



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสำรวจเก็บรวบรวมและจำแนกชนิดไม้ดั้งเดิมผจญศัตรูแมลงในประเทศไทย

โดย

บุษนากร ดั่งจิตสมคิด

มิถุนายน 2543

สัญญาเลขที่ RDG 4120017

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การสำรวจเก็บรวบรวมและจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย

ผู้วิจัย

บุษนารถ ดั่งจิตสมคิด

กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

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) อุดรธานี (AY) กาฬสินธุ์ (KS) มหาสารคาม (MK) ขอนแก่น (KK) หนองคาย (NK) และสระแก้ว (SK) รวม 8 ไอโซเลต และได้ไส้เดือนฝอย heterorhabditid แยกได้จากจังหวัดร้อยเอ็ด (RE) 1 ไอโซเลต 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) โดยศึกษารูปร่าง ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่ามีรูปร่างลักษณะแตกต่างจากไส้เดือนฝอย *Steinernema* species 23 ชนิด โดยพิจารณาจากลักษณะสำคัญของไส้เดือนฝอย ตัวอ่อนระยะเข้าทำลายได้แก่ 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 และในส่วนหัวของตัวเต็มวัยเพศเมีย มีลักษณะกลมมน 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 steinernematid 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 เมื่อนำไส้เดือนฝอยมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมชนิดวุ้น 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) ตัวงมหัดกระโดด (*Phyllotreta sinuata*) หนอนด้วงกินรากสตรอบเออรี่ (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 และในแมลงสาป (*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 Roiet (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.

ความสำคัญและปัญหา

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในวงศ์ Steinernematidae และ Heterorhabditidae เป็นพาราสิตและทำให้เกิดโรคในแมลง ได้รับการยอมรับในการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูสำคัญหลายชนิด สามารถเลี้ยงขยายปริมาณได้และมีศักยภาพในการใช้ควบคุมแมลงในสภาพไร่ รวมทั้งปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม ในปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกให้ความสนใจและมีการผลิตไส้เดือนฝอยเป็นการค้าประสบความสำเร็จในการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร รวมทั้งประเทศไทยซึ่งตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม ปัญหาสำคัญของเกษตรกรคือแมลงศัตรูพืช มีการป้องกันกำจัดแมลงโดยใช้สารเคมีซึ่งมีพิษตกค้างในสภาพแวดล้อมและผลผลิตพืช อย่างไรก็ตาม มีการนำไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สายพันธุ์ All จากอเมริกา มาขยายปริมาณในอาหารเทียมและมีการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* เป็นการค้า บรรจุในฟองน้ำจำนวน 4 ล้านตัวต่อถุง เพื่อนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิดประสบความสำเร็จ ไส้เดือนฝอยในกลุ่มนี้จึงได้รับความสนใจจากทั้งภาครัฐและเอกชน การค้นหาไส้เดือนฝอยสายพันธุ์พื้นเมืองในเขตร้อนชื้นจึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจศึกษาค้นคว้า เพื่อได้สายพันธุ์ไทยที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง นำขึ้นมาพัฒนาและนำกลับไปใช้ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ศักยภาพและความทนทานย่อมดีกว่าสายพันธุ์จากแหล่งอื่น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจ เก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากประเทศไทย และการจัดจำแนกชนิดโดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบชนิดด้วยเทคนิคทางอนุชีวโมเลกุล
2. เพื่อศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย โดยศึกษาวงจรชีวิต อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตภายในตัวแมลงอาศัย อัตราการพัฒนาเป็นเพศผู้-เพศเมีย และการเข้าทำลายแมลง ศึกษา symbiotic bacteria ที่แยกจากไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย และการทำให้เกิดโรคกับแมลง
3. เพื่อศึกษาการขยายปริมาณไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในอาหารเทียมสูตรต่างๆ ในระดับห้องปฏิบัติการ
4. เพื่อทดสอบศักยภาพในการกำจัดแมลงศัตรูสำคัญ ในระดับห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินงาน

การเก็บตัวอย่างดินและการแยก เก็บดินจำนวน 306 ตัวอย่างดิน จาก 42 จังหวัดของประเทศไทย นำมาแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินโดยใช้หนอนกินรังผึ้งเป็นเหยื่อล่อ

การจัดจำแนกชนิด นำไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินมาจัดจำแนกในระดับสกุลและชนิด โดยวิธีผสมข้ามชนิด ศึกษารูปร่างลักษณะสำคัญทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope และ scanning electron microscope และตรวจสอบดีเอ็นเอเพื่อการแบ่งแยกในระดับยีนโดยใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และ restriction fragment length polymorphism (RFLP)

การศึกษาวงจรชีวิต ศึกษาวงจรชีวิตไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในตัวแมลงอาศัย โดยบันทึกระยะการเจริญเติบโตทุก 24 ชม. ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย นับอัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นเพศผู้-เพศเมียที่อุณหภูมิต่างๆ และอุณหภูมิมีผลต่อการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย การแยก symbiotic bacteria จากน้ำเลือดของแมลงที่ถูกไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยเข้าทำลายและแบ่งแยกแบคทีเรียโดยศึกษารูปร่างลักษณะของโคโลนีและการดูสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาการเกิดโรค ศึกษาความรุนแรงของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในการทำให้เกิดโรคในแมลง โดยพิจารณาอัตราต่างๆ ของไส้เดือนฝอยสัมพันธ์กับช่วงเวลาในการทำให้แมลงตายเร็วที่สุด ศึกษาคุณสมบัติของการทนร้อนเปรียบเทียบกับสายพันธุ์จากอเมริกา

การเพาะเลี้ยงในอาหารเทียม ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการขยายปริมาณไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย ในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบศักยภาพในการฆ่าแมลง ทดสอบศักยภาพในการฆ่าแมลงศัตรูสำคัญบางชนิดในอันดับ Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera, Isoptera และ Blattodea โดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงหลังใส่ไส้เดือนฝอยเป็นเวลา 24 และ 48 ชม. ในระดับห้องปฏิบัติการ

ผลการดำเนินงาน

แยกได้ไส้เดือนฝอย steinernematid จำนวน 8 ไอโซเลท และไส้เดือนฝอย heterorhabditid จำนวน 1 ไอโซเลท จากการศึกษา steinernematid เพื่อการจัดจำแนกชนิด สามารถจำแนกได้ไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ สายพันธุ์ไทย 3 กลุ่ม คือ *S. thailandensis* n. sp., *Steinernema* sp. (AY isolate) และ *Steinernema* sp. (SK isolate)

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 การทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคในหนอนกินรังผึ้ง พบว่า ไส้เดือนฝอยอัตรา 10 ตัวต่อแมลง 1 ตัว สามารถทำให้หนอนกินรังผึ้งตาย 53 % ในเวลา 24 ชม. และจัดเป็นไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ที่ร้อนที่มีศักยภาพในการฆ่าหนอนกินรังผึ้งตาย 100 % ในเวลา 22 ชม. ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 °ซ และคงศักยภาพในการเข้าทำลายแมลงได้สูงที่อุณหภูมิ 38 °ซ เมื่อนำไส้เดือนฝอยมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมชนิดอื่น พบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีตัวเหลืองเป็นองค์ประกอบ 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) ตัวหมัดกระโดด (*Phyllotreta sinuata*) หนอนด้วงกินรากสตรอเบอรี่ (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.

Budget 267,009 (phase I) + 688,240 (phase II) = 955,248 baht
Duration 3 1/2 years (June 1996 - December 1999)

Problem statement and importance

Entomopathogenic nematodes are obligate parasites of insects that exist in many parts of the world. Nematodes belonging to the families Steinernematidae and Heterorhabditidae are proved to be potential control agents of a number of insect pests. They are tested for mass production, application, field efficacy, and safety standards. A number of commercial enterprises worldwide are now producing entomopathogenic nematodes. The search of entomopathogenic nematodes becomes interesting in many countries which successfully use the nematodes to control agricultural and horticultural insect pests. Thailand is situated in the tropical region of the world, in which insect is one of the most damaging pests causing losses in many crops. The control of the insects is undertaken by using hazardous chemicals adversely affect human and environment. However, entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, All strain imported from the United States more than 12 years ago proves highly effective to control several insect pests in Thailand and its acceptance is increasing. *S. carpocapsae* could be produced both by *in vivo* and *in vitro* methods, it is easy to use and inexpensive compared with the chemicals. The nematodes are currently commercialized in sponge package of 4 million nematodes/package. However, the search and related studies of indigenous strains of entomopathogenic nematodes are of great interest to both government and private sector since the native nematodes could serve as resource for use in the country. In the tropics, the local nematode isolates could be more effective to control native insect pests compared with the exotic isolates.

Objectives

1. To survey, collection and identify native isolates of entomopathogenic nematodes in Thailand by morphological taxonomy and molecular techniques.
2. To study biology of a new Thai entomopathogenic nematode isolate including its life cycle, sex ratio, infection, symbiotic bacteria and pathogenicity.
3. To mass rearing the new Thai entomopathogenic nematode isolate on modified artificial media in the laboratory.
4. To study the potential of the new Thai entomopathogenic nematode isolate as a biological control agent of insect pests under the laboratory conditions.

Methodology

Soil collection and isolation Three hundred and six soil samples were taken from different parts (42 locations) in the country. The entomopathogenic nematodes were isolated by baiting with wax moth larvae.

Identification Nematodes recovered were identified to genera and species on the basis of their cross mating test results and morphological characterization by light microscopic and scanning electron microscopic studies. DNA examination by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique was also used to identify those nematodes.

Biology In the laboratory, tests were conducted to study the life cycle of a Thai nematode isolate within the test insect the every 24 hours. Influence of the temperature on its life cycle, that on female/male sex ratio, and that on the infection of infective-stage juvenile in the test insect were determined. A symbiotic bacterium was isolated from a drop of haemolymph of an infected wax moth larva.

Pathogenicity To determine the pathogenicity of the infective-stage juvenile of the Thai nematode isolate at different doses in the test insect. Heat tolerant test of the Thai nematode isolate was conducted in comparison with the tolerant isolate from the United States.

Mass rearing To determine suitable components of the agar nutrient culture medium by high yielding of the Thai nematode isolate.

Potential for biological control To determine its potential as a biological control agent, the Thai nematode isolate was tested against some insect pests is the orders Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera, Isoptera and Blattoidea in the laboratory. Each insect pest was examined for its mortality percentage 24 and 48 hours after inoculation.

Outputs

Eighth isolates of steinernematid and one isolate of heterorhabditid nematodes were recovered from the surveys in Thailand. The steinernematids were separated into three groups based on cross mating test, morphological characters and DNA examination. They were identified as *Steinernema thailandensis* n. sp., *Steinernema* sp. (AY isolate), and *Steinernema* sp. SK isolate.

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 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. The bacterium was identified as *Xenorhabdus* sp. phase I as it was adsorbed by 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 nematode isolate could kill 100 % of *G. mellonella* in 22 hours at 30 and 35 °C, and it 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. It caused 57 % mortality in American cockroach (*Periplaneta americana*) within 48 hours.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
อุปกรณ์และวิธีการ	17
ผลการดำเนินงาน	29
วิจารณ์ผลการทดลอง	71
สรุปผลการทดลอง	75
เอกสารอ้างอิง	77
ภาคผนวก	86
บทความเผยแพร่และการเสนอผลงานของโครงการ	
วิทยานิพนธ์	
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์	
กิจกรรมที่วางแผน/ที่ดำเนินการและผลที่ได้รับตลอดโครงการ	

บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม มีการปลูกพืชหลายชนิดเพื่อการบริโภคภายในประเทศและส่งออกเป็นมูลค่าสูง ดังนั้นการจัดการด้านผลผลิตทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวจึงเป็นเรื่องที่สำคัญของการเพาะปลูกพืช ปัญหาสำคัญที่เป็นอุปสรรคต่อผลผลิตทางการเกษตรคือ โรคและแมลงศัตรูพืช ที่ต้องมีการป้องกันกำจัดอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีฉีดพ่นควบคุมศัตรูพืช เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ได้ผลเร็ว ใช้สะดวก ซึ่งผลกระทบที่ตามมาคือ เกิดสารพิษตกค้างอย่างรุนแรงทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสภาพแวดล้อม รวมทั้งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในระบบนิเวศ ทุกหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและเอกชน ได้ตระหนักถึงผลกระทบจากการใช้สารเคมีดังกล่าว ได้ร่วมกันในการหาแนวทางลดการใช้สารเคมีหรือวิธีการใช้ที่เหมาะสมเพื่อลดอันตรายจากสารพิษลง แนวทางหนึ่งที่มีความสนใจจากนักวิจัยทั้งภาครัฐและเอกชนคือ การใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และเป็นศัตรูธรรมชาติมาใช้ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร เพื่อช่วยลดการใช้สารเคมีและแก้ปัญหาการดื้อสารเคมีของศัตรูพืชสำคัญหลายชนิด ตลอดจนเพิ่มทางเลือกในการพิจารณาใช้วิธีใดวิธีหนึ่งที่เหมาะสมในการปกป้องผลผลิตของเกษตรกร

ในปัจจุบันมีผลงานวิจัย การนำจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรที่ประสบผลสำเร็จและนำไปใช้ประโยชน์ในประเทศไทยคือ การใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Bt) กำจัดหนอนผีเสื้อที่เป็นศัตรูสำคัญของพืชหลายชนิด การใช้ไวรัส nuclear polyhedrosis virus (NPV) ควบคุมหนอนกระทู้หอมในแปลงผัก การใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว การใช้รา *Trichoderma harzianum* ควบคุมรา *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริกไทย และทุเรียน เป็นต้น งานวิจัยส่วนใหญ่ได้ถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตจุลินทรีย์เพื่อการค้าประสบผลสำเร็จ ทำให้จุลินทรีย์ต่างๆ เหล่านี้ได้รับความสนใจและยอมรับจากเกษตรกรในการนำไปใช้ทดแทนสารเคมีบางส่วน โดยเฉพาะเลือกใช้กับแมลงศัตรูพืชที่ดื้อสารเคมี เช่น หนอนหน้างเหนียว (*Spodoptera exigua*) ที่ทำความเสียหายกับพืชผักและไม้ดอกหลายชนิด

การค้นหายูนิทที่มีประโยชน์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เพื่อนำขึ้นมาพัฒนาและนำกลับไปใช้ควบคุมศัตรูพืช ได้เพิ่มความสำคัญและมีการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องในหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะงานวิจัยขั้นพื้นฐาน ซึ่งดำเนินงานโดยนักวิจัยในแต่ละสาขาเพื่อค้นหาจุดสำคัญของการนำยูนิทมาใช้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ยูนิทแต่ละชนิดมีข้อจำกัดในการนำไปใช้แตกต่างกันไป เช่น ไล่เดือนฝอย *S. carpocapsae* ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในดินร่วนปนทราย ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส (Kaya, 1990) เป็นต้น ข้อจำกัดดังกล่าวจึงต้องมีการค้นคว้าวิจัยข้อมูลพื้นฐานทั้งด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และพฤติกรรม การดำรงชีวิต ซึ่งข้อมูลทางวิชาการเหล่านี้มีความสำคัญยิ่งต่อการพัฒนายูนิทที่พบตามธรรมชาติให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง การพยายามค้นหายูนิทสายพันธุ์ใหม่ในเขตต่างๆ ซึ่งมีความแตกต่างของสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้น ความเข้มของแสงอุลตราไวโอเลต แมลงอาศัย ชนิด และคุณสมบัติของดินและอื่นๆ ที่สำคัญ เพื่อนำยูนิทสายพันธุ์พื้นเมืองมาใช้ควบคุมศัตรูพืชในท้องถิ่นที่มีสภาพแวดล้อมเดียวกัน ศักยภาพและประสิทธิภาพของยูนิทย่อมดีกว่าสายพันธุ์จากแหล่งอื่น

ไล่เดือนฝอยใน order Rhabditida เป็นยูนิทที่มีประโยชน์อีกชนิดหนึ่งที่มีความสนใจในการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เนื่องจากมีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงตายภายในเวลารวดเร็ว กำจัดแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียม และได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ถึงความปลอดภัยต่อพืชและสัตว์เลือดอุ่น รวมถึงสภาพแวดล้อม ได้มีการค้นหาไล่เดือนฝอยกลุ่มนี้ในภูมิภาคต่างๆ ของโลก เพื่อนำขึ้นมาศึกษาค้นคว้าวิจัยและพัฒนาสายพันธุ์ในการนำไปใช้เป็น bio-pesticide กันอย่างกว้างขวาง ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และญี่ปุ่น มีผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเป็นการค้า เช่น บริษัท MicroBio ผลิตไล่เดือนฝอย *Steinernema feltiae* ควบคุมหนอนด้วงทำลายเห็ด (mushroom beetle) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys และไล่เดือนฝอย *Heterorhabditis megidis* ควบคุมด้วงงวงองุ่น (vine weevil) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys H บริษัท Biosys ผลิตไล่เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมหนอนด้วง Japanese beetle และบริษัท Ciba-Geigy ผลิตไล่เดือนฝอย *S. carpocapsae* (S25) และ *S. feltiae* (S27) ควบคุมด้วงงวงองุ่นสีดำ (black vine weevil)

สำหรับในประเทศไทย กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ได้นำไล่เดือนฝอย *S. carpocapsae* All strain เป็นสายพันธุ์จากอเมริกาที่ผลิตเป็นการค้าทั่วโลก นำมาเพิ่มปริมาณในอาหารเทียมและนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชสำคัญหลายชนิด ประสบผลสำเร็จในสภาพไร่กับหนอนเจาะเปลือกลองกอง หนอนกระทู้หอมทำลายดอกดาวเรือง และด้วงหมัดผักทำลายผักกาดหัว เป็นต้น ในปัจจุบัน

เกษตรกรให้ความสนใจการนำจุลินทรีย์ไปใช้ควบคุมแมลงโดยเฉพาะแมลงศัตรูสารเคมี ไล่เดือนฝอยจึงเป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจในการศึกษาวิจัย โดยเฉพาะการค้นหาไล่เดือนฝอยสายพันธุ์ในประเทศไทย ซึ่งเป็นงานวิจัยที่ยังไม่เคยมีรายงาน การเสนอโครงการ **การสำรวจเก็บรวบรวมและการจำแนกชนิดไล่เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย** จึงมีเป้าหมายของโครงการวิจัยเพื่อค้นหาไล่เดือนฝอยสายพันธุ์พื้นเมืองนำมาจัดเก็บ รวบรวมและจัดจำแนกในระดับชนิด (species) เพื่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ไทยและศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพในการนำไปใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ตลอดจนพัฒนานักวิจัยในสายงานไล่เดือนฝอยศัตรูแมลงของประเทศให้ศึกษาวิจัยในระดับปริญญาเอก ผลงานวิจัยที่ได้จะเกิดประโยชน์ต่อการพัฒนาทางด้านไล่เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อการสำรวจและค้นหาไล่เดือนฝอยในกลุ่มที่เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลง ครอบคลุมทุกภาคของประเทศไทย
2. เพื่อการจัดเก็บรวบรวมไล่เดือนฝอย (culture collection) สายพันธุ์พื้นเมืองในแต่ละพื้นที่แบ่งแยกเป็นไอโซเลต (isolate) และกำหนดรหัสไล่เดือนฝอย (nema code) ในการนำไปใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน
3. เพื่อการจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์โดยการศึกษาการผสมข้ามชนิด (species) การศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characters) และการตรวจสอบสายพันธุ์ (strain) ในระดับยีนด้วยเทคนิคทางอนุชีวโมเลกุล
4. เพื่อศึกษาชีววิทยาของไล่เดือนฝอย Thai isolate โดยศึกษาวงจรชีวิตในแมลงอาศัย ผลของอุณหภูมิต่อวงจรชีวิต sex ratio และการเข้าทำลาย การแยกเชื้อบริสุทธ์ของ symbiotic bacteria ที่อยู่ในไล่เดือนฝอย Thai isolate
5. เพื่อศึกษาความสามารถของไล่เดือนฝอย Thai isolate ในการทำให้เกิดโรคกับแมลงโดยวิธี pathogenicity test และ heat tolerance test
6. เพื่อศึกษาการขยายปริมาณของไล่เดือนฝอย Thai isolate ในอาหารเทียมชนิดวุ้น สภาพ monoxenic culture
7. เพื่อทดสอบศักยภาพของไล่เดือนฝอย Thai isolate ในการกำจัดแมลงศัตรูสำคัญใน order Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera, Isoptera และ Blattoidea

ผลงานวิจัยวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในแมลง (entomopathogenic nematodes) จัดเป็น จุลินทรีย์ที่เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงอีกชนิดหนึ่ง ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Steiner ในประเทศเยอรมนี เมื่อปี ค.ศ. 1923 เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและเป็น obligate parasite ภายในตัวแมลง ในปัจจุบัน ได้รับการยอมรับในการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจในหลายประเทศ เนื่องจากมี ศักยภาพในการฆ่าแมลงตายภายในเวลาอันรวดเร็ว กำจัดแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด ได้รับการ รับรองถึงความปลอดภัยต่อพืช สัตว์เลื้อยคลานและสภาพแวดล้อมจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ตลอดจนสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียมหลายชนิด (Gaugler and Kaya, 1990) .

ไส้เดือนฝอยจัดอยู่ใน order Rhabditida และพบว่ามีเพียง 2 วงศ์ (family) เท่านั้นที่มีศักยภาพในการทำให้เกิดโรคใน แมลง คือ family Steinernematidae และ Heterorhabditidae มีการศึกษาวิจัยเป็น เวลากว่า 75 ปี โดยได้ศึกษาไส้เดือนฝอยทั้ง



ในด้านการจัดจำแนกชนิด พฤติกรรม ความอยู่รอด ศักยภาพในการเป็น biological control agent และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีนำมาเพิ่มปริมาณในอาหารเทียม นำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชสำคัญ หลายชนิด เพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมีในหลายประเทศทั่วโลก

การศึกษากการกระจายตัวของไส้เดือนฝอย steinernematid ในเขตภูมิภาคต่างๆ ของโลก มีรายงานการกระจายตัวในยุโรปตอนเหนือเท่ากับ 37-49 % และพบในทุกประเทศที่มีการสำรวจในทวีป ยุโรป ได้แก่ 36.8 % ในสาธารณรัฐเชคโกสโลวาเกีย (Mracek, 1980) 25 % ในสวีเดน (Burman *et al.*, 1986) 5.8 % ในฟินแลนด์ (Vanninen *et al.*, 1989) 10.4 % ในสาธารณรัฐไอร์แลนด์ (Griffin *et al.*,

1991) 18.3 % ในนอร์เวย์ (Haukeland, 1993) และ 26.5 % ในสวีเดน (Steiner, 1994) ในทวีปอเมริกา มีการศึกษาการกระจายตัวและรายงานใน 5 ประเทศของอเมริกาเหนือ-กลางคือ แคนาดา สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก คิวบา และเปอร์โตริโก และ 3 ประเทศของอเมริกาใต้คือ บราซิล อุรุกวัย และ อาร์เจนตินา นอกจากนี้มีรายงานในประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ ส่วนในทวีปเอเชียมีการสำรวจและศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย มีรายงานใน 6 ประเทศ คือ จีน (Shen, 1992) อินเดีย (Poinar *et al.*, 1992) ศรีลังกา (Amarasinghe *et al.*, 1994) ญี่ปุ่น (Yoshida, 1998) เกาหลี (Stock *et al.*, 1997) และโอมาน (Elawad *et al.*, 1997) และ Waturu *et al.* (1997) ได้รายงานการสำรวจและค้นพบในประเทศเคนยาของทวีปแอฟริกา ส่วนไส้เดือนฝอย heterorhabditid พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 โดย Poinar และตั้งชื่อสกุลเป็น *Heterorhabditis* มีการศึกษากันมากในทวีปยุโรปและอเมริกา จากรายงานการสำรวจของ Griffin *et al.* (1991) พบว่า heterorhabditid มีการกระจายตัวตามชายฝั่งหรือพื้นที่ที่เป็นดินทรายเป็นส่วนใหญ่

Poinar and Thomas (1990) ได้จัดลำดับชั้นของไส้เดือนฝอยที่ทำให้เกิดโรคในแมลง ดังนี้ :- Phylum Nematoda

Class Secernentea

Order Rhabditida

Sub-order Rhabditina

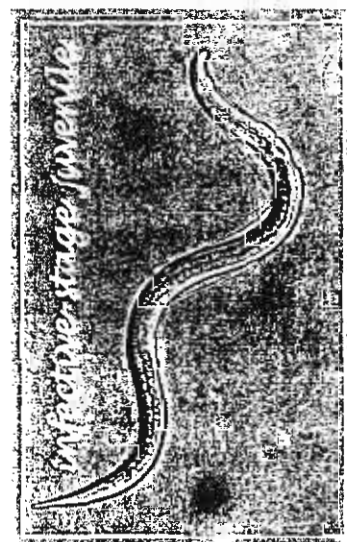
Superfamily Rhabditoidea

Family Steinernematidae

Family Heterorhabditidae

การจัดจำแนกชนิดโดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา จัดเป็นงานพื้นฐานที่มีความสำคัญในการแบ่งแยกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย (Siddiqi, 1986) หลักของการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงคือ การวัดขนาดสัดส่วนต่างๆ และพิจารณารูปร่างลักษณะที่สำคัญของตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียใน 1st และ 2nd generation โดยใช้ light microscopoe (LM) และ scanning electron microscope (SEM) ความแตกต่างของขนาดสัดส่วนและรูปร่างลักษณะของไส้เดือนฝอยสามารถจัดจำแนกชนิดได้ (Nguyen and Smart, 1996) นอกจากนี้ ในปัจจุบันวิทยาการทางด้านอนุชีววิทยา (molecular biology) ได้พัฒนาอย่างรวดเร็วและเข้ามามีบทบาทในงานการจัด

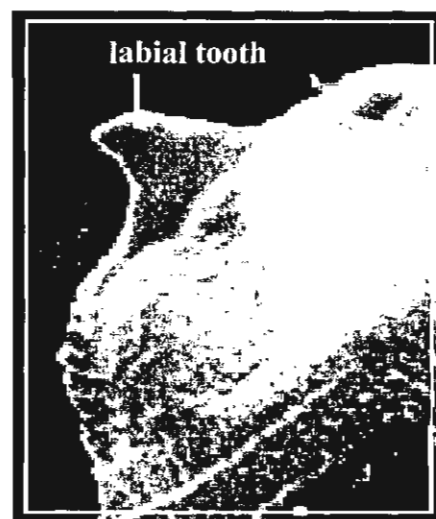
จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อมภายนอก จึงนิยมใช้ในตรวจสอบและแบ่งแยกชนิดและสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายในระบบนิเวศ และการใช้ยีนของดีเอ็นเอเป็นตัวตรวจสอบความเหมือนกันหรือแตกต่างกันของการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยให้ความถูกต้องมากที่สุด หากเป็นชนิดเดียวกันจะมีดีเอ็นเอเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันตลอดจนการใช้เทคนิค molecular biology ยังเป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วมากที่สุด เทคนิคอณูชีววิทยาที่นำมาใช้จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย ได้แก่ DNA sequence analysis (Curran *et al.*, 1985), restriction fragment length differences (RFLD) (Curran, 1991), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Reid and Hominick, 1992) และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Hashmi *et al.*, 1996) เป็นต้น ในปัจจุบันเทคนิคที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกและตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลง ได้แก่ เทคนิค PCR-RFLP และ RAPD



Tangchitsomkid (2000) ได้รวบรวมชนิดของไส้เดือนฝอยที่ค้นพบทั่วโลก แบ่งแยกได้เป็น family Steinernematidae ประกอบด้วย 2 สกุล (genera) คือ สกุล *Steinernema* spp. ในปัจจุบันจัดจำแนกออกเป็นชนิด (species) ได้ 23 ชนิด คือ *S. kraussei* (Steiner, 1923) syn. *Aplectana kraussei* Steiner, 1923; *S. glaseri* (Steiner, 1929); *S. feltiae* (Filipjev, 1934); *S. affinis* (Bovien, 1937); *S. carpocapsae* (Weiser, 1955); *S. arenarium (anomala)* (Kozodoi, 1984); *S. intermedium* (Poinar, 1985); *S. rarum* (De Doucet, 1986); *S. kushidai* (Mamiya, 1988); *S. ritteri* (Doucet & Doucet, 1990); *S. scapterisci* (Nguyen & Smart, 1990); *S. caudatum* (Xu *et al.*, 1991); *S. neocurtillae* (Nguyen & Smart, 1992); *S. longicaudum* (Shen, 1992); *S. cubanum* (Mracek *et al.*, 1994); *S. puertoricense* (Roman & Figueroa, 1994); *S. riobrave* (Cabanillas *et al.*, 1994); *S. bicornutum* (Tallosi *et al.*, 1995); *S. oregonense* (Liu & Berry, 1996); *S. monticolum* (Stock *et al.*, 1997); *S. kari* (Waturu *et al.*, 1997); *S. abbasi* (Elawad *et al.*, 1997) และ *S. ceratophorum* (Jian *et al.*, 1997) ในสกุล *Neosteinerema* sp. 1 ชนิด คือ *N. longicurvicauda* (Nguyen & Smart, 1994)

family Heterorhabditidae พบ 1 สกุล คือ *Heterorhabditis* spp. จำแนกได้ 8 ชนิด คือ *H. bacteriophora* (Poinar, 1976), *H. zealandica* (Wouts, 1979), *H. megidis* (Poinar et al., 1987), *H. indica* (Poinar et al., 1992), *H. argentinensis* (Stock, 1993), *H. hawaiiensis* (Gardner et al., 1994), *H. brevicaudis* (Liu, 1994) และ *H. marelata* (Liu and Berry, 1996)

ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สกุล คือ *Steinernema* และ *Heterorhabditis* เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ในดิน ดำรงชีวิตเป็นอิสระโดยไม่กินอาหาร เป็นระยะที่เรียกว่า free living หรือตัวอ่อนระยะที่ 3 (third-stage juvenile) หรือตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) เป็นตัวอ่อนระยะเดียวที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีที่สุด โดยลำตัวมี ผนังใสที่เรียกว่า cuticle ปกคลุมป้องกัน อุณหภูมิและความชื้น มีการสะสมอาหารสำรองพวกไขมัน (lipid reserve) จึงสามารถอยู่ในดินได้นานโดยไม่กินอาหารเพื่อรอคอยแมลงเหยื่อ (Poinar, 1990) เมื่อพบแมลงไส้เดือนฝอยจะเข้าสู่ช่องว่างในตัวของแมลง (haemocoel) ได้หลายทาง ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย ซึ่งสัมพันธ์กับชนิดแมลงและสภาพแวดล้อม เช่น ไส้เดือนฝอย *S. scapterisci* เข้าทำลายแมลงกะซอน โดยผ่านรูหายใจทาง ผิวหนัง (spiracle) และเคลื่อนที่เข้าสู่ท่อ trachea ดันตัวจนท่อ trachea ฉีกขาด เพื่อเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวที่มีน้ำเลือด (haemolymph) (Nguyen and Smart, 1991) นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายของ *Steinernema* และ *Heterorhabditis* สามารถเข้าสู่แมลงได้ทางช่องเปิดตามธรรมชาติอื่นๆ เช่น ปากและช่องขับถ่าย และเจาะทะลุผ่านท่อทางเดินอาหารของแมลง (foregut หรือ midgut หรือ hindgut) เข้าสู่ haemocoel ของแมลง (Poinar, 1979) แต่อย่างไรก็ตาม ไส้เดือนฝอยพวก *Heterorhabditis* มี labial tooth

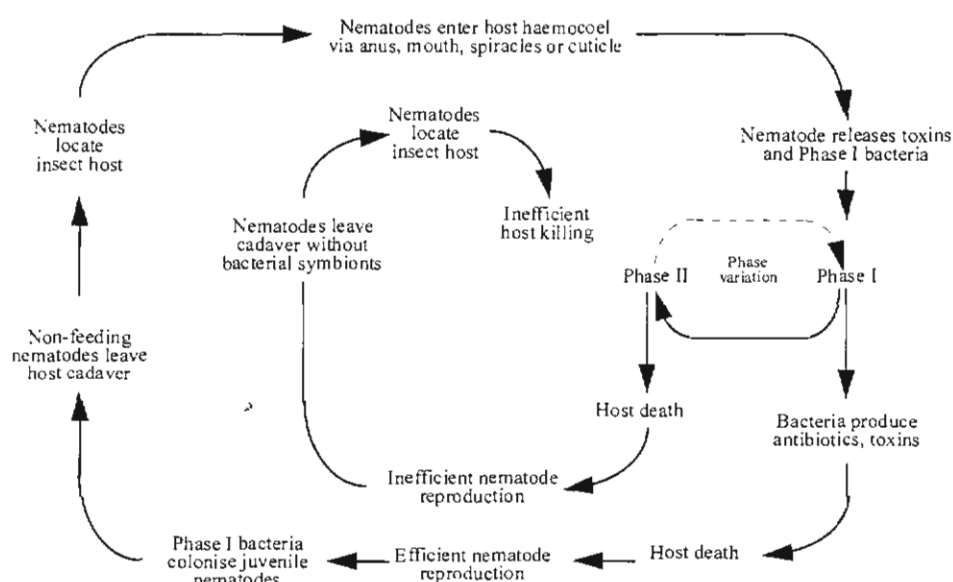


อยู่บริเวณส่วนหัวของไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile มีลักษณะเป็นฟันที่แข็ง ช่วยในการเจาะทะลุผนังลำตัวของแมลง ซึ่งเป็นโครงสร้างพิเศษที่พบเฉพาะในสกุลนี้เท่านั้น (Wouts, 1979) จากรายงานของ Bedding และ Molyneux (1982) แสดงให้เห็นว่า ไส้เดือนฝอย *H. bacteriophora* strain D1 มี tooth ช่วยเจาะเข้าสู่หนอนแมลงวัน (sheep blowfly) ทางผิวหนังบริเวณ intersegment

ในเรื่องของอุณหภูมิมีผลต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยที่แตกต่างกัน โดยพบว่า *S. carpocapsae* มีความสามารถในการเข้าสู่แมลงเหยื่อได้ดีที่อุณหภูมิ 24°C และ *S. scapterisci* ได้ดีที่อุณหภูมิ 32°C (Grewal et al., 1993)

เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง จะปลดปล่อย symbiotic bacteria สู่น้ำเลือดของแมลง แบคทีเรียจะเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างรวดเร็วและสร้างสารพิษ ทำให้แมลงเกิดอาการของโรคเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายภายในเวลาไม่เกิน 48 ชม. (Poinar and Thomas, 1966) ในปี 1982 Burman ได้รายงานการสร้างสารพิษจากไส้เดือนฝอย *Neoaplectana* (*Steinernema*) *carpocapsae* ที่เรียกว่า NGE (nematode growth extract) ที่ผลิตจากการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในสภาพ axenic สารพิษที่ได้เมื่อนำไป inject กับแมลงทดสอบ พบว่าแมลงเกิดอาการ heart beat ช่อนแอและตายภายในเวลา 24 ชม.

โดยสรุปการเกิดโรคในแมลงของไส้เดือนฝอยร่วมกับ symbiotic bacteria แสดงได้ดังไดอะแกรม ต่อไปนี้ :-



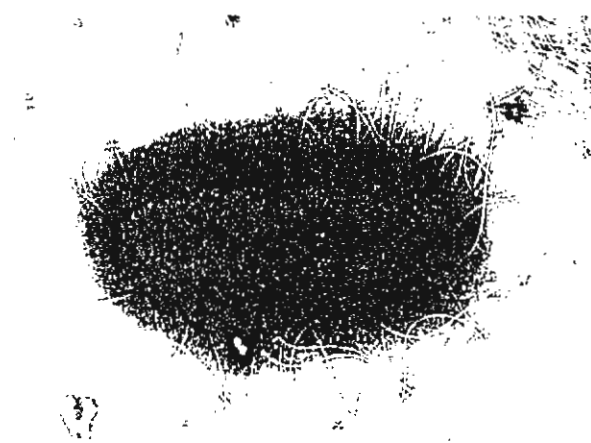
Connor Thomas (<http://www.microbiology.adelaide.edu.au/>)

ไส้เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode มีการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบ 4 ครั้ง ประกอบด้วยตัวอ่อน 4 ระยะคือ ตัวอ่อนระยะที่ 1 (J1) พักออกจากไข่ภายในตัวแม่ มีการลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ตัวอ่อนระยะที่ 3 (J3) และตัวอ่อนระยะที่ 4 (J4) ตามลำดับ ก่อนเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ตัวอ่อนทั้ง 4 ระยะและตัวเต็มวัยจะเจริญเติบโตภายในแมลงอาศัยเท่านั้น มีเพียงระยะเดียวที่อยู่นอกตัวแมลงคือ ตัวอ่อนระยะ infective juvenile (IJ) เท่านั้น ซึ่งก็คือตัวอ่อนในระยะ J2 และ J3 ที่มีการปรับสภาพตัวให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอก และเคลื่อนที่ออกจากซากแมลงดำรงชีพอยู่ในดินโดยไม่กินอาหารได้เป็นเวลานานเพื่อรอแมลงเหยื่อตัวใหม่ (Nguyen and Smart, 1992)

ไส้เดือนฝอย *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัดของการขยายพันธุ์ โดยพบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema* มีการผสมพันธุ์แบบ amphimictic เท่านั้น คือการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ส่วนไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* พบว่า ใน generation ที่ 1 จะมีการขยายพันธุ์แบบ hermaphroditic โดยตัวเมียสามารถสร้างไข่และสเปิร์มภายในตัวให้ลูกได้เอง และใน generation ที่ 2 เป็นแบบ amphimictic (Poinar, 1990)

ความสัมพันธ์ของการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด ระหว่างไส้เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode ใน family Steinernematidae และ Heterorhabditidae กับแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae เป็นการอยู่ร่วมกันแบบที่เรียกว่า symbiotic association (Poinar and Thomas, 1966) พบอยู่บริเวณลำไส้ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย โดยแบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตรอดในดินหรือน้ำด้วยตัวมันเองได้ (Poinar, 1979) และไม่ทำให้เกิดโรคเมื่ออยู่ในระบบย่อยอาหารของแมลง (Poinar and Thomas, 1967) จนกว่าไส้เดือนฝอยเป็นตัวนำเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง จึงสามารถออกมาอยู่ในน้ำเลือดของแมลงได้ ดังนั้น การเคลื่อนย้ายของแบคทีเรียจากซากแมลงหนึ่งสู่แมลงตัวใหม่ต้องอาศัยไส้เดือนฝอยเป็นตัวนำและปกป้องแบคทีเรียต่อสภาพแวดล้อมเซลล์ของแบคทีเรียเมื่ออยู่ในน้ำเลือดของแมลงจึงจะสามารถทวีจำนวนได้ และเซลล์ของแบคทีเรียเป็นแหล่งอาหารสำคัญต่อกระบวนการขยายพันธุ์ (reproduction) ของไส้เดือนฝอยภายในตัวแมลง (Akhurst and Boemare, 1990)

แบคทีเรียที่พบในไส้เดือนฝอยจัดอยู่ในสกุล *Xenorhabdus* spp. มีรูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) เป็นพวก facultative anaerobic แกรมลบ จากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Volume 1) มีการจัดจำแนกโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีไว้ 2 ชนิด (species) ได้แก่ *X. luminescens* และ *X. nematophilus* (Krieg and Holt, 1984)



Akhurst (1980) พบว่า *Xenorhabdus* spp. มี 2 รูปแบบ (form) คือ primary form และ secondary form การแยกความแตกต่างระหว่าง form ของ *X. nematophilus* อาศัยลักษณะโคโลนี (colony) ในปี ค.ศ. 1988 Boemare และ Akhurst ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของ *Xenorhabdus* spp. ทั้ง 2 form ที่แยกจาก Steinernematidae และ Heterorhabditidae 21

สายพันธุ์ (strain) พบว่า *Xenorhabdus* ทั้ง 2 form ของทุกสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน

ในการแยกความแตกต่างของทั้ง 2 form ทำได้โดยดูความสามารถของโคโลนีในการดูดสี neutral red จากอาหาร MacConkey agar และการดูดสี bromthymol blue จากอาหาร NBTA นอกจากนั้น ยังแยกความแตกต่างด้วยการทดสอบ antibiotic activity และ lecithinase

ในปี ค.ศ. 1988 Akhurst และ Boemare ได้ทำการศึกษาการจัดหมวดหมู่ *Xenorhabdus* จากเชื้อทั้ง 2 form จำนวน 21 สายพันธุ์ โดยทำการทดสอบคุณสมบัติ 240 ลักษณะ และได้เสนอจัดแบคทีเรีย *X. nematophilus* เป็น 4 species คือ *X. nematophilus*, *X. beddingii*, *X. bovienii* และ *X. poinarii* ในปี ค.ศ. 1993 Boemare *et al.* ได้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้วยวิธี DNA hybridization และเปลี่ยนจาก *X. luminescens* เป็นสกุลใหม่คือ *Photorhabdus* โดยใช้ความแตกต่างของยีนหรือดีเอ็นเอ

Xenorhabdus spp. ที่แยกจากธรรมชาติมีลักษณะเป็น primary form โดยมีลักษณะโคโลนีบนโค้ง ทึบแสง บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสี (dye) เชื้อสามารถดูดซับสีทำให้โคโลนีมีสี แต่ถ้าเลี้ยง *Xenorhabdus* spp. ไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน เชื้อเปลี่ยนเป็น secondary form โคโลนีมีลักษณะแบนและเชื้อไม่สามารถดูดซับสีที่ผสมลงในอาหารได้ ไม่พบความแตกต่างในการทำให้เกิดโรคของเชื้อทั้ง 2 form แต่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกับไส้เดือนฝอย โดยไส้เดือนฝอยมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรีย primary form ได้ดีกว่า ไส้เดือนฝอยมีความสัมพันธ์เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่แบคทีเรียชนิดหนึ่งๆ มีความสัมพันธ์กับไส้เดือนฝอยได้หลายชนิด แบคทีเรียแต่ละชนิดก็ยังสามารถจัดแบ่งได้อีกหลายกลุ่ม นอกจากการจัดจำแนกแบคทีเรีย (classical taxonomy) โดยใช้วิธีการที่ถือปฏิบัติกันมา ได้มีการนำวิธีการอื่นๆ มาช่วยในการจัดจำแนก เช่น การศึกษาดีเอ็นเอ วิธีการทางเซรุ่มวิทยา การใช้ gas-liquid chromatography ของ fatty acid methyl esters (FAMES) (Aguillera et al., 1993) เป็นต้น การจำแนกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* spp. มีความสำคัญมากเนื่องจากแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีความผันแปรสูงอีกทั้งยังเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย ประกอบกับมีความซับซ้อนของความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตทั้ง 3 ชนิด คือ แมลง ไส้เดือนฝอย และแบคทีเรีย

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแต่ละชนิดมีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของแบคทีเรีย ได้แก่ *S. carpocapsae* มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียชนิด *X. nematophilus* ไส้เดือนฝอย *S. feltiae*, *S. affinis*, *S. kraussei*, *S. intermedia* มีความสัมพันธ์กับ *X. bovienii* เป็นต้น ความเฉพาะเจาะจงของการอยู่ร่วมกันของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย ขึ้นกับสารอาหารที่จำเป็นสำหรับไส้เดือนฝอยที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและการเก็บรักษาเซลล์ของแบคทีเรียบริเวณลำไส้ของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (Akhurst and Boemare, 1990)

