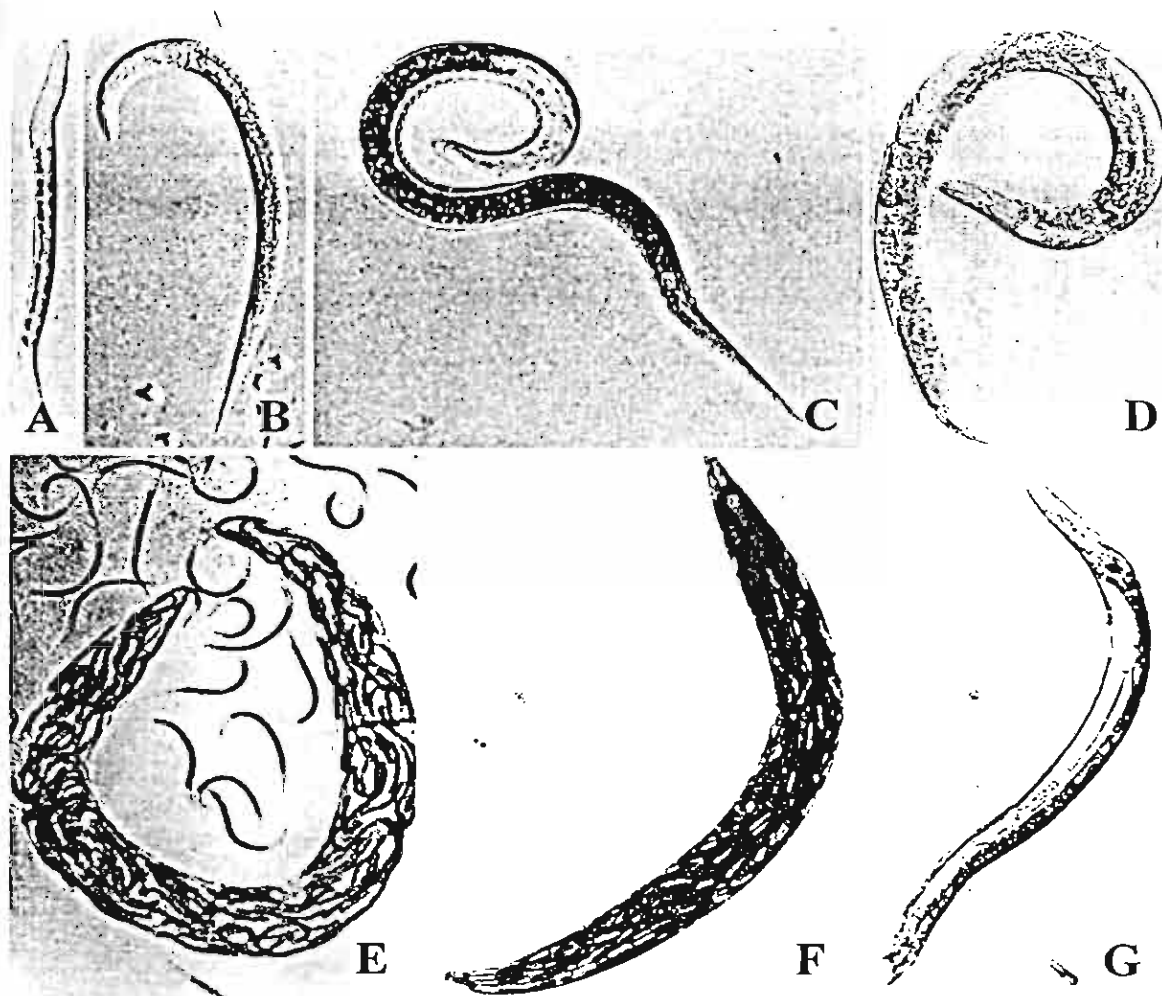


Figure 1 Growth stages of *Heterorhabditis* sp. -Thai isolate :
 A) first-stage juvenile; B) second-stage juvenile;
 C) third-stage juvenile; D) fourth-stage juvenile;
 E) hermaphroditic female; F) amphimictic female;
 and G) male.

Mass Rearing in Semi-solid Culture of an Entomopathogenic Nematode,

Heterorhabditis sp. Thai Isolate

Nuchanart Tangchitsomkid and Somkid Disthaporn

Nematology Section, Plant Pathology & Microbiology Division,

Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900 THAILAND

ABSTRACT

Entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis* sp. -Thai isolate was multiplied in semi-solid monoxenic culture media containing 60% animal protein, 20% lard, and 20% water. The yields of 349, 293, 205 and 182 million nematodes per one litre of medium were obtained from the media containing protein, pigs kidney, chicken egg, tuna fish meat, and canned dog's food (kidney flavor), respectively. The medium containing plant protein (90% soybean milk) and 10% lard, also yielded 191 million nematodes per one litre of the medium within 15 days. This experiment indicated that the cost of nematode production using soybean milk, tuna fish meat, chicken egg, and canned dog's food, was 20, 35, 40, and 40 baht per litre, respectively. While the cost of pigs kidney medium was 60 baht per litre and more difficult in preparation. The nematodes can be produced in large scale with low cost in soybean milk, tuna fish meat, chicken egg, and canned dog's food media.