ความต้องการสารอาหารของไส้เดือนฝอยที่แบคทีเรียสร้างขึ้นพบว่า ไม่เฉพาะเจาะจงกับชนิดของแบคทีเรียมากนัก โดยไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่มี *X. nematophilus* อยู่ร่วม ยังสามารถขยายพันธุ์ในอาหารที่มีแบคทีเรียชนิดอื่นได้ แต่การขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยจะลดลง อย่างไรก็ตาม *Steinernema* spp. ไม่สามารถขยายพันธุ์ในอาหารที่มีแบคทีเรีย *X. luminescens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบในไส้เดือนฝอยในสกุล *Heterorhabditis* spp. (Akhurst and Boemare, 1990)

แมลงที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอยพบว่า ไม่มีจุลินทรีย์อื่นๆ เข้าทำลายซ้ำเติม เป็นผลมาจากแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำเลือดของแมลง สร้างสาร antimicrobial ซึ่งจะยับยั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรียอื่นๆ Paul et al. (1981) พบว่า antimicrobials เป็นสารประกอบทางเคมี (chemical compound) ใน *X. nematophilus* strain R เป็น 4 indole derivatives และ *X. luminescens* strain Hb เป็น 2 *trans-stilbene* derivatives

ความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลงของ *Xenorhabdus* spp. มีประสิทธิภาพสูงมาก เมื่ออยู่ในน้ำเลือดภายในช่องว่างลำตัวแมลง โดยพบว่า หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) มีจำนวนของ เซลล์แบคทีเรียเพียง 50 เซลล์ ก็สามารถทำให้เกิดโรคในหนอนชนิดนี้ได้ (Akhurst, 1982)



ไส้เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode นั้น ได้รับการยอมรับและนำมาใช้เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีความสามารถในการฆ่าแมลงให้ตายในเวลาอันรวดเร็ว กำจัดแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด (Poinar, 1979) สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ง่ายในอาหารเทียม ชนิดแข็งกึ่งเหลวและอาหารเหลว (Friedman, 1990) และได้รับการรับรองถึงความปลอดภัยต่อพืชและสัตว์เลือดอุ่นโดย The United States Environmental Protection Agency (EPA) (Gaugler and Kaya, 1990) ได้มีการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยนำมาผลิตเป็นการค้า ได้แก่ 6 ชนิด ในสกุล *Steinernema* spp. คือ *S. carpocapsae*, *S. glaseri*, *S. feltiae*, *S. riobrave*, *S. scapterisci* และ *S. kushidai* และ 2 ชนิด ในสกุล *Heterorhabditis* spp. คือ *H. bacteriophora* และ *H. megidis* (Ehlers, 1995)

การนำไส้เดือนฝอยมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช มีการศึกษาวิจัยถึงวิธีการใช้ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากไส้เดือนฝอยเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กไม่ทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูง แสง อุตราไวโอเลต สภาพความแห้ง ซึ่งมีผลทำให้อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยต่ำลง ดังนั้น วิธีการใช้จึงมีปัจจัยหลายประการเป็นตัวกำหนด ปัจจัยที่สำคัญคือ ปัจจัยทางด้านพฤติกรรมของไส้เดือนฝอยเป็นแบบ cruiser หรือ ambusher โดยพฤติกรรมแบบ cruiser เป็นไส้เดือนฝอยพวกที่มีการเคลื่อนที่เข้าหาแมลงเหยื่อ ได้แก่ *S. glaseri* และ *H. bacteriophora* ส่วนพฤติกรรมแบบ ambusher เป็นพวกไม่ค่อยเคลื่อนที่ แต่จะหยุดอยู่กับที่ (sit and wait) และมีการยืดลำตัวขึ้นโบกส่วนหัวหรือลำตัวไปมา (nictating) เพื่อรอจังหวะในการกระโดดเข้าเกาะตัวแมลงที่วิ่งไปมา จะพบไส้เดือนฝอยพวกนี้อยู่บริเวณผิวดิน ได้แก่ *S. carpocapsae* และ *S. scapterisci* (Campbell and Gaugler, 1993) ลักษณะพฤติกรรมที่แตกต่างทำให้ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงแตกต่างกัน เช่น การควบคุมแมลงกระซอนในสนามกอล์ฟ ควรเลือกใช้ *S. scapterisci* เนื่องจากแมลงกระซอนเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วบนผิวดิน และใช้ *S. glaseri* ควบคุม white grub ที่กัดกินรากพืชใต้ดิน (Klein, 1990) นอกจากนี้ ปัจจัยทางด้านความแข็งแรงของไส้เดือนฝอยที่ผลิตเป็นการค้ามีความอยู่รอดและมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งขึ้นกับรูปแบบการผลิต การเก็บรักษาและการขนส่ง ที่มีผลต่อการตายของไส้เดือนฝอย จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียและปริมาณไขมันสะสมในตัวไส้เดือนฝอย ตลอดจนปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม ได้แก่ โครงสร้างดิน อุณหภูมิดิน และความชื้นในดิน (Kaya, 1990) การนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชให้ประสบผลสำเร็จนั้น จึงต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้อง ความรู้ทางวิชาการจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญในการพิจารณาเลือกใช้ไส้เดือนฝอยชนิดใดไปควบคุมแมลงศัตรูพืชให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

ไส้เดือนฝอย *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีศักยภาพในการเป็น biopesticide ควบคุมแมลงศัตรูพืชที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ได้มีการศึกษาวิจัยในด้านการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเทียมตั้งแต่ปี 1931 โดย Glaser ได้เพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* และ *S. carpocapsae* เป็นผลสำเร็จในอาหารชนิดวุ้นที่ประกอบด้วย 1% ไตกระต่าย และ 1% วุ้น ในสภาพ axenic culture ต่อมาในปี 1953 Stoll พัฒนาการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ โดยเลี้ยงในหลอดทดสอบที่มีการเขย่า 100 ครั้งต่อนาที สามารถเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวได้แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงยังเป็นการวิจัยในห้องทดลอง ผลผลิตที่ได้ต่ำต้นทุนสูง จึงได้มีการค้นคว้าและการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ทั้งในด้านเทคนิคและสูตรอาหาร เพื่อให้ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงที่สุดและต้นทุนการผลิตต่ำ (Friedman, 1990)

ในปี 1964-1967 Dutky *et al.* พบว่า สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มี symbiotic bacteria ร่วมด้วย ทำให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงขึ้น โดยพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีผลต่อกระบวนการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม

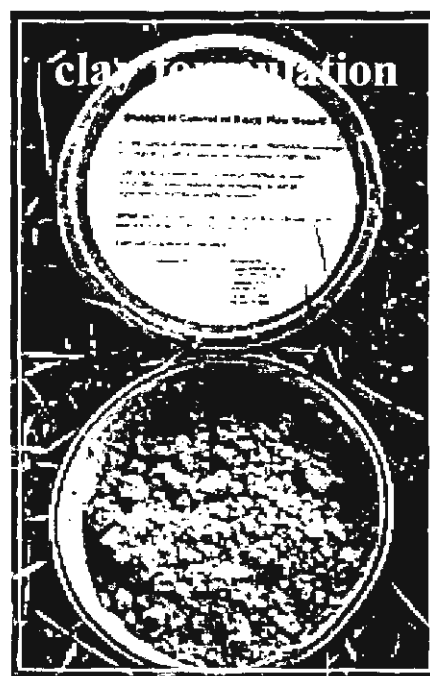
ในปี 1981 Bedding ได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) ในสภาพ monoxenic culture ที่มีองค์ประกอบของ 70% ไตหมู 10% ไขมันสัตว์ และ 20% น้ำ ของการเลี้ยง *Steinernema* sp. และ 60% ไตหมู 20% ไขมันสัตว์ และ 20% น้ำ ของการเลี้ยง *Heterorhabditis* sp. ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงเฉลี่ย 40 ล้านตัวต่อ flask ขนาด 500 มล. ต่ออาหาร 70 กรัม ต้นทุนการผลิตเท่ากับ \$ 0.50/flask (ประมาณ 20 บาท) เทคนิคการผลิตนี้ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ต่อมา Bedding (1984) ได้ศึกษาเทคนิคการผลิตเพื่อขยายปริมาณในระดับการค้า โดยเพาะเลี้ยงในถุง polypropylene ขนาด 1.0x0.5 เมตร ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงถึง 2,000 ล้านตัวต่อถุง



มีการศึกษาวิจัยองค์ประกอบของอาหารที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยใน 2 สกุล ในสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ซึ่งมีความแตกต่างกันของสารอาหารที่ไส้เดือนฝอยต้องการ จากรายงานของ Dunphy และ Webster (1989) ได้ศึกษาแหล่งอาหารต่างๆ เพื่อการขยายปริมาณ *S. carpocapsae* DD 136 strain และ *H. heliothidis* พบว่าสารอาหารชนิดต่างๆ มีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดย culture ที่มี stearic acid จากน้ำมันดอกทานตะวัน (0.1% V/V) เพิ่มผลผลิต *S. carpocapsae* และน้ำมันตับปลา (0.5% V/V) เพิ่มผลผลิต *H. heliothidis*

ในปัจจุบันการผลิตไส้เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode สามารถผลิตในอาหารเหลวได้สูงถึง 190,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในระดับ shake flask และ 90,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในถังหมัก (fermenter) (Friedman, 1990) มีผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเป็นการค้าในต่างประเทศ เช่น บริษัท MicroBio ผลิตไส้เดือนฝอย *S. feltiae* ควบคุมหนอนแมลงวันทำลายเห็ด (mushroom sciarids) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys และไส้เดือนฝอย *H. megidis* ควบคุมด้วงงวงองุ่น (vine weevil) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys H บริษัท Biosys ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมหนอนด้วง Japanese beetle และบริษัท Ciba-Geigy ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (S25) และ *S. feltiae* (S27) ควบคุมด้วงงวงองุ่นสีดำ (black vine weevil) (นุชนารถ, 2541)

รูปแบบผลิตภัณฑ์ (formulation) ไส้เดือนฝอยและการนำไปใช้ควบคุมแมลงในสภาพไร่ มีหลายรูปแบบ ได้แก่ การผสมไส้เดือนฝอยในดินเหนียว ฟองน้ำ และเวอร์มิคูไลต์ หรือบรรจุเป็นแคปซูลในสารแอลจีเนต (alginate capsule) และในรูปเจลโพลีอะครีลาไมด์ (gel-forming polyacrylamides) เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย มีจำหน่ายในหลายประเทศ เช่น บริษัท Mellinger's ในสหรัฐอเมริกา ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในชื่อผลิตภัณฑ์ scanmark ราคา \$ 13.95 บรรจุไส้เดือนฝอย 7 ล้านตัว สามารถสั่งซื้อได้ง่ายโดยผ่านทาง internet และจ่ายเงินด้วยบัตรเครดิต



วิธีการนำไปใช้ง่ายและสะดวก โดยละลาย formulated product ในน้ำตามคำแนะนำของแต่ละผลิตภัณฑ์ ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนไส้เดือนฝอยและชนิดของแมลงเป้าหมาย ด้วยวิธีฉีดพ่นด้วยเครื่องพ่นสารชนิดสะพายหลัง หรือใช้วิธีการหว่านในแปลงปลูกที่มีแมลงศัตรูระบาด ควรใช้ในช่วงเช้าหรือเย็น เพื่อหลีกเลี่ยงแสงอุลตราไวโอเลตและความร้อนจากแสงแดดในเวลากลางวัน

สำหรับในประเทศไทย งานวิจัยทางด้านไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเริ่มมีการศึกษาค้นคว้าเมื่อประมาณปี 2530 โดยกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร งานวิจัยมุ่งเน้นทางด้านการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สายพันธุ์ที่นำมาจากสหรัฐอเมริกา โดยใช้เทคนิคการผลิตในอาหารแข็งกึ่งเหลวสภาพ monoxenic culture ที่ได้ดัดแปลงสูตรอาหารและเทคนิคจาก Bedding (1981) และนำผลิตภัณฑไปใช้ในสภาพไร่ประสบความสำเร็จในการควบคุมแมลงศัตรูสำคัญหลายชนิด ได้แก่ หนอนเจาะเปลือกลองกอง หนอนกระทู้หอมในดอกดาวเรือง เป็นต้น ปัจจุบันกำลังดำเนินงานวิจัยการผลิตในอาหารเหลว และ scale up ในระดับถึงหมักเพื่อได้ปริมาณผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงต้นทุนต่ำ ซึ่งในอนาคตผลิตภัณฑไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สายพันธุ์จากอเมริกาที่ผลิตได้ในประเทศไทย จะถึงมือเกษตรกรเพื่อนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน ได้แก่ ถังพลาสติก ท่อเหล็กเจาะดิน (เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 ซม. สูง 80 ซม.) ถังพลาสติกคลุมดิน ถังรักษาความเย็น เป็นต้น
2. กล่องพลาสติก (ความจุปริมาตร 300 มล.)
3. หนอนกินรังผึ้ง (wax moth, *Galleria mellonella* L.)
4. สารอาหารเลี้ยงแมลง ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า นมถั่วเหลือง น้ำผึ้ง ฟอร์มาลิน กลีเซอริน ไข่ผึ้ง และวิตามิน เป็นต้น
5. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope (LM)
6. สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างให้เดือนฝอยตรวจภายใต้กล้อง LM ได้แก่ น้ำยาคองให้เดือนฝอย (fixative) น้ำยาคองสภาพให้เดือนฝอย (solution I และ solution II)
7. กล้อง scanning electron microscope (SEM) รุ่น JSM-35 CF model
8. สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างให้เดือนฝอยตรวจภายใต้กล้อง SEM ได้แก่ NaCl, ethanol และ glutaraldehyde เป็นต้น
9. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler)
10. เครื่องมือวิทยาศาสตร์สำหรับห้องปฏิบัติการ DNA analysis ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยง ความเร็วรอบสูง ตู้ deep freez และตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นต้น
11. เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ ได้แก่ ตู้เชื้อเชื้อ หม้อนึ่ง ความดัน และตู้อบฆ่าเชื้อ เป็นต้น
12. สารเคมีสำหรับแยกสกัดดีเอ็นเอ และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ได้แก่ worm lysis buffer, 18S และ 26S primer, 10x PCR buffer, dNTP, Taq polymerase, agarose, Tris-borate buffer, ethidium bromide และ restriction enzyme 17 ชนิด เป็นต้น
13. สารอาหารเลี้ยงให้เดือนฝอยในสภาพ monoxenic culture ได้แก่ นมถั่วเหลือง แป้งข้าวสาลี แป้งข้าวโพด น้ำตาลข้าวโพด แป้งถั่วเหลือง น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันตับปลา $MgCl_2$ และ yeast extract เป็นต้น

14. สารเคมีสำหรับแยกเชื้อปรสิตของ symbiotic bacteria ได้แก่ nutrient agar, nutrient broth, bromthymol blue, 2,3,5 triphenyl-tetrazolium chloride เป็นต้น

15. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการได้เดือนฝอย

วิธีการ

1. การสำรวจเก็บตัวอย่างดิน

1. การเก็บตัวอย่างดิน

สุ่มเก็บดินในระดับความลึก 10-15 ซม. จำนวน 5 จุดๆ ละประมาณ 300-500 กรัม นำมาคลุกเคล้ารวมกัน ใส่ถุงพลาสติกน้ำหนักประมาณ 1 กก. เท่ากับ 1 ตัวอย่างดิน ในแต่ละตัวอย่างครอบคลุมพื้นที่ 10 ตรม. ตัวอย่างดินเก็บในถังรักษาความเย็น (20-24 °C) ขณะนำกลับห้องปฏิบัติการ และนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะนำมาแยกได้เดือนฝอยออกจากดินต่อไป

2. การวัดอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของดิน

ทำการวัดอุณหภูมิดินที่จุดเก็บ 2 ระดับ คือระดับผิวดินและระดับความลึก 10-15 ซม. และนำดินในแต่ละตัวอย่างน้ำหนัก 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น วัดค่า pH บันทึกข้อมูล

3. การแยกได้เดือนฝอยออกจากดิน

นำดินแต่ละตัวอย่างใส่กล่องพลาสติกประมาณ 300 กรัม วางบนกระดาษขี้เถ้าเป็นเหยื่อล่อ (Bedding and Akhurst, 1975) บนผิวดินจำนวน 10-15 ตัว ปิดฝาและคว่ำกล่องพลาสติก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 7 วัน ในดินที่มีได้เดือนฝอย steinernematid และ heterorhabditid ได้เดือนฝอยจะเข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อ หนอนจะตาย จากนั้นนำหนอนที่ตายมาผ่าเพื่อตรวจหาได้เดือนฝอยในตัวแมลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

ทำ Koch's postulates เพื่อยืนยันการเป็นได้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในแมลง (entomopathogenic nematode) โดยนำหนอนที่ตายวางบนกระดาษกรองชุ่มน้ำ (White trap) ให้ได้ตัวอ่อนได้เดือนฝอยระยะ infective-stage juvenile (IJ) ซึ่งจะเคลื่อนที่ออกมาจากซากหนอน นำ IJ มา infect กับหนอนชุดใหม่ ทั้งไว้ประมาณ 5-7 วัน นำหนอนทดสอบมาผ่าพิสูจน์ยืนยันการเป็นศัตรูแมลงของได้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในแต่ละตัวอย่าง ในส่วนของตัวอย่างดินอื่นๆ ถ้าหนอนเหยื่อไม่ตายภายในเวลา 10 วัน ตัวอย่างดินนั้นจะถูกคัดทิ้งไป

4. การแบ่งแยกไส้เดือนฝอยในระดับ family และ genus

เตรียมไส้เดือนฝอยเพื่อการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำไส้เดือนฝอยระยะ J ในแต่ละรหัสไส้เดือนฝอย ปลุกเชื้อในหนอนกินรังผึ้ง หลังจากปลุกเชื้อเป็นเวลา 3 วัน บันทึกสีผิวของหนอนที่ตายในแต่ละรหัส และนำหนอนมาผ่าเพื่อได้ไส้เดือนฝอยระยะตัวเต็มวัยเพศผู้เพศเมีย และหลังปลุกเชื้อ 10 วัน ได้ไส้เดือนฝอยระยะ J นำไส้เดือนฝอยทั้งหมดมาที่น้ำอุ่นอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 วินาที วางไส้เดือนฝอยลงบนสไลด์แก้ว เชียโยแก้ววางบนและปิดทับด้วย cover glass ซิลด้วยน้ำยาซิลสไลด์ นำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope เปรียบเทียบกับ key มาตรฐานของ Kaya and Stock (1988)

5. การบันทึกผล ทำการ mapping พื้นที่เก็บทุกจังหวัด และกำหนดจุดที่มีการค้นพบไส้เดือนฝอยใน family Steinernematidae และ Heterorhabditidae บันทึกชนิดดิน ระดับ pH อุณหภูมิ ผิวดินและอุณหภูมิที่ระดับลึก 10-15 ซม.

2. การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย Thai isolate

1. การเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้งในอาหารเทียม

หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella* L.) ใช้เป็นหนอนทดสอบและเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย Thai isolate เพื่อการเก็บรักษา โดยหนอนกินรังผึ้งเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเทียมสูตรดัดแปลง ส่วนประกอบคือ แป้งข้าวเจ้า 100 กรัม นมถั่วเหลือง 200 กรัม น้ำผึ้ง 100 มล. พอร์มาลีน 5 มล. วิตามิน 20 มล. กลีเซอริน 100 มล. ไข่ผึ้ง 100 กรัม และน้ำกลั่น 375 มล. นำไข่ของ *G. mellonella* ประมาณ 200-300 ฟอง ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 32.5 x 17.6 x 10 ซม. มีฝาครอบเป็นหลอดตาข่ายให้อากาศถ่ายเท ที่บรรจุอาหารเทียม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 °C ไข่ฟักเป็นตัวหนอนวัย 1 ในเวลา 3-4 วัน หลังจากนั้นหนอนเจริญเติบโตตามลำดับ ในเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ได้หนอนวัยสุดท้ายก่อนเข้าดักแด้ (late instar larvae) ซึ่งเป็นวัยที่ใช้ในการขยายปริมาณไส้เดือนฝอยเพื่อการจัดเก็บในแต่ละไอโซเลต

2. การจัดเก็บไส้เดือนฝอยในน้ำกลั่น

ไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินแต่ละสถานที่เก็บ จัดเก็บในน้ำกลั่นใน culture flask รวบรวมเฉพาะไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile เท่านั้น โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณและจัดเก็บดังนี้

เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในหนอนกินรังผึ้ง โดยนำหนอนจำนวน 25 ตัว วางใน Petri dish (เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม.) ที่มีกระดาษกรอง (Whatman # 2) วางไว้ ใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จำนวน $5,000 \pm 500$ ตัวในน้ำ 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 2 วัน นำหนอนมาล้างผ่าน alcohol 75 % และผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำมาวางบน White trap เป็นเวลา 7 วัน ไส้เดือนฝอย IJ รุ่นใหม่จะเคลื่อนที่ออกจากซากหนอน IJ ที่ได้นำมาล้างด้วย hyamine 0.1 % เป็นเวลา 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวของไส้เดือนฝอย ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง ก่อนเก็บใน culture flask (ขนาด 50 มล.) บันทึกรหัสไส้เดือนฝอย และวันที่เก็บลงบน culture flask นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ไส้เดือนฝอยแต่ละรหัสทำการ reculture ทุก 3 เดือน กับหนอนกินรังผึ้งตามวิธีการเดิม

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. และ *Heterorhabditis* sp. Thai isolate วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Random Design) 4 กรรมวิธี ได้แก่ อุณหภูมิ 10 15 25 และ 33°C จำนวน 3 ซ้ำ แบ่งแยกแต่ละสกุล

ไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile (IJ) ของ *Steinernema* sp. (KB code) และ *Heterorhabditis* sp. (RE code) เตรียมได้จากหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) ที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอยแต่ละสกุลเป็นเวลา 10 วัน ได้ IJ ในรุ่นใหม่เพื่อใช้ในการทดลอง นำ IJ ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย hyamine 0.1 % และล้างผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง ไส้เดือนฝอยที่ได้นำใส่ลงใน culture flask ขนาดปริมาตร 50 มล. จำนวน $50,000 \pm 5,000$ ตัว ในน้ำกลั่น 10 มล. จำนวนสกุลละ 12 flask นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 15 25 และ 33°C อย่างละ 3 flask (ซ้ำ)

ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอยแต่ละสกุลทุก 15 30 45 60 75 และ 90 วัน โดยสุ่มนับครั้งละ 1 มล.ต่อ flask รวม 3 flask (ซ้ำ) ในแต่ละอุณหภูมิ นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ANOVA) ตามแผนการทดลอง CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT)

3. การจัดจำแนกไส้เดือนฝอย Thai isolate

1. การจัดจำแนกโดยวิธีผสมข้ามชนิด (cross mating)

เตรียมน้ำเลือดของแมลงจากหนอนกินรังผึ้ง โดยนำตัวหนอนฆ่าเพื่อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 75 % ล้างผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง ใช้กรรไกรตัดขาคู่ที่สองของหนอนและบีบน้ำเลือดเก็บไว้ในหลอดทดสอบ ขนาด 1.5 มล. เก็บน้ำเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนใช้

ไส้เดือนฝอยที่ใช้ในการทดสอบ cross mating คือ *S. carpocapsae* All strain, *S. feltiae* และ *Steinernema* sp. ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย นำไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile ของแต่ละชนิด ใส่ลงใน drop ของน้ำเลือดบนสไลด์หลุม นำไปวางใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. ที่มีกระดาษกรองชุ่มน้ำ ปิดฝา dish ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ตรวจสอบการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จนเป็น young male (YM) และ young female (YF) เชื่อมไส้เดือนฝอยผสมสลับระหว่าง YM และ YF จำนวนอย่างละ 10 ตัว ของแต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบ ลงใน drop น้ำเลือดบนสไลด์หลุม นำไปวางใน Petri dish ที่มีกระดาษกรองชุ่มน้ำ โดยมีไส้เดือนฝอยชนิดเดียวกันผสมกันเองเป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10 วัน ตรวจสอบการผสมพันธุ์และให้ลูกในแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำซ้ำ 3 ครั้ง

2. การศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ Light microscope (LM)

ไส้เดือนฝอยเพื่อการวัดขนาดสัดส่วน เตรียมได้จากหนอนกินรังผึ้งที่ปลูกเชื้อด้วย IJ ของไส้เดือนฝอย KB code ตัวเต็มวัยเพศผู้ เพศเมียของไส้เดือนฝอยใน 1st และ 2nd generation ได้จากการฆ่าหนอนกินรังผึ้งหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 วัน และ 6 วัน ตามลำดับ และไส้เดือนฝอยระยะ IJ ได้จากการเคลื่อนที่ออกมาจากซากของหนอนเป็นเวลาประมาณ 10 วันหลังปลูกเชื้อ ไส้เดือนฝอยทุกระยะการเจริญเติบโตนำมาฆ่าด้วยน้ำอุ่น (50 °C) เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำยา fixative (TAF, 7 ml of 40 % formaldehyde, 2 ml tri-ethanolamine, 91 ml distilled water) นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเชื่อมไส้เดือนฝอยลงใน solution I (20 parts 95 % ethanol, 1 part glycerine, 79 parts distilled water) นำไปวางใน desiccator ที่มี 95 % ethanol บรรจุอยู่ วางไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 12 ชม. เพื่อดึงน้ำออกจากตัวไส้เดือนฝอยซ้ำๆ และมีการแทนที่ด้วยกลีเซอริน จากนั้นเติม solution II (5 parts of glycerine, 95 parts of 95 % ethanol) ลงไป นำไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 3 ชม. กลีเซอรินจะเข้าแทนที่น้ำในตัวไส้เดือนฝอย สามารถเห็นอวัยวะสำคัญภายในตัวไส้เดือนฝอยได้ชัดเจน

แช่ได้เดือนฝอยลงในหยดกลีเซอรินบนสไลด์แก้ว หนูนด้วยใบแก้วก่อนปิดทับด้วย cover slip และซีลด้วยน้ำยาซิลสไลด์ ถ่ายภาพรูปร่างลักษณะและวัดขนาดสัดส่วนภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงโดยวัดส่วนต่างๆ ดังนี้

ตัวเต็มวัยเพศผู้ : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว(W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES); ความยาวหาง (Tail); ความกว้างบริเวณ anus; ความยาว spicule และความยาว gubernaculum

ตัวเต็มวัยเพศเมีย : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว(W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES); ความยาวหาง (Tail); ความกว้างบริเวณ anus และเปอร์เซ็นต์ vulva

ตัวอ่อนระยะ Infective juvenile : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว(W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES) และความยาวหาง (Tail)

นำมาคำนวณค่าสัดส่วน (ratio) โดยใช้ De Man's formula (Poinar, 1986) ดังนี้

Ratio : a = L/W; b = L/ES; c = L/Tail; d = EP/ES; e = EP/Tail

และคำนวณค่าพารามิเตอร์ตามวิธีการของ Nguyen (1993) ดังนี้

D% = EP/ES x 100; E% = EP/Tail x 100

ถ่ายภาพรูปร่างลักษณะที่สำคัญของไข่เดือนฝอยระยะ Infective juvenile ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่างๆ ด้วยกล้อง Olympus รุ่น NBZ ที่มีระบบปรับแต่งสีพื้น (Normaski system) ค่าการวัดขนาดสัดส่วนและรูปร่างลักษณะสำคัญของไข่เดือนฝอย นำไปเปรียบเทียบกับ key to species of the genus *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Nguyen and Smart, 1996)

3. การศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ scanning electron microscope (SEM)

การเตรียมตัวอย่างไข่เดือนฝอยเพื่อทำ SEM ไข่เดือนฝอยระยะ infective juvenile ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ที่ได้จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณในหนอนกินรังผึ้ง นำมาล้างด้วย 0.05 % NaCl 3 ครั้ง และน้ำกลั่น 3 ครั้ง เพื่อล้างผิวของไข่เดือนฝอยให้สะอาด โดยใช้วิธีตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบสูง ไข่เดือนฝอยทั้งหมดนำมาฆ่าในน้ำอุณหภูมิ 60°ซ เป็นเวลา 2 นาที การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจ SEM มีขั้นตอนคือ prefixed ไข่เดือนฝอยใน 3% glutaraldehyde ใน 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) เป็นเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 8°ซ ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำไปแช่ในสารละลายของ

2 % osmium tetroxide เป็นเวลา 12 ชม. ที่อุณหภูมิ 25 °C ล้างน้ำ 1 ครั้ง จากนั้น dehydrated ใน ethanol ระดับต่างๆ ตั้งแต่ 30 50 70 90 95 และ 100 % และทำให้แห้ง (critical point dried) ใน liquid CO₂ นำจัดวางใส่แผ่นฝอยบน SEM stub ภายใต้ stereo microscope coat SEM stub ด้วยทอง นำไปตรวจภายใต้ SEM (JSM-35 CF model) และถ่ายภาพ

4. การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอย Thai isolate โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP

4.1 การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอย ตัดลำตัวไส้เดือนฝอย Thai isolate (KB, AY, SK, PC codes) และไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* และ *S. feltiae* ด้วยเข็มขนาดเล็ก ในหยดของ worm lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.45 % Tween 20, 0.01 % gelatin, 60 mg/ml proteinase K) บนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ดูดของเหลวเก็บไว้ในหลอดทดสอบขนาด 0.5 มล. จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -40 °C ถึง -80 °C เป็นเวลา 10-20 นาที ต่อด้วย 65 °C 1 ชั่วโมง และ 95 °C 10 นาที

4.2 การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาใช้เป็นต้นแบบสำหรับการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีของ Joyce *et al.* (1994) โดยใช้ไพรเมอร์

18S (TTGATTACGTCCCTGCCCTTT)

26S (TTTCACTCGCCGTTACTAAGG)

ในปฏิกิริยารวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร dNTP 0.5 ไมโครลิตร 18S (forward primer) 0.5 ไมโครลิตร 26S (reverse primer) 0.5 ไมโครลิตร Taq polymerase (2U/ml) 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นในปฏิกิริยาให้ครบ 45 ไมโครลิตร และใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ (worm lysate) 5 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาเข้าเครื่อง DNA thermal cycler ตั้งโปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

1 รอบที่	94 °C	(2 นาที)
40 รอบที่	94 °C	(30 วินาที)
	45 °C	(60 วินาที)
	72 °C	(1.5 นาที)
1 รอบที่	72 °C	(5 นาที)

ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x Tris-borate buffer (TBE) ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมสี gel ด้วย ethidium bromide และตรวจแถบ (band) ของดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (UV transilluminator)

4.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RFLP (restriction fragment length polymorphism) นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 4.2 ของไส้เดือนฝอย KB code, *S. carpocapsae* และ *S. feltiae* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 17 ชนิด คือ *Alu I*, *Dde I*, *EcoR I*, *EcoR II*, *Hae III*, *Hha I*, *Hind III*, *Hinf I*, *Hpa I*, *Kpn I*, *Pst I*, *Pvu II*, *Rsa I*, *Sal I*, *Sau3A I*, *Sau96 I* และ *Xba I* และดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอย KB, AY, SK, PC, *S. carpocapsae*, *S. feltiae* ตัดด้วยเอนไซม์ 9 ชนิด คือ *Alu I*, *Dde I*, *Hha I*, *Hind III*, *Hinf I*, *Hpa I*, *Rsa I*, *Sau3A I* และ *Xba I* ปริมาตรแต่ละเอนไซม์เท่ากับ 10 ไมโครลิตร รวมกับดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ของแต่ละไอโซเลต บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาตั้งแต่ 3-12 ชม. จากนั้นนำดีเอ็นเอมาแยกขนาดใน 1.5% agarose gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชม. และย้อมสีด้วย ethidium bromide ตรวจสอบจำนวนและขนาดของดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator และบันทึกภาพด้วยกล้องโฟลลอลอยด์

4. การศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code

1. การศึกษาวงจรชีวิต ใช้หลอดทดสอบชนิด microtube (1.5 มล.) เจาะรูที่ฝา นำกระดาษกรอง Whatman # 2 ขนาด 1 x 1.5 ซม. ใส่ลงไปในหลอดทดสอบ ใส่ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code ระยะเข้าทำลาย จำนวน 300 ± 50 ตัวที่อยู่ในน้ำ 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำหนอนกินรังผึ้งใส่ 1 ตัวต่อ 1 หลอดทดสอบ จำนวน 35 หลอดทดสอบ (ซ้ำ) และเก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30°C นำหนอนมาผ่าทุกวันๆ ละ 5 ซ้ำ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของไส้เดือนฝอยระยะต่างๆ จนครบ 1 วงจรชีวิต

2. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อวงจรชีวิต นำไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code ระยะเข้าทำลายจำนวน 300 ± 50 ตัวที่อยู่ในน้ำ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. ที่มีกระดาษกรอง Whatman # 2 วางไว้ จากนั้นใส่หนอนกินรังผึ้งจำนวน 10 ตัวต่อ dish นำไปวางที่อุณหภูมิ 15 20 25 30 35 และ 38 °C นำหนอนแต่ละอุณหภูมิมาผ่าจำนวน 3 ตัว (ซ้ำ) ที่เวลา 24 48 72 96 120 และ 144 ชม. บันทึกการเจริญเติบโตและนับจำนวนแต่ละระยะของไส้เดือนฝอยที่อุณหภูมิต่างๆ คำนวณเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยในแต่ละช่วงเวลา

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อ sex ratio วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 10 ซ้ำ นำไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code ระยะเข้าทำลายจำนวน 300 ± 50 ตัวที่อยู่ในน้ำ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. ที่มีกระดาษกรอง Whatman # 2 วางไว้ จากนั้นใส่หนอนกินรังผึ้งจำนวน 10 ตัวต่อ dish นำไปวางที่อุณหภูมิ 20 25 30 และ 35 °ซ เป็นเวลา 3 วัน นำหนอนแต่ละอุณหภูมิมา ผ่าจำนวน 10 ตัว (ซ้ำ) บันทึกจำนวนการเป็นเพศผู้และเพศเมียในแต่ละอุณหภูมิ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ANOVA) ตามแผนการทดลอง และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเข้าทำลาย (infection) นำไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code ระยะเข้าทำลายจำนวน 300 ± 50 ตัวที่อยู่ในน้ำ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. ที่มีกระดาษกรอง Whatman # 2 วางไว้ จากนั้นใส่หนอนกินรังผึ้งจำนวน 10 ตัวต่อ dish นำไปวางที่อุณหภูมิ 15 20 25 30 35 และ 38 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. นำหนอนจำนวน 5 ตัวของแต่ละอุณหภูมิ มาผ่านับจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายและนับจำนวนหนอนตายภายในเวลา 24 ชม. คำนวณค่าเฉลี่ยและคิดเปอร์เซ็นต์จำนวนไส้เดือนฝอยเข้าทำลายและเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนทดสอบ

5. การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ symbiotic bacteria จากไส้เดือนฝอย

ปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code ระยะเข้าทำลาย ในหนอนกินรังผึ้งเป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำหนอนที่ตายมาล้างฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 75% และล้างผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง ใช้กรรไกรตัดส่วนหัวของหนอนและใช้ลูบแตะน้ำเลือด นำมา streak บนอาหาร NBTA (37 g standard-I-nutrient agar, 25 mg bromthymol blue, 1,000 ml distilled water, 4 ml sterile filtrate 1 % 2,3,5 triphenyl-tetrazolium chloride solution) ทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 25 °ซ บันทึกการดูสี bromthymol blue ของแบคทีเรียจากอาหาร NBTA

5. การศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code

1. ทดสอบศักยภาพของสายพันธุ์โดยวิธี insect bioassay วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธีคือ ใส่ไส้เดือนฝอย 0 4 6 8 และ 10 ตัวต่อหนอนทดสอบ 1 ตัว งานทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง โดยมีวิธีการคือ ใช้หลอดทดสอบชนิด microtube (1.5 มล.) เจาะรูที่ฝา นำกระดาษกรอง Whatman #2 ขนาด 1 x 1.5 ซม. ใส่ลงไปในหลอดทดสอบ ใช้ไมโครไปเปตปรับที่ 25 ไมโครลิตร ดูดไส้เดือนฝอยระยะ IJ ที่อยู่ในน้ำกลั่นตามกรรมวิธีกำหนด ใส่ลงไปหลอดทดสอบที่เตรียมไว้ จำนวนละ 10 หลอด นำหนอนกินรังผึ้งใส่ 1 ตัวต่อหลอด เก็บที่อุณหภูมิ $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนทดสอบ ที่ 12 24 36 และ 48 ชม.

2. การทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิ ใช้หลอดทดสอบชนิด microtube (1.5 มล.) เจาะรูที่ฝา นำกระดาษกรอง Whatman #2 ขนาด 1 x 1.5 ซม. ใส่ลงไปหลอดทดสอบ ใส่ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code สายพันธุ์ไทย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์จากต่างประเทศ (*S. carpocapsae*) สายพันธุ์ละ 300 ± 50 ตัวต่อน้ำ 25 ไมโครลิตร จำนวนสายพันธุ์ละ 90 หลอดทดสอบ จากนั้นนำหนอนกินรังผึ้งใส่ 1 ตัวต่อ 1 หลอดทดสอบ แบ่งเก็บอย่างละ 15 หลอด ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 15 20 25 30 35 และ 38°C บันทึกการตายของหนอนทดสอบในแต่ละสายพันธุ์ทุก 2 ชม. เริ่มตั้งแต่ 10 ชม. หลังการใส่ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สายพันธุ์ จนครบ 48 ชม.

6. การขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code ในอาหารเทียม

1. การเตรียมไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code ระยะเข้าทำลาย (IJ) เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในหนอนกินรังผึ้ง ตามวิธีการของ Kaya และ Stock (1988) ได้ไส้เดือนฝอย IJ รุ่นใหม่ นำมาล้างด้วย 0.1 % hyamine เป็นเวลา 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เก็บไว้ใน culture flask ที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียม symbiotic bacteria แยกเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้งที่ถูกไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code เข้าทำลายบนอาหาร NBTA และ nutrient agar (8 g nutrient broth, 15 g agar, 1,000 ml distilled water) ได้โคโลนีเดี่ยวชนิด primary from เก็บเป็น stock culture ใน glycerol medium ที่อุณหภูมิ -70°C

3. การเตรียมอาหารชนิดวุ้น ผสมอาหารสูตรดัดแปลง 5 สูตร lipid agar (control) คือ

สูตร SM : soybean milk 10 g, 5 g yeast extract, 1 ml sunflower oil,
10 g agar, 1 liter distilled water

สูตร WF : wheat flour 10 g, 5 g yeast extract, 1 ml sunflower oil,
10 g agar, 1 liter distilled water

สูตร SF : soybean flour 10 g, 5 g yeast extract, 1 ml sunflower oil,
10 g agar, 1 liter distilled water

สูตร CS : corn syrup 10 g, 5 g yeast extract, 1 ml sunflower oil,
10 g agar, 1 liter distilled water

สูตร CF : corn flour 10 g, 5 g yeast extract, 1 ml sunflower oil,
10 g agar, 1 liter distilled water

lipid agar : 10 g corn syrup, 5 g yeast extract, 25 g nutrient agar,
2.5 ml cod liver oil, 2 g $MgCl_2$, 1 liter distilled water

นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทอาหารแต่ละสูตรใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. ปริมาตร 20 มล.ต่อ dish ในสภาพปลอดเชื้อ

4. การปฏิบัติงานทดลอง ย้ายโคโลนีของแบคทีเรียจาก stock culture ลงใน flask ขนาด 125 มล. ที่มีอาหารชนิด nutrient broth (8 g Bacto nutrient broth, 1,000 ml distilled water) ปริมาตร 20 มล. นำไปตั้งบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรีย และนำไปหยดลงบนอาหารวุ้นสูตรอาหารต่างๆ จำนวน 10^7 เซลล์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นใส่ใส่ได้ตอนฝอย IJs ที่เตรียมไว้จำนวน $5,000 \pm 500$ ตัวต่อ Petri dish ทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 10 วัน ตรวจนับผลผลิตได้ตอนฝอยที่เพาะเลี้ยง จำนวน 10 ซ้ำต่อสูตรอาหาร คำนวณค่าเฉลี่ยและค่า standard error

7. การทดสอบ Pathogenicity ของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code กับแมลงในห้องปฏิบัติการ

แมลงทดสอบ 12 ชนิด คือ หนอนกระทู้ผัก (common leafworm : *Spodoptera litura*) หนอนกระทู้หอม (beet armyworm : *S. exigua*) หนอนใยผัก (diamond-back moth : *Plutella xylostella*) หนอนเจาะสมอฝ้าย (American bollworm : *Heliothis armigera*) หนอนเจาะดอกมะลิ (jasmine flower borer : *Henedecasis duplifacialia*) หนอนกินรังผึ้ง (wax moth : *G. mellonella*) หนอนด้วงในถุงเห็ด (mushroom beetle : unidentified) ตัวหมัดกระโดด (flea beetle : *Phyllotreta sinuata*) หนอนด้วงกินรากสตรอเบอร์รี่ (scarab beetle : unidentified) เพลี้ยอ่อน (aphid : *Myzus persicae*) ปลวก (wet wood termite : *Coptotermes* sp.) และแมลงสาป (American cockroach : *Periplaneta americana*) นำแมลงชนิดต่างๆ มาทดสอบใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. ที่วางด้วยกระดาษกรอง Whatman # 2 จากนั้นนำไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายจำนวน $1,000 \pm 100$ ตัว ที่อยู่ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงบนกระดาษกรอง และใส่น้ำกลั่นใน Petri dish ที่เป็น control ตรวจนับการตายที่ 24 ชม. และในแมลงสาปที่ 48 ชม.

8. สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

สถานที่ จุดเก็บตัวอย่างดินรวม 42 จังหวัด แบ่งออกเป็นภาคต่างๆ ดังนี้

1. ภาคเหนือ 9 จังหวัด คือ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง ลำพูน อุตรดิตถ์ น่าน แพร่ ตาก และพิษณุโลก
2. ภาคกลาง 10 จังหวัด คือ เพชรบูรณ์ พิจิตร นครสวรรค์ อุทัย สิงห์บุรี ชัยนาท อ่างทอง กำแพงเพชร นครนายก และปทุมธานี
3. ภาคตะวันตก 4 จังหวัด คือ กาญจนบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม
4. ภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 14 จังหวัด คือ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง จันทบุรี นครราชสีมา บุรีรัมย์ ขอนแก่น ร้อยเอ็ด หนองคาย อุดรธานี กาฬสินธุ์ มหาสารคาม ปราจีนบุรี และสระแก้ว

5. ภาคใต้ 5 จังหวัด คือ ชุมพร ระนอง พังงา กระบี่ และนครศรีธรรมราช

ปฏิบัติงานทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา การศึกษาระดับปริญญาเอก ณ โครงการเกษตรเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ระยะเวลา 4 ปี เริ่มงานตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2539 สิ้นสุดเดือนพฤษภาคม 2543

ผลการดำเนินงาน

1. การสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย

การค้นหาไส้เดือนฝอยใน family Steinernematidae และ Heterorhabditidae ในประเทศไทย ซึ่งประกอบด้วย 3 genera คือ *Steinernema*, *Neosteinerema* และ *Heterorhabditis* เป็นการค้นหาไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ (new species) และสายพันธุ์ใหม่ (new strain) โดยใช้ *Galleria* bait technique ในเขตร้อนชื้นที่มีอุณหภูมิสูงเฉลี่ย 37 °C งานสำรวจได้ปฏิบัติในพื้นที่ทุกภาคของประเทศไทย ที่มีความแตกต่างของแหล่งที่อยู่และสภาพแวดล้อม จากการเก็บตัวอย่างดินในช่วงตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2539 ถึงเดือนมีนาคม 2541 ครอบคลุมทุกภาคของประเทศไทย รวม 42 จังหวัด จำนวนจุดเก็บ 1,530 จุด รวมเท่ากับ 306 ตัวอย่างดิน สามารถแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินได้ใน 9 พื้นที่ (location) คือ กาญจนบุรี พิจิตร อุรุษยา กาฬสินธุ์ มหาสารคาม ขอนแก่น หนองคาย ร้อยเอ็ด และสระแก้ว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย เท่ากับ 21.4 % ของพื้นที่เก็บ และ 2.9 % ของจำนวนตัวอย่างดิน ไส้เดือนฝอยแยกได้จากเนื้อดินชนิดร่วนปนทราย พบในพื้นที่สวนผลไม้ (fruit crop) พื้นที่ปลูกไม้ดอก (ornamental crop) และพื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตร (roadside verge) คิดเป็น 33.3 11.1 และ 55.6 % ของจำนวนตัวอย่างดินที่แยกได้ ตามลำดับ (Table 1, Figure 1) จากผลของอุณหภูมิดิน ณ จุดเก็บ (ลึก 10-15 ซม.) อยู่ในช่วงระหว่าง 24-29 °C และมีอุณหภูมิผิวดิน 27-37 °C มีระดับ pH 6.8-7.9 (Table 2)

จากผลการศึกษาแบ่งแยกในระดับ family และ genus ของไส้เดือนฝอย 9 ไอโซเลท พบไส้เดือนฝอย Thai isolate ทั้ง 2 family โดยแยกได้ไส้เดือนฝอย steinernematid เป็นครั้งแรกในเขตพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี (KB code) ในเดือนธันวาคม 2539 และแยกได้ไส้เดือนฝอย heterorhabditid ในพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ด (RE code) ในเดือนกรกฎาคม 2540 นอกจากนั้น สามารถแยกไส้เดือนฝอย steinernematid ได้ในพื้นที่จังหวัดพิจิตร (PC code) อุรุษยา (AY code) กาฬสินธุ์ (KS code) มหาสารคาม (MK code) ขอนแก่น (KK code) หนองคาย (NK code) และสระแก้ว (SK code) ทั้ง 9 ไอโซเลท สามารถแบ่งแยกในระดับ genus ให้รายละเอียดดังนี้คือ ลักษณะสีผิวของหนอนที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลท แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนของสีผิว หนอนที่ตายโดยไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* spp. ของรหัส KB PC AY KS MK KK NK และ SK มีลักษณะสีผิวน้ำตาลดำ-ดำ และที่ตายโดย *Heterorhabditis* sp. ของรหัส RE สีผิวเป็นสีน้ำตาลแดง-แดงส้ม (Figure 2)

เมื่อพิจารณารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (infective juvenile, IJ) ในส่วนบริเวณหัวของระยะ IJ พบว่าในสกุล *Steinernema* ไม่มี labial tooth (Figure 3 A) แต่ในสกุล *Heterorhabditis* พบ labial tooth บริเวณส่วนหัว (Figure 3 B) ซึ่งเป็นโครงสร้างพิเศษที่พบเฉพาะในสกุลนี้เท่านั้น มีลักษณะคล้ายฟันที่แข็งช่วยในการเจาะทะลุผนังลำตัวของแมลงเหยื่อ นอกจากนี้การพิจารณาดำแหน่งของ excretory pore พบว่า ไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* มีตำแหน่งของ excretory pore (Exp) เหนือ nerve ring (Figure 3 C) ส่วนในสกุล *Heterorhabditis* มีตำแหน่ง Exp ใต้ nerve ring (Figure 3 D)

ในตัวเต็มวัยเพศผู้ของทั้งสองสกุลนี้ สามารถแบ่งแยกได้โดยพิจารณาบริเวณปลายหางที่มีหรือไม่มีอวัยวะเป็นผนังใสบางๆ หุ้มคลุมส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (spicule) เรียกว่า แพนหาง (bursa) ซึ่งมีหน้าที่ในการจับตัวเมียเพื่อการผสมพันธุ์ ในไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* จะไม่พบส่วนของ bursa (Figure 3 E) แต่ใน *Heterorhabditis* ตัวเต็มวัยเพศผู้จะมี bursa คลุมตลอดปลายหาง (Figure 3 F)

ไส้เดือนฝอย Steinernematidae และ Heterorhabditidae ที่พบในประเทศไทย คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การค้นพบแบ่งแยกตาม family เท่ากับ 19 และ 2.4 % ของพื้นที่สำรวจ ตามลำดับ (Figure 4) แบ่งเป็นเปอร์เซ็นต์การแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยเป็นภาคต่างๆ ของประเทศ พบว่ามี การกระจายตัวในพื้นที่ส่วนกลางของประเทศ คือ ภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคตะวันตก พบการกระจายตัวสูงที่สุดในภาคตะวันออก-ออกเฉียงเหนือ เท่ากับ 66.7 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่สำรวจ ยังไม่พบไส้เดือนฝอยในพื้นที่ภาคเหนือและภาคใต้ (Figure 5)

Table 1 Location, soil texture and associated habitat containing the nematode in the Thailand region, during June 1996 to March 1998.

Location	No. of samples	Sampling time (month)	Soil texture	Habitat	Nematode
Rayong	15	June/1996	Sandy loam	Fruit crop	-
			Sand	Beach	-
Chanthaburi	3	June	Sand	Beach	-
Chonburi	5	June	Sand	Beach	-
Chiang Mai	5	August	Sandy loam	Field crop	-
Lampang	5	September	Sandy loam	Woodland	-
Chiang Rai	5	October	Clay loam	Woodland	-
Phetchabun	5	October	Clay loam	Woodland	-
Ratchaburi	3	November	Clay loam	Fruit crop	-
Ranong	4	November	Sandy clay loam	Fruit crop	-
Phangnga	17	November	Sandy loam	Fruit crop	-
Krabi	3	November	Sandy loam	Fruit crop	-
Chumphon	16	November	Sandy loam	Fruit crop	-
Kanchanaburi	12	December	Sandy loam	Fruit crop	+
Chachoengsao	7	January/1997	Sandy loam	Woodland	-
Buriram	7	January	Sandy loam	Field crop	-
Nakhon Ratchasima	8	January	Sandy loam	Field crop	-
Nakhon Sawan	3	February	Sandy loam	Field crop	-
Phichit	9	February	Sandy loam	Fruit crop	+
Phitsanulok	14	February	Sandy loam	Field crop	-
			Sandy loam	Fruit crop	-
Tak	4	February	Sandy loam	Field crop	-
Ayuthaya	5	March	Sandy loam	Ornamental crop	+
Chainat	9	April	Sandy loam	Field crop	-
Singburi	8	April	Sandy loam	Vegetable crop	-
Nakornnayoke	5	April	Sandy loam	Woodland	-
Prathomthane	5	April	Sandy loam	Vegetable crop	-
Kalasin	15	July	Sandy loam	Roadside verge	+
Roiet	15	July	Sandy loam	Roadside verge	+
Mahasarakham	10	July	Sandy loam	Roadside verge	+
Khon Kaen	10	July	Sandy loam	Roadside verge	+
Udon Thani	5	July	Sandy loam	Roadside verge	-
Nongkhai	10	July	Sandy loam	Roadside verge	+
Nakornsritummarat	9	August	Sandy loam	Vegetable crop	-
Nakhonpathom	10	January/1998	Sandy loam	Fruit crop	-
Suphanburi	6	January	Sandy loam	Field crop	-
Prachinburi	8	February	Sandy loam	Roadside verge	-
Sakaeo	5	February	Sandy loam	Fruit crop	+
Angthong	6	March	Sandy loam	Roadside verge	-
Kamphaengphet	9	March	Sandy loam	Roadside verge	-
Phare	5	March	Sandy loam	Roadside verge	-
Nan	5	March	Sandy loam	Roadside verge	-
Uttaradit	8	March	Sandy loam	Roadside verge	-
Lamphum	10	March	Sandy loam	Fruit crop	-
Total 42 locations	306 samples				nema recovered 9 samples

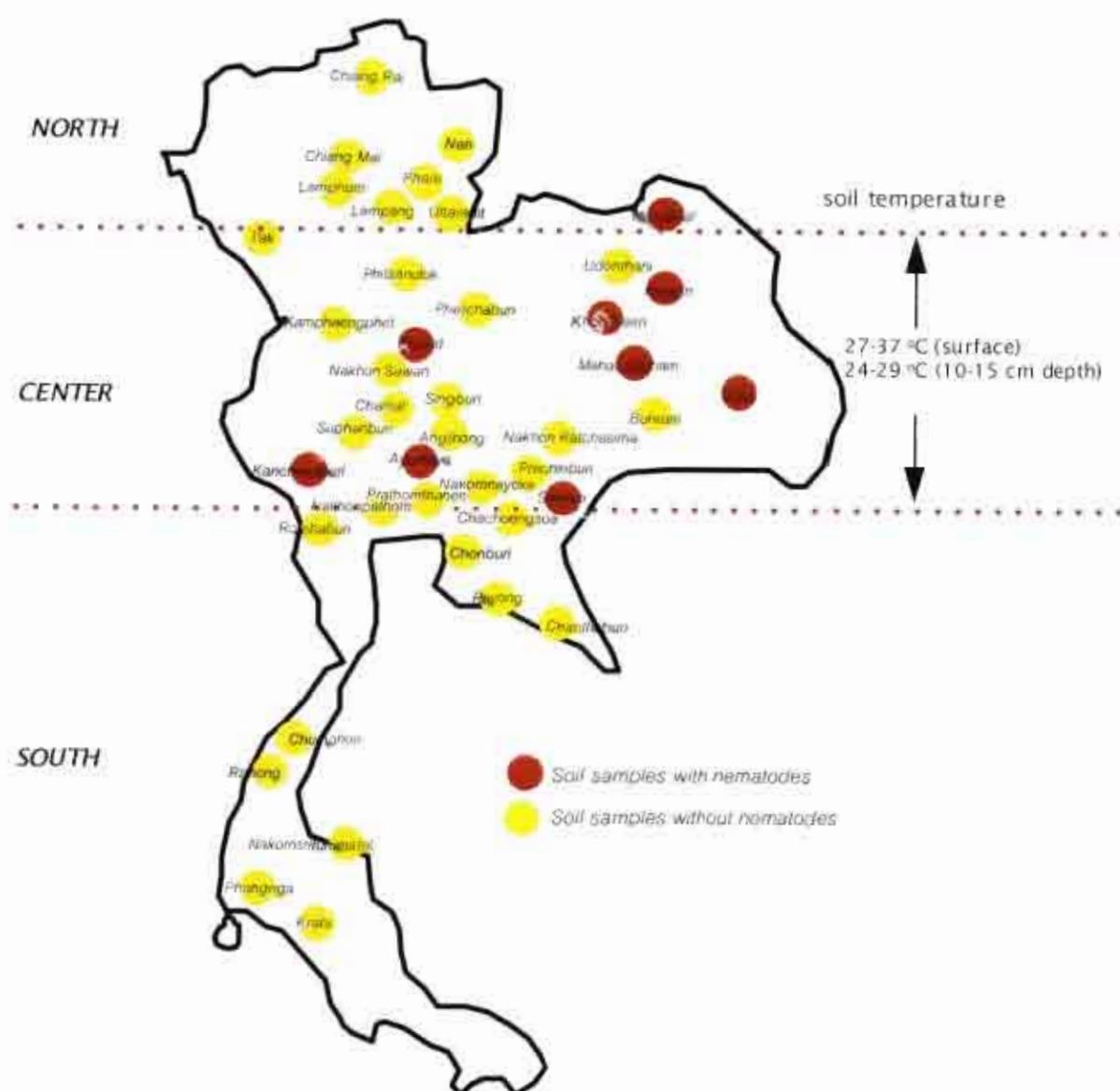


Figure 1 Map of soil sampling area in Thailand showing the location (42 provinces) and temperature zone where nematodes were found.

Table 2

Locations, number of samples with nematode, vegetation, soil temperature and pH containing the entomopathogenic nematodes, *Steinernematid* (S) and *Heterorhabditid* (H) in Thailand.

Nematode code	Locations	No. of samples/ No. samples with nema (% recovered)	Vegetations	Soil temperature		pH		Nematodes	
				surface	10-15 cm depth			S	H
				soil					
KB	Kanchanaburi	12/1 (8.3 %)	Coconut	33.0	27.0	7.2		+	-
PC	Phitchit	9/1 (11.1 %)	Pepper	27.0	24.0	7.1		+	-
AY	Ayuthaya	5/1 (20.0 %)	Jasmine	30.0	28.0	6.8		+	-
KS	Kalasin	15/1 (6.7 %)	Grass	30.5	28.0	7.5		+	-
RE	Roiet	15/1 (6.7 %)	weed	34.5	26.0	7.9		-	+
MK	Maharakham	10/1 (10.0 %)	weed	37.0	29.0	7.3		+	-
KK	Khon Kaen	10/1 (10.0 %)	Grass	28.5	25.0	7.4		+	-
NK	Nongkhai	10/1 (10.0 %)	weed	29.0	27.0	7.4		+	-
SK	Sakaep	5/1 (20.0 %)	Grava	28.0	25.0	7.1		+	-

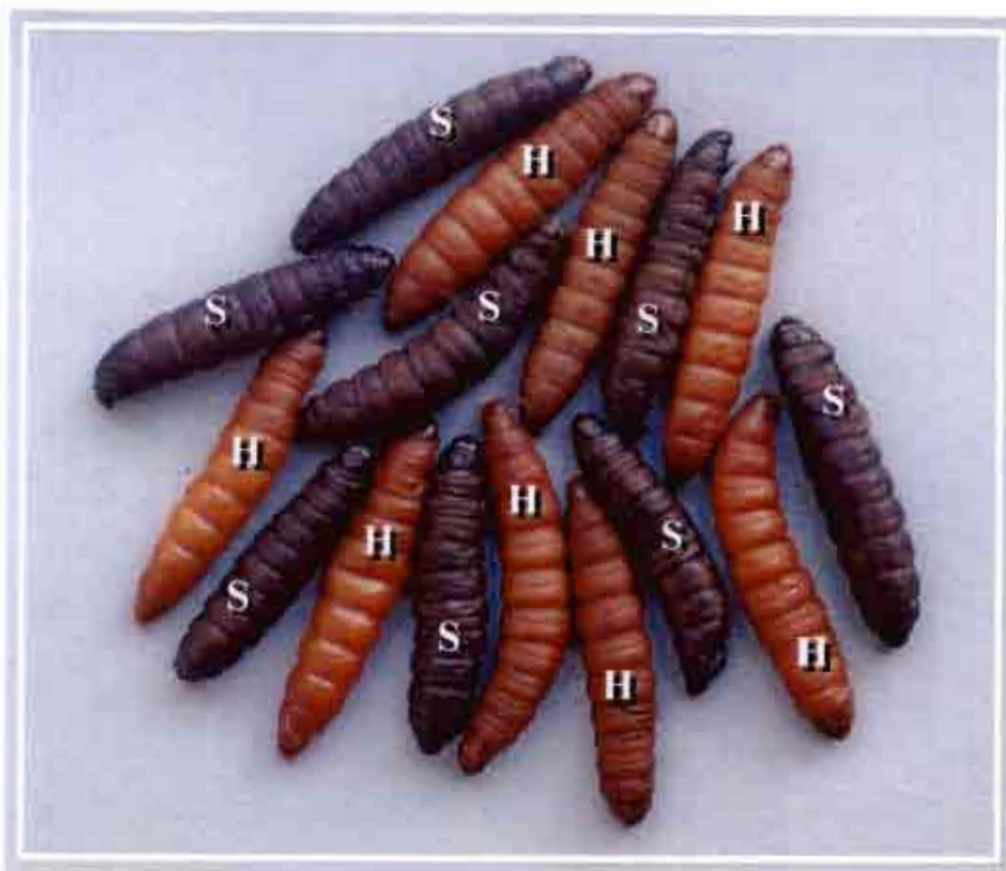


Figure 2 Coloration of *Galleria mellonella* cadavers infected by steinernematids (S) and heterorhabditids (H).

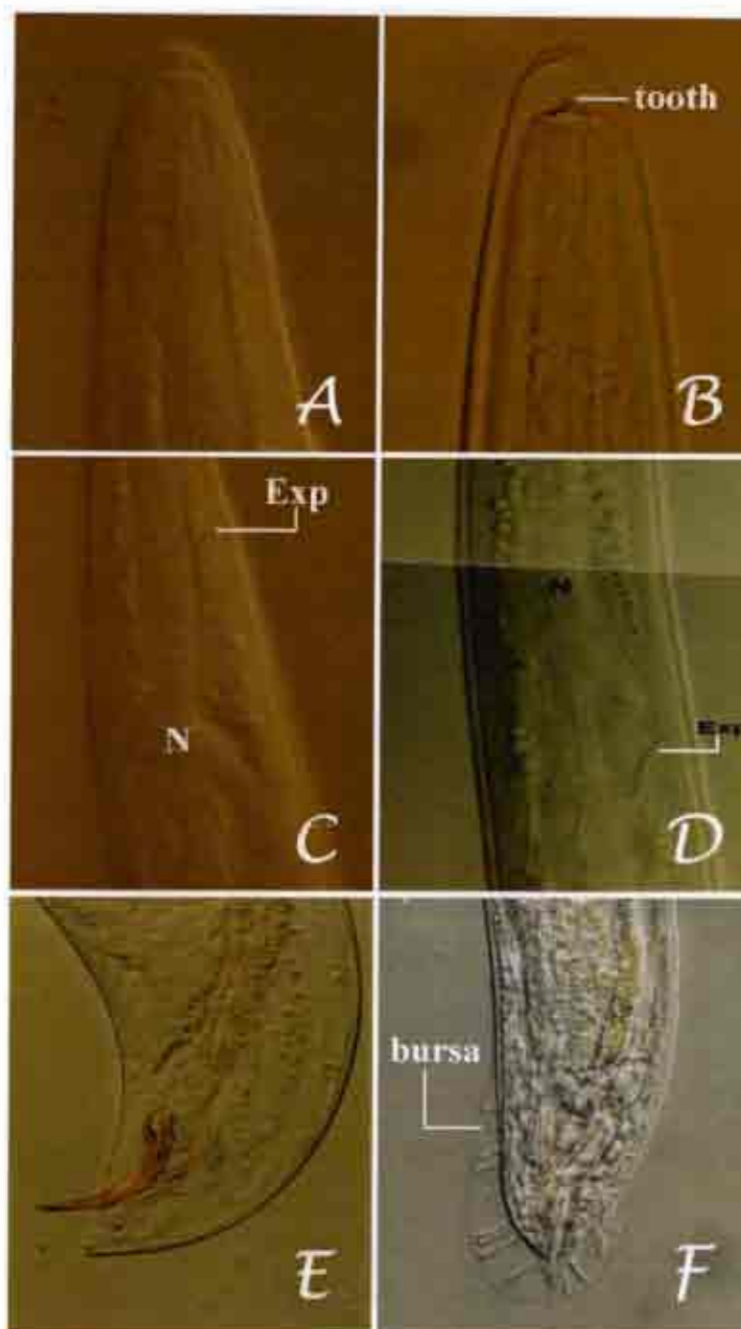


Figure 3

Morphological characters of infective juvenile (IJ) and male of nematode Thai isolate. (A) The IJ of *Steinernema* sp. without tooth. (B) The IJ of *Heterorhabditis* sp. with tooth. (C) The excretory pore (Exp) opening occurs anterior to the nerve ring (N) in *Steinernema* sp. (D) The excretory pore (Exp) opening occurs posterior to the nerve ring (N) in *Heterorhabditis* sp. (E) The male of *Steinernema* sp. without bursa. (F) The male of *Heterorhabditis* sp. with bursa.

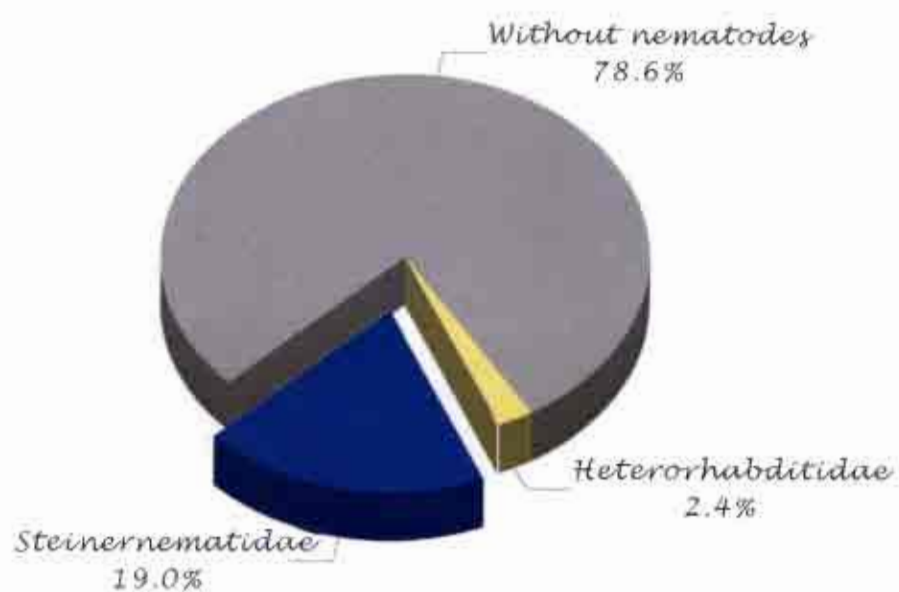


Figure 4 Percentage of number of samples with entomopathogenic nematodes, Steinernematidae, Heterorhabditidae and without nematodes.

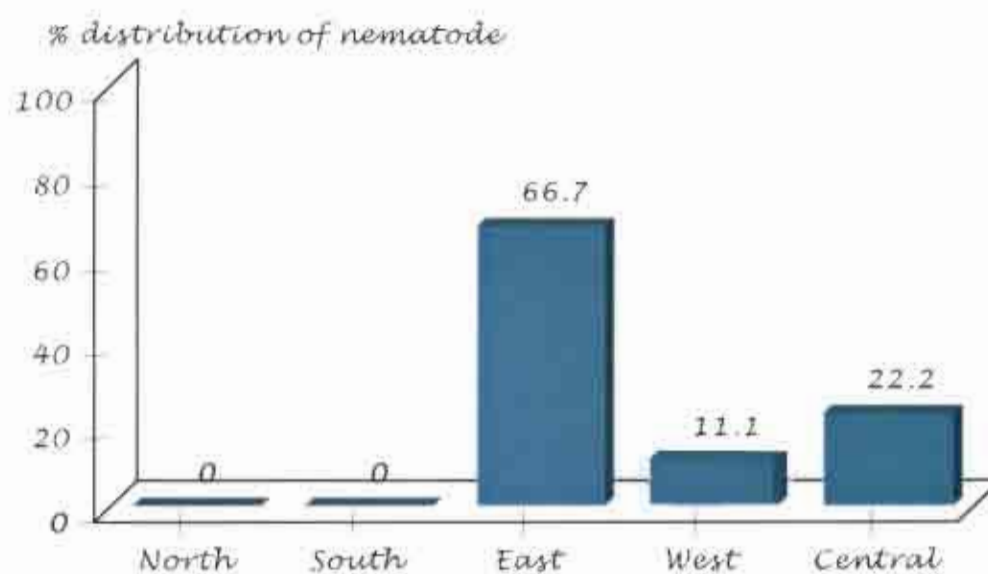


Figure 5 Percentage of distribution of entomopathogenic nematodes in the part of Thailand.

2. การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย Thai isolate

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง Thai isolate ที่แยกได้จากดินใน 9 พื้นที่ของประเทศไทย กำหนดรหัสไส้เดือนฝอย (nema code) คือ KB code (แหล่งเก็บ : กาญจนบุรี); PC code (แหล่งเก็บ : พิจิตร); AY code (แหล่งเก็บ : อัญชยา); KS code (แหล่งเก็บ : กาฬสินธุ์); MK code (แหล่งเก็บ : มหาสารคาม); KK code (แหล่งเก็บ : ขอนแก่น); NK code (แหล่งเก็บ : นครนายก); RE code (แหล่งเก็บ : ร้อยเอ็ด) และ SK code (แหล่งเก็บ : สระแก้ว) จัดเก็บใน culture flask ขนาดความจุปริมาตร 50 มล. รวบรวมเฉพาะไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile เท่านั้น จำนวน $50,000 \pm 5,000$ ตัว ในน้ำกลั่น 10 มล. ไส้เดือนฝอย Thai isolate เก็บรวบรวมไว้ ณ กลุ่มงาน ไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. เพื่อการอนุรักษ์สายพันธุ์และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป (Figure 6)

การศึกษามลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย Thai isolate โดยทดสอบกับ *Steinernema* sp. KB code และ *Heterorhabditis* sp. RE code พบว่า ระดับของอุณหภูมิมีผลต่อการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยทั้งสองสกุลในน้ำกลั่นให้คงความมีชีวิตรอดได้แตกต่างกัน ผลการทดลองมีความแตกต่างทางสถิติ โดยพบว่า การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KB code ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 °ซ ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดได้นานที่สุด 90 วัน มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุดเท่ากับ 39 % รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 33 °ซ ไส้เดือนฝอยตาย 66.7 เปอร์เซ็นต์ในเวลาเท่ากัน แต่การเก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 10 และ 15 °ซ ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ไม่สามารถมีชีวิตรอดเมื่อเวลาผ่านไปเพียง 15 วัน ซึ่งพบว่า ไส้เดือนฝอยเปอร์เซ็นต์การตายสูงเท่ากับ 83.3 และ 82 % ตามลำดับ (Figure 7A)

สำหรับไส้เดือนฝอยในสกุล *Heterorhabditis* sp. RE code แยกได้จากดินในพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ด พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษา คือ 15 °ซ สามารถมีชีวิตรอดได้นานเมื่อเวลาผ่านไป 90 วัน มีการตายของไส้เดือนฝอยเท่ากับ 43 เปอร์เซ็นต์ แต่ในอุณหภูมิ 25 และ 33 °ซ นั้น ไส้เดือนฝอยคงความมีชีวิตสั้นกว่า โดยพบว่า ในเวลา 30 วัน ไส้เดือนฝอยมีการตายเท่ากับ 59 และ 93 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 10 °ซ ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดได้ในช่วงเวลา 15-30 วัน เท่านั้น ซึ่งเท่ากับ 12-79 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไปมากกว่า 30 วัน ไส้เดือนฝอยอ่อนแอและตายเมื่อตรวจสอบที่เวลา 45 วัน พบการตายเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 7B)



Figure 6

Culture collections of entomopathogenic nematodes Thai isolate in Nematology Section, Plant Pathology & Microbiology Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok.

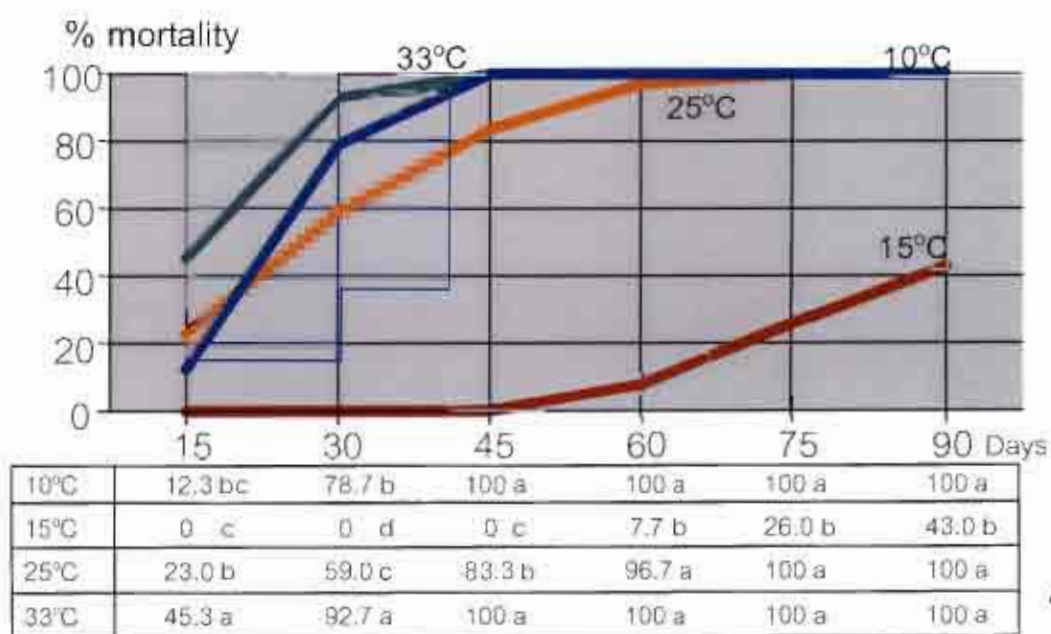
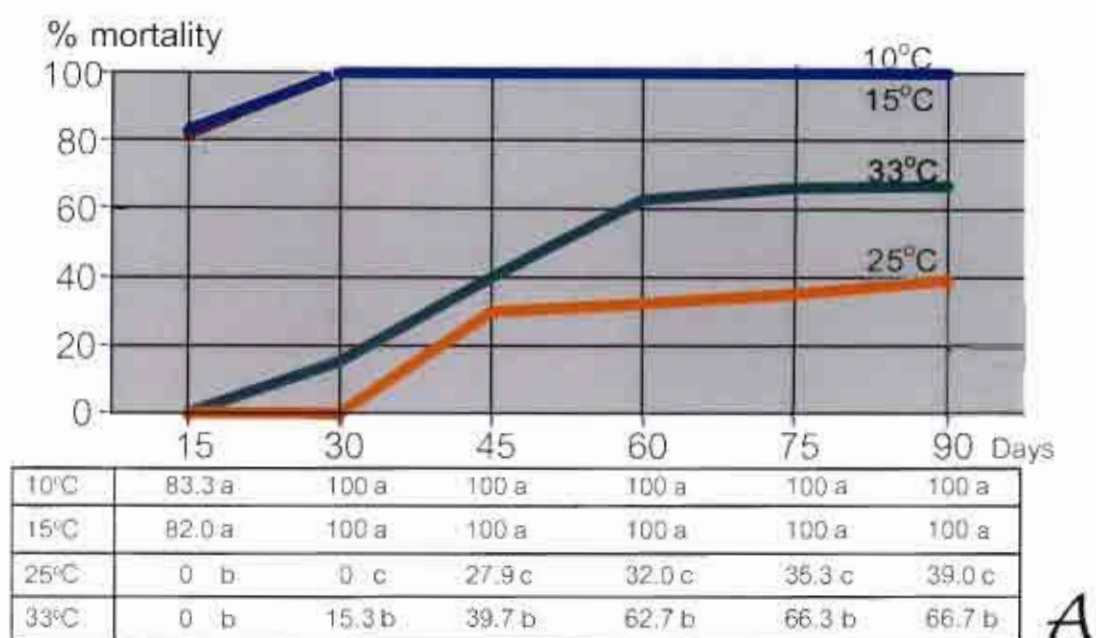


Figure 7 Effect of temperatures on percent mortality of *Steinernema* spp. (A) *Heterorhabditis* sp. (B) in culture flask condition.

3. การจัดจำแนกไส้เดือนฝอย Thai isolate

3.1 ไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp

1. ผลการจัดจำแนกโดยวิธีผสมข้ามชนิด (cross mating)

การทดสอบ cross mating ของไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. ที่แยกได้จากดินใน จังหวัดกาญจนบุรี (KB code) พิจิตร (PC-code) ชัยภูมิ (AY code) กาฬสินธุ์ (KS code) มหาสารคาม (MK code) ขอนแก่น (KK code) นครราชสีมา (NK code) และสระแก้ว (SK code) กับไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* All strain และ *S. feltiae* พบว่า ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่แยกได้จากดินในรหัส KB, KS, MK, KK และ NK มีการผสมพันธุ์ข้ามและให้ลูกรุ่นใหม่ได้ แต่ไม่มีการผสมพันธุ์และวางไข่กับไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* และ *S. feltiae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์จากต่างประเทศ ภายในเวลา 10 วัน ที่ทำการตรวจสอบ (Table 3)

ส่วนไส้เดือนฝอยในรหัส PC สามารถผสมได้กับ *S. carpocapsae* แต่ไม่ผสมกับไส้เดือนฝอยชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบในภายหลังพบว่า ในตัวอย่างดินที่เก็บจากพื้นที่จังหวัดพิจิตรนั้น เคยมีการใช้ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สายพันธุ์อเมริกา ดังนั้น จึงไม่จัดเป็นไส้เดือนฝอย Thai isolate

ส่วนไส้เดือนฝอยในรหัส AY และ SK ไม่ผสมข้ามกับไส้เดือนฝอยรหัส KB, PC, KS, MK, KK, NK และสายพันธุ์จากต่างประเทศ แสดงให้เห็นว่า ไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในประเทศไทย แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) KB KS MK KK และ NK 2) AY และ 3) SK

Table 3 Results of cross-mating study between a Thai strain, *Steinernema* spp. (PC, AY, SK, KB, KS, MK, KK and NK codes) and other *Steinernema* species.

	<i>Steinernema</i> sp.									
	<i>S. feltiae</i>	<i>S. carpocapsae</i>	PC code	AY code	SK code	KB code	KS code	MK code	KK code	NK code
<i>S. feltiae</i>	+									
<i>S. carpocapsae</i>	-	+	+							
<i>Steinernema</i> sp. PC code	-	+	+							
<i>Steinernema</i> sp. AY code	-	-	-	+						
<i>Steinernema</i> sp. SK code	-	-	-	-	+					
<i>Steinernema</i> sp. KB code	-	-	-	-	-	+				
<i>Steinernema</i> sp. KS code	-	-	-	-	-	+	+			
<i>Steinernema</i> sp. MK code	-	-	-	-	-	+	+	+		
<i>Steinernema</i> sp. KK code	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
<i>Steinernema</i> sp. NK code	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Notes : + = presence of progeny; - = absence of progeny.

2. การศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ LM และ SEM

Steinernema sp. KB code

จากการศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ที่แยกได้จากดินในเขตพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี พบว่า มีรูปร่างลักษณะสำคัญและขนาดสัดส่วนของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (infective juvenile) และตัวเต็มวัยเพศผู้-เพศเมีย แตกต่างจากไส้เดือนฝอย 23 ชนิดที่ได้จัดจำแนกและรายงานในต่างประเทศ จึงสามารถจัดจำแนกเป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ (new species) สายพันธุ์ไทย (Thai strain)

การตั้งชื่อได้กำหนดชื่อตามแหล่งที่พบคือ ประเทศไทย และใช้หลักการตั้งชื่อ species ตาม International Code of Zoological Nomenclature ให้ชื่อว่า *S. thailandensis* n. sp.

Type host : unknown แยกได้จากดินชนิดร่วนปนทราย

Type locality : แปลงปลูกมะพร้าว จังหวัดกาญจนบุรี

Type specimens :

Holotype (male, first generation) : แยกจากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) ที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. จัดทำเป็น permanent slide no. SM-01

Allotype (female, first generation) : แยกจากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) ที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. จัดทำเป็น permanent slide no. SF-01

Paratypes (first generation males, first generation females and infective-stage juvenile) : แยกจากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) ที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. ประกอบด้วยตัวเมีย 20 ตัว ตัวผู้ 20 ตัว และตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย 10,000 ตัว เก็บในน้ำยา fixative (TAF) Vial no. SMFIJ-01

specimens ทั้งหมดเก็บที่กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. ประเทศไทย

รายละเอียด (Description) : *Steinernema thailandensis* n. sp.

Infective-stage juvenile : ผลการวัดขนาดสัดส่วนตัวอ่อนระยะ infective juvenile จำนวน 20 ตัว (Table 4) มีรูปร่างท่อนบาง ขนาดความยาวและความกว้างลำตัวเล็ก ($L = 432 \mu\text{m}$; $W = 22 \mu\text{m}$) มี sheath ใสหุ้มตลอดลำตัวปิดส่วนปาก ช่องขับถ่ายและช่องเปิดอื่นๆ ไม่มีปากต่อเชื่อมลำตัวไม่แบ่งแยก labial papillae ยังไม่เจริญ ประกอบด้วย 4 cephalic papillae ส่วนของผนังชั้นนอก (cuticle) เรียบ มีเส้นข้างลำตัว (lateral field) จำนวน 6 เส้น 5 ช่อง พบ phasmid บริเวณปลายหางทางด้านข้างที่ระดับต่ำกว่า anus เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ของความยาวหาง ปลายหางแหลม (tail tip pointed) ไม่มีติ่ง (mucron) ได้เห็นมอ้อยที่มีชีวิตปลายหางจะโค้งงอทำมุม 110° ของหางของลำตัว (Figure 8)

Male, first generation : ผลการวัดขนาดสัดส่วนตัวเต็มวัยเพศผู้จำนวน 10 ตัว (Table 5) ตัวเต็มวัยเพศผู้มีขนาดเล็กกว่า 1 ใน 3 เท่าของตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปร่างลำตัวได้สัดส่วนกันจากหัวถึงปลายหาง ส่วนปลายหางโค้งเป็นรูป C-shaped เมื่อฆ่าด้วยความร้อน มีท่อสร้าง sperm ข้างเดียว (testis single) ซึ่งปลาย testis จะโค้งงอกลับ (reflexed) ส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ (spicule) เป็นคู่ มีสีน้ำตาลอ่อน มีรูปร่างโค้ง ส่วนปลายแหลมเป็นเหลี่ยมมุม ส่วนของ gubernaculum ยาวและแยกออกจาก spicule ส่วนหลัง (posterior) ชัดเจน และในส่วนหน้า (anterior) อยู่ติดกับ spicule เพื่อเป็นตัวบังคับทิศทางและช่วยพยุง spicule ในขณะที่ผสมพันธุ์ บริเวณหางตัวผู้ประกอบด้วย genital papillae จำนวน 23 papillae และปลายหางมีติ่ง (mucron) (Figure 9).

Male, second generation : ผลการวัดขนาดสัดส่วนตัวเต็มวัยเพศผู้จำนวน 10 ตัว (Table 5) ตัวผู้ใน second generation มีลักษณะรูปร่างทั่วไปเหมือนกับใน first generation ยกเว้นมีความยาวลำตัวสั้นกว่า (1360 vs $2008 \mu\text{m}$) และความกว้างลำตัวใน second generation เป็นครึ่งหนึ่งของ first generation (84 vs $154 \mu\text{m}$)

Holotype (male, first generation, in glycerine) : Length $1,934.9 \mu\text{m}$; width $157.6 \mu\text{m}$; head to excretory pore $94.6 \mu\text{m}$; head to end of esophagus $189.1 \mu\text{m}$; body width at anus $51.2 \mu\text{m}$; tail length $31.5 \mu\text{m}$; spicule length $88.7 \mu\text{m}$; gubernaculum length $63.0 \mu\text{m}$

Female, first generation : ผลการวัดขนาดสัดส่วนตัวเต็มวัยเพศเมียจำนวน 10 ตัว (Table 6) ตัวเต็มวัยเพศเมียมีความยาวลำตัวเป็น 3 เท่าของตัวเต็มวัยเพศผู้ (6,927 vs 2,008) ส่วนของผนังลำตัว (cuticle) เรียบ ส่วนหัวกลมมน มีส่วนนูนเป็นลักษณะเนินกลม 6 เนิน มีอวัยวะรับความรู้สึก (sensory organ) ประกอบด้วย 10 papilla แบ่งเป็น 6 labial และ 4 cephalic ช่องปากช่วงบน (cheilothabdon) หนา แยกออกจากส่วนทางเดินอาหารตอนหน้า ตำแหน่งของช่องขับถ่ายผิวหนัง (excretory pore) อยู่บริเวณทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid-metacarpus) ระบบสืบพันธุ์มีท่อรังไข่เป็นแบบ gonads didelphic ส่วนปลายของรังไข่ทั้งสองด้านจะ reflexed มีการผสมพันธุ์แบบ amphimictic อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (vulva) อยู่กลางลำตัว (52 %) มีลักษณะนูนเป็นเนิน (protuberance) และเป็นแบบ flapped epiptygma ความยาวหาง (28.4 μm) สั้นกว่าความกว้างลำตัวบริเวณ anus (91.3 μm) ปลายหางมีติ่ง (Figure 10)

Female, second generation : ผลการวัดขนาดสัดส่วนตัวเต็มวัยเพศเมียจำนวน 10 ตัว (Table 6) มีรูปร่างลักษณะโดยทั่วไปเหมือนกับใน first generation แต่มีขนาดความยาวและความกว้างลำตัวเล็กกว่า และมีปลายหางที่เรียวแหลมกว่า

Allotype (Female, first generation, in glycerine) : Length 7,078.0 μm ; width 214.1 μm ; head to excretory pore 117.6 μm ; head to end of esophagus 276.3 μm ; body width at anus 82.3 μm ; tail length 27.4 μm ; vulva 52.0 %

3. การตรวจสอบชนิดได้เดือนฝอยโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP

ได้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp.

ผลการตรวจสอบ RFLP pattern ของดีเอ็นเอในได้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของ *S. carpocapsae* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะ 17 เอนไซม์ พบว่าได้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. มีจำนวนแถบ (band) ที่ปรากฏบนแผ่นเจลและตำแหน่งของแถบเทียบกับ molecular weight แตกต่างจากได้เดือนฝอย *S. carpocapsae* จำนวน 5 เอนไซม์ คือ *Alu I*, *Dde I*, *Hind III*, *Rsa I* และ *Xba I* ความแตกต่างของดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP ในได้เดือนฝอยทั้งสองชนิดสามารถแบ่งแยกชนิดออกจากกันได้ (Figure 11)

Table 4 Measurements (in μm) of the third-stage juvenile of *Steinernema thailandensis* n.sp. (n=20).

Character	Mean	SD	Range
Body length	432	13	404-460
Greatest width	22	0.6	22-24
EP (head to excretory pore)	35	2	34-39
ES (head to end of esophagus)	106	4	99-112
Tail length	42	2	37-47
Ratio : a	20	0.8	18-21
Ratio : b	4	0.1	3.8-4.3
Ratio : c	10	0.4	9-11
D%	33	1.7	30-37
E%	83	5	75-91

Table 5 Measurements (in μm) of first-generation and second-generation males of *Steinernema thailandensis* n.sp. (n=10).

Character	First generation		Second generation	
	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range
Body length	2,008 (120)	1,784-2,260	1,360 (130)	1,047-1,530
Greatest width	155 (8)	145-172	85 (8)	70-94
EP (head to excretory pore)	93 (6)	85-103	87 (8)	67-98
ES (head to end of esophagus)	188 (7)	175-197	147 (8)	130-159
Anal body width	51 (7)	39-63	29 (2)	27-33
Tail length	33 (4)	24-41	20 (3)	17-27
Spicule length	94 (5)	83-99	85 (4)	78-92
Gubernaculum length	67 (4)	61-79	58 (7)	43-69
D%	50 (4)	44-56	59 (6)	42-64
SW	1.9 (0.3)	1.3-2.5	2.9 (0.3)	2.4-3.3
GS	0.7 (0.05)	0.6-0.8	0.7 (0.1)	0.5-0.8

Table 6 Measurements (in μm) of first-generation and second-generation females of *Steinernema thailandensis* n.sp. (n=10).