Key words : entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis* sp., Thai isolate, mass rearing, semi-solid media

INTRODUCTION

Entomopathogenic nematodes of families Heterorhabditidae and Steinernematidae are obligate parasites of insects and are potential biological control agents of insect pests (Poinar, 1990). Large numbers of nematodes are required for successful treatment of insect pests in the field. Shearer (1999) showed that about 1,000-2,000 million *Heterorhabditis bacteriophora* per acre would be required to effectively treat black vine weevil on strawberries. Consequently the nematodes must be produced in very large numbers and at low cost if they are to be economically effective. Commercialisation of nematodes, which have been widely used against various soil-inhabiting pests, is dependent on an efficient mass rearing and storage. A major constraint in the commercial development of these nematodes was overcome by inexpensive, monoxenic *in vitro* mass rearing methods. The nematodes grows monoxenically with the symbiotic bacteria on sponge culture (Bedding, 1981, 1984; Wouts, 1981) or in a liquid medium system (Pace *et al.*, 1984; Friedman, 1990). Although the nematodes can be mass reared on artificial media, several parameters such as medium components, temperature (Dunphy and Webster, 1989), inoculum size, culture time (Han *et al.*, 1993) and strain of nematode are critically important for efficient production. Factors that affect nematode yields should be adjusted simultaneously to be reliable, maximal harvest of infectives and at the low cost.

The objective of this paper is to produce a new Thai nematode isolate, *Heterorhabditis* sp. (Tangchitsomkid and Sontirat, 1998) on the mass rearing with inexpensive semi-solid media following the Bedding's method (1981). The data can used as a appropriate media formulate for the mass production of Thai isolate nematode.

MATERIALS AND METHODS

Nematode inoculum

Heterorhabditis sp., Thai isolate was obtained by exposing the larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella*) to 1,000 infective juveniles in 9 cm Petri dishes lined with two filter papers (Whatman No.2). Twenty wax moths were released in each Petri dish and all dishes were maintained in an incubator at 26-28 °C. Two days after exposure, the cadavers were transferred to the White's water trap. Ten days later, infective-stage juveniles were extracted from the cadavers into the water trap. The infective juveniles were surface sterilized with 0.1 % hyamine for 15 minutes and gravity washed for three times with distilled water by using a high speed microcentrifuge at 8,000 rpm/min.

Bacterial inoculum

The primary form of *Photorhabdus* sp. was isolated from infected *G. mellonella* by *Heterorhabditis* sp., Thai isolate on NBTA medium (37 g nutrient agar, 25 mg bromthymol blue, 1,000 ml distilled water, 4 ml sterile filtrated 1% 2,3,5 triphenyl-tetrazolium chloride solution) with sterile loop. The Petri dishes were maintained in an incubator at 28°C. After 48 hours, single colonies of the bacteria were subcultured by streaking them onto a nutrient agar (8 g nutrient broth, 15 g agar, 1,000 ml distilled water) at 26 °C for approximately 48 hours. These colonies were transferred onto glycerol medium (4 g nutrient broth, 150 ml glycerin, 500 ml distilled water) in 2 ml cryogenic vials and stored at -30 °C.

Culture media

The five media formula were componented as follows :

Media formular	Components	Price/litre (baht)
1. BDM*	60% Pigs' kidney, 20% Lard, 20% Distilled water	60
2. MM1**	90% Soybean milk, 10% Lard, 20% Distilled water	20
3. MM2	60% Chicken egg, 20% Lard, 20% Distilled water	40
4. MM3	60% Tuna fish meat, 20% Lard, 20% Distilled water	35
5. MM4	60% Canned dog food, 20% Lard, 20% Distilled water	40

* BDM : medium formula of Bedding (1981)

** MM1, MM2, MM3, and MM4 : modified medium 1, 2, 3, and 4

The media culture were prepared as follows : Either pigs' kidneys, soybean milk, chicken egg, tuna fish meat or dog food and water were homogenized thoroughly before adding and blending melted lard. The homogenate was added to the 1 cm³ sponge size and evenly distributed. About 30 g homogenate was added to 250 ml Erlenmeyer flasks. The necks were cleaned and closed with lightly rolled bungs of non-absorbent cotton wool covered with aluminium foil and autoclaved at 121 °C for 20 min.