Character	First generation		Second generation	
	Mean (SD)	Range	Mean (SD)	Range
Body length	6,927 (871)	5,332-8,332	3,318 (332)	2,857-3,854
Greatest width	230 (16)	206-259	219 (10)	204-243
EP (head to excretory pore)	129 (16)	94-153	86 (7)	71-94
ES (head to end of esophagus)	275 (11)	256-294	271 (11)	255-290
Anal body width	91 (11)	75-106	51 (7)	39-59
Tail length	28 (5)	20-35	42 (4)	36-47
Vulva %	53 (0.9)	52-55	56 (1.6)	53-58

Notes : Ratio a = body length/greatest width; Ratio b = body length/ES; Ratio c = body length/tail length; D% = EP divided by esophagus length $\times 100$; E% = EP divided by tail length $\times 100$; SW = spicule length divided by anal body width; GS = gubernaculum length divided by spicule length.

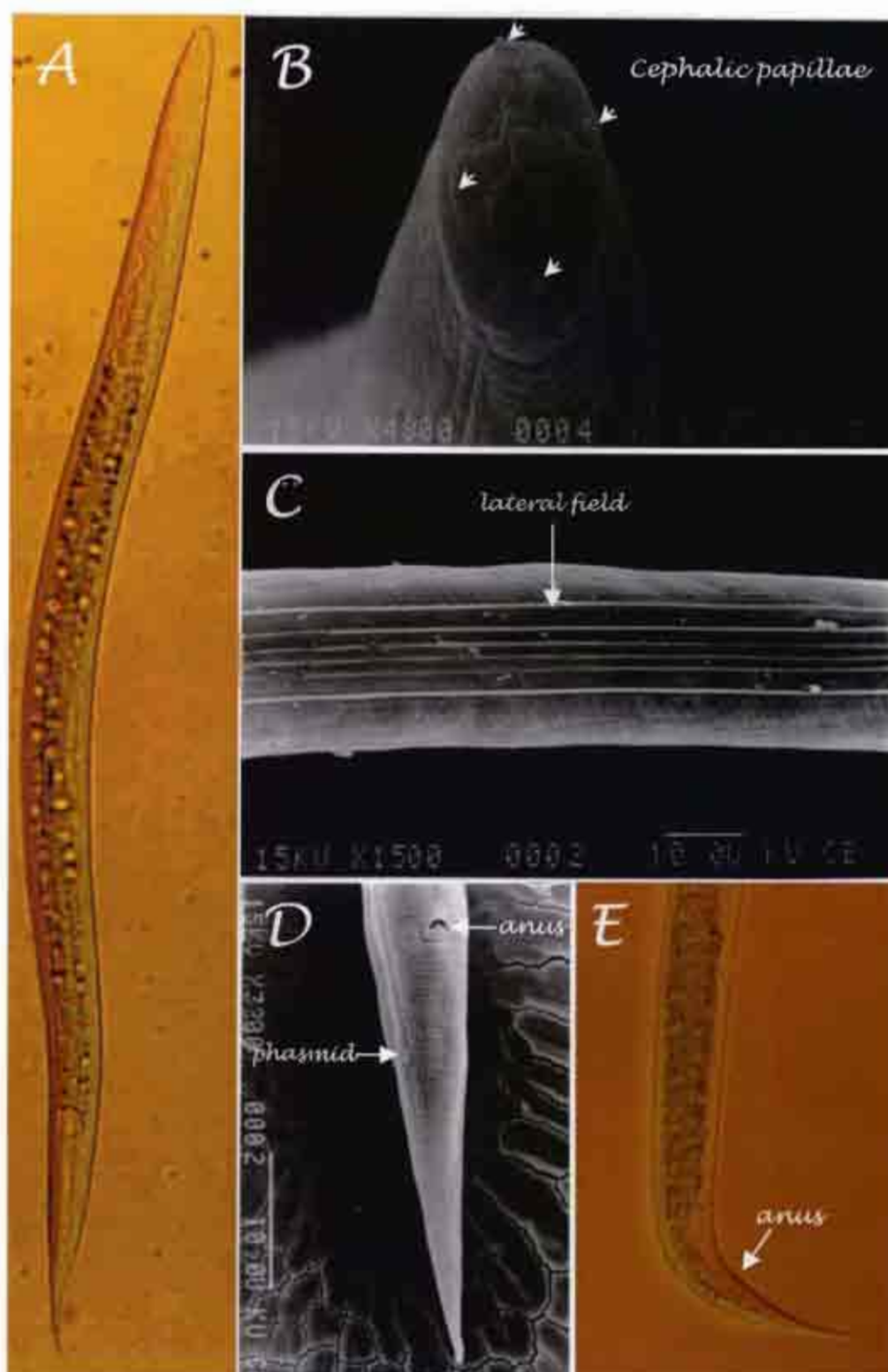


Figure 8 LM and SEM micrographs of *Steinerinema thailandensis* n. sp., third-stage infective juvenile. A) Entire body. B) Anterior region showing four cephalic papillae. C) Lateral field with six ridges. (D) Phasmid region. (E) Posterior region of a living but inactive nematode. Typical ventral curvature of the tail region.

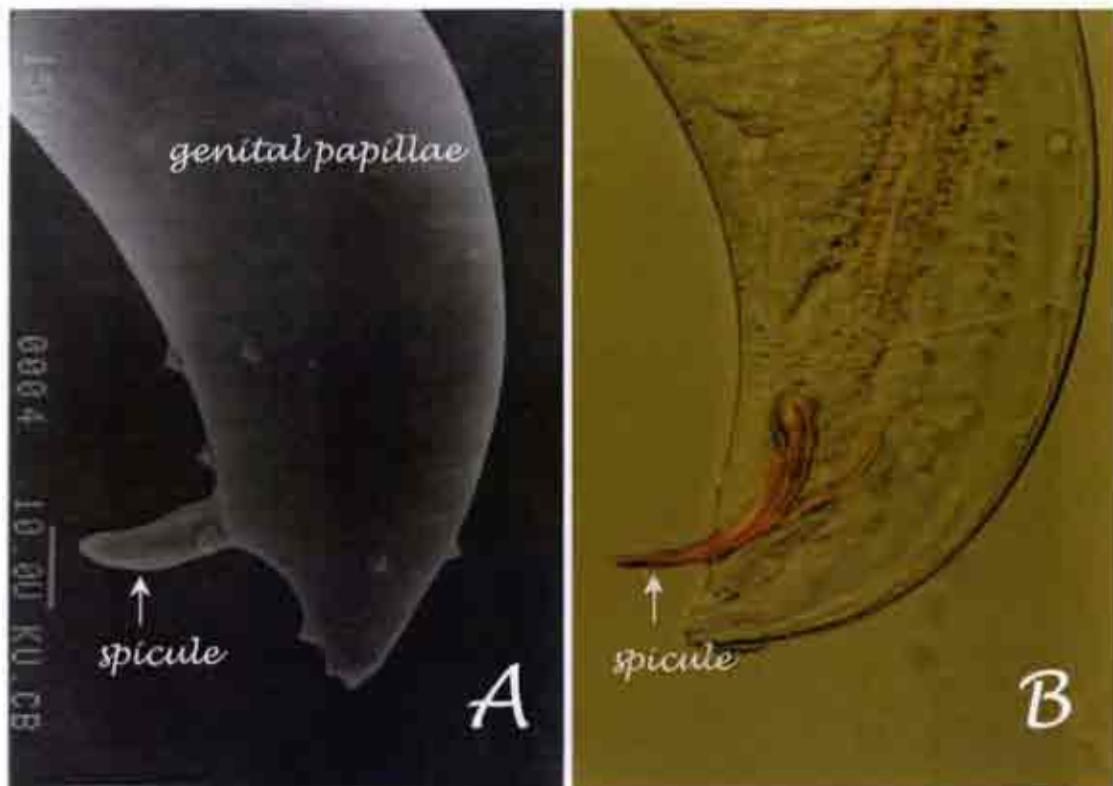


Figure 9 SEM and LM micrographs of *Steinernema thailandensis* n. sp., male. A) Posterior region showing shape, genital papillae and conoid and mucronate. (B) Spicule paired, light brown in color.

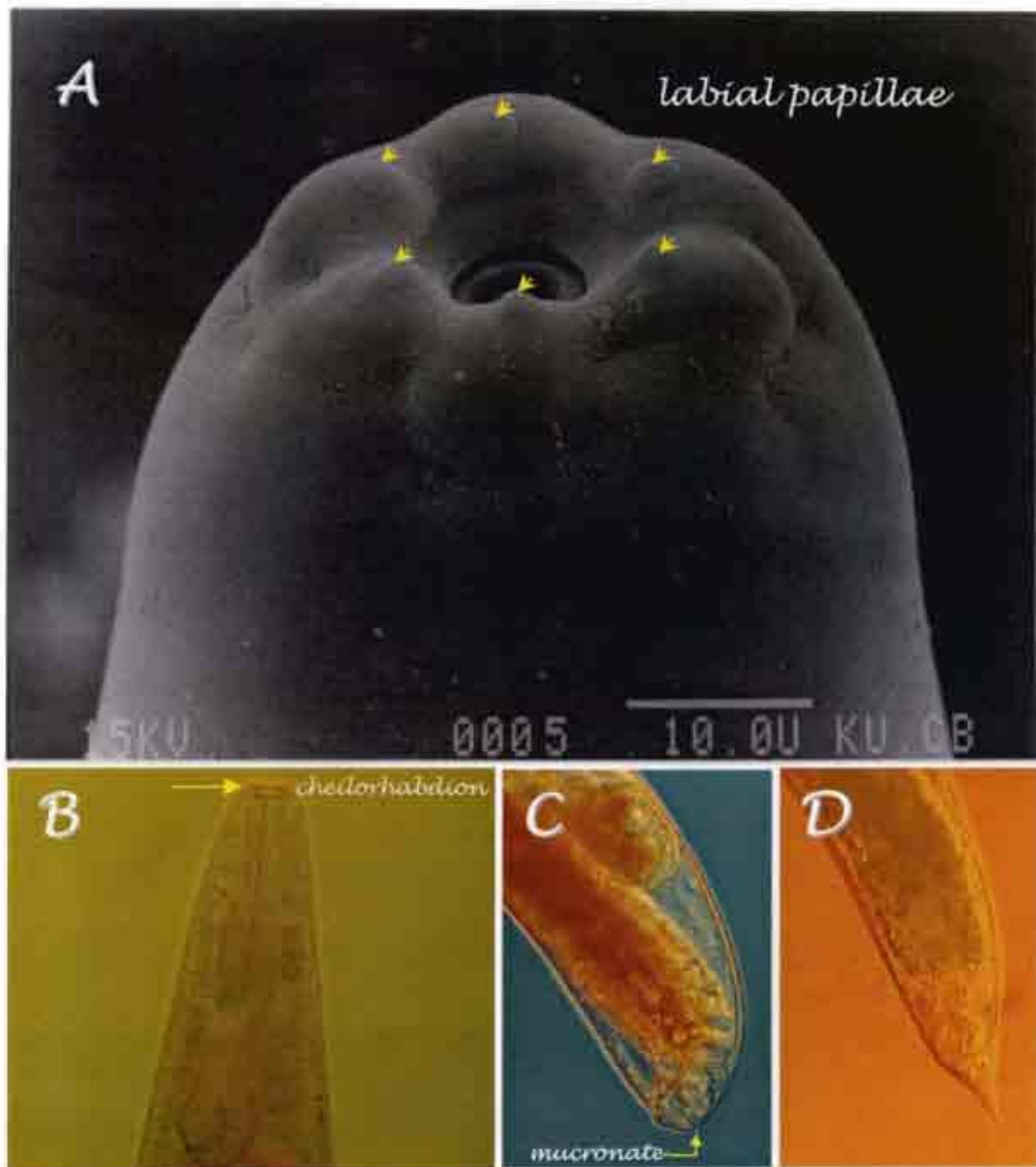


Figure 10 SEM and LM micrographs of *Steinernema thailandensis* n. sp., female. A) Anterior region showing six labial papillae. (B) Head of the first-generation female showing thickened cheilorhabdion. (C) Tail of the first-generation female. (D) Tail of the second-generation.

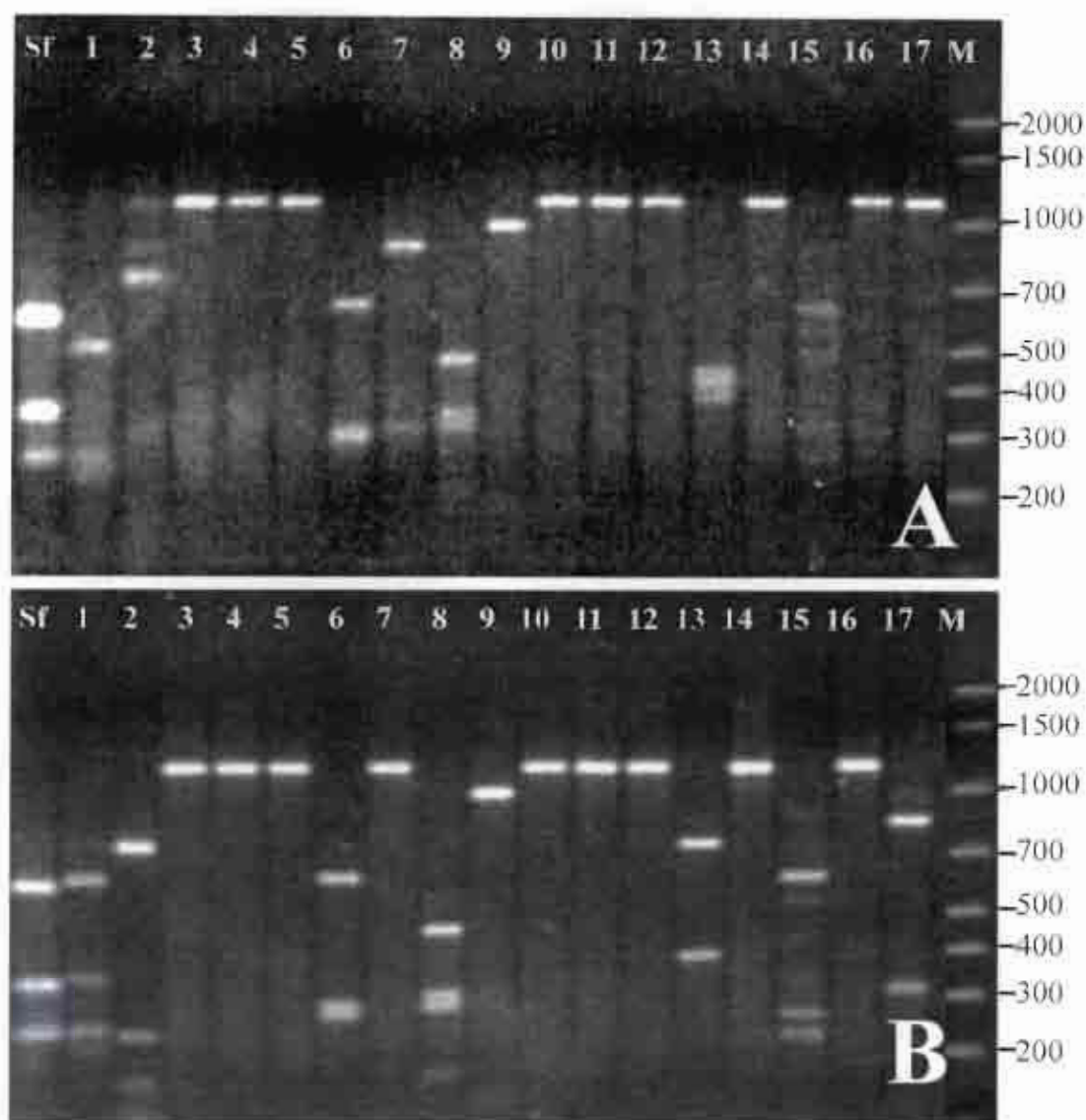


Figure 11. RFLP profiles of two steinernematid isolates digested with 17 different restriction enzymes. (A) *Steinernema carpocapsae*. (B) *S. thailandensis* n. sp. Sf lane is the digest of *S. feltiae* with *Alu* I. Lane 1-17 are digested of each isolate with the following restriction enzymes : 1, *Alu* I; 2, *Dde* I; 3, *EcoR* I; 4, *EcoR* II; 5, *Hae* III; 6, *Hha* I; 7, *Hind* III; 8, *Hinf* I; 9, *Hpa* II; 10, *Kpn* I; 11, *Pst* I; 12, *Pvu* II; 13, *Rsa* I; 14, *Sal* I; 15, *Sau*3A I; 16, *Sau*96 I; and 17, *Xba* I. M, molecular weight marker. A band sizes are shown in base pairs.

การวินิจฉัย *S. thailandensis* n. sp. เป็น new species

จากผลของการวัดขนาดสัดส่วนและรูปร่างลักษณะสำคัญภายใต้กล้อง LM และ SEM สามารถแบ่งแยกได้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. ออกจากได้เดือนฝอยในกลุ่มที่มีความยาวลำตัวของตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย น้อยกว่า 600 ไมครอน ได้แก่ *S. kushidai* (Mamiya), *S. scapterisci* (Nguyen and Smart), *S. carpocapsae* (Weiser), *S. abbasi* (Elawad, Ahmad and Reid), *S. rarum* (De Doucet) and *S. ritteri* (Doucet & Doucet) โดยพบว่า ค่าเฉลี่ยความยาวลำตัวของตัวอ่อนระยะเข้าทำลายของได้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. (432 ไมครอน) มีขนาดเล็กกว่า *S. kushidai* (569 ไมครอน) *S. scapterisci* (572 ไมครอน) *S. carpocapsae* (558 ไมครอน) *S. abbasi* (541 ไมครอน) *S. rarum* (511 ไมครอน) และ *S. ritteri* (510 ไมครอน) เมื่อพิจารณาค่า D% (วัดจากส่วนหัวถึงตำแหน่ง excretory pore ทหารด้วยความยาวจากหัวถึง esophagus $\times 100$) พบว่า ค่าเฉลี่ย D% ของ *S. thailandensis* n. sp. ไม่คาบเกี่ยวกับ *S. kushidai*, *S. carpocapsae*, *S. abbasi* และ *S. ritteri* แต่คาบเกี่ยวกับ *S. scapterisci* และ *S. rarum* และในค่า E% (วัดจากส่วนหัวถึงตำแหน่ง excretory pore ทหารด้วยความยาวหาง $\times 100$) พบว่า ไม่คาบเกี่ยวกับ *S. kushidai*, *S. scapterisci*, *S. carpocapsae* และ *S. rarum* แต่คาบเกี่ยวกับ *S. abbasi* และ *S. ritteri* นอกจากนี้ ได้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. มีความยาวของหาง (tail length) สั้น (Table 7) และมีเส้นข้างลำตัว (lateral field) จำนวน 6 เส้น

ในตัวเต็มวัยเพศผู้สามารถแยกออกจากได้เดือนฝอยชนิดอื่น โดยพิจารณาความยาวของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (spicule) เท่ากับ 84 ไมครอน และอวัยวะช่วยพุง spicule ในการผสมพันธุ์ (gubernaculum) มีความยาว 3 ใน 4 ของความยาว spicule และอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (vulva) มีลักษณะนูนเป็นเนิน (protuberance) และมีอวัยวะเป็นแผ่นคลุมลักษณะ double-flapped epioxygma พบทั้งใน 1st และ 2nd generation

จากการตรวจลอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP ของได้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของ *S. carpocapsae* พบว่า มีความแตกต่างของจำนวนและตำแหน่งของ band บนแผ่นเจล ของ restriction enzyme 5 ชนิด ได้เดือนฝอยทั้งสองชนิดจึงแยกออกจากกัน

Table 7 Comparison of morphometric characters of infective-stage juveniles and males of *Steinernema thailandensis* n. sp. and other *Steinernema* spp.

Species	Infective-stage juveniles			Males		Reference
	Body length (μm)	Tail length (μm)	D% (%)	E% (%)	Spicule length (μm)	Gubernaculum (μm)
<i>S. kushidai</i>	589 (524-662)	50 (44-59)	41 (38-44)	92 (84-95)	63 (48-72)	44 (39-60)
<i>S. scapterisci</i>	572 (517-609)	54 (48-60)	31 (27-40)	73 (60-80)	83 (72-92)	65 (59-75)
<i>S. carpocapsae</i>	558 (438-650)	53 (46-61)	26 (23-28)	60 (54-66)	66 (58-77)	47 (39-55)
<i>S. abbasi</i>	541 (496-579)	56 (52-61)	53 (51-58)	86 (79-94)	65 (57-74)	45 (33-50)
<i>S. rarum</i>	511 (443-573)	51 (44-56)	35 (30-39)	72 (63-80)	47 (42-52)	34 (23-38)
<i>S. ritteri</i>	510 (470-590)	49 (44-54)	46 (44-50)	88 (79-97)	69 (58-75)	44 (33-50)
<i>S. thailandensis</i> n. sp.	432 (404-460)	42 (37-47)	33 (30-37)	83 (75-91)	84 (73-89)	67 (61-79)

Notes: D%, distance from anterior end to excretory pore divided by distance from anterior end to esophagus x 100; E%, distance from anterior end to excretory pore divided by the tail length x 100.

ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. SK, AY และ PC code

จากผล RFLP pattern ของดีเอ็นเอในไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ไอโซเลท SK, AY และ PC เปรียบเทียบกับ pattern ของไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. และ *S. carpocapsae* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 9 เอนไซม์ พบว่า ในเอนไซม์ *Alu*I ตัดดีเอ็นเอของไอโซเลท AY และ SK แสดงจำนวนแถบและขนาดของดีเอ็นเอบนแผ่นเจลเหมือนกัน แต่แตกต่างจาก *S. thailandensis* n. sp. และ *S. carpocapsae* ส่วน PC เหมือนกับ pattern ของ *S. carpocapsae* และในเอนไซม์ *Dde*I และ *Hha*I พบว่า ไส้เดือนฝอยทุกไอโซเลทไม่แตกต่างกัน (Figure 12A)

ใน RFLP pattern ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III พบว่า ไส้เดือนฝอย AY และ SK มีจำนวนแถบและขนาดของดีเอ็นเอเหมือนกับ *S. thailandensis* n.sp. และ PC เหมือนกับ *S. carpocapsae* ในเอนไซม์ *Hinf*I พบว่า ไอโซเลท AY แตกต่างจากทุกไอโซเลท ส่วนในเอนไซม์ *Hpa*I เหมือนกันทุกไอโซเลท (Figure 12B)

ในเอนไซม์ *Rsa*I พบว่า ไส้เดือนฝอย AY และ SK เหมือนกับ *S. thailandensis* n.sp. เช่นเดียวกับ PC เหมือนกับ *S. carpocapsae* ส่วนในเอนไซม์ *Sau*3A I ไอโซเลท SK แตกต่างจากทุกไอโซเลท สำหรับในเอนไซม์ *Xba*I ไอโซเลท SK เหมือนกับ *S. thailandensis* n. sp. และ AY, PC และ SC เหมือนกัน (Figure 12C)

จำนวนแถบบนแผ่นเจลและขนาดของดีเอ็นเอ แสดงถึงความแตกต่างในระดับยีนของไส้เดือนฝอยในแต่ละไอโซเลท โดยขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ที่นำมาตัดที่ตำแหน่ง ITS ของ ribosomal DNA จาก RFLP pattern ที่ตัดด้วยเอนไซม์ 9 ชนิด พบว่า มีเอนไซม์ 3 ชนิด ไม่สามารถแบ่งแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอในไอโซเลทที่นำมาตรวจสอบได้คือ *Dde*I, *Hha*I และ *Hpa*I ส่วนในเอนไซม์ *Rsa*I และ *Hind* III สามารถแบ่งแยกดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยออกเป็น 2 กลุ่ม โดยไอโซเลท AY และ SK เหมือนกับ *S. thailandensis* n.sp. และไอโซเลท PC เหมือนกับ *S. carpocapsae* ส่วนชนิดของเอนไซม์ที่แบ่งแยกความแตกต่างของแต่ละไอโซเลทออกจากกัน ได้แก่ *Alu*I, *Hinf*I, *Sau*3A I และ *Xba*I ซึ่งสามารถให้คำตอบของความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลทได้อย่างชัดเจน โดยเอนไซม์ *Alu*I แบ่งแยก AY และ SK ออกจาก *S. thailandensis* n. sp. และเอนไซม์ *Hinf*I และ *Sau*3A I แบ่งแยก AY ออกจาก SK ดังนั้น ไส้เดือนฝอยไอโซเลท AY ไม่ใช่ชนิดเดียวกับไอโซเลท SK และ *S. thailandensis* n.sp. ส่วนไอโซเลท SK แตกต่างจาก *S. thailandensis* n.sp. เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I และ *Sau*3A I

สำหรับไอโซเลท PC พบว่าการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 9 ชนิด ให้ RFLPs pattern ที่เหมือนกับ *S. carpocapsae* จึงสามารถสรุปได้ว่าเป็นไส้เดือนฝอยชนิดเดียวกัน และการแบ่งแยก PC ออกจาก AY, SK และ *S. thailandensis* n.sp. พบว่า RFLP pattern แสดงให้เห็นความแตกต่างของดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I, *Hind* III และ *Rsa* I

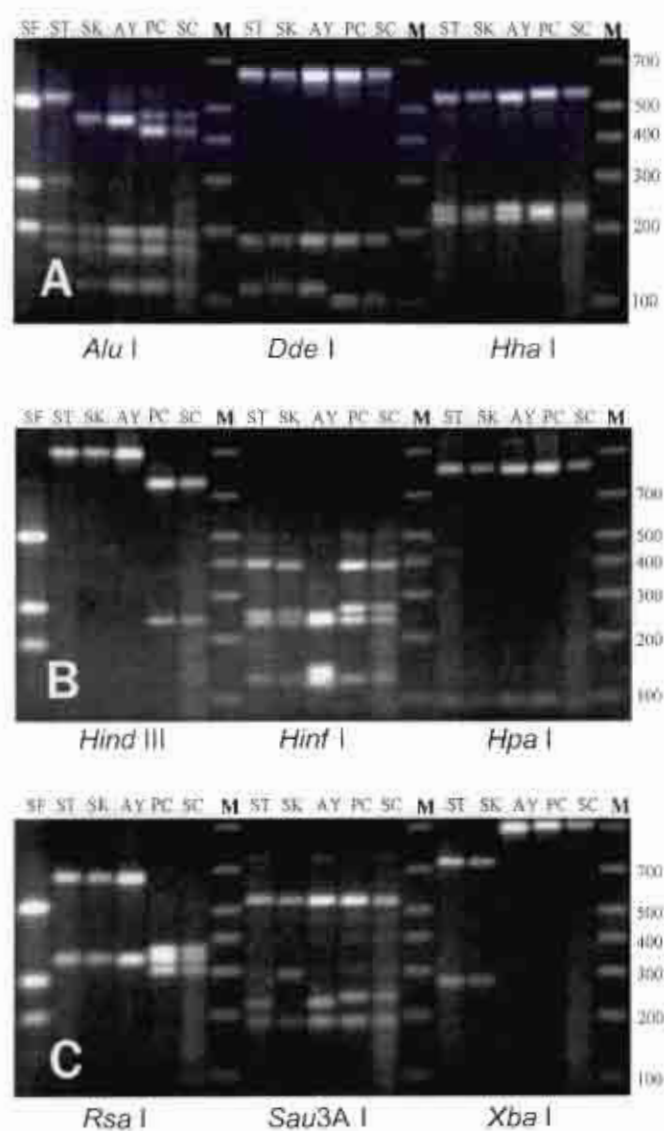


Figure 12 RFLP profiles by digestion of three isolates with 9 different restriction enzymes. SF lane is the digest of *Steinernema feltiae* with *Alu* I. ST lane is *S. thailandensis* n. sp., SK lane is SK isolate, AY lane is AY isolate, PC lane is PC isolate, SC lane is *S. carpocapsae*. M, molecular weight. A band sizes are shown in base pairs.

3.2 ไข่เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp.

ไข่เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. RE code ที่แยกได้จากจังหวัดร้อยเอ็ด นำมาวัดขนาด สัดส่วนไข่เดือนฝอยระยะ infective juvenile เปรียบเทียบกับ Key ของ *Heterorhabditis* species ค่าการวัด ขนาดสัดส่วนแสดงใน Table 8

จากการพิจารณาขนาดของลำตัว (L) ของระยะ infective juvenile พบว่ามีขนาดความยาว วัดจากหัวถึงปลายหาง เฉลี่ยเท่ากับ 541 ไมครอน ความกว้าง (W) เฉลี่ยเท่ากับ 21 ไมครอน ซึ่งมีค่า ใกล้เคียงกับ *H. indicus* (Poinar et al., 1992) ที่แยกได้จากประเทศอินเดีย นอกจากนั้น ค่า ratio a, b และ c อยู่ในระดับที่เท่ากันหรือไม่แตกต่างกันมาก ในค่า D% และ E% ของ RE code เฉลี่ยเท่ากับ 72 และ 92 % ใกล้เคียงเช่นกันกับ *H. indicus* เฉลี่ยเท่ากับ 84 และ 94 % ตามลำดับ

Table 8. Morphometrics (in μm) of infective juveniles of *Heterorhabdus* sp. RE code compared with other *Heterorhabdus* spp.

<i>Heterorhabdus</i> spp.	Morphometric character ^a (Range)											References
	L	W	EP	NR	ES	T	a	b	c	D%	E%	
<i>H. mogidis</i>	768 (736-800)	29 (27-32)	131 (123-142)	109 (104-115)	155 (147-160)	119 (112-128)	26 (23-28)	5.0 (4.6-5.9)	6.5 (6.1-6.9)	85 (81-91)	110 (103-120)	Poinar et al., 1987
<i>H. zealandica</i>	685 (570-740)	27 (22-30)	112 (94-123)	100 (90-107)	140 (135-147)	102 (87-119)	25 (24-26)	4.9 (4.2-5.0)	6.6 (6.2-6.7)	90 (70-84)	108 (103-109)	Wouts, 1979
<i>H. argentinensis</i>	657 (610-710)	31 (24-38)	107 (68-122)	95 (82-116)	132 (101-150)	84 (70-105)	21 -	5 -	7.8 -	83 -	127 -	Stock, 1993
<i>H. marelaia</i>	654 (588-700)	28 (24-32)	102 (81-113)	99 (83-113)	133 (121-139)	107 (99-117)	24 (21-29)	4.9 (4.7-5.4)	6.1 (5.5-6.6)	77 (60-86)	96 (89-110)	Liu and Berry, 1996
<i>H. bacteriophora</i>	588 (512-671)	23 (18-31)	103 (87-110)	85 (72-93)	125 (100-139)	98 (83-112)	25 (17-30)	4.5 (4.0-5.1)	6.2 (5.5-7.0)	84 (76-92)	112 (103-130)	Poinar, 1976
<i>H. hawaiiensis</i>	575 (506-631)	25 (21-28)	114 (86-132)	92 (79-103)	133 (115-181)	90 (62-108)	23 -	4.3 -	6.4 -	86 -	127 -	Gardner et al., 1994
<i>H. brevicauda</i>	572 (528-632)	22 (20-24)	111 (104-116)	101 (96-104)	124 (120-136)	76 (68-80)	26 -	4.6 -	7.6 (6.6-8.6)	90 -	147 -	Liu, 1994
<i>H. indicus</i>	528 (479-573)	20 (19-22)	98 (88-107)	82 (72-85)	117 (109-123)	101 (93-109)	26 (25-27)	4.5 (4.3-4.8)	5.3 (4.5-5.6)	84 (79-90)	94 (83-103)	Poinar et al., 1992
<i>Heterorhabdus</i> sp. RE code	541 (523-562)	21 (20-22)	80 (79-85)	79 (76-82)	112 (109-116)	87 (82-92)	26 (25-26)	4.8 (4.7-7.9)	6.2 (5.9-6.4)	72 (70-73)	52 (48-96)	Nuchanart, unpubl.

^a L = length, W = greatest width, EP = distance from antenna end to esophageal pore, NR = distance from anterior end to nerve ring, ES = esophageal length, T = tail length, a = LW, b = L/ES.c = L/T, D% = EP/ES $\times$ 100, E% = EP/T $\times$ 100

- No data available.

4. การศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp.

1. วงจรชีวิต

จากการศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. ในแมลงทอดสอบ (wax moth, *Galleria mellonella*) ซึ่งประกอบด้วยระยะตัวอ่อน 4 ระยะ และตัวเต็มวัยแยกเพศผู้-เพศเมีย จากไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile, IJ) หรือตัวอ่อนระยะที่ 3 third-stage juvenile, J3) เข้าสู่ตัวแมลง มีการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบ (molting) เป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 (fourth-stage juvenile, J4) จากนั้นเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้-เพศเมีย (adult) มีการผสมพันธุ์และให้ลูกตัวอ่อนระยะที่ 1 (first-stage juvenile, J1) เจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (second-stage juvenile, J2) และ J3 (IJ) ตามลำดับ ใช้เวลาดำรงชีพได้สูงสุด 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ (Figure 13)

2. อิทธิพลของอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย

จากการศึกษาพบว่า ที่อุณหภูมิ 15 °ซ และ 38 °ซ ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตไม่ครบวงจรชีวิต แต่ที่อุณหภูมิ 20 25 30 และ 35 °ซ มีการเจริญเติบโตครบวงจร และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยอยู่ระหว่าง 25 ถึง 35 °ซ โดยพบว่า ในเวลา 144 ชม (6 วัน) ไส้เดือนฝอยมีการเจริญเติบโตภายในตัวแมลงได้ถึง generation ที่ 2 (Table 9)

3. อิทธิพลของอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กับการเป็นตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอยในแมลง

พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °ซ มีการเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้สูงที่สุดเท่ากับ 129 และ 129 ตัวต่อแมลงทอดสอบ ตามลำดับ (Table 10) เมื่อพิจารณาถึง sex ratio ของไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมีย : เพศผู้ในชั่วที่ 1 (first-generation female : male) พบว่า อุณหภูมิ 20 25 30 และ 35 °ซ มีอัตรา sex ratio (female : male) เท่ากับ 2.2 : 1 (13/6) 1.8 : 1 (83/46) 4.6 : 1 (106/23) และ 3.2 : 1 (71/22) ตามลำดับ จำนวนของ female สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °ซ การมีจำนวนของเพศเมียมากมีผลต่อการให้ลูกหรือผลผลิตของไส้เดือนฝอยสูง ซึ่งเป็นหลักการโดยพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กทั่วๆ ไปที่ต้องสร้างลูกหลานในปริมาณสูงเพื่อไม่ให้สูญพันธุ์ไปจากโลก

Table 9 Development of *Steinernema thailandensis* n. sp. in *Galleria mellonella* at different temperatures.

Temperatures °C	Stages of nematode	Development percentage at different durations (hours)					
		24	48	72	96	120	144
15	IJ	100	96.4	80.0	72.2	66.7	63.3
	J4	0	3.6	20.0	27.8	33.3	36.7
20	IJ	84.2	0	0	0	0	0
	J4	15.8	85.8	53.6	27.0	23.0	17.4
	Adults (G1)	0	14.2	46.4	73.0	97.4	52.2
	J1 & J2	0	0	0	0	2.4	13.0
	J3	0	0	0	0	0.2	17.4
25	IJ	47.5	0	0	0	0	0
	J4	52.5	11.1	17.7	6.7	11.0	12.3
	Adults (G1)	0	88.9	82.3	93.3	85.4	13.4
	J1 & J2	0	0	0	0	2.4	60.0
	J3	0	0	0	0	1.2	12.6
	J4	0	0	0	0	0	0
	Adults (G2)	0	0	0	0	0	1.7
30	IJ	18.8	9.9	0	0	0	0
	J4	76.9	23.2	0	0	0	0
	Adults (G1)	4.3	66.9	78.8	5.2	2.0	0
	J1 & J2	0	0	21.2	93.0	88.2	72.6
	J3	0	0	0	1.8	5.8	20.0
	J4	0	0	0	0	4.0	4.5
	Adults (G2)	0	0	0	0	0	2.9
35	IJ	62.1	21.7	0	0	0	0
	J4	35.5	0	0	0	0	0
	Adults (G1)	2.6	78.3	100.0	40.0	30.8	30.9
	J1 & J2	0	0	0	50.7	42.3	55.6
	J3	0	0	0	9.3	7.7	10.3
	J4	0	0	0	0	19.2	2.2
	Adults (G2)	0	0	0	0	0	1.0
38	IJ	100.0	42.8	16.7	22.8	34.6	20.0
	J4	0	28.6	60.3	58.6	38.9	45.7
	Adults (G1)	0	38.6	23	18.6	26.5	34.3

Notes : G1 = first-generation; G2 = second-generation.

Table 10 Number of first-generation females and males of *Steinernema thailandensis* n. sp. at 20, 25, 30 and 35 °C in *Galleria mellonella*.

Temperature °C	Total adults/insect ^{1/}	No. of first generation adults $\pm$ SE ^{1/} Range ^{2/}	
		Female	Male
20	19	13 $\pm$ 3 d ^{3/} (9-19)	6 $\pm$ 3 c (2-12)
25	129	83 $\pm$ 11 b (59-101)	46 $\pm$ 7 a (36-58)
30	129	106 $\pm$ 17 a (76-132)	23 $\pm$ 6 b (15-33)
35	93	71 $\pm$ 10 c (56-86)	22 $\pm$ 4 b (17-30)

^{1/} = mean, averaged from 10 insects; ^{2/} = a range of numbers found in 10 insects;
^{3/} = numbers with the same letters in the same column are not significantly different at 5 %
 level according to Duncan's Multiple-Range Test.

4. อิทธิพลของอุณหภูมิมีผลต่อการเข้าทำลายและการตายของแมลงทดสอบ

พบว่า ที่อุณหภูมิ 15 °C และ 20 °C ในเวลา 24 ชม. มีเปอร์เซ็นต์ของการเข้าทำลายตัว และแมลงทดสอบไม่ตาย แต่ที่อุณหภูมิ 25 °C และ 30 °C มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายและเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงสูง ภายในเวลา 24 ชม. เท่ากัน ช่วงอุณหภูมิที่ต่ำที่สุดคือ 30 °C มีเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ตัวแมลงเท่ากับ 65.7 % และแมลงทดสอบตาย 100 % (Figure 14)

5. การศึกษาแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ symbiotic bacteria

พบว่าแยกได้โคโลนีของแบคทีเรีย 2 ลักษณะ (form) บนอาหาร NBTA คือ โคโลนีที่ไม่ดัดสี bromthymol blue มีสีแดงตรงกลางและมี clear zone สีครีมล้อมรอบ ลักษณะของโคโลนี นูนโค้ง ที่บดแสงขอบเรียบ โคโลนีลักษณะที่ 2 คือ โคโลนีที่สามารถดัดสีเขียวของ bromthymol blue จากอาหาร NBTA โคโลนีมีรูปร่างแบน ที่บดแสง ขอบไม่เรียบ มี clear zone โคโลนีทั้งสอง form นำมาเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) ได้โคโลนีสีครีม ลักษณะรูปร่างของโคโลนีและการดัดสี bromthymol blue สามารถจัดจำแนกในเบื้องต้นได้เป็นแบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* sp. ซึ่งอยู่ใน family Enterobacteriaceae และเป็นสกุลที่พบในไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. (Figure 15)

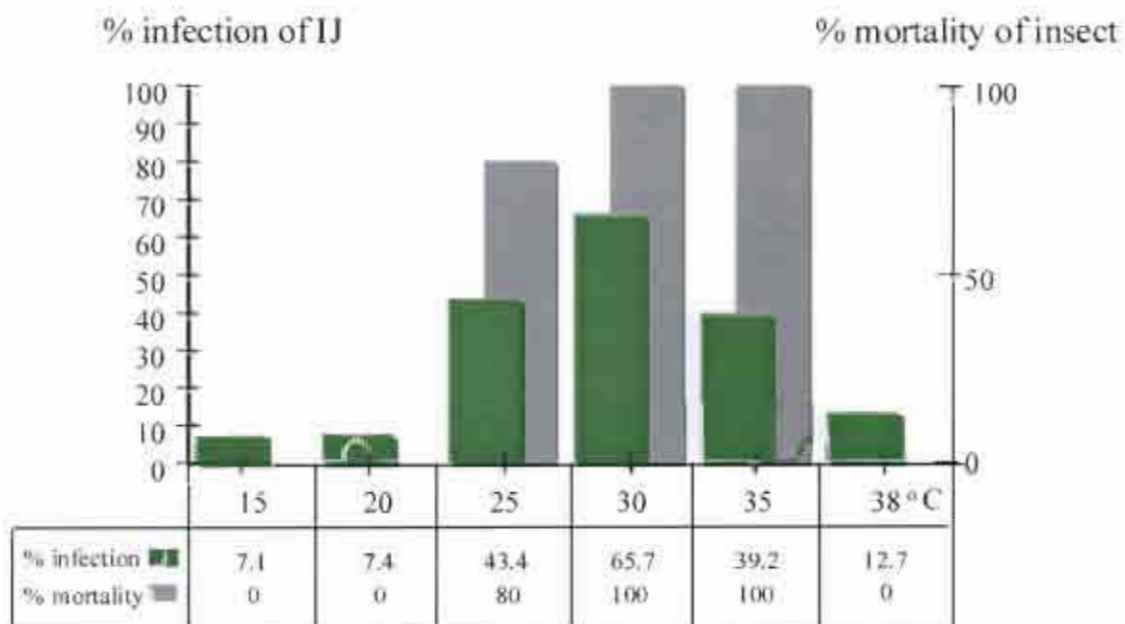


Figure 14 The infection percentage of the infective juvenile (*Steinernema thailandensis* n. sp.) and mortality of the test insect (*Galleria mellonella*) after 24 hours at different temperatures.

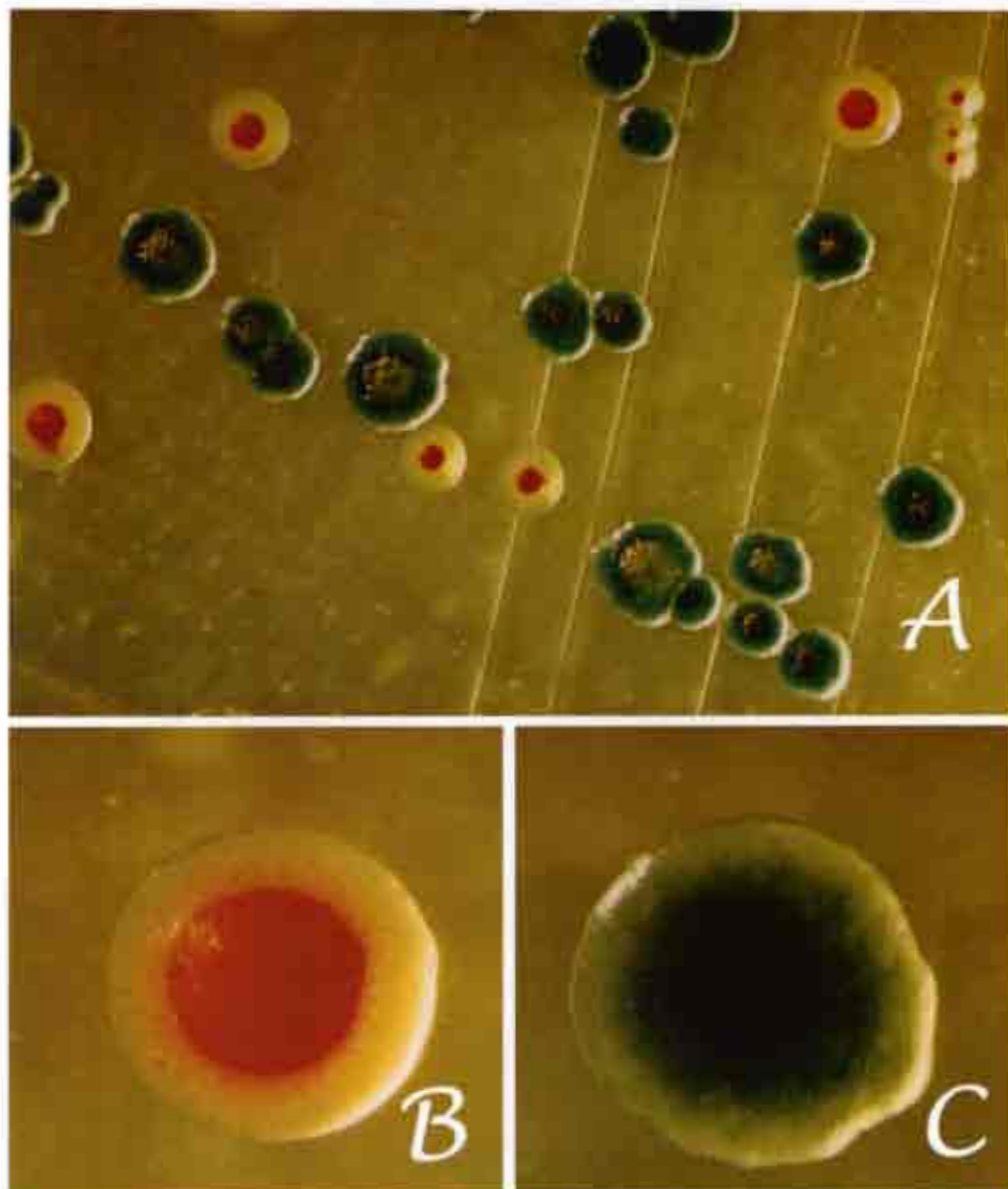


Figure 15 Colony of the symbiotic bacterium (*Xenorhabdus* sp.) isolated from *Steinernema thailandensis* n. sp.

(A) Showed form variants on NBTA medium.

(B) No bromthymol blue (BTB), red colony, with clear zone around colony.

(C) Absorbed BTB, green colony, with clear zone around colony.

5. การศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp.

1. การทดสอบศักยภาพของสายพันธุ์โดยวิธี insect bioassay

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติตามแผนการทดลอง CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT พบว่าจำนวนไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย 10 ตัวต่อหนอนทดสอบ 1 ตัว มีศักยภาพในการฆ่าหนอนได้ 50 % ที่เวลาเร็วที่สุด 24 ชม. และมีความแตกต่างทางสถิติกับจำนวนไส้เดือนฝอย 4 6 และ 8 ตัวต่อหนอน 1 ตัว หนอนทดสอบตายที่ 50 % ที่เวลา 36 ชม. ความรุนแรงในการฆ่าหนอนทดสอบของไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. ขึ้นกับพฤติกรรมหรือความสามารถในการค้นหาช่องเปิดของหนอนเพื่อเข้าหาแหล่งอาหารซึ่งต้องใช้เวลา พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนทดสอบเพิ่มขึ้นตามลำดับ ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนไส้เดือนฝอย (Table 11)

2. การทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิ

การทดสอบความทนทานต่อระดับของอุณหภูมิ โดยเปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยสายพันธุ์จากอเมริกา (*S. carpocapsae*) พบว่า อุณหภูมิต่ำที่ 15 °ซ ไส้เดือนฝอยไม่มีความสามารถในการฆ่าหนอนทดสอบได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่เวลา 48 ชม. ในช่วงอุณหภูมิ 20 ถึง 30 °ซ ทั้งสองสายพันธุ์มีความสามารถในการฆ่าหนอนทดสอบได้ แต่ที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 35 °ซ *S. thailandensis* ยังมีศักยภาพในการฆ่าหนอนได้ดีโดยที่ *S. carpocapsae* ไม่มีศักยภาพในการทำลาย และที่อุณหภูมิสูงถึง 38 °ซ สายพันธุ์ไทยยังคงศักยภาพในการฆ่าหนอนได้ แต่ไม่ถึง 100 % ในเวลา 48 ชม. (Figure 16)

Table 11 Mortality of *Galleria mellonella* infected with *Steinernema thailandensis* n. sp. at different doses and times.

Doses (IJ : insect)	Mortality of <i>Galleria mellonella</i> (%)			
	12 hours	24 hours	36 hours	48 hours
0 : 1 (control)	0 c ¹	0 d	0 c	0 d
4 : 1	6.7 c	13.3 c	50.0 b	53.3 c
6 : 1	20.0 b	26.7 b	56.7 b	63.3 b
8 : 1	23.3 b	33.3 b	56.7 b	63.3 b
10 : 1	43.3 a	53.3 a	73.3 a	83.3 a
CV. (%)	24.0	26.3	13.4	9.8

¹ Numbers with the same letters in the same column are not significantly different at 5 % level, according to Duncan's Multiple-Range Test.

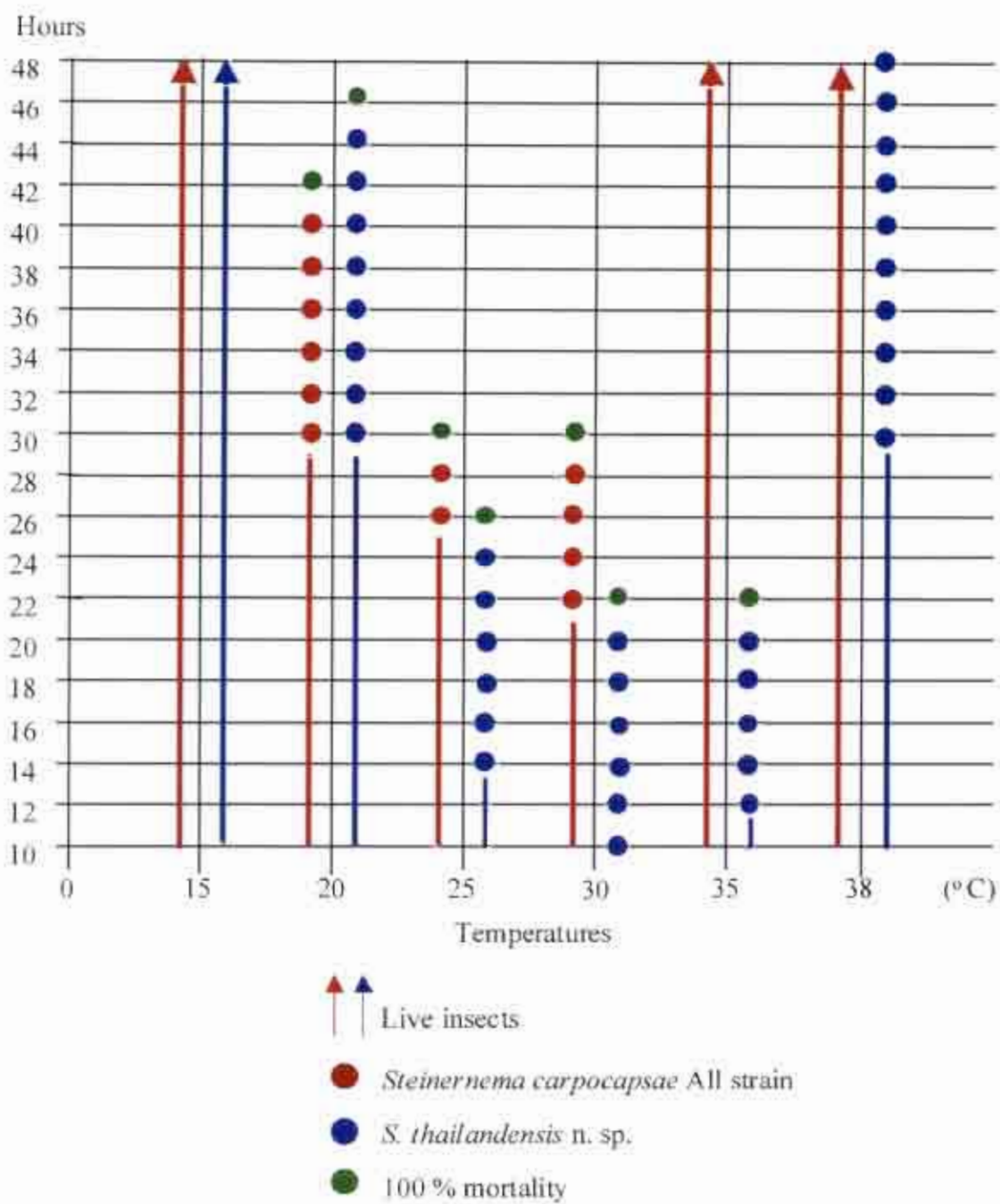


Figure 16. Mortality of *Galleria mellonella* exposed to *Steinernema carpocapsae* All strain and *S. thailandensis* n. sp. at different temperatures.

6. การขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. ในอาหารเทียม

จากการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n.s.p. ในสภาพ monoxenic culture โดยดัดแปลงอาหารเทียมชนิดกึ่งที่มีองค์ประกอบของถั่วเหลือง ข้าวโพด ข้าวสาลี ที่มีต้นทุนต่ำ จำนวน 5 สูตร คือ SM (soya milk), WF (wheat flour), SF (soybean flour), CS (core syrup) และ CF (corn flour) เปรียบเทียบกับอาหารกึ่งชนิด lipid agar (LP) ผลการเพาะเลี้ยงพบว่า ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบของถั่วเหลืองใช้เวลา 10 วัน ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเท่ากับ 661,400 และ 615,000 ตัวต่ออาหาร 20 กรัม ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตกับการเพาะเลี้ยงใน LP ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เตรียมจากสารเคมีสังเคราะห์ที่มีราคาสูง พบว่าให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยต่ำกว่าประมาณ 50 % (Figure 17) เมื่อพิจารณาต้นทุนอาหารต่อลิตรพบว่า อาหารสูตรดัดแปลงที่มีองค์ประกอบของถั่วเหลืองมีราคาต่ำกว่าโดยประมาณ 4.7 เท่า

7. การทดสอบ Pathogenicity กับแมลงศัตรูพืชและแมลงอื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบศักยภาพในการฆ่าแมลงรวม 5 อันดับ พบว่าภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากใส่ไส้เดือนฝอย แมลงทดสอบใน order Lepidoptera ได้แก่ หนอนกระทู้หอมดาวเรือง หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนเจาะดอกมะลิ และหนอนกินรังผึ้ง มีเปอร์เซ็นต์การตายในช่วง 55-100 % แมลงใน order Coleoptera ทดสอบในหนอนคืบในถุงเห็ด ตัวเต็มวัยของด้วงหมัดกระโดด และหนอนด้วงกุดรากสตรอเบอรี่ พบว่ามีศักยภาพในการฆ่าเท่ากับ 100 33 และ 20 % ตามลำดับ การทดสอบกับพวกเพลี้ยอ่อนซึ่งเป็นแมลงถ่ายทอดโรคสำคัญของไวรัสสาเหตุโรคพืช ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยสามารถฆ่าได้ 44 % นอกจากนั้น การนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูเหาะสถานที่ ได้แก่ ปลวก และแมลงสาบ พบว่า มีศักยภาพในการฆ่าปลวก 42 % ในเวลา 24 ชั่วโมง ในแมลงสาบตาย 57 % ใช้เวลาประมาณ 48 ชม. (Table 12, Figure 18)

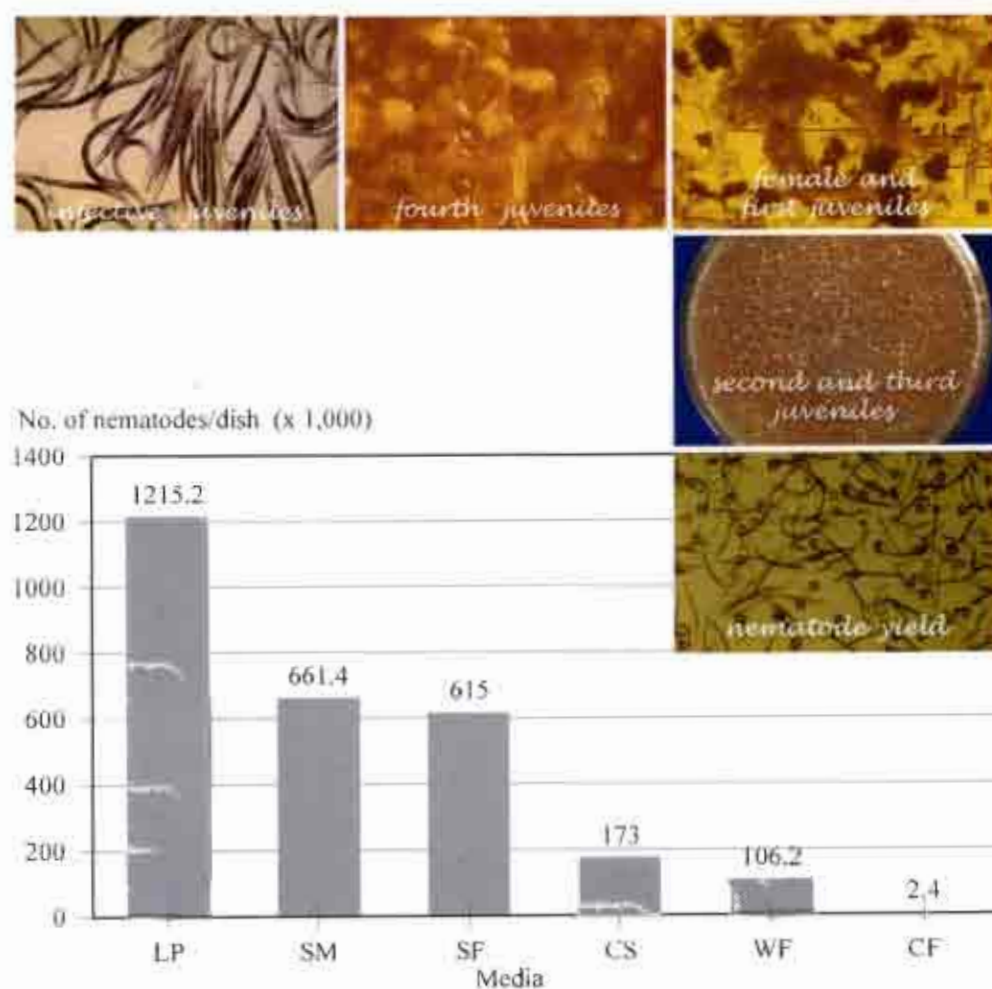


Figure 17 Population count of *Steinernema thailandensis* n. sp. reared on modified culture media compared to lipid agar medium (LP). The modified culture media are soybean milk (SM), soybean flour (SF), corn syrup (CS), wheat flour (WF), and corn flour (CF).

Table 12 Mortality of various insect species when exposed to *Steinernema thailandensis* n. sp.

Insect species	Treated			Control			Mortality (%) ^U
	Tested	Dead	Alive	Tested	Dead	Alive	
	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)	
Lepidoptera							
<i>Spodoptera litura</i>	10	6	4	10	1	9	55.56
<i>S. exigua</i>	10	6	4	10	0	10	60.00
<i>Plutella xylostella</i>	45	42	3	30	3	27	88.89
<i>Heliothis armigera</i>	25	23	2	25	1	24	91.67
<i>Henedecasis duplifacialis</i>	12	12	0	10	2	8	100.00
<i>Galleria mellonella</i>	50	50	0	50	0	50	100.00
Coleoptera							
mushroom beetle	10	10	0	10	0	10	100.00
<i>Phyllotreta sinuata</i>	15	5	10	15	0	15	33.33
scarab beetle	5	1	4	5	0	5	20.00
Homoptera							
<i>Myzus persicae</i>	35	20	15	35	8	27	44.44
Isoptera							
<i>Coptotermes</i> sp.	30	19	11	30	11	19	42.11
Blattoidea							
<i>Periplaneta americana</i>	14	8	6	14	0	14	57.14

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



Figure 18 Mortality of various insect pests infected by *Steinernema thailandensis* n. sp.

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจเก็บดินรวม 306 ตัวอย่าง จากพื้นที่ 42 จังหวัด ครอบคลุมทุกภาคของประเทศไทย สามารถแยกได้ไส้เดือนฝอยที่เป็นศัตรูแมลงได้ใน 9 พื้นที่ หรือเท่ากับ 21.4 % ของพื้นที่สำรวจ จากข้อมูลของการสำรวจนี้เมื่อนำมาพิจารณาการกระจายตัวของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย ซึ่งอยู่ในเขตร้อนชื้น พบว่ามีการกระจายตัวต่ำกว่าในเขตอบอุ่น ความสามารถในการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในสภาพที่มีความแตกต่างของพื้นที่ที่มีความสัมพันธ์กับการค้นพบไส้เดือนฝอย *steinernematid* และ *heterorhabditid* เป็นความแตกต่างผันแปรในที่อยู่อาศัยซึ่งมีความหลากหลายในระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด สิ่งที่ต้องพิจารณาคือ เรื่องของอุณหภูมิและแสงแดดที่มีผลกระทบต่อความมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยในเขตร้อนชื้น อุณหภูมิและแสงแดดที่ไวโอเลตจึงนับเป็นปัจจัยที่สำคัญของการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยในประเทศไทย ดังนั้น เปอร์เซ็นต์การค้นพบไส้เดือนฝอยในการสำรวจครั้งนี้จึงต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับในเขตอบอุ่น-หนาว เช่น ใน Great Britain พบการกระจายตัวของไส้เดือนฝอย *steinernematid* และ *heterorhabditid* เท่ากับ 48.6 และ 1 % ตามลำดับ โดยมีอุณหภูมิดินเท่ากับ 12-15 °C (Hominick and Briscoe, 1990) ส่วนไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในประเทศไทย มีอุณหภูมิผิวดินระหว่าง 27-37 °C และอุณหภูมิ ณ จุดเก็บ (ลึก 10-15 ซม.) อยู่ช่วงระหว่าง 24-29 °C มีแนวโน้มของการเป็นสายพันธุ์ทนร้อน (heat tolerant strain) เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ที่แยกจากดินในรัฐเท็กซัส สหรัฐอเมริกา ซึ่งตั้งอยู่ในตำแหน่งเส้น latitude 26 องศาเหนือ และ longitude 97 องศาตะวันตก และเหนือระดับน้ำทะเล 21.7 เมตร (Cabanillas *et al.*, 1994) และ *S. abbasi* สายพันธุ์ที่พบในประเทศ Oman (Elawad *et al.*, 1997) ความทนร้อนเป็นคุณสมบัติที่ดีประการหนึ่งของการนำเข้ามาพัฒนาใช้เป็น bio-control agent และนำกลับมาใช้กับแมลงศัตรูพืชในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ความทนทานและศักยภาพในการทำลายยอดดีกว่าสายพันธุ์จากแหล่งอื่น

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย Thai isolate ให้คงสภาพความชีวิตและยังมีศักยภาพในการเป็น bio-control agent นั้น อุณหภูมิของการเก็บรักษาจึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอย ทั้ง 2 สกุล อิทธิพลของอุณหภูมิต่ำ (10 °C) และสูง (33 °C) แสดงให้เห็นความแตกต่างในการเก็บรักษา culture โดยอุณหภูมิที่ต่ำไม่สามารถคงสภาพความมีชีวิตของไส้เดือนฝอยในกลุ่ม *steinernematid* แต่การเก็บที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 °C ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดได้นานกว่า ซึ่งเมื่อเทียบกับไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ต่าง

ประเทศและผลิตเป็นการค้าในปัจจุบัน (*S. carpocapsae*) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บอยู่ที่ 4-10 °ซ (Kaya and Stock, 1988) ส่วนไส้เดือนฝอย heterorhabditid ที่แยกได้จากดินจังหวัดร้อยเอ็ด การเก็บรักษาที่เหมาะสมอยู่ที่อุณหภูมิ 15 °ซ ซึ่งระดับของอุณหภูมิการเก็บสูงกว่า *H. bacteriophora* สายพันธุ์จากต่างประเทศเช่นกัน ข้อมูลที่ได้สนับสนุนงานด้านการจัดจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่ที่เป็น "Tolerant of higher temperatures and less tolerant of lower temperature" และเป็นข้อพิจารณาประการหนึ่งในการจะนำสายพันธุ์ไทยไปใช้เป็น bio-control agent เพื่อการค้า คุณสมบัติของการหนอนนี้เป็นอย่างดีในด้านศักยภาพของการฆ่าแมลงศัตรูพืชในเขตร้อนชื้นที่มีอุณหภูมิสูง ตลอดจนผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยไม่มีความจำเป็นต้องจัดเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (10°ซ) ในขณะที่ขนส่งหรือเก็บรักษาก่อนนำไปใช้ในไร-นา

ไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. จัดเป็น new species ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย ที่แบ่งแยกความแตกต่างทางด้าน morphological character จากไส้เดือนฝอย 23 ชนิด ที่มีรายงานจากทั่วโลก ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยจัดอยู่ในกลุ่มของ steinernematid ที่มีความยาวของ infective-stage juvenile ต่ำกว่า 600 ไมครอน ได้แก่ *S. kushidai*, *S. scapterisci*, *S. carpocapsae*, *S. abbasi*, *S. rarum*, และ *S. ritteri* (Nguyen and Smart, 1996) *S. thailandensis* n. sp. มีรูปร่างลักษณะและสัดส่วนใกล้เคียงกับ *S. carpocapsae* และ *S. scapterisci* แต่สามารถแยกได้เมื่อพิจารณาความยาวของ infective juvenile โดย *S. thailandensis* n. sp. (432 ไมครอน) *S. carpocapsae* (558 ไมครอน) และ *S. scapterisci* (572 ไมครอน) นอกจากนั้น ยังมีความแตกต่างของความยาวหาง ค่า D% และ E% รูปร่างลักษณะและความยาวของ spicule และ gubernaculum ของตัวเต็มวัยเพศผู้ ลักษณะ double-flapped epiptygma ของ vulva ในตัวเต็มวัยเพศเมีย ซึ่งสายพันธุ์ไทยมีความแตกต่างที่สามารถจัดแบ่งเป็น new species ได้โดยสมบูรณ์

ในปี 1997 มีรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยในเขตพื้นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ และจัดจำแนกชนิดเป็น *S. siamkayai* โดย Stock และคณะ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ *S. thailandensis* n. sp. พบว่ารูปร่างลักษณะและสัดส่วนมีความใกล้เคียงกัน แตกต่างกันเล็กน้อยที่ความยาวหางและค่า E% ของ infective juvenile แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเอ็นเอด้วยวิธี PCR-RFLP พบว่า RFLP profile มีความแตกต่างของจำนวน band และขนาดของดีเอ็นเอบนแผ่นเจลที่ restriction enzyme จำนวน 8 เอนไซม์ ได้แก่ *AluI*, *DdeI*, *EcoRI*, *HhaI*, *HinfI*, *RsaI*, *Sau96I* และ *XbaI* ดังนั้น ไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. จึงแยกจาก *S. siamkayai* โดยอาศัยความแม่นยำของเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล

รวมถึงไส้เดือนฝอย AY และ SK isolate ที่มีความแตกต่างของยีนเช่นกัน สอดคล้องกับรายงานการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย steinernematid ในประเทศญี่ปุ่น พบไส้เดือนฝอยที่มีความแตกต่างของดีเอ็นเอจำนวน 7 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากดินในแต่ละพื้นที่ที่มีความแตกต่างของสภาพอากาศ และลักษณะทางภูมิศาสตร์ (Yoshida *et al.*, 1988) เป็นความหลากหลายทางชีวภาพ (bio-diversity) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในโลกและรวมทั้งในประเทศไทย ที่น่าสนใจศึกษาและอนุรักษ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านี้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

S. thailandensis n. sp. เป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่และเป็นสายพันธุ์ไทย ที่ควรศึกษาวิจัยในด้านต่างๆ อันได้แก่ ชีววิทยา ศักยภาพในการกำจัดแมลงศัตรูสำคัญ และความสามารถในการขยายปริมาณในอาหารเทียม เพื่อพิจารณาคุณสมบัติต่างๆ ในการนำไปพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ต่อไป จากการศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. พบว่า มีวงจรชีวิตเหมือนกับไส้เดือนฝอย steinernematid ชนิดอื่นๆ ที่ประกอบด้วยระยะตัวอ่อน 4 ระยะ และระยะตัวเต็มวัย มีการผสมพันธุ์แบบแยกเพศภายในตัวแมลง แต่การครบวงจรชีวิตเร็วหรือช้าขึ้นกับอุณหภูมิ โดยไส้เดือนฝอย Thai isolate ครบวงจรชีวิตสั้นที่สุด 4 วัน ซึ่งใกล้เคียงกับ *S. abbasi* และ *S. riobrave* ใช้เวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ (Elawad *et al.*, 1999) ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูง (>30 °ซ) ได้ดีกว่าอุณหภูมิต่ำ (<20 °ซ) แตกต่างจาก *S. carpocapsae* strain DD-136 ทนทานได้ดีที่อุณหภูมิ 20-25 °ซ (Kaya, 1977) รวมถึงอุณหภูมิมีผลต่อ sex ratio และการเข้าทำลายของสายพันธุ์ไทย ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25-35 °ซ และยังคงศักยภาพในการฆ่าแมลงได้ที่อุณหภูมิ 38 °ซ ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยจึงสามารถจัดอยู่ในกลุ่มของ heat tolerant isolate เช่นเดียวกับ *S. abbasi* จากประเทศ Oman และ *S. riobrave* จากรัฐ Texas

การศึกษาความสามารถในการทำให้เกิดโรคในแมลง พบว่า ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยสามารถฆ่าแมลงตาย 53 % ภายในเวลา 24 ชม. ในอัตราไส้เดือนฝอย 10 ตัวต่อหนอนทอดสอบ 1 ตัว ซึ่งการตายของหนอนทอดสอบเป็นผลร่วมกันของ symbiotic bacteria ที่พบอยู่บริเวณลำไส้ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอย (Ehlers and Peters, 1995) สามารถสร้างสารพิษและมีผลทำให้แมลงเกิดอาการโรคเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายในเวลารวดเร็ว และขึ้นกับความสามารถของไส้เดือนฝอยในการเคลื่อนที่เข้าสู่ลำเลือดของแมลงเพื่อปลดปล่อยเซลล์แบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว

การนำไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยมาทดสอบเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมชนิด
 ฝุ่น ซึ่งพบว่าไส้เดือนฝอยสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบของ
 ตัวเหลืองราคาถูก จากผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จากการเลี้ยงในสูตรนมตัวเหลืองให้ผลผลิตเท่ากับ 33 ล้าน
 ตัวต่ออาหาร 1 ลิตร ต้นทุนอาหารเท่ากับ 41 บาท เมื่อเทียบกับการผลิตในอาหาร dog biscuit ต้นทุนเท่ากับ
 1 ดอลลาร์ (40 บาท) ผลิตได้เพียง 1 ล้านตัว (Poinar, 1972) จากงานทดสอบนี้พบว่า ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์
 ไทยเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ง่ายในอาหารเทียม เป็นคุณสมบัติที่ดีประการหนึ่งของไส้เดือนฝอย รวมทั้ง
 มีศักยภาพในการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อและหนอนดักแด้ ซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของประเทศไทย
 ตลอดจนสามารถกำจัดปลวกและแมลงสาบที่เป็นแมลงศัตรูเคหะสถานได้ดีอีกด้วย อย่างไรก็ตาม
 งานวิจัยยังเป็นงานในระดับห้องปฏิบัติการ แต่มีแนวโน้มของการเป็น biocontrol agent ที่ดี จึงควร
 ศึกษาวิจัยสายพันธุ์ไทยและพัฒนาเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

ได้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 9 ไอโซเลท แยกได้จากดินในพื้นที่ประเทศไทย แบ่งแยกเป็น 2 family คือ Steinernematidae รวม 8 ไอโซเลท กำหนดรหัสตามจังหวัดที่พบคือ จังหวัดกาญจนบุรี (KB) พิจิตร (PC) อุทัยฯ (AY) กาฬสินธุ์ (KS) มหาสารคาม (MK) ขอนแก่น (KK) นนทบุรี (NK) และสระแก้ว (SK) และ Heterorhabditidae 1 ไอโซเลท คือ ร้อยเอ็ด (RE) นำมาเก็บรวบรวมเป็น culture collection ณ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ไส้เดือนฝอย steinernematid นำมาจัดจำแนกชนิดโดยการศึกษาการผสมข้ามชนิด ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วย LM และ SEM และการใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการตรวจสอบชนิดและสายพันธุ์ สามารถจัดจำแนกได้เป็น ไส้เดือนฝอย 3 กลุ่ม คือ *Steinernema thailandensis* n. sp., *Steinernema* sp. (AY isolate) และ *Steinernema* sp. (SK isolate) ส่วนไส้เดือนฝอย heterorhabditid ที่แยกจากดินในเขตจังหวัดร้อยเอ็ด มีรูปร่างลักษณะใกล้เคียงกับ *H. indica* ที่แยกจากประเทศอินเดีย

จากการศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. และความสามารถในการเป็น biological control agent ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า 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. และจัดเป็นไส้เดือนฝอยสายพันธุ์หนร้อนที่มีศักยภาพในการฆ่าหนอนกินรังผึ้งตาย 100 % ในเวลา 22 ชม. ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 °ซ และคงศักยภาพในการเข้าทำลายแมลงได้สูงที่อุณหภูมิ 38 °ซ เมื่อนำไส้เดือนฝอยมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมชนิดวุ้น 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) ตัวงมหัดกระโดด (*Phyllotreta sinuata*)

หนอนด้วงกินรากสตรอเบอรี่ (unidentified) เพลี้ยช้อน (*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.

เอกสารอ้างอิง

- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2541. ความก้าวหน้าของงานวิจัยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, น. 9-13. ใน จุลินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารประกอบนิทรรศการ "งานเกษตรแฟร์" 31 มกราคม - 7 กุมภาพันธ์ 2541 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18 : 165-267.
- 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. 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.
- Burman, M. 1982. *Neoaplectana carpocapsae* : toxin production by axenic insect parasitic nematodes. *Nematologica* 28 : 62-70.

- Burman, M., K. Abrahamsson, J. Ascard, A. Sjöberg 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 riobravo* 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. Commonwealth 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.
- Ehlers, R.U. and A. Peters. 1995. Entomopathogenic nematodes in biological control : feasibility, perspectives and possible risks, pp. 119-136. *In* H.M.T. Hokkanen and J.M. Lynch (eds.). *Biological Control, Benefits and Risks*. OECD, Cambridge University Press, Cambridge.
- 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.
- 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. Florida. 365 p.
- Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 365 p.
- Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. *Science* 614.

- 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.
- Hominick, W.M. and B.R. Briscoe. 1990. Survey of 15 sites over 28 months for entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae). Parasitol. 100 : 289-294.
- Joyce, S.A., A.P. Reid, E. Driver and J. Curran. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes, pp. 178-187. 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, Manooch, Co. Kildare, Ireland.
- 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. Florida.
- Kaya, H.K. and S.P. Stock. 1988. Techniques in Insect Nematology. Department of Nematology University of California, Davis. California. 100 p.
- 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.
- Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1 Williams & Wilkins, Baltimore.
- Liu, J. and R.E. Berry. 1996. *Steinernema oregonensis* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae) from Oregon. Fundam. Appl. Nematol. 19 : 375-380.
- 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.
- 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, Jr. 1990. *Steinernema scapterisci* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae). J. Nematol. 23 : 187-199.

- Nguyen, K.B. and G.C. Smart. 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. Life cycle of *Steinernema scapterisci* Nguyen & Smart, 1990. *J. Nematol.* 24(1) : 160-169.
- Nguyen, K.B. and G.C. Smart Jr. 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. Neilson. 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.
- Poinar, G.O., Jr. 1979. Nematodes for Biological Control of Insect Pests. CRC Press, Boca Raton. 143 p.
- Poinar, G.O., Jr. 1986. Recognition of *Neoaplectana* species (Steinernematidae : Rhabditida). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 53 : 121-129.
- 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. Boca Raton. CRC Press.

- 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. and G.M. Thomas. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae : Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoaplectana* sp. Steinernematidae). Parasitol. 56 : 385-390.
- Poinar, G.O., Jr. and G.M. Thomas. 1967. The nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen. J. Invertebrate Pathol. 9 : 510.
- 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.
- 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, W.A. 1994. Distribution of Entomopathogenic Nematodes in the Swiss Alps. CH-8820 Wädenswill, 268 p.
- 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., 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.
- 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.
- Wouts, W.M. 1979. The biology and life cycle of a New Zealand population of *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae). *Nematologica* 25 : 191-202.
- 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.
-

ภาคผนวก

ผลงานเผยแพร่ของโครงการฯ

ชื่อผลงานเผยแพร่	ชื่อผู้วิจัยและผู้ร่วมงาน	การเสนอผลงาน/ชื่อวารสาร	ปีที่/หน้า	หมายเหตุ
1. ไข่เดือนฝอยศัตรูแมลงสาบสายพันธุ์ไทย (<i>Steinernema thailandensis</i> n. sp.) : อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและศักยภาพในการควบคุมแมลง	นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สืบศักดิ์ สนิธิรัตน์	การเสนอผลงานภาคบรรยาย : การประชุมวิชาการอภิศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 3 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 18-20 พ.ย. 2540, กรุงเทพฯ	2540/48 (บทคัดย่อ)	ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่น อันดับ 1
2. ไข่เดือนฝอยศัตรูแมลงสาบสายพันธุ์ไทย <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae)	นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด	วารสารวิชาการเกษตร	2541/185-193 (9 หน้า)	-
3. การเพาะเลี้ยงไข่เดือนฝอยศัตรูแมลงสาบสายพันธุ์ไทย (<i>Steinernema</i> sp.) บนอาหารเทียมชนิด lipid agar	นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด	การเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ : การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 37 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2-5 ก.พ. 2542, กรุงเทพฯ.	2542/49 (บทคัดย่อ)	ได้รับรางวัลชมเชย ภาคโปสเตอร์
4. Occurrence of entomopathogenic nematodes in Thailand	Nuchanart Tangchitsomkid Suebsak Sontirat	Kasetsart Journal (Nat. Sci.) Vol. 32 (3)	1998/347-354 (8 pages)	-
5. Monoxenic culture of a new Thai strain of entomopathogenic nematode (<i>Steinernema</i> sp. KB strain) on artificial media	Nuchanart Tangchitsomkid Suebsak Sontirat Jariya Chanpaisaeng	Thammasat International Journal of Science and Technology Vol. 4 (1)	1999/49-53 (5 pages)	-

ผลงานเผยแพร่ของโครงการฯ

ชื่อผลงานเผยแพร่	ชื่อผู้วิจัยและผู้ร่วมงาน	การเสนอผลงานชื่อวารสาร	ปีที่/หน้า	หมายเหตุ
6. การใช้เทคนิค PCR-RFLPs ตรวจหาสายพันธุ์ <i>Steinernema</i> ที่พบในประเทศไทย	นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช	ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา ปีที่ 10 (1)	2543/2-8 (7 หน้า)	-
7. งานวิจัยและพัฒนาได้เดือนฉาย <i>Steinernema</i> spp. Thai isolate เพื่อควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี	นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด พรพิมล อธิปัญญาคม สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช สืบศักดิ์ สนิธิรัตน์	การเสนอผลงานภาคบรรยาย : การ ประชุมวิชาการกองโรคพืชและ จุลชีววิทยา ประจำปี 2543 โรงแรมล่องบัว 8-10 มี.ค. 2543, จ. เพชรบุรี	2543/31-32 (บทความย่อ)	ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่น อันดับ 1
8. A New Entomopathogenic Nematode (Rhabditida : Steinernematidae) in Thailand : Taxonomy, Biology and Its Potential for Biological Control	Nuchanart Tangchitsomkid	วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	2543/ 105 หน้า	ได้รับพิจารณาเห็นชอบให้ เป็นวิทยานิพนธ์ระดับดี



กรุงเทพฯ

18-20 พฤศจิกายน 2540

บทคัดย่อ และ รายชื่อผู้เข้าร่วมประชุม

Abstracts and Participants

การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 3

The Third National Plant Protection Conference

เรื่อง การอารักขาพืชเพื่อความอยู่ดีมีสุข

18 - 20 พฤศจิกายน 2540

อาคารสารนิเทศ 50 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรุงเทพมหานคร

จัดโดย

สมาคมนิกริศพืชแห่งประเทศไทย

สมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย

สมาคมคนไทย-ผู้ประกอบธุรกิจสารเคมีเกษตร

สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย

สมาคมอารักขาพืชไทย

สมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย

และ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema thailandensis* n. sp.) : อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและศักยภาพในการควบคุมแมลง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด¹ และ สืบศักดิ์ สนธิรัตน์²

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทย ค้นพบครั้งแรกในปี 2539 ที่จังหวัดกาญจนบุรี เป็นไส้เดือนฝอย ใน Family Steinernematidae จัดอยู่ในสกุล *Steinernema* การจำแนกในระดับ species โดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยา สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่นๆ ในสกุล *Steinernema* โดยแบ่งแยกจากความยาวของตัวอ่อนระยะเข้าทำลายที่มีขนาดความยาวน้อยกว่าชนิดอื่นๆ เท่ากับ 432 (404-460) ไมครอน มีค่า D% และ E% เท่ากับ 33 (30-37) และ 83 (75-91) ตามลำดับ มีรูปร่างลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้แตกต่างจากชนิดอื่น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อวงจรชีวิต 1 รอบ คือที่ 30°C ใช้เวลาสั้นที่สุดเท่ากับ 4 วัน มีความสามารถในการฆ่าแมลงทดสอบ (wax moth, *Galleria mellonella*) ตาย 100 % ในเวลา 22 ชม. ที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C และมีศักยภาพในการฆ่าแมลงในอุณหภูมิที่สูงถึง 38°C ไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายมีความอยู่รอดได้นานประมาณ 2 เดือน เมื่อเก็บในน้ำที่อุณหภูมิ 28 ± 2°C ดังนั้น สามารถจัดจำแนกเป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ ตั้งชื่อตามแหล่งที่พบคือ *Steinernema thailandensis* n. sp. จากการทดสอบศักยภาพในการกำจัดแมลงด้วยวิธี insect bioassay โดยใช้ LC₅₀ และ LT₅₀ เป็นพารามิเตอร์ในการวัดพบว่า แมลงทดสอบตาย 50 % ในเวลา 24 ชม. เมื่อใส่ไส้เดือนฝอย 10 ตัวต่อแมลงทดสอบ 1 ตัว การตรวจสอบการเป็น biological control agent กับแมลงศัตรูพืช 4 ชนิด คือ หนอนกระทู้หอมดาวเรือง (*Spodoptera litura*) หนอนกระทู้หอม (*S. exigua*) หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) และหนอนเจาะดอกกะหล่ำ (*Henedecasis duplifacialis*) พบว่า ภายในเวลา 24 ชม. มีเปอร์เซ็นต์ การตายเท่ากับ 55.6 60.0 88.9 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

A New Entomopathogenic Nematode in Thailand (*Steinernema thailandensis* n. sp.) : Taxonomy, Biology and Its Potential for Biological Control

Nuchanart Tangchitsomkid¹ and Suebsak Sontirat²

Abstract

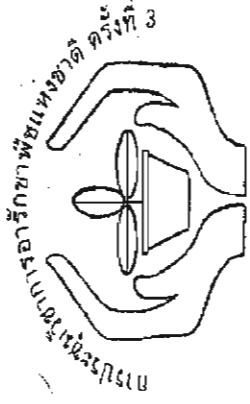
A new entomopathogenic nematode in the family Steinernematidae, genus *Steinernema*, was found in Kanchanaburi province. The morphology and biology of the nematode showed that it was a new species of *Steinernema* which could be distinguished from other *Steinernema* species by the length of infective juveniles and the shape of spicules of first-generation males. The length of infective juveniles ranged from 404-460 (432) μ m. D% and E% of the infective juveniles ranged from 30 to 37 (33) and 75 to 91 (83). The life cycle at the optimum temperature of 30 °C took about four days. The nematode could kill 100% of insect test (wax moth, *Galleria mellonella*) in 22 hours at 30 and 35 °C and be effective at high temperature of 38 °C. In addition, the infective juveniles could survive about 2 months when maintained in the water at room temperature (28 ± 2 °C). Therefore, it was described as a new species: *Steinernema thailandensis* n. sp. *S. thailandensis* n. sp. was tested for its biological control potential by insect bioassay. From the parameters of LC₅₀ and LT₅₀, it appeared that 10 IJs per insect caused 50 % mortality of insect in the shortest time of 24 hours. The pathogenicity test against 4 insect pests, *Spodoptera litura*, *S. exigua*, *Plutella xylostella* and *Henedecasis duplifacialis* were investigated and the result showed that *S. thailandensis* n. sp. could cause high percent mortality of 55.6, 60.0, 88.9 and 100 % to the insects respectively, at 24 hours.

¹ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

² ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

³ Nematology section, Plant Pathology & Microbiology Division, Department of Agriculture

⁴ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University



กรรณการ

18-20 พฤศจิกายน พ.ศ. 2540

สมาคมนักโรคพิษแห่งประเทศไทย สมาคมกัญญาวิทยาและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย
สมาคมวิทยาการพิษแห่งประเทศไทย สมาคมคนไทย-ผู้ประกอบการธุรกิจสารเคมีเกษตร
สมาคมอาชีวศึกษาไทย สมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มอบประกาศนียบัตรนี้ เพื่อประกาศเกียรติคุณ

นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ นายสีปศักดิ์ สนธิรัตน์

ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่นอันดับ ๑

เรื่อง ได้เสนอผลยาคูมูลงสายพันธุ์ไทย (Steinernema thailandensis n. sp.) อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และศักยภาพในการควบคุมแมลง

ให้ไว้ ณ วันที่ ๒๐ พฤศจิกายน พุทธศักราช ๒๕๔๐

นายจรัส สุนทราม

ประธานคณะกรรมการจัดการประชุมวิชาการอภิปรัชญาแห่งชาติครั้งที่ ๓

นายกสมาคมนักโรคพิษแห่งประเทศไทย



วารสาร วิชาการเกษตร

THAI AGRICULTURAL RESEARCH JOURNAL

ISSN : 0125-8389

ปีที่ 16 ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม 2541

สารบัญ

บทบรรณาธิการ 170

ธวัชชัย ณ นคร

ผลงานวิจัย

- การใช้สารจิบเบอเรลลิน (GA₃) และปุ๋ยยูเรียในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม 172
อรพิน วัฒนเสถ์/เล็ก จันทร์เกษม
- อิทธิพลของปุ๋ยพืชสดจากพืชตระกูลถั่วยืนต้น ลมลูก และพืชคลุมต่อผลผลิตของข้าวไร่
และสมบัติบางอย่างของดิน. 178
องอาจ วีระโสภณ/ประไพ ชัยโรจน์/สมศักดิ์ เหลืองศิริโรจน์/วิญญู วงษ์อุบล
- ไข่เดือนฝอยศัตรูแมลงสาบพันธุ์ไทย *Steinernema thailandensis* n. sp.
(Rhabditida: Steinernematidae). 185
นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด
- ผลของพาโคโลบิวทราโซลต่อคุณภาพของข้าวขาวดอกมะลิ 105 และผลตกค้าง
ของสารในข้าว. 194
สุนันทา ชมภูนิช/รัตนาวรณ พรมศรัทธา/หรรษา คุณาโท
- ศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อจุลินทรีย์ดินหลังการเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งแห้ง. 199
สมใจ ปฏิบุทธิ
- ผลของอัตราปุ๋ยฟอสเฟต โพแทสเซียม และปูนขาวต่อผลผลิตอ้อย ในดินร่วนทราย
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. 203
สมภพ จงรวยทรัพย์/สมพร เจริญรุ่งเรือง/อุดม รัตนรักษ์
- ระบบพันสารเคมีแก่วัสตุทรงกลม. 212
บัณฑิต จริโมภาส
- แมลงศัตรูข้าวและศัตรูธรรมชาติในนาข้าวญี่ปุ่นที่สถานีทดลองข้าวชัยนาท. 217
สุวัฒน์ รวยอารีย์/ทัศนีย์ สงวนสลั
- การประเมินความเสียหายที่เกิดจากหนอนเจาะผลลิ้นจี่ *Conopomorpha sinensis*
(Lepidoptera: Gracillariidae) และบทบาทของแตนเบียนหนอนเจาะผล. 229
สุพิตรา ดลโสภณ/นันทรัตน์ คุณก่าเนต/มนตรี ทศานนท์
- การแก้ไขฝ้ายที่เสียหายจาก 2,4-D ด้วย Urea, Glucose และให้น้ำ 242
ก่อนทอง พวงประโคน/ประเสริฐ อินทะนัย/อภิญา ภมรจันทร์/เจกียา ดิษฐ์สันเทียะ

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทย

Steinernema thailandensis n. sp.