Experiment procedures

The bacterial colonies were removed from the -30 °C storage and subcultured into 125 ml Erlenmeyer flasks filled with 20 ml nutrient broth under continuous agitation for 24 hours. Each medium culture was inoculated with 1 ml of broth. The culture were incubated at 26±2°C for 24 hours and then inoculated with 20,000 infective juveniles per flask. All cultures were incubated at 26±2°C for 15 days.

Harvesting

All nematode cultures were harvested at 15 days post inoculation by crushing sponge in the tap water three or four times. The nematodes in each media culture were released from sponge. The total collective number of nematodes per flask were average from three times counting of the sampling suspension. Each culture was replicated five times.

RESULTS AND DISCUSSION

Yields of nematodes were estimated by counting infective juveniles in five samples from modified media; MM1, MM2, MM3 and MM4 compared with BDM. The number of infective juveniles produced in 30 g medium of protein source, pigs' kidneys, soybean milk, chicken egg, tuna fish meat and dog food as shown in Table 1. Production of infective juveniles was very high in modified media MM2 containing 60% chicken egg. By contrast, the yield of nematodes in MM1 and MM4 media containing soybean milk and dog food was lower than the other media. The major components of MM2 and MM3 gave high protein which are necessary for the production of nematode progeny. Chicken egg and tuna fish meat were the supplemented media, both of these media differently supported greater nematode

Table 1 Number of infective juveniles of a new Thai strain of *Heterorhabditis* sp. after 15 days on 30 g of different media.

Media	No. of infective juveniles/30 g media (N=5)
BDM	10.6×10^6
MM1	5.8×10^6
MM2	8.9×10^6
MM3	6.2×10^6
MM4	5.5×10^6

reproduction than did the dog food and soybean milk medium. It confirms the report of Dunphy and Webster (1989) that yeast extracts are a nitrogen source which stimulate the reproduction of nematode.

The bacterial symbionts are essential for successful mass culture production of nematodes. These bacteria proliferate on artificial media and the nematodes feed on the bacterial cells and other necessary nutrients to reproduce large numbers of offsprings.

Throughout the study, as exemplified by the data from the modified media, monoxenic cultures of the Thai nematode isolate exhibited qualitative and quantitative differences in their responses to many of the modified media. This may reflect species differences in nematode and/or bacteria metabolism and differences in the nematode-bacterium metabolic association.

The cost of the production of nematodes on larvae of wax moth (*Galleria mellonella*), or on dog biscuit, was \$US 1 per million nematodes (Poinar, 1972). This experiment showed that the cost of nematode production using chicken egg, and tuna fish meat was 40 and 35 baht per litre, respectively. The total yield was 200-300 million nematodes per one litre. Consequently, the nematodes can be produced in a large scale with low cost.

The monoxenic culture can be used as a guideline for *Heterorhabditis* sp. and other nematodes to obtain more reliable productions and greater yields of all stages of the Thai entomopathogenic nematodes *in vitro* culture. The techniques are suitable for industrial use with little further development.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support by the Thailand Research Fund (TRF).

REFERENCES

- Bedding, R.A. 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27 : 109-114.
- Bedding, R.A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Ann. Appl. Biol.* 104 : 117-120.
- Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1989. The monoxenic culture of *Neoaplectana carpocapsae* DD 136 and *Heterorhabditis heliothidis*., *Revue de Nematologie* 12 : 113-123.
- Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development, pp. 153-172. *In* R. Gaugler and H.K.Kaya (eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Inc. Florida.
- Han, R. C., L. Cao and X. Liu. 1993. Effects of inoculum size, temperature and time on *in vitro* production of *Steinernema carpocapsae* Agriotos. *Nematologica* 39 : 366-375.
- Pace, W.G., G. Wilfred, P.D. Edward and P.J. Margaret. 1984. Liquid culture of nematodes. Australian Patent, DCT/AU85/00199.
- Poinar, G.O., Jr. 1972. Nematodes as facultative parasites of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 17 : 103-122.
- _____. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae, pp. 23-61. *In* R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Shearer, P.W. 1999. Insect parasitic nematodes for Strawberry pest management. Extension Specialist in Tree Fruit Entomology, Department of Extension Specialista Cook College, Rutgers, The State University of New Jersey, New Jersey. 3 p.
- Tangchitsomkid, N. and S. Sontirat. 1998. Occurrence of entomopathogenic nematodes in Thailand. *Kasetsart J.* 32 : 359-366.

**DEVELOPMENT OF A THAI STRAIN OF HETERORHABDITIS SP.
FOR INSECT PEST CONTROL**

NUCHANART TANGCHITSOMKID AND SOMKID DISTHAPORN

**PLANT PATHOLOGY AND MICROBIOLOGY DIVISION
DEPARTMENT OF AGRICULTURE**