(Rhabditida: Steinernematidae)

A New Entomopathogenic Nematode, *Steinernema thailandensis* n. sp.
(Rhabditida: Steinernematidae) from Thailand

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด¹
Nuchanart Tangchitsomkid¹

ABSTRACT

A new entomopathogenic nematode, *Steinernema thailandensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), isolated from soil samples from Kanchanaburi Province, Thailand, can be distinguished from other members of the genus by the length of infective juveniles and shape of spicule of first-generation males. The length of infective juveniles ranged from 404–406 (432) μ m. D% and E% of the infective juveniles ranged from 30–37 (33) and 75–91 (83) and lateral field with 6 lines. *S. thailandensis* n.sp. was isolated in the tropical region and it was obvious to be heat tolerant strain from Thailand where it serves as a biological control agent for insect pest at high temperature. This is the first steinernematid recorded from Thailand.

key words : Entomopathogenic nematode, *Steinernema thailandensis* n.sp., morphology, taxonomy, heat tolerant strain.

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema thailandensis* n. sp (Rhabditida: Steinernematidae) แยกได้จากตัวอย่างดินในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี จากการศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile และตัวเต็มวัย สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่นๆ ในสกุล *Steinernema* โดยไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile มีความยาวเท่ากับ 432 (404–460) ไมครอน มีค่า D% และ E% เท่ากับ 33 (30–37) และ 83 (75–91) ตามลำดับ และมีเส้นข้างลำตัวจำนวน 6 เส้น ปลายหางของตัวเต็มวัยเพศผู้มีรูปลักษณะและตำแหน่งของอวัยวะสืบพันธุ์แตกต่างจากชนิดอื่น ไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. แยกได้จากเขตร้อนชื้น จัดเป็นสายพันธุ์ทนร้อนและเป็นศัตรูธรรมชาติ

ของแมลง สามารถนำมาพัฒนาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป งานวิจัยนี้เป็นรายงานการพบครั้งแรกและเป็นองค์ความรู้ใหม่ต่อการพัฒนางานทางด้านพื้นฐานของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย

คำหลัก : ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, *Steinernema thailandensis* n.sp., สัณฐานวิทยา, อนุกรมวิธาน, สายพันธุ์ทนร้อน

คำนำ

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (entomopathogenic nematode) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่พบอยู่ในดิน มีความสัมพันธ์ร่วมกับแบคทีเรียพวก *Xenorhabdus* spp. ที่อาศัยอยู่บริเวณลำไส้ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) ในลักษณะ

¹กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

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

พึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) (Thomas and Poinar, 1979) สิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการทำให้แมลงตายได้ โดยไส้เดือนฝอยเข้าสู่แมลงทางช่องเปิดตามธรรมชาติและไปยังช่องว่างภายในลำตัวของแมลงที่มีน้ำเลือดไหลเวียน จากนั้นไส้เดือนฝอยจะปลดปล่อยเซลล์ของแบคทีเรียออกสู่น้ำเลือดของแมลง แบคทีเรียมีการแบ่งเซลล์เพิ่มปริมาณและเกิดสารพิษ (Akhurst and Boemare, 1990) เป็นผลให้แมลงเกิดอาการเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายในที่สุด ส่วนไส้เดือนฝอยมีการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ภายในตัวแมลงประมาณ 2-3 ชั่ว (generation) ขึ้นกับขนาดของแมลง โดยเซลล์ของแบคทีเรียนี้มีผลต่อการขยายพันธุ์ (reproduction) ของไส้เดือนฝอย เมื่อแมลงเหลือแต่ซาก ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 3 ปรับสภาพตัวเองเป็นระยะที่เรียกว่า infective juvenile ซึ่งเป็นระยะที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกมากที่สุด โดยจะสร้างผนังที่เรียกว่า cuticle คลุมตลอดลำตัว มีการสะสมไขมัน (lipid reserve) และดูดกลืนเซลล์แบคทีเรียเก็บไว้ที่ลำไส้ (intestinal lumen) ก่อนเคลื่อนที่ออกจากซากของแมลงลงสู่ดิน สามารถมีชีวิตรอดโดยไม่กินอาหารได้เป็นเวลานานเพื่อรอแมลงเหยื่อใหม่ต่อไป

ไส้เดือนฝอยจึงจัดเป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงอีกชนิดหนึ่ง และถูกคัดเลือกให้เป็น biological control agent เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีคือ

- 1) ฆ่าแมลงตายภายในเวลารวดเร็วไม่เกิน 48 ชม. (Woodring and Kaya, 1998)
- 2) มีศักยภาพในการกำจัดแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด (Poinar, 1990)
- 3) สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ง่ายในอาหารเทียม (Friedman, 1990)
- 4) ได้รับการรับรองความปลอดภัยต่อพืชและสัตว์เลือดอุ่นโดย The United States Environmental Protection Agency (EPA) (Gaugler and Kaya, 1990)

ไส้เดือนฝอยที่เป็นศัตรูแมลง ได้มีการศึกษามามากกว่า 70 ปี ทั้งในด้านรูปร่างลักษณะพฤติกรรม ความอยู่รอด ศักยภาพในการกำจัดแมลง และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีนำมาเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปใช้

ประโยชน์ ในปัจจุบันพบว่าไส้เดือนฝอยที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง จัดอยู่ใน 2 families คือ Steinernematidae และ Heterorhabditidae ได้รับการยอมรับและนำมาใช้เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างกว้างขวาง มีการค้นหาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในภูมิภาคต่างๆ ของโลก พบว่าใน family Steinernematidae ประกอบด้วย 2 สกุล (genera) คือ *Steinernema* spp. จำแนกออกเป็นชนิด (species) ได้ 23 ชนิด และสกุล *Neosteinernema* sp. 1 ชนิด มีการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยนำมาผลิตเป็นการค้า ได้แก่ 6 ชนิด คือ *S. carpocapsae*, *S. glaseri*, *S. feltiae*, *S. riobravis*, *S. scapterisci* และ *S. kushidai* ใน family Heterorhabditidae พบ 1 สกุลคือ *Heterorhabditis* spp. จำแนกได้ 8 ชนิด คัดเลือกผลิตเป็นการค้า 2 ชนิด คือ *H. bacteriophora* และ *H. megidis* ทั้งสอง families นี้มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus*

สำหรับในประเทศไทยมีการศึกษาวิจัยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยกรมวิชาการเกษตร นำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สายพันธุ์ All strain จากสหรัฐอเมริกา มาเพิ่มปริมาณในอาหารเทียมและนำไปใช้ในสภาพไร่ได้เป็นผลสำเร็จ เทคโนโลยีการผลิตได้ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชนเพื่อผลิตเป็นการค้า งานวิจัยทางด้านการผลิตนี้ได้รับความสนใจและมีการศึกษาโดยกองกัญและสัตววิทยา ได้ทำการวิจัยเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สายพันธุ์ All strain ในถังหมัก (fermenter) เพื่อผลิตให้ได้ปริมาณมากต้นทุนต่ำ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) นอกจากนั้นงานวิจัยด้านการสำรวจเพื่อค้นหาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ในประเทศไทย ได้ดำเนินงานวิจัยโดยกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก สกว. เช่นกัน โดยมีเป้าหมายการวิจัยในขั้นพื้นฐานที่เป็นองค์ความรู้ใหม่ของประเทศ ในการค้นหาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ใหม่ที่พบในเขตร้อนชื้น นำมาเก็บรวบรวมเพื่อการจัดจำแนกชนิดและศึกษาชีววิทยา ตลอดจนพฤติกรรมความอยู่รอดและศักยภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีต่อไป

งานสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย

เริ่มดำเนินงานตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2539 ถึงเดือน มีนาคม 2541 โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินครอบคลุมพื้นที่ ทุกภาคของประเทศไทย ใน 42 พื้นที่ (จังหวัด) รวม จำนวน 306 ตัวอย่างดิน สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรู แมลงได้ใน 9 พื้นที่ของประเทศ และพบไส้เดือนฝอย ใน family Steinernematidae เป็นครั้งแรกในพื้นที่จังหวัด กาญจนบุรี และ family Heteromabditidae ในพื้นที่ จังหวัดร้อยเอ็ด (Tangchitsomkid and Sontirat, 1998)

ไส้เดือนฝอย steinernematid ที่แยกได้จาก จังหวัดกาญจนบุรี จัดเป็นไส้เดือนฝอยที่ค้นพบในเขตร้อน ขึ้นที่อุณหภูมิสูงถึง $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ จากการทดสอบศักยภาพของไส้เดือนฝอยในระดับอุณหภูมิต่างๆ พบว่ามี ศักยภาพในการฆ่าแมลงทดสอบที่อุณหภูมิสูงถึง 38°C . (นุชนารถ, 2540) ความทนทานต่ออุณหภูมิที่ สูงนี้เป็นคุณสมบัติที่ดีประการหนึ่งในการนำมา ใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

การค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย จึงต้องมีการศึกษาจัดจำแนกในระดับชนิด (species) โดยมีวัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือ เพื่อต้องการ ทราบชนิดของไส้เดือนฝอย steinernematid ที่พบใน พื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี โดยศึกษารูปร่างลักษณะทาง สัณฐานวิทยา

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาภายใต้กล้อง Ligth microscopy (LM)

ไส้เดือนฝอยสำหรับการวัดขนาดสัดส่วน เตรียม ได้จากหนอนกินรังผึ้ง (wax moth, *Galleria mellonella*) ที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอย steinernematid ระยะ infec- tive juvenile (IJ) หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 และ 6 วัน นำหนอนมาผ่าได้ตัวเต็มวัยเพศผู้เพศเมียใน 1st และ 2nd generation ตามลำดับ และไส้เดือนฝอยระยะ IJ ได้ จากการเคลื่อนที่ออกมาจากซากของหนอนเมื่ออาหาร ในตัวหนอนหมด นำไส้เดือนฝอยทั้งหมดมาฆ่าด้วยน้ำ อุ่น (40°C) เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำยา fixative (TAF) นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ ดึงน้ำออกจากตัวไส้เดือนฝอยและแทนที่ด้วยกลีเซอริน ตามวิธีการของ Kaya and Stock (1998) ไส้เดือนฝอย

ที่ได้จากกระบวนการดังกล่าวนำไปทำสไลด์ถาวร เพื่อถ่ายภาพและวัดขนาดสัดส่วนภายใต้กล้องจุล- ทรรศน์ LM โดยวัดรายละเอียดของส่วนต่างๆ ดังนี้

ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว (W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาว วัดจากหัวถึง esophagus (ES); ความยาวหาง (Tail); ความกว้างบริเวณ anus; ความยาว spicule ความยาว gubemaculum; เปอร์ซิเอนต์ vulva

นำมาคำนวณค่าสัดส่วน (ratio) โดยใช้ De Man's formula (Poinar, 1986) ดังนี้

ratio : a = L/W; b = L/ES; c = L/Tail;

d = EP/ES; e = EP/Tail

และคำนวณค่าพารามิเตอร์ตามวิธีการของ Nguyen (1993) ดังนี้

$D\% = EP/ES \times 100$; $E\% = EP/Tail \times 100$;

SW = spicule length/widit of body at cloaca;

GS = gubemaculum length/spicule length

ถ่ายภาพรูปร่างลักษณะที่สำคัญของไส้เดือน ฝอยระยะ IJ ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ Olympus รุ่น NBZ ที่มี Normarwy's inter- ference contrast

ค่าการวัดขนาดสัดส่วนและรูปร่างลักษณะสำคัญ ของไส้เดือนฝอย นำไปเปรียบเทียบกับ Key to species of the genus *Steinernema* (Nguyen and Smart, 1996)

2. การศึกษาภายใต้กล้อง Scanning electron mi- croscopy (SEM)

เตรียมไส้เดือนฝอยระยะ IJ ตัวเต็มวัยเพศผู้และ เพศเมีย ได้จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณในหนอนกินรังผึ้ง นำมาล้างด้วย NaCl 0.05% 3 ครั้ง และน้ำกลั่น 3 ครั้ง เพื่อล้างผิวของไส้เดือนฝอยให้สะอาด นำไส้เดือนฝอย ทั้งหมดมาฆ่าในน้ำอุณหภูมิ 60°C . เป็นเวลา 2 นาที

การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจ SEM แบ่งเป็นชั้น ตอนดังนี้

2.1 ขั้นตอน prefixed ใน 3% glutaraldehyde ใน 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) เป็นเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 8°C หลังจากนั้นนำไส้เดือนฝอยมา ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง

- 2.2 ขั้นตอน postfixed นำไส้เดือนฝอยจากข้อ 2.1 แช่ในสารละลายของ 2% osmium tetroxide เป็นเวลา 12 ชม. ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นล้างน้ำ 1 ครั้ง
- 2.3 ขั้นตอนการ dehydrated ใน ethanol ระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 30, 50, 70, 90, 95 และ 100%
- 2.4 ขั้นตอนการทำให้แห้ง (critical point dried) ใน liquid CO₂
- 2.5 ขั้นตอนการจัดวางไส้เดือนฝอยบน SEM stub ภายใต้อุปกรณ์ stereo microscope
- 2.6 ขั้นตอนการ coat ด้วยทอง
- 2.7 นำไปตรวจภายใต้ SEM (JSM-35 CF model) และถ่ายภาพ

ผลการทดลอง

จากการศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้อง LM และ SEM ของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะ J ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย พบว่าไส้เดือนฝอย steinernematid ที่แยกจากจังหวัดกาญจนบุรี มีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากไส้เดือนฝอยชนิดอื่น สามารถจัดจำแนกเป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ (new species) และเป็นสายพันธุ์ไทยที่ค้นพบเป็นครั้งแรก โดยจัดลำดับชั้นตามระบบของอนุกรมวิธาน ได้ดังนี้

phylum Nematoda
class Secernentia
order Rhabditida
family Steinernematidae
genus *Steinernema*
species *thailandensis*

รายละเอียด : *Steinemema thailandensis* n.sp.

Infective-stage juvenile: ผลการวัดขนาดสัดส่วนตัวอ่อนระยะ infective juvenile จำนวน 20 ตัว (Table 1) มีรูปร่างผอมบาง ขนาดความยาวและความกว้างลำตัวเล็ก (L=432 µm; W=22 µm) มี sheath ใสหุ้มตลอดลำตัว ปิดส่วนปาก ช่องขับถ่ายและช่องเปิดอื่นๆ ริมฝีปากต่อเชื่อมลำตัวไม่แบ่งแยก labial papillae ยังไม่เจริญ ส่วน cuticle เรียบ มีเส้นข้างลำตัว (lateral line) จำนวน 6 เส้น ปลายหางแหลม (tail tip pointed) ไม่มีติ่ง (mucron) (Figure 1 A-C)

Female, first generation : ผลการวัดขนาดสัดส่วนตัวเต็มวัยเพศเมียจำนวน 10 ตัว (Table 2) ตัวเต็มวัยเพศเมียมีความยาวลำตัวเป็น 3 เท่าของตัวเต็มวัยเพศผู้ (6,927 vs 2,008) ส่วนของผนังลำตัว (cuticle) เรียบ ส่วนหัวกลมมีอวัยวะรับความรู้สึก (sensory organ) ประกอบด้วย 10 papilla แบ่งเป็น 6 labial และ 4 cephalic ช่องปากช่วงบน (cheilorhabdion) หนา แยกออกจากส่วนทางเดินอาหารตอนหน้า ตำแหน่งของช่องขับถ่ายผิวหนัง (excretory pore) อยู่บริเวณทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid-metacarpus) ส่วนต่อระหว่างฐานของท่อทางเดินอาหาร (esophagus) กับลำไส้ส่วนหน้า (intestine) จะมี junction ที่มีรูปร่างแบบ elliptically shaped ระบบสืบพันธุ์มีท่อรังไข่เป็นแบบ gonads didelphic ส่วนปลายของรังไข่ทั้งสองด้านจะ reflexed มีการผสมพันธุ์แบบ amphimictic อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (vulva) อยู่กลางลำตัว (52%) มีลักษณะนูนเป็นเนิน (protuberance) ไม่เป็นแบบ flapped epiptygma ความยาวหาง (28.4 µm) สั้นกว่าความกว้างลำตัวบริเวณ anus (91.3 µm) ปลายหางมีติ่ง (Figure 1 D,E)

Female, second generation : ผลการวัดขนาดสัดส่วนตัวเต็มวัยเพศเมียจำนวน 10 ตัว (Table 2) มีรูปร่างลักษณะโดยทั่วไปเหมือนกับใน first generation แต่มีขนาดความยาวและความกว้างลำตัวเล็กกว่า และมีปลายหางที่เรียวแหลมกว่า (Figure 1F, G)

Allotype (Female, first generation, in glycerine):
Length 7,078.0 µm; width 214.1 µm; head to excretory pore 117.6 µm; head to end of esophagus 278.3 µm; body width at anus 82.3 µm; tail length 27.4 µm; vulva 52.0%

Male, first generation : ผลการวัดขนาดสัดส่วนตัวเต็มวัยเพศผู้จำนวน 10 ตัว (Table 3) ตัวเต็มวัยเพศผู้มีขนาดเล็กกว่า 1 ใน 3 เท่าของตัวเต็มวัยเพศเมีย รูปร่างลำตัวได้สัดส่วนกันจากหัวถึงปลายหาง ส่วนปลายหางโค้งเป็นรูป C-shaped เมื่อฆ่าด้วยความร้อน มีท่อสร้าง sperm ข้างเดียว (testis single) ซึ่งปลาย testis จะโค้งงอกลับ (reflexed) ส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ (spicule) เป็นคู่ มีสีน้ำตาลเข้ม มีรูปร่างโค้ง ส่วนปลายแหลมเป็นเหลี่ยมมุม ส่วนของ gubernaculum ยาว

ส่วนตัวเต็มวัยเพศผู้จำนวน 10 ตัว (Table 3) ตัวผู้ใน second generation มีลักษณะรูปร่างทั่วไปเหมือนกับใน first generation ยกเว้นมีความยาวลำตัวสั้นกว่า (1360 vs 2007 μm) และความกว้างลำตัวเป็นครึ่งหนึ่งของ first generation (84 vs 154 μm) และความกว้างลำตัวเป็นครึ่งหนึ่งของ first generation (84 vs 154 μm)

Holotype (male, first generation, in glycerine) : Length 1,934.9 μm ; width 157.6 μm ; head to excretory pore 94.6 μm ; head to end of esophagus 198.1 μm ; body width at anus 51.2 μm ; tail length 31.5 μm ; spicule length 88.7 μm ; gubernaculum length 63.0 μm

Type locality : แปลงปลูกมะพร้าว จังหวัดกาญจนบุรี

Type specimens:

Holotype (male, first generation) : แยกจาก hemocoel ของหนอนกินรังผึ้ง slide no. SM-01 เก็บที่กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

Allotype (female, first generation) : แยกจาก hemocoel ของหนอนกินรังผึ้ง slide no SF-01 เก็บที่กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

Paratypes (first generation males, first generation females and infective stage juvenile): แยกจาก hemocoel ของหนอนกินรังผึ้ง จำนวน 20 ตัวของเพศผู้และเพศเมีย และ 10,000 ของระยะ infective juveniles ในน้ำยา fixative (TAF) Vial no. SMFIJ-01 เก็บที่กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

Diagnosis : *Steinernema thailandensis* n. sp.

Steinernema thailandensis n. sp. สามารถแยกออกจากไส้เดือนฝอย species อื่นๆ ใน family Steinernematidae โดยพิจารณาขนาดสัดส่วนของไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile ที่มีขนาดลำตัว ความยาวและความกว้าง ค่า D% และ E% ที่แตกต่าง

(Table 4) เมื่อพิจารณาลักษณะรูปร่างปลายหางของเพศผู้มีความแตกต่างจากไส้เดือนฝอยชนิดอื่นๆ (Figure 2) และจากภาพถ่าย SEM แสดงส่วนหัวของตัวเมียมีลักษณะกลมมน มีส่วนนูนเป็นลักษณะเนินกลม 6 เนิน และเป็นตำแหน่งที่ตั้งของ labial papillae มีจำนวน 6 papillae (Figure 1D) ลักษณะเนินกลมเป็นวงนี้จัดเป็นความแตกต่างที่สำคัญจากไส้เดือนฝอยในชนิดอื่นๆ ดังนั้น สามารถจัดจำแนกเป็น new species ได้ตามการศึกษาลักษณะพื้นฐานทาง morphological characteristic

ข้อพิจารณาอื่นๆ ประกอบการเป็น new species มีเหตุผลสนับสนุนคือ 1) แมลงทอดสอบ (*G. mellonella*) เมื่อถูกเข้าทำลายจะมีสีน้ำตาลดำ-ดำ แตกต่างจาก *S. carpocapsae* All strain ที่มีสีน้ำตาล 2) มีการเพิ่มปริมาณได้เร็วมากในแมลงเหยื่อที่อุณหภูมิสูงถึง 30-38 °ซ. เนื้อเยื่อของแมลงเหยื่อจะแตกและพบไส้เดือนฝอยระยะที่เป็นตัวอ่อนและตัวเต็มวัยอยู่ทั้งด้านในและด้านนอกของซากแมลง 3) ไส้เดือนฝอยระยะ IJ เก็บในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 28±2 °ซ. ได้นานประมาณ 5 เดือน และยังมีศักยภาพทำลาย แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 10 °ซ. IJ จะตายภายในเวลา 2-3 วัน จัดเป็นไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ทนร้อน (heat tolerant strain) เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. riobravus* ที่พบในรัฐ Texas (Cabanillas et al., 1994) และ *S. abbasi* สายพันธุ์ที่พบในประเทศ Oman (Elawad et al., 1997)

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย steinernematid ที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่และเป็นสายพันธุ์ไทยที่ค้นพบเป็นครั้งแรกตั้งชื่อชนิดไส้เดือนฝอยตามแหล่งที่พบคือ *Steinernema thailandensis* n.sp. โดยมีรูปร่างลักษณะและขนาดสัดส่วนแตกต่างจากไส้เดือนฝอยชนิดอื่น และจัดว่าเป็นสายพันธุ์ไทยที่ทนร้อน ความทนร้อนเป็นคุณสมบัติที่ดีประการหนึ่งของการนำขึ้นมาพัฒนาใช้เป็น bio-control agent และ

Table 1. Measurements (in μm) of infective-stage juvenile of *Steinernema thailandensis* n.sp. (n=20).

Character	Mean	SD	Range
Body length	432	13	404 - 460
Greatest width	22	0.6	22 - 24
EP (head to excretory pore)	35	2	34 - 39
ES (head to end of esophagus)	106	4	99 - 112
Tail length	42	2	37 - 47
Ratio:a	20	0.8	18 - 21
Ratio:b	4	0.1	3.8 - 4.3
Ratio:c	10	0.4	9 - 11
D%	33	1.7	30 - 37
E%	83	5	75 - 91

Table 2. Measurements (in μm) of first-generation and second-generation females of *Steinernema thailandensis* n.sp. (n=10.)

Character	First generation			Second generation		
	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range
Body length	6,927	871	5,332 - 8,332	3,318	332	2,857 - 3,854
Greatest width	230	16	206 - 259	219	10	204 - 243
EP (head to excretory pore)	129	16	94 - 153	86	7	71 - 94
ES (head to end of esophagus)	275	11	256 - 294	271	11	255 - 290
Anal body width	91	11	75 - 106	51	7	39 - 59
Tail length	28	5	20 - 35	42	4	36 - 47
Vulva%	53	0.9	52 - 55	56	1.6	53 - 58

Table 3. Measurements (in μm) of first-generation and second-generation males of *Steinernema thailandensis* n.sp. (n=10.)

Character	First generation			Second generation		
	Mean	SD	Range	Mean	SD	Range
Body length	2,008	120	1,784 - 2,260	1,360	130	1,047 - 1,530
Greatest width	155	8	145 - 172	85	8	70 - 94
EP (head to excretory pore)	93	6	85 - 103	87	8	67 - 98
ES (head to end of esophagus)	188	7	175 - 197	147	8	130 - 159
Anal body width	51	7	39 - 63	29	2	27 - 33
Tail length	33	4	24 - 41	20	3	17 - 27
Spicule length	94	5	24 - 41	85	4	78 - 92
Gubernaculum length	67	4	61 - 79	58	7	43 - 69
D%	50	4	44 - 56	59	6	42 - 64
SW	1.9	0.3	1.3 - 2.5	2.9	0.3	2.4 - 3.3
CS	0.7	0.05	0.6 - 0.8	0.7	0.1	0.5 - 0.8

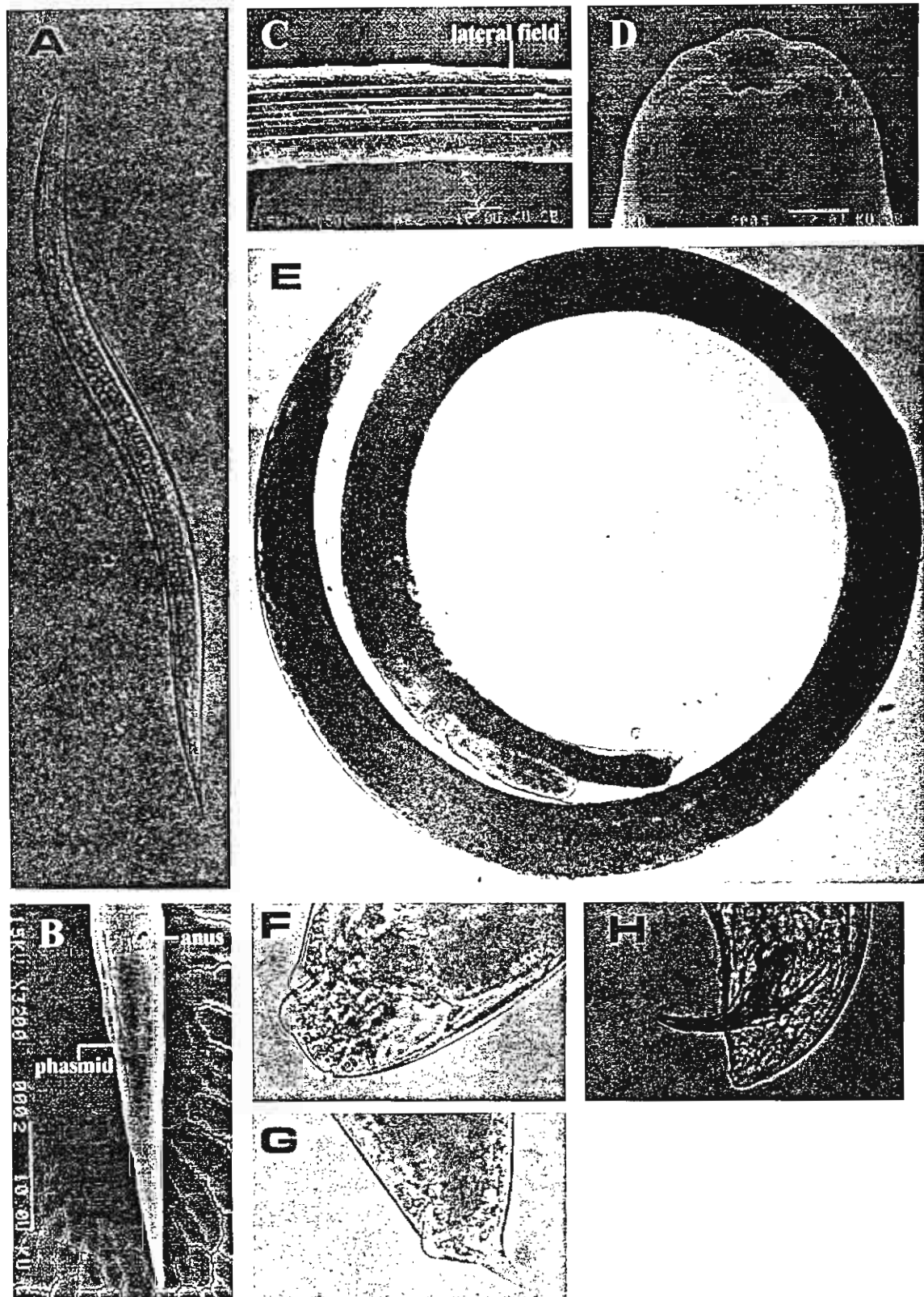


Figure 1. LM and SEM photographs of some structures of *Steinernema thailandensis* n.sp. Infective juveniles, A : Entire body; B : Tail; C : Lateral field. Females, D : Anterior region; E : Entire body; F : 1st generation tail; G : 2nd generation tail. Males, H : Posterior region.

Table 4. Morphometrics (in μm) of infective stage juveniles of *Steinernema thailandensis* n.sp. compared with other *Steinernema* species.

Species	Morphometric character ¹⁾ (Range)									
	L	W	EP	ES	T	a	b	c	D%	E%
<i>S. anomali</i>	1,034 (724-1,408)	46 (28-77)	83 (76-86)	138 (123-160)	75 (64-84)	26 (17-34)	7.6 (5.9-10.8)	13.8 (9.4-16.9)	56 (52-59)	119 (106-130)
<i>S. carpocapsae</i>	558 (438-650)	25 (20-30)	38 (30-60)	120 (103-190)	53 (46-61)	21 (19-24)	4.4 (4.0-4.8)	10.0 (9.1-11.2)	26 (23-28)	60 (54-66)
<i>S. glaseri</i>	1,130 (864-1,448)	43 (31-50)	102 (87-110)	162 (158-168)	78 (62-87)	29 (26-35)	7.3 (6.3-7.8)	14.7 (13.6-15.7)	65 (58-71)	131 (122-138)
<i>S. feltiae</i>	849 (763-950)	26 (22-29)	62 (53-67)	136 (115-150)	81 (70-92)	31 (29-33)	6.0 (5.3-6.4)	10.4 (9.2-12.6)	45 (42-51)	78 (69-86)
<i>S. kushidai</i>	589 (542-662)	26 (22-31)	46 (42-50)	111 (106-120)	50 (44-59)	22.5 (19-25)	5.3 (4.9-5.9)	11.7 (9.9-12.9)	41 (38-44)	92 (84-95)
<i>S. rara</i>	511 (443-573)	23 (18-26)	38 (32-40)	102 (89-120)	51 (44-56)	23 (20-26)	4.7 (4.1-5.6)	9.8 (8.7-11.0)	35 (30-39)	72 (63-80)
<i>S. riobravisi</i>	622 (561-701)	28 (26-30)	56 (51-64)	114 (109-116)	54 (46-59)	23 (20-24)	5.4 (4.9-6.0)	11.6 (10.1-12.4)	49 (45-55)	105 (93-111)
<i>S. scapterisci</i>	572 (517-609)	24 (18-30)	39 (36-48)	127 (143-134)	54 (48-60)	24 (20-31)	4.5 (4.0-4.6)	10.7 (9.2-11.7)	31 (27-40)	73 (60-80)
<i>S. thailandensis</i>	432 (404-460)	22 (22-24)	35 (33-39)	106 (99-112)	42 (37-47)	20 (18-21)	4.1 (3.8-4.3)	10.4 (9.4-11.0)	33 (30-37)	83 (75-91)

1) L = length; W = greatest width; EP = distance from anterior end to excretory pore; ES = esophagus length; T = tail length; a = L/W; b = L/ES; c = L/T; D% = EP/ESx100; E% = EP/Tx100

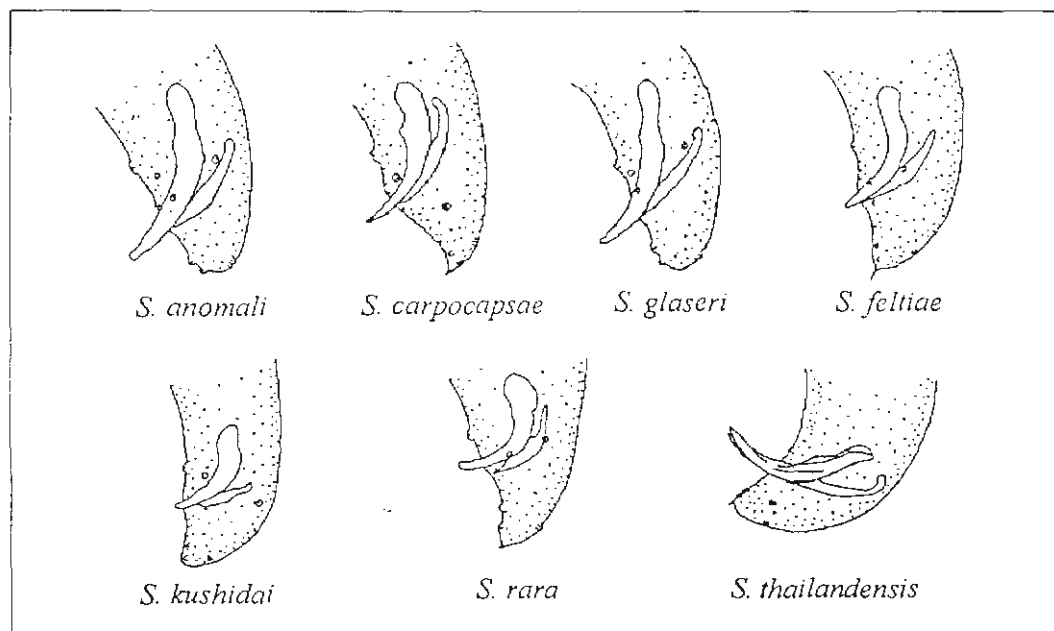


Figure 2. Schematic drawings of male tails of *Steinernema thailandensis* n. sp. compared with other *Steinernema* species.

และแยกออกจาก spicule ส่วนหลัง (posterior) ชัดเจน และในส่วนหน้า (anterior) อยู่ติดกับ spicule เพื่อเป็นตัวบังคับทิศทางและช่วยพยุง spicule ในขณะที่ผสมพันธุ์ และปลายหางมีติ่ง (mucron) (Figure 1H)

Male, second generation : ผลการวัดขนาดสัด นำกลับมาใช้กับแมลงศัตรูพืชในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ความทนทานและศักยภาพในการทำลายย้อมดีกว่า สายพันธุ์จากแหล่งอื่น แต่อย่างไรก็ตาม การคัดเลือกสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่พบในประเทศไทยและเป็น new species เพื่อนำไปผลิตเป็นการค้า นั้น มีข้อพิจารณาอื่นๆ ประกอบอีกมาก นอกเหนือจากความทนร้อน ควรจะทำการศึกษาด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยาของไส้เดือนฝอยที่พบในประเทศไทย ซึ่งจัด

เป็นงานพื้นฐานที่มีความสำคัญในแง่ของการนำไปใช้ประโยชน์ที่ต้องเข้าใจธรรมชาติและพฤติกรรมของสายพันธุ์ใหม่และเป็นข้อมูลทางวิชาการเพื่อการเผยแพร่ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย คุณลักษณะ วรณเกียรติ์ ผู้อำนวยการกองโรงพืชและจุลชีววิทยา ให้การสนับสนุนในการดำเนินงานวิจัย คุณองุ่น ลีวานิช และคุณสมหมาย ชื่นราม กองกัญและสัตววิทยา ให้คำแนะนำในการตั้งชื่อชนิดของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย

เอกสารอ้างอิง

- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2540. การค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ใหม่ของประเทศไทย. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 7: 15-19.
- Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 75-90 pp.
- Cabanillas, H.E., G.O.Jr. Poinar and J.R. Raulston. 1994. *Steinernema riobravus* n.sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. Fundamental and Applied Nematology 17: 123-131.
- Elawad, S., W. Ahmad and A.P. Reid. 1997. *Steinernema abbasi* sp.n. (Nematoda: Steinernematidae) from the Sultanate of Oman. Fundamental and Applied Nematology 20(5): 435-442.
- Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development. In R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 153-172 pp.
- Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 365 p.
- Kaya, H.K. and S.P. Stock. 1988. Techniques in Insect Nematology. Department of Nematology. University of California, Davis. California. 100 p.
- Nguyen, K.B. 1993. Identification to Entomopathogenic Nematode Species of the Genus *Steinernema*. Department of Entomology & Nematology. IFAS, University of Florida, Gainesville. 24 p.
- Nguyen, K.B. and G.C. Smart, Jr. 1996. Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata: Rhabditida). Journal of Nematology 28: 286-300.
- Poinar, G.O., Jr. 1986. Recognition of *Neoaplectana* species (Steinernematidae: Rhabditida). Proc. Helminthol. Soc. Wash. 53: 121-129.
- 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. Boca Raton. CRC Press.
- Tangchitsomkid, N. and S. Sontirat. 1998. Occurrence of entomopathogenic nematodes in Thailand. The Kasetsart Journal (In press).
- Thomas, G.M. and G.O. Poinar, Jr. 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. International Journal Systematic Bacteriology 29: 352-360.
- Woodring, J.L. and H.K. Kaya. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of techniques. Southern Cooperative Series Bulletin. 331. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AK. 30 p.



การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37

The 37th Kasetsart University Annual Conference

บทคัดย่อ

3-5 กุมภาพันธ์ 2542

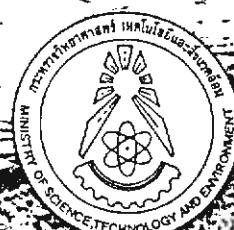
จัดโดย
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ร่วมกับ

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

กระทรวงมหาดไทย

ISBN 974-553-560-5



การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp.)

บนอาหารเทียมชนิด lipid agar

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

จากการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. Thai strain) ที่มีความสัมพันธ์ร่วมกับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ในอาหารเทียมชนิด lipid agar ที่อุณหภูมิ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ พบว่า ไส้เดือนฝอยมีการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดี มีการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบจากไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile (IJ) เป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 (J4) ในวันที่ 2 และ 3 มีการพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ผสมพันธุ์ ให้ลูกเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 (J1) ภายในท้องตัวเมีย ในช่วงระหว่างวันที่ 4 ถึงวันที่ 6 และจากวันที่ 7 ถึงวันที่ 10 มีการเจริญเติบโตพัฒนาจาก J1 เป็น J2 และ J3 มีการรับสภาพจาก J3 เป็นระยะ IJ ตามลำดับ จากการนับจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอยเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่าไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยให้ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 1.31 ล้านตัวต่อ Petri dish (อาหาร 20 กรัม) ต้นทุนอาหารเท่ากับ 3.72 บาท เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตไส้เดือนฝอยจำนวน 1 ล้านตัว ของการเพาะเลี้ยงในหนอนกิ้งมั่ง (greater wax moth, *Galleria mellonella*) กับการเลี้ยงในอาหารเทียมชนิด lipid agar พบว่า การเลี้ยงจากหนอนกิ้งมั่งมีต้นทุนสูงกว่าประมาณ 8 เท่า

Mass rearing of a Thai strain of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* sp.) on lipid agar medium

Nuchanart Tangchitsomkid

Nematology Section, Plant Pathology & Microbiology Division, Department of Agriculture

The possibility of mass rearing of a Thai strain of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* sp.) with its associated bacteria, *Xenorhabdus* sp., was investigated. The study was to determine nematode development, reproduction and final yields of infective juveniles on lipid agar medium at a temperature of $28 \pm 2^\circ\text{C}$. The infective juveniles (IJ) molted to the fourth juveniles in two or three days. These J4 then further developed into adults which mated and gave eggs and J1 inside the female body, this process took another two or three days. The J1 needed one to three days to develop into J2 and J3 (infective juveniles, IJs) which retained the cuticle of the J2 as a sheath. The production of nematodes by this method yielded 1.31 millions and cost 3.72 baht/one petri dish (20 g of the medium). This method is less expensive than the production by using greater wax moth (*Galleria mellonella*) which costs eight times higher.

THE KASETSART JOURNAL

Natural Sciences
Volume 32, Number 3, 1998

ISSN 0075-5192

ผลของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่มีต่ออัตราการเหลืองของข้าวเปลือกขึ้น

Effect of Temperature and Relative Humidity on Yellowing Rate of Paddy

..... นิรชรา ศรีสุบัตติ สมชาติ ไสภนรณฤทธิ์ และ ทิพาพร อัญญาวิทยา 309

ศึกษาการทำคุกกี้จากถั่วเขียวผิวดำเปรียบเทียบกับถั่วเขียวและถั่วมะแฮะ

Study on the Production of Cookies from Black Gram Compare with Cookies from Mungbean and Pigeon Pea

..... สมชาย ประภาวัต ยืนใจ รัฐะฐาน ดวงจันทร์ เสงส์สวัสดิ์ และ พยอม อัดถวิบูลย์กุล 319

In Vitro Preservation of *Vanda coerulea* Giff. Protocorm-Like Bodies

..... Surawit Wannakrairoj 329

Bioreactor Performance and Design of Large Scale Packed-Bed Solid-State Fermentation

..... Penjit Srinophakun and Thongchai Srinophakhun 333

Diversity of Blue-Green Algae and Green Algae in the Deciduous Dipterocarp Forest at

Huai Kha Khang Wildlife Sanctuary

..... Duenrut Chonudomkul, Wichien Yongmanitchai, Chantana Sookpreedee, Prima Yongmanitchai,

..... Wallapa Arunpairojana, and Prasart Kermanee 339

Occurrence of Entomopathogenic Nematodes in Thailand

..... Nuchanart Tangchitsomkid and Suebsak Sontirat 347

Properties, Environment and Fertility Capability of Sandy Soils in Northeast Plateau, Thailand

..... Irb Kheoruenromne, Anchalee Suddhiprakarn, and Piboon Kanghae 355

Effects of Intercropping Groundnut and Green-Manure Legumes to Corn on the Yields of Corn and Productivity and

Chemical Properties of Soil

..... A. Suwanarit, N. Lekhasoonthakorn, J. Rungchuang, and S. Kritapirom 374

Impacts of Land Cover Changes and Large Reservoirs Development on Streamflow Regime of the Chao Phraya River

Basin and Its Tributaries

..... Nipon Tangtham, Samakkee Boonyawat, and Pongsak Witthawatchutikul 385

Occurrence of Entomopathogenic Nematodes in Thailand

Nuchanart Tangchitsomkid¹ and Suebsak Sontirat²

ABSTRACT

A soil survey of indigenous strains of entomopathogenic nematode was conducted in 42 provinces of Thailand between June 1996 to March 1998. A total of 306 soil samples were extracted using *Galleria* baiting technique. The nematodes were recovered from 9 out of 42 locations (21.4 %). The identification using morphological characteristics of infective-stage juveniles and adults revealed 8 isolates of Steinernematidae : *Steinernema* sp. and 1 isolate of Heterorhabditidae : *Heterorhabditis* sp. The nematodes were collected from central plains at the temperature range of 24-27°C (10-15 cm deep from soil surface) and 29-37°C (at soil surface) and they were heat-tolerant isolates from Thailand.

Key words : entomopathogenic nematodes, *Steinernema* sp., *Heterorhabditis* sp., heat-tolerant isolate

INTRODUCTION

Insect nematodes have been discovered and studied for more than 70 years. Although nearly 40 nematode families have been isolated from soil inhabiting insects throughout the world and the association existing between nematodes and insects is variable; only two families, Steinernematidae and Heterorhabditidae, are commonly used as a biological control agent (Gaugler and Kaya, 1990) since they have a mutualistic relationship with the bacteria, *Xenorhabdus*, which could kill insect hosts within 24-48 hours (Woodring and Kaya, 1988).

Surveys of entomopathogenic nematodes have been conducted in many parts of the world. So far, the family Steinernematidae is comprised of two genera, *Steinernema* Travassos, 1927 (Poinar, 1990) and *Neosteinerema* Nguyen and Smart, 1994 (Nguyen and Smart, 1994). The family

Heterorhabditidae contains only one genus, *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (Poinar, 1976). Currently, 18 species of *Steinernema*, 1 species of *Neosteinerema* and 7 species of *Heterorhabditis* have been described (Nguyen and Smart, 1996).

Thailand is situated in the tropical region of the world. Insects are of the most damaging pests causing losses in many crops. The control of insects is undertaken by using hazardous chemicals which adversely affect human and environment. However, an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* (All strain) imported from the US for more than 10 years, has proven highly effective in controlling several damaging insect pests in Thailand and its acceptance is increasing. *S. carpocapsae* could be produced by both *in vitro* and *in vivo* cultures, easy to be used and inexpensive compared with chemicals. Commercially, the nematodes are suspended in sponge and kept in packages of 4 million nematodes/package.

¹ Nematology Section, Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900, Thailand.

² Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

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). If Thai strains are obtained, they could serve as a resource for use in the tropics because they could be more effective against native insect pests and also present less risk to non-target organisms compared to exotic isolates.

Entomopathogenic nematodes at infective-stage juveniles are associated with disease inducing bacteria in insects. Approximately 250 bacterial cells were found in the foregut of one nematode (Ehlers, 1995). The rapidity in killing insects is not dependent solely upon bacteria, it also depends upon the search ability of nematodes for the preyed insects as well as on how quick the nematodes can carry the bacteria in insect blood content (Woodring and Kaya, 1988). The ability of nematodes which differ among species or strains, leads to the beginning of the bio-control era.

The objectives of this study were to discover new Thai strains of entomopathogenic nematodes for development and use in biological control programmes in Thailand and to document their occurrence in different habitats and soil types.

MATERIALS AND METHODS

1. Maintenance of *Galleria mellonella* cultures (Modification after Miduturi, 1997).

Greater wax moth larvae *G. mellonella* (Pyralidae : Lepidoptera), were used for culturing nematode isolates from Thailand. Insect cultures were maintained on an artificial diet containing 200 g rice powder, 100 ml honey, 100 ml glycerol and 50 g beer yeast in aerated plastic containers (32.5 × 17.6 × 10 cm) at 25-28°C. Approximately 200-300 eggs were placed on a piece of artificial diet in plastic containers and kept at 25-28°C. The eggs hatched in 3-4 days. After 2 weeks the larvae were given a new diet. After 3 weeks, late instar

larvae were ready to be collected. Larvae could then be stored on paper shavings for 2-3 weeks at 10±1°C.

2. Collection of soil samples

A total of 306 soil samples were collected from 42 different locations of habitat types, including fruit crops, field crops, ornamental plants, woodland and beach (Table 1). Soil samples representing each site were collected to a depth of 10-15 cm using an auger. At each site, five subsamples were randomly taken from an area of approximately 10 m² and were placed in a plastic bucket in which they were mixed thoroughly. One kilogram of soil (one sample) was taken from the plastic bucket and placed in a plastic bag. Samples were placed in coolers (18-20°C) during transportation to the laboratory where they were stored at 10±1°C until further process. Site locations, soil temperatures, associated vegetations and insects present were recorded.

3. Baiting technique

The presence of entomopathogenic nematodes in soil samples was tested by baiting with wax moth *Galleria mellonella* larvae (Bedding and Akhurst, 1975). Ten last instars of *G. mellonella* were placed at the bottom of each plastic container (capacity 300 ml), soils were added and lids with ventilation holes were positioned. The insects in this trap bioassay were incubated in the dark at 25°C with 85% relative humidity. After 7 days, the larvae were removed from the soil and the dead larvae with characteristic signs and symptoms of entomopathogenic nematode infection were either dissected or placed on White traps (White, 1927), in which the emerging infective juveniles were then collected. These juveniles were re-exposed to *G. mellonella* in Petri dishes to confirm the pathogenicity test.

Table 1 Locations, soil textures and associated habitats in which the nematodes were found in different regions of Thailand during June 1996 to March 1998.

Location	No. of samples	Sampling time (month)	Soil texture	Habitat	Nematode code
Rayong	15	June/1996	Sandy loam	Fruit crop	-
			Sand	Beach	-
Chantha Buri	3	June	Sand	Beach	-
Chon Buri	5	June	Sand	Beach	-
Chiang Mai	5	August	Sandy loam	Field crop	-
Lampang	5	September	Sandy loam	Woodland	-
Chiang Rai	5	October	Clay loam	Woodland	-
Phetchabun	5	October	Clay loam	Woodland	-
Ratcha Buri	3	November	Clay loam	Fruit crop	-
Ranong	4	November	Sandy clay loam	Fruit crop	-
Phangnga	17	November	Sandy loam	Fruit crop	-
Krabi	3	November	Sandy loam	Fruit crop	-
Chumphon	16	November	Sandy loam	Fruit crop	-
Kanchana Buri	12	December	Sandy loam	Fruit crop	KB
Chachoengsao	7	January/1997	Sandy loam	Woodland	-
Buri Ram	7	January	Sandy loam	Field crop	-
Nakhon Ratchasima	8	January	Sandy loam	Field crop	-
Nakhon Sawan	3	February	Sandy loam	Field crop	-
Phichit	9	February	Sandy loam	Fruit crop	PC
Phitsanulok	14	February	Sandy loam	Field crop	-
			Sandy loam	Fruit crop	-
Tak	4	February	Sandy loam	Field crop	-
Phra Nakhon	5	March	Sandy loam	Ornamental crop	AY
Si Ayutthaya					
Chai Nat	9	April	Sandy loam	Field crop	-
Sin Buri	8	April	Sandy loam	Vegetable crop	-
Nakhon Nayok	5	April	Sandy loam	Woodland	-
Pathum Thani	5	April	Sandy loam	Vegetable crop	-
Kalasin	15	July	Sandy loam	Roadside verge	KS
Roi Et	15	July	Sandy loam	Roadside verge	RE
Maha Sarakham	10	July	Sandy loam	Roadside verge	MK
Khon Kaen	10	July	Sandy loam	Roadside verge	KK
Udon Thani	5	July	Sandy loam	Roadside verge	-
Nong Khai	10	July	Sandy loam	Roadside verge	NK
Nakhon Si Thammarat	9	August	Sandy loam	Vegetable crop	-
Nakhon Pathom	10	January/1998	Sandy loam	Fruit crop	-
Supan Buri	6	January	Sandy loam	Field crop	-
Prachin Buri	8	February	Sandy loam	Roadside verge	-
Sakaeo	5	February	Sandy loam	Fruit crop	SK
Ang Thong	6	March	Sandy loam	Roadside verge	-
Kamphang Phet	9	March	Sandy loam	Roadside verge	-
Phare	5	March	Sandy loam	Roadside verge	-
Nan	5	March	Sandy loam	Roadside verge	-
Uttaradit	8	March	Sandy loam	Roadside verge	-
Lamphun	10	March	Sandy loam	Fruit crop	-
Total 42 locations	306 samples				recovered 9 nema samples

4. Preparation of nematodes for identification

Nematodes recovered from *Galleria* traps were identified to families and genera for this description. Males and females were obtained by dissecting cadavers of *G. mellonella* larvae 4 days after infection but infective juveniles were collected from the watery trap 10 days after infection. The nematodes were mounted in water mounts under a coverglass. The examination of morphology and microphotography was performed with an Olympus microscope equipped with differential interference contrast optics.

RESULTS

Many kinds of nematodes were isolated from soil samples collected from the survey. Entomopathogenic nematodes were recovered from 9 of 42 locations (21.4%) and mainly from sandy loam soil with a temperature zone at soil surface and at a depth of 10-15 cm of 27-37°C and 24-29°C respectively (Figure 1). The nematodes were recovered from 2.4%, 7.1% and 11.9% of the samples taken in ornamental plants, fruit crops and roadside verges respectively while soil samples from beach, field crops, woodland and vegetable crops did not yield any entomopathogenic nematodes.

Identification was initially conducted to family and genus level by morphological characteristics of infective-stage juveniles, females and males. All isolates were compared with a key to 2 major families and genera of entomopathogenic nematodes which was compiled by Kaya and Stock (1988). Eight nematode isolates from family Steinernematidae, genus *Steinernema* (KB, PC, AY, KS, MK, KK, NK, and SK code) and 1 isolate from family Heterorhabditidae, genus *Heterorhabditis* (RE code) were recovered (Table 2).

Family Steinernematidae

Diagnosis : Order Rhabditida, superfamily Alloionematoidea, family Steinernematidae, Type genus : *Steinernema* Travassos, 1927. Obligate insect parasites. Infectives carry symbiotic bacteria in the bacterial chamber of the intestine. Both males and females are necessary for reproduction.

Infective-stage juvenile : Body slender. Mouth and anus closed. Excretory pore anterior to nerve ring. Mouth region not armed with a dorsal hook (Figure 2 A).

Female : Large nematode. Amphimictic with opposed reflexed ovaries. Vulva with lips, located in midbody region. Older females become ovoviviparous, the young juveniles consuming female body contents and eventually killing the females.

Male : Body smaller than female. Testis single, reflexed at tip. Spicules paired and separate. Gubernaculum long. Bursa absent. Tail tip with mucron (Figure 2 C).

Family Heterorhabditidae

Diagnosis : Order Rhabditida, superfamily Rhabditoidea, family Heterorhabditidae, Type genus : *Heterorhabditis* Poinar, 1976. Obligate insect parasites. Infectives carry symbiotic bacteria in the bacterial chamber of the intestine. Both hermaphroditic and amphimictic females present.

Infective-stage juvenile : Body slender. Mouth and anus closed. Excretory pore posterior to nerve ring. (Figure 2 B).

Female : Large nematode. Hermaphroditic in first generation and amphimictic in second generation.

Male : Body smaller than female. Testis single, reflexed at tip. Spicules paired and separate. Gubernaculum long. Bursa present. (Figure 2 D).

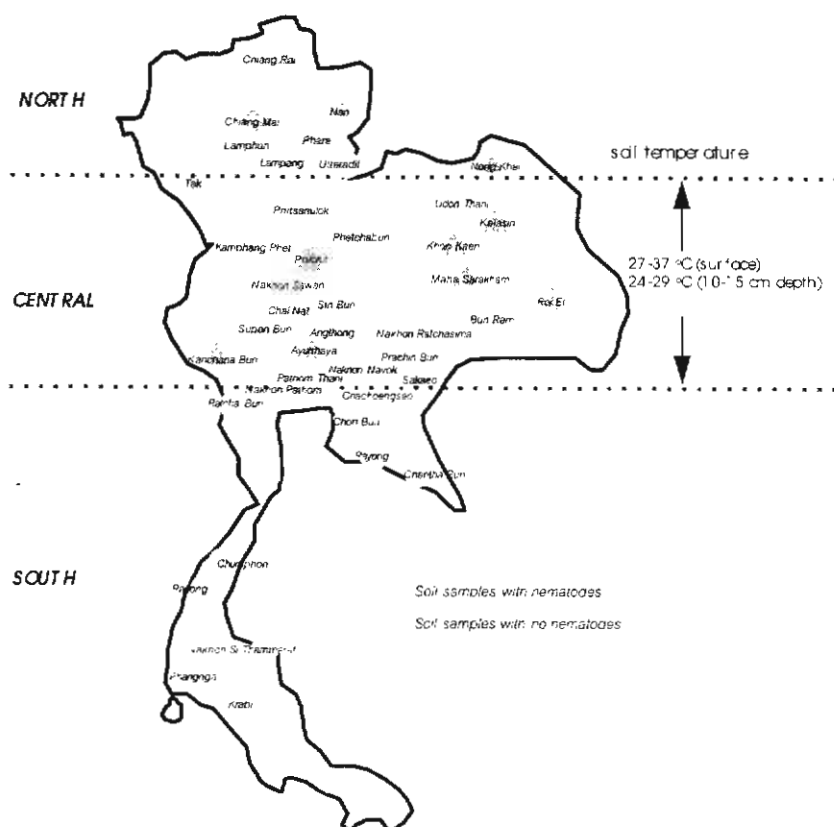


Figure 1 Map of soil sampling areas in Thailand showing the locations (42 provinces) and temperatures where nematodes were found.

Table 2 Key to 2 major families and genera of entomopathogenic nematodes (Kaya and Stock, 1988).

Definition	Family Steinernematidae Genus <i>Steinernema</i>	Family Heterorhabditidae Genus <i>Heterorhabditis</i>
1. Pathogenicity to insect	obligate pathogen	obligate pathogen
2. Reproduction in the cadaver	2-3 amphimictic generations	2 generations : Hermaphroditic in the first generation, and amphimictic in the second generation
3. Position of excretory pore	anterior to nerve ring	posterior to nerve ring
4. With and without bursa in male	bursa absent	bursa present
5. Color of cadavers	yellow-brown or black with no luminescence in the dark	red, brick-red, purple, orange or sometimes green with luminescence in the dark

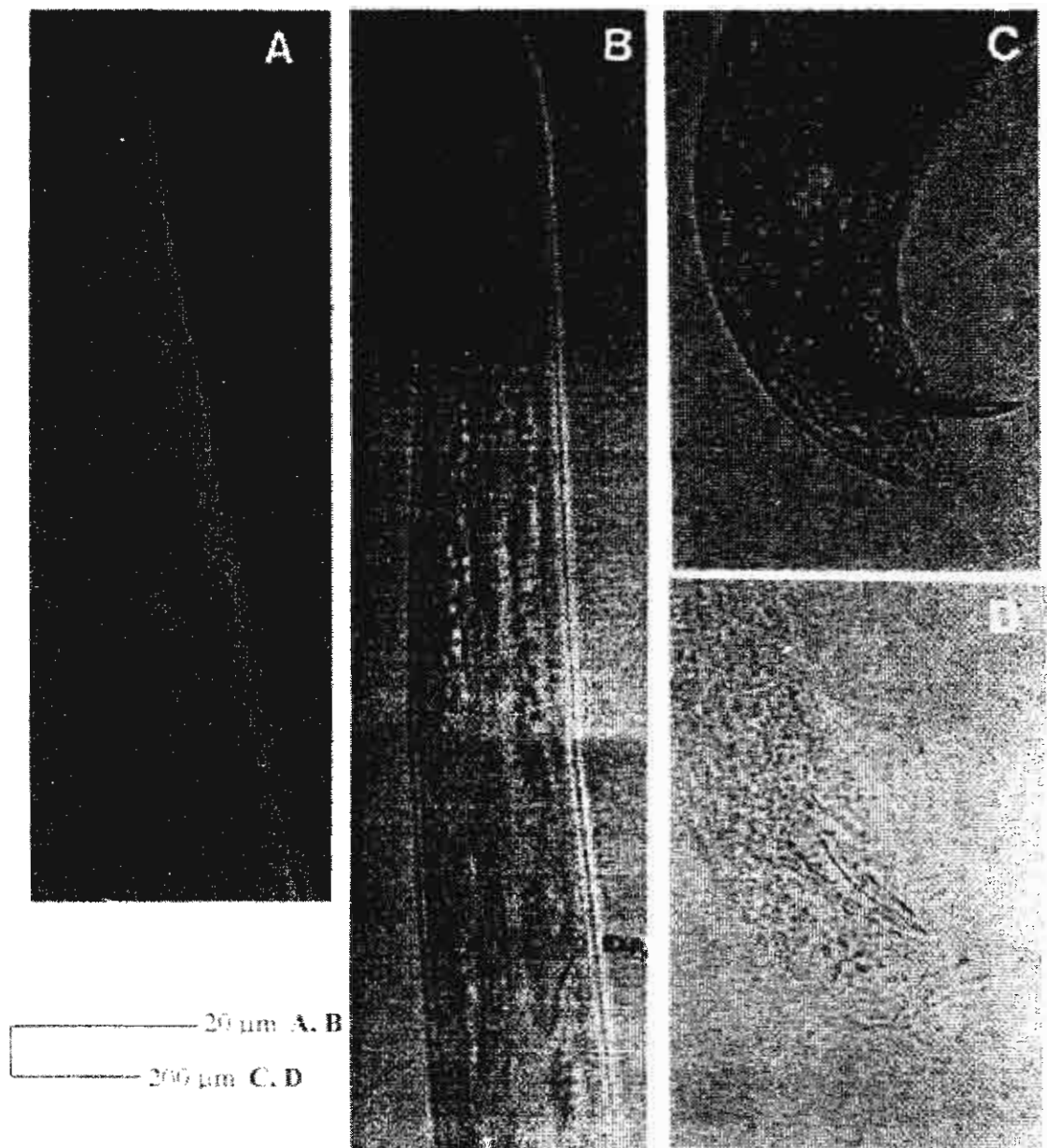


Figure 2 Light micrographs of steinernematid and heterorhabditid. Infective-stage juveniles of steinernematid (A) and heterorhabditid (B) showing excretory pore (Exp.), anterior and posterior to nerve ring (N). Males of steinernematid (C) and heterorhabditid (D) with and without bursa.

DISCUSSIONS

Occurrence of entomopathogenic nematodes was low and restricted only to fruit trees, ornamental plants, roadside verges and in sandy loam soils. The present survey in forty-two provinces of Thailand yielded 8 steinernematid and 1 heterorhabditid populations. All isolates were recovered only from the central area of the country while the samples from the north and south did not yield any entomopathogenic nematodes. The recovery frequency of entomopathogenic nematodes in the present survey was 21.4% and steinernematids were predominant. The recovery rate of *Steinernema* spp. was less than that from surveys conducted in the temperate zone, 37-48% in Europe (Hominick *et al.*, 1995).

Soil temperature is one of the important factors determining the abundance of nematodes in soil. Due to being recovered from high temperature soils (27-37°C at soil surface and 24-29°C at 10-15 cm soil depth), all collected isolates may be considered as heat tolerant strains like *Steinernema riobrave* (Cabanillas *et al.*, 1994).

The present surveys are important because they document the occurrence of entomopathogenic nematodes in various habitats and localities and also yield of new species and isolates of the nematodes (Miduturi, 1997). At the same time, the advantage of using native isolates of entomopathogenic nematodes for biocontrol is likely to be an enhanced ecological compatibility and also in the reduction of significant impact on non-target organisms when compared with exotic isolates.

Accordingly, the new steinernematid and heterorhabditid isolates will be evaluated in the future for their control potentials against natural hosts under local conditions.

The taxonomic studies to identify of their species by using morphometric and DNA analysis

are being conducted.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was a part of the Project "Survey, Collection and Identification of Entomopathogenic Nematodes in Thailand" supported by the Thailand Research Fund (TRF).

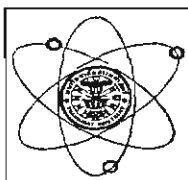
LITERATURE CITED

- 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.
- Cabanillas, H.E., G.O. Poinar, Jr., and J.R. Raulston. 1994. *Steinernema riobrave* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae) from Texas. *Fundamental and Applied Nematology* 17 : 123-131.
- Ehlers, R.U. 1995. Introduction of non-endemic nematodes for biological control : Scientific and regulatory policy issues. COST & OECD workshop. Bruhnskoppel-Seminar hotel Malente, Germany. 17 p.
- Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Inc., Florida. 365 p.
- Hominick, W.M., A.P. Reid, and B.R. Briscoe. 1995. Prevalence and habitat specificity of steinernematid and heterorhabditid nematodes isolated during soil surveys of the UK and the Netherlands. *J. Helminthol.* 69 : 27-32.
- Kaya, H.K. and S.P. Stock. 1988. *Techniques in Insect Nematology*. Department of Nematology. Univ. of California, Davis. California. 100 p.
- Miduturi, J.S. 1997. *Bionomics of naturally occurring entomopathogenic nematodes in Belgium*. Ph.D. thesis, Univ. of Gent, Gent.
- Nguyen, K.B. and G.C. Smart, Jr. 1994.

- Neosteinerinema longicurvicauda* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). J. Nematol. 26 : 162-174.
- Nguyen, K.B. and G.C. Smart, Jr. 1996. Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata : Rhabditida). J. Nematol. 28 : 286-300.
- Poinar, G.O., Jr. 1976. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida : Heterorhabditidae n. fam.). Nematologica 21 : 463-470.
- 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, Inc., Florida.
- White, G.F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Sci. 66 : 302-303.
- Woodring, J.L. and H.K. Kaya. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes. A hand-book of techniques. Southern Cooperative Series Bulletin. 331. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas. 30 p.

Received date : 15/12/97

Accepted date : 27/05/98



THAMMASAT INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

TIJSAT

A Publication of Thammasat University, Thailand

Vol.4 No.1 January 1999

ISSN 0859-4074

CONTENTS

Effect of FEM Domain on the Estimation of the Bearing Capacity Factor of Sand	1
<i>Teachavorasinskun Supot and Pongvithayapanu Pulpong</i>	
Nonlinear Analysis of Three- Dimensional Framed Structures Using Smeared Crack Models... 11	
<i>Chaisomphob T. Hansapinyo C.</i>	
Database for Student Registration System at SIIT	19
<i>Nakarin Netcharussaeng, Nichalin Suakkaphong, Apichat Tungthangthum and Pichet Chintrakulchai</i>	
Development of Integrated Multi-Criteria Investment Justification Approach Based on Fuzzy Logic.....	27
<i>Navee Chiadamrong</i>	
Removal of Organic Matters and Phenol Compounds from the Waste Water by Using Granular Activated Carbon - Sequence Batch Reactor System	38
<i>Suntud Sirianuntapiboon, Soydo Vinitnantharat and Waree Chamlongras</i>	
Monoxenic Culture of a New Thai Strain of Entomopathogenic Nematodes (Steinernema sp. KB Strain) on Artificial Media	49
<i>Nuchanart Tangchitsomkid, Suebsak Sontirat and Jariya Chanpaisaeng</i>	
Photoluminescence of Ce^{3+} in Some Fluoroindate Compounds.....	54
<i>Thitinai Gaewdang and Ngamnit Gaewdang</i>	
Development of Tolerance to Monocrotophos.....	61
<i>Kornnika Khanobdee, Naiphinich Kotchabhakdi, Piyarat Govitrapong and Chainarong Cherdchu</i>	
Growth and Yield Response of Chinese Radish to Application of <i>Trichoderma harzianum</i>	68
<i>Wirat Phuwiwat and Kasem Soyong</i>	
Quality Assurance Circular in Knitting Part I : Theoretical Analysis.....	72
<i>Jearranai Lek-Uthai and Tiluk Dias</i>	

Monoxenic Culture of a New Thai Strain of Entomopathogenic Nematodes (*Steinernema* sp. KB Strain) on Artificial Media

Nuchanart Tangchitsomkid

Nematology Section, Plant Pathology & Microbiology Division,
Department of Agriculture, Bangkok 10900, Thailand

Suebsak Sontirat

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture
Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Jariya Chanpaisaeng

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

Abstract

A new Thai strain of entomopathogenic nematodes, *Steinernema* sp. KB strain, was cultured monoxenically with associated bacteria, *Xenorhabdus* spp., of the nematode. The experiment was done to compare the growth of the nematode on five modified artificial agar media and one lipid agar medium. All modified media contained 10 g/liter of either soya milk (SM), wheat flour (WF), soybean flour (SF), corn syrup (CS) or corn flour (CF), 5 g/liter of yeast extract, 1 ml of sunflower oil and 10 g/liter of agar. The maximum yield of 33.1×10^6 and 30.8×10^6 IJs per one liter was obtained from SM and SF media while CS, WF and CF yielded 8.6×10^6 , 5.3×10^6 and 1.2×10^5 IJs per one liter respectively. Although the modified artificial media are inferior to the lipid agar medium in the number of harvested nematodes which was 60.8×10^6 IJs per one liter, the cost of nematode production by these modified media is 4.7 times less than that of the lipid agar medium.

Introduction

Entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* have long been recognized as effective insect control agents and have attracted considerable interest as a bio-pesticide. The nematodes have been proved to be potential control agents of a number of insect pests and consist of an infective juvenile stage which penetrates a host either through body openings, e.g. mouth, anus and spiracle or interskeletal membranes [1].

The symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species, held in the foregut of infective juveniles, are excreted into the host's hemocoel. These bacteria cause a lethal septicemia which kills the insect host within 48 hours and establishes suitable conditions for the reproduction of the nematodes [2]. The nematodes feed on the proliferating bacteria and the decomposing insect cadavers. Maturation of the nematodes occurs inside the cadaver. Male and female nematodes develop, mate, and

produce eggs, and these develop into a new generation of infective juvenile which exit the host in search of further insect hosts [3].

Entomopathogenic nematodes are tested for production, field application and safety standards. A number of commercial enterprises worldwide are now producing entomopathogenic nematodes [4]. Steinernematid and Heterorhabditid can be cultured in either a host insect or on synthetic diet [5]. The advent of artificial media incorporating the nematodes' symbiotic bacteria was a major step toward commercial production of these nematodes for insect control [6].

Mass production of entomopathogenic nematodes has evolved from the first large scale *in vitro* solid medium production by Glaser *et al.* [7]. He was the first to develop an axenic culture process for *S. glaseri* and later *S. carpocapsae*. Dutky *et al.* [5] refer to the "nematode-bacterium complex" which they maintained on peptone-glucose agar and pork kidney and found that a medium with the bacterial associate could support the reproduction of *S. carpocapsae* DD136 strain. Bedding [8] developed a semi-solid culture method whereby nematodes were reared on an animal protein and lipid-based medium coated onto a polyether polyurethane sponge matrix to give a large surface area for passive aeration. This medium-coated matrix was inoculated with the symbiotic bacteria several days prior to the addition of the nematode inoculum.

Monoxenic mass culture techniques with the goal of producing, cost effectively, large numbers of infective nematodes have been used for several years. However, the effects of dietary components on nematode culture under monoxenic conditions are insufficiently known to enable optimum culture of the nematodes. Dunphy and Webster [9] documented the effects of nutritional components, lipids, nitrogen source, carbohydrates, vitamins and salts of the medium for maximum production of *S. carpocapsae* DD136 and *H. heliothidis*.

Development of production technology, distribution, and sales of entomopathogenic

nematode-containing products is occurring now at a rapid pace. In many countries, commercial production has proved successful in insect control.

In Thailand, the first indigenous strain of entomopathogenic nematode was recovered from Kanchanaburi province in 1996 [10]. The nematode was shown to be a new species of *Steinernema* by morphological and molecular characteristics (Tangchitsomkid, unpublished). Tangchitsomkid and Sontirat [11] documented the pathogenicity test on larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella*) which yielded 100 % mortality in 22 hours at 30 and 35 °C. The efficacy of this nematode was also evaluated with positive results obtained for *Spodoptera litura*, *S. exigua*, *Plutella xylostella* and *Henedecasis duplifacialis*. The mortality of the insects within 24 hours was 55.6, 60.0, 88.9 and 100 %, respectively. The Thai strain nematode could serve as a resource for use in the tropics because it could be more effective controlling native insect pests and also present less risk to non target organisms, compared with exotic isolates.

The present study examines the effect of selected nutritional components of the artificial agar media on the growth and reproduction of *Steinernema* sp. Thai strain. The data are used to formulate media appropriate for the pilot scale mass production of Thai strain nematodes.

Materials and Methods

Nematode inoculum

The nematode was obtained by exposing the larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella*) to 5,000 infective juveniles of *Steinernema* sp. Thai strain 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 30 °C. Five days after exposure, the cadavers were transferred to the White's water trap. Five 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 micro-centrifuge at 8,000 rpm/min.

Bacterial inoculum

The primary form of *Xenorhabdus* sp. was isolated from *Steinernema* sp. Thai strain reared continuously *in vivo* at the Nematology Section, Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture.

To isolate the bacteria, infective-stage juvenile nematodes were rinsed with distilled water, transferred to a solution composed of 0.1 % thimerosal and 0.6 % streptomycin sulphate and maintained for 12 hours under aseptic conditions. The nematodes were then rinsed three times with sterile water and transferred, as a suspension in distilled water, to a sterile tissue grinder and crushed. An aliquot of the resulting suspension, consisting of nematode tissues and fluids and bacterial cells, was pipetted into 9 cm Petri dishes containing T7-TTC medium. The Petri dishes were maintained in an incubator at 28°C. After 48 hours, single colonies of bacteria showing any morphological differences such as size, shape, growth rate, or color were subcultured by streaking them onto a nutrient agar and left at 28°C for approximately 48 hours. Single colonies were streaked one more time onto nutrient agar to insure purity. These colonies were transferred to glycerol medium in 2 ml vials and stored at -70 °C.

Culture media

All modified media contained 10 g of either soya milk (SM), wheat flour (WF), soybean flour (SF), corn flour (CS) or corn flour (CF) and were mixed with 5 g yeast extract, 1 ml sunflower oil, 10 g agar and 1 liter distilled water. The lipid agar was prepared according to Dunphy and Webster [9] : 10 g corn syrup, 5 g yeast extract, 25 g nutrient agar, 2.5 ml cod liver oil, 2 g MgCl₂ and 1 liter distilled water.

The media were autoclaved at 121°C for 15 min and then poured aseptically into 9 cm Petri dishes.

Experiment procedures

The bacterial colonies were removed from storage and subcultured to 125 ml Erlenmeyer flasks filled with 20 ml nutrient broth under continuous agitation for 24 hours. Each culture dish was inoculated with 1 ml of broth. The Petri dishes were incubated at 30°C for 24 hours and then inoculated with 5,000 infective juveniles per dish. All cultures were incubated at 30°C for 10 days.

Harvesting

All nematode cultures were harvested 10 days post inoculation by flooding the Petri dishes with 10 ml of distilled water for 10 min to dislodge juvenile nematodes from the agar-bacterial matrix. The total collective number of nematodes per dish was estimated based upon the average yield of nematodes in three samples of suspension per dish. Each culture was replicated five times.

Results and Discussion

Yields were estimated by counting infective juveniles in five samples from modified media compared with lipid agar.

The number of infective juveniles produced in 20 g medium of SM, WF, SF, CS and CF is shown in Table 1. The yield of infective juveniles was very high in media containing soybean. Dunphy and Webster [9] reported that yeast extracts are a nitrogen source which stimulate the reproduction of nematode. The major components of SM and SF are proteins and lipids which are necessary for the production of nematode progeny. Soya milk and soybean flour (concentration of 10 g per liter) were the supplemented media, both of these media differently supported greater nematode reproduction than did the wheat or corn medium.

The bacterial symbionts are essential for successful mass culture of the nematodes. These bacteria proliferate on artificial media and the nematodes feed on the bacterial cells and other

Table 1. Number of infective juveniles (IJ) of a new Thai strain of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* sp. KB strain) after 10 days on 20 g of different media.

Media	No. of IJs/dish (Mean $\pm$ SE) (N = 5)
SM	661,400 $\pm$ 66,725
WF	106,200 $\pm$ 14,469
SF	615,000 $\pm$ 89,259
CS	173,000 $\pm$ 25,052
CF	2,400 $\pm$ 1,200

necessary nutrients to reproduce large numbers of offsprings. A new Thai strain, *Steinernema* sp. KB strain can be grown and reproduced in proteins and lipids from soybean. However, the yield of nematodes in lipid agar was higher than in modified media (Figure 1). The lipid agar is a complex medium of lipid (cod liver oil), nitrogen (yeast extract), carbohydrate (corn syrup) and salt ($MgCl_2$). The nutritional components are screened for their ability to support monoxenic nematode culture.

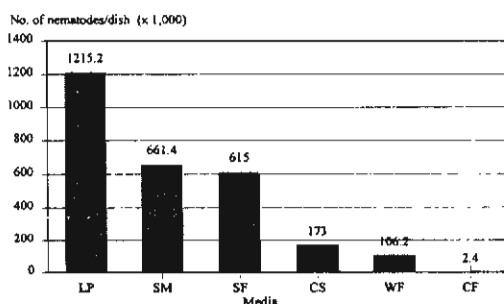


Figure 1. Comparison of modified media (SM, SF, CS, WF and CF) with lipid agar medium (LP) in the number of infective juveniles (*Steinernema* sp. KB strain) produced.

Throughout the study, as exemplified by the data from the modified media, monoxenic

cultures of a new Thai strain of entomopathogenic nematodes 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, is \$US 1 per million nematodes [12]. This experiment demonstrated that the cost of nematode production using SM, WF, SF, CS and CF media was less than 41 baht per 50 dishes (1 liter) which was 4.7 times lower than that of lipid agar. The total nematode yield was 33×10^6 and 31×10^6 in SM and SF, respectively. (Table 2). Consequently, the nematodes can be produced in very large numbers and at low cost.

Table 2. Comparison of total nematode yield per 50 dishes (1 liter) and the cost of production between modified media and lipid agar.

Media	Total nematode yield/liter (50 dishes)	Cost per liter (Baht)
SM	33.1×10^6	40.90
SF	30.8×10^6	39.95
CS	8.6×10^6	40.40
WF	5.3×10^6	39.95
CF	1.2×10^5	39.98
LP	60.8×10^6	186.04

The monoxenic agar culture described here establishes a baseline of media for *Steinernema* KB strain and other steinernematid nematodes. The data arising from this research can be used as a guideline to obtain more reliable productions and greater yields of all

stages of the Thai strain of entomopathogenic nematodes in laboratory culture *in vitro* and is a step towards improved mass industrial production.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support by the Thailand Research Fund (TRF) and thank Mr. B. Chinnasri for helpful comments and discussions.

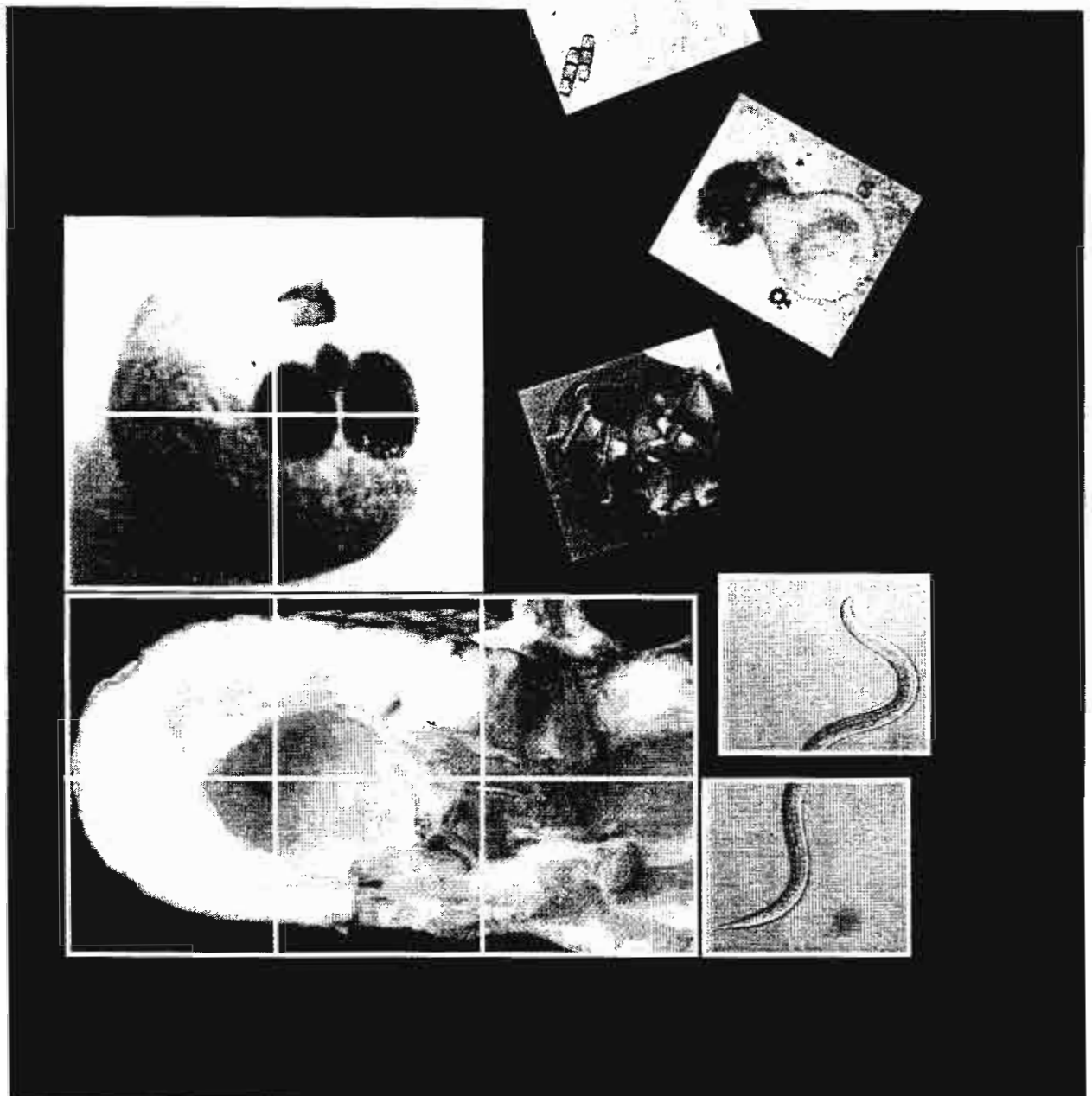
References

- [1] Bedding, R.A. and Molyneux, A.S. (1982), Penetration of Insect Cuticle by Infective Juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae : Nematoda), *Nematologica*, Vol. 28, pp. 354-359.
- [2] Thomas, G.M. and Poinar, G.O. Jr. (1979), *Xenorhabdus* gen. nov., a Genus of Entomopathogenic, Nematophilic Bacteria of the Family Enterobacteriaceae, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Vol. 29, pp. 352-360.
- [3] Surrey, M.R. and Davies, R.J. (1996), Pilot-scale Liquid Culture and Harvesting of an Entomopathogenic Nematode, *Heterorhabditis Bacteriophora*, *J. Invertebrate Pathol.*, Vol. 67, pp. 92-99.
- [4] 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.
- [5] Dutky, S.R., Thompson, J.V. and Cantwell, G.E. (1964), A Technique for the Mass Propagation of the DD-136 Nematode, *J. Insect Pathol.* Vol. 6, pp. 417-422.
- [6] Wouts W.M. (1981), Mass Production of the Entomogenous Nematode *Heterorhabditis Heliothidis* (Nematoda : Heterorhabditidae) on Artificial Media. *J. Nematol.*, Vol. 13, pp. 467-469.
- [7] Glaser, R.W., McCoy, E.E. and Girth, H.B. (1940), The Biology and Economic Importance of a Nematode Parasite in Insects, *J. Parasitol.*, Vol.26, pp. 479-495.
- [8] Bedding, R.A. (1981), Low Cost *in vitro* Mass Production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* Species (Nematoda) for Field Control of Insect Pests, *Nematologica*, Vol. 27, pp. 109-114.
- [9] Dunphy, G.B. and Webster J.M. (1989), The Monoxenic Culture of *Neoaplectana Carpocapsae* DD 136 and *Heterorhabditis Heliothidis*, *Revue de Nematologie*, Vol. 12, pp. 113-123.
- [10] Tangchitsomkid, N. and Sontirat, S. (1998), Occurrence of Entomopathogenic Nematodes in Thailand, *Kasetsart J.*, Vol. 32, pp. 359-366.
- [11] Tangchitsomkid, N. and Sontirat, S. (1997), A New Entomopathogenic Nematode in Thailand : Taxonomy, Biology and Its Potential for Biological Control, *Proceedings of the Plant Protection Conference in Bangkok, Thailand*, Nov. 19-21, Bangkok, pp. 26, (Abstr.).
- [12] Poinar, G.O. Jr. (1972), Nematodes as Facultative Parasites of Insects, *Annual Review of Entomology*, Vol. 17, pp. 103-122.

ISSN 0858-6462

ข่าวสาร โรคพืชและจุลชีววิทยา

ปีที่ 10 เล่มที่ 1 มกราคม-เมษายน พ.ศ. 2543



การใช้เทคนิค PCR-RFLPs ตรวจสอบชนิด ไส้เดือนฝอย *Steinernema* ที่พบในประเทศไทย

Use of PCR-RFLPs Technique to Identify species of *Steinernema* in Thailand

บุษนารถ ถังจิตสมกิต และ สาริณี ประชาศรัยสรเดช

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา

ABSTRACT

Three species of *Steinernema* nematode were isolated from the soil samples collected from Ayutthaya (AY), Phichit (PC) and Sakaeo (SK) provinces. Their DNAs were extracted from the infective-stage juvenile, and the internal transcribe spacer region of the ribosomal DNA repeat units were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using 18S and 26S gene primers. The PCR products were digested in nine restriction enzymes and the resulting fragments were separated by agarose gel electrophoresis. The RFLPs patterns of these three Thai nematode isolates were compared with those of *S. thailandensis* n.sp. Tangchitsomkid & Sontirat and *S. carpocapsae* Weiser. It was shown that the PC isolate was identical to *S. carpocapsae*, but different from *S. thailandensis* n. sp. The AY and SK isolates were found to be different from both *S. carpocapsae* and *S. thailandensis* n. sp. They tend to be new species, and need to be further identified by morphological and biological characterization.

Key words : PCR-RFLPs technique, identify, *Steinernema thailandensis* n.sp., *S. carpocapsae*

ไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในพื้นที่จังหวัดอยุธยา (AY) พิจิตร (PC) และสระแก้ว (SK) รวม 3 ไอโซเลทนำมาจัดจำแนกชนิดในระดับยีน โดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายในแต่ละแหล่ง นำไปเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ที่ตำแหน่ง internal transcribe spacer ของ ribosomal DNA (rDNA) ใช้ไพรเมอร์ 18S และ 26S gene และตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จำนวน 9 ชนิด เปรียบเทียบกับ *S. thailandensis* n. sp. Tangchitsomkid & Sontirat และ *S. carpocapsae* Weiser ตรวจสอบจำนวนชิ้นและขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis พบว่า RFLPs pattern ของ PC เหมือนกับไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 9 ชนิด จึงจัดเป็นชนิดเดียวกับ *S. carpocapsae* สำหรับ AY และ SK มีความแตกต่างจากไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. และ *S. carpocapsae* มีแนวโน้มของการเป็น new species ซึ่งต้องการข้อมูลทางด้านรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยา ประกอบการพิจารณาต่อไป

คำหลัก : เทคนิค PCR-RFLPs, การจัดจำแนกชนิด, ไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp., *S. carpocapsae*

พื้นฐานของงานทางด้านการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยคือ การศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและนำไปเปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยในสกุล (genera) เดียวกันที่มีการจำแนกชนิดไว้แล้ว ค่าของขนาดสัดส่วนและรูปร่างลักษณะที่สำคัญต่าง ๆ จะเป็นข้อมูลบ่งชี้ความคล้ายคลึงหรือแตกต่างในเบื้องต้นของการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย อย่างไรก็ตาม การแบ่งแยกในระดับชนิด (species) ต้องการความถูกต้องและแม่นยำสูง โดยเฉพาะไส้เดือนฝอยที่ค้นพบใหม่และมีแนวโน้มของการเป็น new species

ในปัจจุบัน วิทยาการทางด้านอนุชีววิทยา (molecular biology) ได้พัฒนาอย่างรวดเร็วและเข้ามามีบทบาทในงานการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อมภายนอก จึงนิยมใช้ในตรวจสอบและแบ่งแยกชนิดและสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายในระบบนิเวศ และการใช้ชิ้นของดีเอ็นเอเป็นตัวตรวจสอบความเหมือนกันหรือแตกต่างกันของการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย ให้ความถูกต้องมากที่สุด หากเป็นชนิดเดียวกันจะมีดีเอ็นเอเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกัน ตลอดจนการใช้เทคนิค molecular biology ยังเป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วมากที่สุด

เทคนิคอนุชีววิทยา ที่นำมาใช้จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย ได้แก่ DNA sequence analysis (Curran *et al.*, 1985), restriction fragment length differences (RFLDs) (Curran, 1991), restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) (Reid and Hominick, 1992) และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Hashmi *et al.*, 1996) เป็นต้น ในปัจจุบันเทคนิคที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกและตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* spp. หรือไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลง (entomopathogenic nematode) ได้แก่ เทคนิค PCR-RFLPs และ RAPD

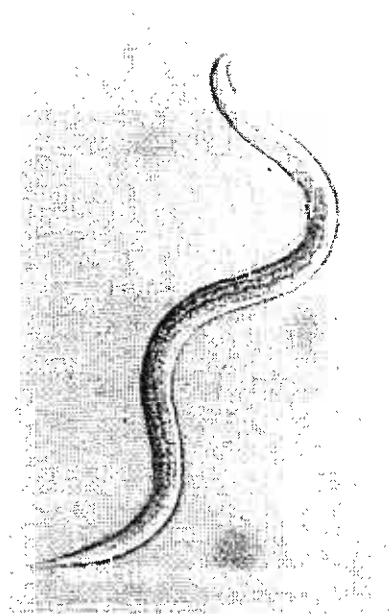
การนำเทคนิคทางด้านอนุชีววิทยา มาใช้ในการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ของจังหวัดอยุธยา พิจิตร และสระแก้ว ได้เลือกใช้เทคนิค PCR-RFLPs โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจัดจำแนกในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ และหาความแตกต่างหรือความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ของไส้เดือนฝอยที่พบในประเทศไทย โดยเปรียบเทียบกับ *S. thailandensis* n. sp. ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่สายพันธุ์ไทย ที่แยกได้จากดินในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี (นุชนารถ, 2541) และไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สายพันธุ์ที่นำมาจากอเมริกาและผลิตเป็นการค้าในปัจจุบัน ผลงานวิจัยที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานการเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยและ

สายพันธุ์อื่นๆ ตลอดจนเป็นแหล่งเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอย

ตัดลำตัวไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลตด้วยเข็มขนาดเล็กในหยดของ worm lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.45 % Tween 20, 0.01 % gelatin, 60 μ g/ml proteinase K) บนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ดูดของเหลวเก็บไว้ในหลอดทดสอบขนาด 0.5 มล. จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -40°C ถึง -80°C เป็นเวลา 10-20 นาที ต่อด้วย 65°C 1 ชั่วโมง และ 95°C 10 นาที



2. การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ มาใช้เป็นต้นแบบ สำหรับการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีของ Joyce *et al.* (1994) โดยใช้ไพรเมอร์ 18S (TTGATTACGTCCCTGCCCTTT) และ 26S (TTTCACTCGCCGTTACTAAGG) ในปฏิกิริยารวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร dNTP 0.5 ไมโครลิตร 18S (forward primer) 0.5 ไมโครลิตร 26S (reverse primer) 0.5 ไมโครลิตร Taq polymerase (2U/ μ l) 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นในปฏิกิริยาให้ครบ 45 ไมโครลิตร และใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ (worm lysate) 5 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาเข้าเครื่อง DNA thermal cycler ตั้งโปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่

1 รอบ	94°ซ	2 นาที
40 รอบ	94°ซ	30 วินาที
	45°ซ	60 วินาที
	72°ซ	1.5 นาที
1 รอบ	72°ซ	5 นาที

ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้ โดยแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x Tris-borate buffer (TBE) ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมสี gel ด้วย ethidium bromide และตรวจแถบ (band) ของดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (UV transilluminator)

3. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RFLPs

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2 มาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 เอนไซม์ คือ *Alu* I, *Dde* I, *Hha* I, *Hind* III, *Hinf* I, *Hpa* I, *Rsa* I, *Sau*3A I และ *Xba* I ปริมาตรแต่ละเอนไซม์ เท่ากับ 10 ไมโครลิตร รวมกับดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ของแต่ละไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาตั้งแต่ 3-12 ชม. จากนั้นนำดีเอ็นเอมา แยกขนาดใน 1.5% agarose gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชม. และย้อมสีด้วย ethidium bromide ตรวจสอบ จำนวนและขนาดของดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator และบันทึกภาพด้วยกล้องโฟลลาลอยด์

ผลการทดลอง

จากผล RFLPs pattern ของดีเอ็นเอในไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ไอโซเลท SK, AY และ PC เปรียบเทียบกับ pattern ของไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. และ *S. carpocapsae* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จำนวน 9 เอนไซม์ พบว่า ในเอนไซม์ *Alu* I ตัดดีเอ็นเอของไอโซเลท AY และ SK แสดงจำนวน แถบและขนาดของดีเอ็นเอบนแผ่นเจลเหมือนกัน แต่แตกต่างจาก *S. thailandensis* n. sp. และ *S. carpocapsae* ส่วน PC เหมือนกับ pattern ของ *S. carpocapsae* และในเอนไซม์ *Dde* I และ *Hha* I พบว่า ไส้เดือนฝอยทุกไอโซเลทไม่แตกต่างกัน (Figure 1A)

RFLPs pattern

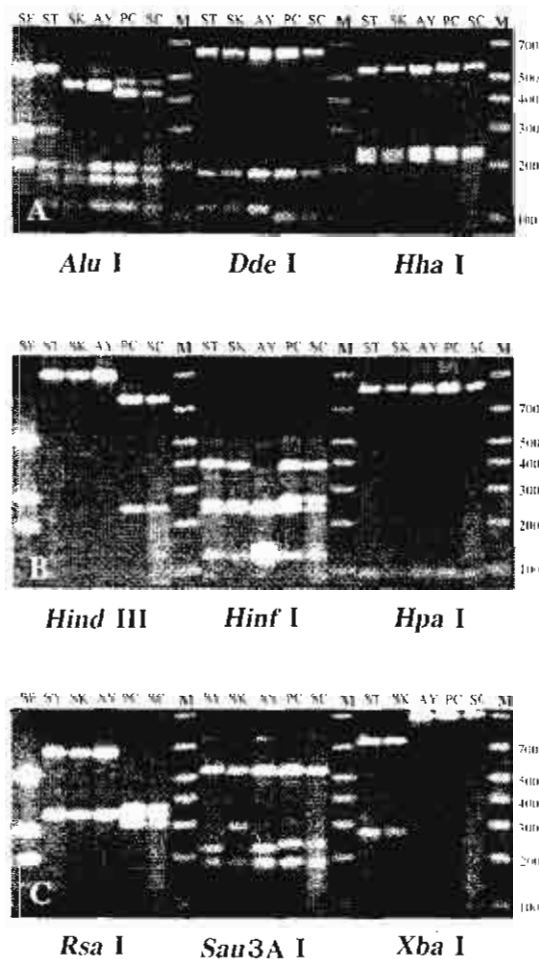


Figure 1 RFLPs pattern by digestion of three isolates with 9 different restriction enzymes. SF lane is the digest of *Steinernema feltiae* with *Alu* I. ST lane is *S. thailandensis* n. sp., SK lane is SK isolate, AY lane is AY isolate, PC lane is PC isolate, SC lane is *S. carpocapsae*. M, molecular weight.

ใน RFLPs pattern ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III พบว่า ไล่เดือนฝอย AY และ SK มีจำนวนแถบและขนาดของดีเอ็นเอเหมือนกับ *S. thailandensis* n.sp. และ PC เหมือนกับ *S. carpocapsae* ในเอนไซม์ *Hinf* I พบว่า ไอโซเลท AY แตกต่างจากทุกไอโซเลท ส่วนในเอนไซม์ *Hpa* I เหมือนกันทุกไอโซเลท (Figure 1B)

ในเอนไซม์ *Rsa* I พบว่า ไล่เดือนฝอย AY และ SK เหมือนกับ *S. thailandensis* n.sp. เช่นเดียวกับ PC เหมือนกับ *S. carpocapsae* ส่วนในเอนไซม์ *Sau*3A I ไอโซเลท SK แตกต่างจากทุกไอโซเลท สำหรับในเอนไซม์ *Xba* I ไอโซเลท SK เหมือนกับ *S. thailandensis* n. sp. และ AY, PC และ SC เหมือนกัน (Figure 1C)

วิจารณ์และสรุป

จำนวนแถบบนแผ่นเจลและขนาดของดีเอ็นเอ แสดงถึงความแตกต่างในระดับยีนของไล่เดือนฝอยในแต่ละไอโซเลท โดยขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ที่นำมาตัดที่ตำแหน่ง ITS ของ ribosomal DNA จาก RFLPs pattern ที่ตัดด้วยเอนไซม์ 9 ชนิด พบว่า มีเอนไซม์ 3 ชนิด ไม่สามารถแบ่งแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอในไอโซเลทที่นำมาตรวจสอบได้คือ *Dde* I, *Hha* I และ *Hpa* I ส่วนในเอนไซม์ *Rsa* I และ *Hind* III สามารถแบ่งแยกดีเอ็นเอของไล่เดือนฝอยออกเป็น 2 กลุ่ม โดยไอโซเลท AY และ SK เหมือน

กับ *S. thailandensis* n.sp. และไอโซเลท PC เหมือนกับ *S. carpocapsae* ส่วนชนิดของเอนไซม์ที่แบ่งแยกความแตกต่างของแต่ละไอโซเลทออกจากกัน ได้แก่ *Alu* I, *Hinf* I, *Sau*3A I และ *Xba* I ซึ่งสามารถให้คำตอบของความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลทได้อย่างชัดเจน โดยเอนไซม์ *Alu* I แบ่งแยก AY และ SK ออกจาก *S. thailandensis* n. sp. และเอนไซม์ *Hinf* I และ *Sau*3A I แบ่งแยก AY ออกจาก SK ดังนั้น ไส้เดือนฝอยไอโซเลท AY ไม่ใช่ชนิดเดียวกับไอโซเลท SK และ *S. thailandensis* n.sp. ส่วนไอโซเลท SK แตกต่างจาก *S. thailandensis* n.sp. เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I และ *Sau*3A I

สำหรับไอโซเลท PC พบว่า การตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 9 ชนิด ให้ RFLPs pattern ที่เหมือนกับ *S. carpocapsae* จึงสามารถสรุปได้ว่าเป็นไส้เดือนฝอยชนิดเดียวกัน และการแบ่งแยก PC ออกจาก AY, SK และ *S. thailandensis* n.sp. พบว่า RFLPs pattern แสดงให้เห็นความแตกต่างของดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I, *Hind* III และ *Rsa* I

การวิเคราะห์ผล ในการจัดจำแนกระดับชนิดของไส้เดือนฝอยด้วยเทคนิค PCR-RFLPs ให้คำตอบของความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในระบบ ecosystem ไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในทุกพื้นที่ยังมีความแตกต่างของยีนที่สามารถตรวจ

สอบด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยา ที่ให้คำตอบถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว ผลของความแตกต่างของยีนเป็นข้อมูลยืนยันการแบ่งแยกไส้เดือนฝอยในแต่ละไอโซเลท โดยไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในพื้นที่จังหวัดพิจิตร เป็นชนิดเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser, 1955) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบทั่วโลก ส่วนไส้เดือนฝอยที่แยกจากจังหวัดอุทัย และสระแก้ว มีความแตกต่างของยีนจากทั้ง *S. thailandensis* n.sp. ที่แยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรี (Tangchitsomkid, 2000) และ *S. carpocapsae* ดังนั้น ไอโซเลท AY และ SK จึงมีแนวโน้มของการเป็น new species ซึ่งจะต้องมีข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา และชีววิทยา ประกอบการพิจารณาจัดจำแนกชนิดต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณเครือพันธุ์ กิตติปกรณดร. วันเพ็ญ ศรีทองชัย และ ดร. พัฒนา ศรีฟ้า ตรวจแก้ไขต้นฉบับ และขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ผู้ให้ทุนอุดหนุนโครงการ การเก็บรวบรวมและจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2541. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทย *Steinernema thailandensis* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae). วารสารวิชาการเกษตร. 16 (3) : 185-193.
- Curran, J. 1991. Application of DNA Analysis to Nematode Taxonomy. Commonwealth 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. Parasitology 90 : 137-144.
- 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.
- Joyce, S.A., A.P. Reid, E. Driver and J. Curran. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes, pp. 178-187. 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.
- Reid, A.P. and W.M. Hominick. 1992. Restriction fragment length polymorphisms within the ribosomal DNA repeat unit of British entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae). Parasitology 105 : 317-323.
- 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.

ประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา

กรมวิชาการเกษตร ปี 2543

บทคัดย่อและสรุปผลการดำเนินงาน



วันที่ 8-10 มีนาคม 2543

ณ โรงแรมกองปืซ อ.ระบือ จ.พรวนบุรี

งานวิจัยและพัฒนาไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. Thai isolate เพื่อควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด¹ พรพิมล อธิปัญญาคม²
สาโรจน์ ประชาศรีสรเดช² สืบศักดิ์ สนธิรัตน์²

¹ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา

² กลุ่มงานวิจัยโรคไม้ผล พืชสวนอุตสาหกรรมและสมุนไพร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา

² ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

การสำรวจไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* spp. ระหว่างเดือนมิถุนายน 2539 ถึงมีนาคม 2541 จำนวน 306 ตัวอย่างดิน ในพื้นที่ 42 จังหวัด ของประเทศไทย สามารถแยกไส้เดือนฝอย *steinernematid* จากพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี (KB) ตาก (TK) อุรุธา (AY) กาฬสินธุ์ (KS) มหาสารคาม (MK) ขอนแก่น (KK) หนองคาย (NK) และสระแก้ว (SK) รวม 8 ไอโซเลต นำมาแบ่งแยกในเบื้องต้นโดยการทดสอบ cross mating สามารถจัดแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) KB TK KS MK KK และ NK 2) AY และ 3) SK เมื่อนำมาจัดจำแนกในระดับชนิด (species) โดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา และตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR-RFLPs สามารถจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ 1 เป็น *S. thailandensis* n. sp. กลุ่มที่ 2 *Steinernema* sp. (AY isolate) และกลุ่มที่ 3 *Steinernema* sp. (SK isolate) ทุกไอโซเลตได้จัดเก็บรวบรวมให้คงสภาพความมีชีวิตเพื่อการศึกษาวิจัยและพัฒนา สายพันธุ์ต่อไป โดยได้นำไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. (KB isolate) มาศึกษาชีววิทยาและ ศักยภาพของสายพันธุ์ จากการศึกษาพบว่า มีวงจรชีวิตสั้น (4 วัน) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ มีความทนทาน ต่ออุณหภูมิสูงถึง 35 °ซ และแยกได้ symbiotic bacteria (*Xenorhabdus* sp.) บนอาหาร NBTA จากการ ทดสอบศักยภาพในการฆ่าแมลงด้วยวิธี insect bioassay พบว่า แมลงทดสอบตาย 50% ในเวลา 24 ชม. เมื่อใส่ไส้เดือนฝอย 10 ตัวต่อแมลง 1 ตัว การตรวจสอบการเป็น biological control agent ในห้อง ปฏิบัติการกับแมลง 12 ชนิด คือ หนอนกระทู้หอมดาวเรือง หนอนกระทู้ผัก หนอนโยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนเจาะดอกมะลิ หนอนกินรังผึ้ง หนอนในถุงเห็ด ดั้วหมัดกระโดด หนอนด้วง ปลวก เพลี้ยอ่อน และแมลงสาปพบว่า ภายในเวลา 24-48 ชม. มีเปอร์เซ็นต์การตาย 56, 60, 89, 92, 100, 100, 33, 20, 100, 42, 44 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการศึกษา เพิ่มปริมาณในอาหารเทียมชนิดต่างๆ โดยใช้อาหารเทียมชนิดวุ้น 5 สูตร พบว่าสูตรที่มีองค์ประกอบ ของนมถั่วเหลืองให้จำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงสุด 33×10^6 ตัวต่ออาหาร 1 ลิตร และการเพิ่ม ปริมาณได้พัฒนาวิธีการเลี้ยงในอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว 15 สูตร พบว่าสูตรที่มีองค์ประกอบของ นมถั่วเหลืองเช่นกัน ให้ผลผลิตสูงสุด 300×10^6 ตัวต่ออาหาร 1 ลิตร

Research and Development of *Steinernema* spp. Thai Isolate For Biological Pest Control

Nuchanart Tangchitsomkid^{1/} Pornpimon Atthipunyakom^{2/}

Sarote Prachasaisoradate^{1/} Suebsak Sontirat^{1/}

^{1/} Nematology Group, Plant Pathology and Microbiology Division

^{2/} Fruit Tree Industrial Horticultural Crops and Herbs Pathology Group,
Plant Pathology and Microbiology Division

^{1/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University

ABSTRACT

Surveys for *Steinernema* spp. were conducted during June 1996 to March 1998 in 42 provinces of Thailand. From 306 soil samples collected from the surveys, eight isolates of steinernematid nematode were obtained from Kanchana Buri (KB), Tak (TK), Ayutthaya (AY), Kalasin (KS), Maha Sarakham (MK), Khon Kaen (KK), Nong Khai (NK), and Sakaeo (SK) provinces. They were initially separated into three groups by the cross mating test : KB, TK, KS, MK, KK and NK belonging to group 1; AY belonging to group 2; and SK belonging to group 3. On the basis of morphological characterization and DNA analysis by PCR-RFLPs technique, the isolates belonging to group 1 were identified as *S. thailandensis* n. sp., the isolate belonging to group 2 was identified as *Steinernema* sp. (AY isolate), and that belonging to group 3 was identified as *Steinernema* sp. (SK isolate). All isolates were maintained for further research and development. *S. thailandensis* n. sp. (KB isolate) was studied on its biological characteristics as well as its potential for practical use in controlling the insect pests. From the studies, the life cycle of this nematode was short, it was completed within four days at 30 °C. The nematode could survive at the temperature as high as 35 °C and its symbiotic bacteria (*Xenorhabdus* sp.) could be isolated on the NBTA medium. The insect bioassay showed 50 % of the insect sample died within 24 hr when 10 nematodes were used per one insect. Under laboratory conditions, mortality percentages within 24-48 hr of common leafworm, beet armyworm, diamond-back moth, American bollworm, jasmine flower borer, wax moth, mushroom worm, flea beetle, grub of scarab beetle, wet wood termite, aphids and American cockroach were 56, 60, 89, 92, 100, 100, 100, 33, 20, 42, 44, and 57 %, respectively. The nematode was multiplied in various modified artificial media. Out of five formula of the agar medium, the soybean milk formula yielded highest number of 33×10^6 nematodes per one liter of the medium. Out of 15 formula of the semi-solid medium, the formula containing soybean milk also yielded highest number of 300×10^6 nematodes per liter.

กองโรคพิษและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

ขอมอบเกียรติบัตรเพื่อแสดงว่างานวิจัย

เรื่อง งานวิจัยและพัฒนาไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. Thai isolate เพื่อควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี

โดย

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

พรพิมล อธิปัญญาคม สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช และ สืบศักดิ์ สนธิรัตน์

ได้รับรางวัลที่ ๑ ในการประชุมวิชาการ ประจำปี ๒๕๕๓ กองโรคพิษและจุลชีววิทยา
ให้ไว้ ณ วันที่ ๑๐ มีนาคม พุทธศักราช ๒๕๕๓

Alida Whalen

นางประไพศรี พิทักษ์ไพรวณ

ผู้อำนวยการกองโรคพิษและจุลชีววิทยา

THESIS

**A NEW ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE
(RHABDITIDA : STEINERNEMATIDAE) IN THAILAND :
TAXONOMY, BIOLOGY AND ITS POTENTIAL
FOR BIOLOGICAL CONTROL**

MRS. NUCHANART TANGCHITSOMKID

2000



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Doctor of Philosophy (Tropical Agriculture)

ปริญญา

Tropical Agriculture

สาขา

Interdisciplinary Graduate Program

ภาควิชา

เรื่อง A New Entomopathogenic Nematode (Rhabditida : Steinernematidae)
in Thailand : Taxonomy, Biology and Its Potential for Biological Control

นามผู้วิจัย Mrs. Nuchanart Tangchitsomkid

ได้พิจารณาเห็นชอบให้เป็นวิทยานิพนธ์ระดับ.....ดี.....

โดย ประธานกรรมการ.....
(.....Professor Suebsak Sontirat, Ph.D.)

กรรมการ.....
(.....Miss Wanphen Srithongchai, Ph.D.)

กรรมการ.....
(.....Associate Professor Jariya Chanpaisaeng, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา.....
(.....Associate Professor Somnuk Wongtong, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(.....Professor Tasnee Attanandana, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....31.....เดือน.....มกราคม.....พ.ศ. 2543.....

THESIS

**A NEW ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE
(RHABDITIDA : STEINERNEMATIDAE) IN THAILAND :
TAXONOMY, BIOLOGY AND ITS POTENTIAL
FOR BIOLOGICAL CONTROL**

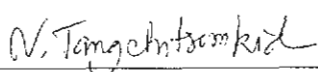
MRS. NUCHANART TANGCHITSOMKID

A Thesis Submitted in Partial
Fulfillment of the Requirements
for the Degree of
Doctor of Philosophy (Tropical Agriculture)
Interdisciplinary Graduate Program
Graduate School
Kasetsart University
2000

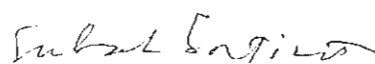
Nuchanart Tangchitsomkid 2000 : A New Entomopathogenic Nematode (Rhabditida : Steinernematidae) in Thailand : Taxonomy, Biology and Its Potential for Biological Control. Doctor of Philosophy (Tropical Agriculture), Major Field Tropical Agriculture, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor : Professor Suebsak Sontirat, Ph.D. 105 pages.

Steinernematid (Rhabditida : Steinernematidae) is a new entomopathogenic nematode collected from Kanchana Buri province, Thailand. Based on morphological 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 when compared to that of *S. carpocapsae* (All strain). Thus, it is proposed as a new species namely; *S. thailandensis* n. sp.

Studies on its biology and pathogenicity in the laboratory, showed that its life cycle was four days at 30 °C. 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., the phase I of this bacterium was characterised by the 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. This 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.) and the result showed that *S. thailandensis* n. sp. caused 56, 60, 89, 92, 100, 100, 100, 33, 20, 44, and 42 % mortality, respectively at 24 hours. The American cockroach (*Periplaneta americana*) showed 57 % mortality at 48 hours.



Student's signature



Thesis Advisor's signature

22, May 2000

Acknowledgments

I wish to express my sincere thanks to my advisor, Professor Dr. Suebsak Sontirat, for his patience, advice, and guidance throughout this study.

I am grateful to the following committee members for suggestions and criticism of this study : Dr. Wanphen Srithongchai, Plant Pathologist, Department of Agriculture (DOA); and Associate Professor Dr. Jariya Chanpaisaeng, Department of Entomology.

I am thankful to the Thailand Research Fund (TRF) for supporting this study. My special thanks also goes to Professor Dr. Piyawat Boon-long, Professor Dr. Amaret Bhumiratana and Associate Professor Dr. Peeradet Tongumpai, for their encouragement.

I am deeply indebted to Mrs. Kruapan Kittipakorn, Plant Pathologist, DOA, for her support, guidance and encouragement during this manuscript preparation.

I would like to thank Dr. Mutsuhiro Yoshida, Nematologist of National Institute of Agro-Environmental Sciences, Japan, for his helpful advice and assistance in PCR-RFLP study.

I wish to extend my sincere thanks to Mrs. Prapaisri Pitakpaivan, Director of Plant Pathology and Microbiology Division, and to Mr. Sarote Prachasaisoradej, Head of Nematology Section, DOA for their encouragement and kindness shown to me during this successful study.

Finally, I wish to express my deep sense of gratitude to my husband, Mr. Somnuk Tangchitsomkid, to my son, Kirati Tangchitsomkid and to my daughter, Kornvika Tangchitsomkid, for their never-ending support and encouragement during this study.

Nuchanart Tangchitsomkid

May 2000

TABLE OF CONTENTS

	Page
TABLE OF CONTENTS	(i)
LIST OF TABLES	(ii)
LIST OF FIGURES	(iii)
INTRODUCTION	1
LITERATURE REVIEW	3
MATERIALS AND METHODS	24
RESULTS	37
DISCUSSION	82
CONCLUSION	90
LITERATURE CITED	92

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Locations, soil textures, and associated habitats or vegetations in which samplings for the steinernematid nematodes were conducted in Thailand during June - December 1996 and the nematode isolated.	38
2	Comparison of morphometric characters of infective-stage juveniles and males of <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp. and other <i>Steinernema</i> spp.	59
3	Development of <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp. in <i>Galleria mellonella</i> at different temperatures.	63
4	Number of first-generation females and males of <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp. at 20, 25, 30 and 35 °C in <i>Galleria mellonella</i> .	65
5	Mortality of <i>Galleria mellonella</i> infected with <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp. at different doses and times.	71
6	Mortality of various insect species when exposed to <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp.	78

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Locations and global position where samplings for the steinernematid nematodes were conducted.	39
2	Coloration of <i>Galleria mellonella</i> cadavers infected by steinernematids and heterorhabditids.	40
3	<i>Steinernema thailandensis</i> n. sp., third-stage infective juvenile. A) Entire body. B) Anterior end. C) Posterior end.	43
4	SEM micrographs of <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp., infective-stage juvenile. A) Anterior region showing four cephalic papillae. B) Lateral field with six ridges.	44
5	SEM and light micrographs of <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp., infective-stage juvenile. A) Phasmid. B) Posterior region of a living but inactive nematode. Typical ventral curvature of the tail region.	45
6	<i>Steinernema thailandensis</i> n. sp., first-generation male. A) Entire body. B) Tail shape.	48
7	SEM and light micrographs of <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp., male. A) Posterior region showing shape, genital papillae and conoid and mucronate. B) Spicule paired, light brown in color.	49
8	<i>Steinernema thailandensis</i> n. sp., first-generation female. A) Entire body. B) Anterior end. C) Double-flapped epiptygma on vulva.	52

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
9	SEM and light micrographs of <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp., female. A) Anterior region showing six labial papillae. B) Head of the first generation female showing thickened cheilorhabdions.	53
10	Light micrographs of <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp., female. A) Spiral-shaped bodies when heat-killed. B) Tail of the first generation female. C) Tail of the second generation female.	54
11	RFLP profiles of two steinernematid isolates digested with 17 different restriction enzymes. A) <i>Steinernema carpocapsae</i> . B) <i>S. thailandensis</i> n. sp.	56
12	Life cycle of <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp. at 30 °C.	61
13	The infection percentage of infective juvenile (<i>Steinernema thailandensis</i> n. sp.) and mortality of the test insect (<i>Galleria mellonella</i>) after 24 hours at different temperatures.	67
14	Colony of the symbiotic bacterium (<i>Xenorhabdus</i> sp.) isolated from <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp. showing bromthymol blue (BTB) absorption and clear zone around the colony.	70
15	Relationships among time, mortality percentage of <i>Galleria mellonella</i> , and population of <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp.	72

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
16	Mortality of <i>Galleria mellonella</i> exposed to <i>Steinernema carpocapsae</i> All strain and <i>S. thailandensis</i> n. sp. at different temperatures.	74
17	Population count of <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp. reared on modified culture media compared to lipid agar medium (LP). The modified culture media are soybean milk (SM), soybean flour (SF), corn syrup (CS), wheat flour (WF) and corn flour (CF) .	76
18	Mortality of some Lepidopterous insects infected by <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp.	79
19	Mortality of unidentified mushroom beetle and scarab beetle, and <i>Phyllotreta sinuata</i> infected by <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp.	80
20	Mortality of <i>Myzus persicae</i> , <i>Coptotermes</i> sp. and <i>Periplaneta americana</i> infected by <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp.	81

**A New Entomopathogenic Nematode (Rhabditida : Steinernematidae)
in Thailand : Taxonomy, Biology and Its Potential
for Biological Control**

INTRODUCTION

Entomopathogenic nematodes are obligate parasites of insects that exist in many parts of the world. Nematodes belonging to the families Steinernematidae and Heterorhabditidae are proved to be potential control agents of a number of insect pests. They consist of an invasive juvenile stage that is non-feeding and free-living which can penetrate a host either through body openings, e.g. mouth, anus and spiracle or interskeletal membranes (Bedding and Molyneux, 1982). Their symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* or *Photorhabdus* are released as soon as they are inside the insect hosts. The bacteria proliferate, causing septicemia and rapid death of the insect host (24-48 hours) and establish suitable conditions for the reproduction of the nematodes (Thomas and Poinar, 1979). First generation develops from these initial invaders and lays eggs that give rise to a second generation. The young ones from this generation usually develop into infective juveniles which emerge from the cadaver to search for new hosts although a third generation is possible. Entomopathogenic nematodes are becoming accepted as a biological control agent, especially against insects in the soil environment. They are tested for mass production, application, field efficacy, and safety standards. A number of commercial enterprises worldwide are now producing entomopathogenic nematodes (Poinar, 1990).

The search of entomopathogenic nematodes becomes interesting in many countries which successfully use the nematodes to control agricultural and horticultural insect pests. Thailand is situated in the tropical region of the world, in

which insect is one of the most damaging pests causing losses in many crops. The control of the insects is undertaken by using hazardous chemicals adversely affect human and environment. However, entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, All strain imported from the United States more than 12 years ago proves highly effective to control several insect pests in Thailand and its acceptance is increasing. *S. carpocapsae* could be produced both by *in vivo* and *in vitro* methods, easy to use and inexpensive compared with the chemicals. The nematodes are currently commercialized in sponge package of 4 million nematodes/package. However, the search and related studies of indigenous strains of entomopathogenic nematodes are of great interest to both government and private sector since the native nematodes could serve as resource for use in the country. In the tropics, the local nematode isolates could be more effective to control native insect pests compared with the exotic isolates.

OBJECTIVES

1. To collect and identify native isolates of entomopathogenic nematodes in Thailand by morphological taxonomy and molecular techniques.
2. To study biology of a new Thai entomopathogenic nematode isolate including its life cycle, sex ratio, infection, symbiotic bacteria and pathogenicity.
3. To mass rearing the new Thai entomopathogenic nematode isolate on modified artificial media in the laboratory.
4. To study the potential of the new Thai entomopathogenic nematode isolate as a biological control agent of insect pests under the laboratory conditions.

LITERATURE REVIEW

1. Historical aspects

The Swiss-born scientist, Gotthold Steiner (1886-1961) described the first steinernematid nematode isolated from Germany in 1923 under the name *Aplectana kraussei* (Steiner, 1923). Steiner came to U.S. and remained to work under N.A. Cobb. He could well be considered the “Father of Entomogenous Nematodes” in America because of his contributions to the systematics of many insect-parasitic nematode groups (Poinar, 1990). Rudolf William Glaser (1888-1947) isolated a parasitic nematode from the Japanese beetle *Popillia japonica*, in New Jersey in May 1929, which was described by Steiner as a new genus and species, *Neoaplectana (Steinernema) glaseri* (Steiner, 1929). Glaser became the first to cultivate an entomopathogenic species on solid media and axenically, and the first to conduct field experiments with cultured nematodes against an insect pest, the Japanese beetle (Poinar, 1990).

Significant developments have continued over the last 75 years. Many species and strains of entomopathogenic nematodes have been isolated worldwide. The development in classical and molecular taxonomy of nematodes, relationship between nematodes and their symbiotic bacteria and ecological studies have often been proven. Finally, field experiments have shown that these nematodes have great potentials as biological insecticides against a range of soil and other insects. A number of research work have been conducted leading to the commercialization of entomopathogenic nematodes.

2. Global distributions of steinernematid nematode

In the broadest sense, steinernematid nematodes are widespread. The only continent where they have not been found is Antarctica (Griffin *et al.*, 1990). The search for potential biocontrol agents has led to worldwide surveys of naturally occurring entomopathogenic nematodes. The surveys are conducted by using the *Galleria* bait technique (Bedding and Akhurst, 1975).

Europe is the most intensively surveyed region on earth for entomopathogenic nematodes and is the region with most of the available quantitative data (Hominick *et al.*, 1995). The prevalences of steinernematids that have been reported (37-49 %) are highest documented so far in Northern Europe and are at least partly explained by the method whereby the soil in a negative assay is exposed to *Galleria* larvae a second time because nematodes frequently do not infect in the first bioassay (Hominick and Briscoe, 1990a, b). Other Northern European surveys varied widely in the prevalence of steinernematids, ranging from 5.8 % in Finland (Vanninen *et al.*, 1989) to 10.4 % in the Republic of Ireland (Griffin *et al.*, 1991), 18.3 % in Norway (Haukeland, 1993), 25 % in Sweden (Burman *et al.*, 1986), 26.5 % in the Swiss Alps (Steiner, 1994) and 36.8 % in Czechoslovakia (Mracek, 1980). Boag *et al.* (1992) found only 2.2 % of 1,014 sites in Scotland positive and felt that this low recovery was a reflection of the cold climate of Scotland. Such a conclusion is supported by data from a recent survey in Western Canada (Mracek and Webster, 1993). Blackshaw (1988) reported a prevalence of 3.8 % in Northern Ireland because the majority of the sample sites contained clay type soils which consistently yielded low numbers of entomopathogenic nematodes (Hominick and Briscoe, 1990a). It thus appears that the climate and soil types of England, Wales and the Netherlands provide excellent conditions for steinernematid populations in particular.

Within the steinernematids, two species appear to have a global distribution, namely *S. feltiae* and *S. carpocapsae*. These two species have been isolated from soils in Europe (Ehlers *et al.*, 1991), North and South America (Poinar, 1992), Australia (Poinar, 1990) and China (Yang *et al.*, 1990). However, some species of the nematodes occur in rather restricted area. For example, *S. affinis* and *S. kraussie* only appear to be present in Europe (Hominick *et al.*, 1995) while *S. rara* and *S. ritteri* are restricted to South America (Hominick *et al.*, 1995).

In Asia, the surveys of the steinernematid nematodes were conducted in some countries. They were recovered from Japan (Mamiya, 1988; Yoshida *et al.*, 1998), India (Poinar *et al.*, 1992), China (Han, 1994), Sri Lanka (Amarasinghe *et al.*, 1994), Korea (Stock *et al.*, 1997) and Oman (Elawad *et al.*, 1997).

3. Habitat

The information on habitat preference for steinernematids is by and large contradicting. Griffin *et al.* (1991) found *S. feltiae* in woodland, tilled fields, pasture and roadside verge, while *S. affinis* was absent from woodland. However, the prevalences were low and showed no significant association between nematode occurrence and habitat. Boag *et al.* (1992) found mostly in pasture and absent from heathland. As their prevalences were less than 5 %, it was difficult to draw firm conclusions. Steiner (1994) found no relationship between vegetation and the prevalence of *S. kraussei*, but did conclude that *S. feltiae*, *S. affinis* and *S. intermedia* were typical of grassland ecosystems. Hominick *et al.* (1995) demonstrated that few steinernematids showed a distinct habitat preference, *S. feltiae*, *S. affinis* were found in fields and verges, species B3 was exclusive to woodlands, while *S. kraussei* was most frequently found in woodland.

4. Taxonomy and systematics of steinernematid nematodes

The classification of family Steinernematidae has been outlined by Poinar and Thomas (1984).

Phylum Nematoda

Class Secernentea

Order Rhabditida

Sub-order Rhabditina

Superfamily Rhabditoidea

Family Steinernematidae

The genus *Steinernema* was erected by Travassos in 1927 for the species *Aplectana kraussei* which Steiner had described in 1923 from a sawfly, *Cephalaeia abietis*. Another genus in the family, *Neoaplectana*, described by Steiner (1929) is considered a junior synonym of *Steinernema* by Wouts *et al.* in 1982 (Poinar, 1990).

Steinernema is an obligate entomopathogenic nematode capable of infecting a wide variety of insects. The infective-stage juvenile contains cells of a symbiotic bacterium (*Xenorhabdus* spp.) in its alimentary tract. The infective juvenile is capable of surviving in the environment, entering the body cavity of a host, and then developing into a male or female. One, two, or more generations are possible in the host.

4.1 Morphological taxonomy Morphology is at present the basis for taxonomy and classification. The morphological characters show that there is a great deal of scopes for their use for the determination of species, genera into groups and systems (Siddiqi, 1986). Identification of entomopathogenic nematodes is based on morphometric and morphological characters of the first and second generation

of female, male and infective juvenile. These differences complicate identification in some cases. Also, structures observed with the scanning electron microscope (SEM) and the description of additional species have necessitated modification of family and generic diagnoses (Nguyen and Smart, 1996).

Female : Large, size variable. Cuticle smooth or annulated. Head rounded or truncate, rarely offset. Six lips present, partly or completely fused, each lip with one labial papilla, four cephalic papillae. Amphids present, small. Stoma collapsed; cheilorhabdions pronounced, forming a ring resembling two large sclerotized dots in lateral view. Excretory pore distinct. Esophagus rhabditoid with metacarpus slightly swollen, narrow isthmus surrounded by nerve ring, and large basal bulb with reduced valve. Reproductive system didelphic, amphidelphic, reflexed. Vulva at midbody, sometimes on a protuberance with and without epiptygma. Females are oviparous or ovoviviparous with juveniles developing up to the infective stage before emerging from the body of the female. Tail longer or shorter than anal body width, with or without prominent phasmids (Nguyen and Smart, 1996).

Male : Smaller than female. Anterior end usually with six labial papillae, four large cephalic papillae, and usually with perioral disc. Testis single, reflexed; spicule paired; gubernaculum long; bursa absent. Tail tip rounded, digitate, or mucronate. One single and 10 to 14 pairs of genital papillae present with 7 to 10 pairs precloacal (Nguyen and Smart, 1996).

Infective juvenile (third-stage infective juvenile) : Body slender. Cuticle annulated. Lateral fields present with 4 to 9 incisures and 3 to 8 smooth ridges. Mouth and anus closed. Excretory pore anterior to nerve ring. Esophagus and intestine appearing reduced. Tail conoid or filiform. Phasmids, located about mid-tail (Nguyen and Smart, 1996).

Currently, the genus *Steinernema* containing 23 species. Species of *Steinernema* is listed below in chronological order :-

- S. kraussei* (Steiner, 1923) syn. *Aplectana kraussei* Steiner, 1923.
- S. glaseri* (Steiner, 1929)
- S. feltiae* (Filipjev, 1934)
- S. affinie* (Bovien, 1937)
- S. carpocapsae* (Weiser, 1955)
- S. arenarium (anomala)* (Kozodoi, 1984)
- S. intermedium* (Poinar, 1985)
- S. rarum* (De Doucet, 1986)
- S. kushidai* (Mamiya, 1988)
- S. ritteri* (Doucet & Doucet, 1990)
- S. scapterisci* (Nguyen & Smart, 1990)
- S. caudatum* (Xu *et al.*, 1991)
- S. neocurtillae* (Nguyen & Smart, 1992)
- S. longicaudum* (Shen, 1992)
- S. cubanum* (Mracek *et al.*, 1994)
- S. puertoricense* (Roman & Figueroa, 1994)
- S. riobrave* (Cabanillas *et al.*, 1994)
- S. bicornutum* (Talloso *et al.*, 1995)
- S. oregonense* (Liu & Berry, 1996)
- S. monticolum* (Stock *et al.*, 1997)
- S. karii* (Waturu *et al.*, 1997)
- S. abbasi* (Elawad *et al.*, 1997)
- S. ceratophorum* (Jian *et al.*, 1997)

Identification criteria to species of the genus *Steinernema* are based on infective-stage juvenile and first-generation male characters. Diagnostic characters

of 23 *Steinernema* species showed the species names arranged in descending order of the infective-stage juvenile length.

Infective-stage juvenile length greater than 1,000 micrometers are as follows :

Steinernema cubanum

IJ length = 1283 μm (1149-1508), EP = 106 μm (101-114), T = 67 μm (61-77), E% = 160, D% = 70. Spicule length = 58 μm (50-67), SW = 1.41, spicule head continuous with spicule blade dorsally, spicule tip hookless, in ventral view, cuneus of gubernaculum V-shaped, velum narrow, mucron absent.

Steinernema puertoricense

IJ length = 1171 μm (1057-1238), EP = 95 μm (90-102), T = 94 μm (98-107), E% = 101 (88-108). Spicule length = 78 μm (71-88), spicule well curved with tip without a hook, D% = 77, mucron absent. Female double-flapped epiptygma.

Steinernema glaseri

IJ length = 1130 μm (864-1448), EP = 102 μm (87-110), T = 78 μm (62-87), E% = 102 (87-110). Spicule length = 77 μm (64-90), spicule with prominent shaft and hooked tip, in ventral view, gubernaculum tapering gradually anteriorly, cuneus Y-shaped, D% = 70 (60-78), mucron absent. Female epiptygma absent.

Steinernema longicaudum

IJ length = 1063 μm , EP = 81 μm , T = 95 μm , E% = 85. Spicule length = 77 μm , hookless spicule tip, spicule narrows suddenly to form tip with flattened terminus, mucron absent. Female epiptygma absent.

Steinernema arenarium (anomala)

IJ length = 1034 μm (724-1408), EP = 83 μm (76-86), T = 75 μm (64-84), E% = 119 (106-130). Spicule length = 84 μm (81-91), hookless spicule with ball-like tip, D% = 93 (88-102), in ventral view, cuneus of gubernaculum V-shaped, mucron absent.

Infective-stage juvenile length less than 1,000 micrometers are as follows :

Steinernema oregonense

IJ length = 980 μm (820-1110), EP = 66 μm (60-72), T = 70 μm (64-78), E% = 100 (90-110), D% = 73 (64-75). Spicule length = 71 μm (65-73), spicule moderately curved, spicule head enlarged, tapering anteriorly, mucron absent.

Steinernema kraussei

IJ length = 951 μm (797-1102), EP = 63 μm (56-66), T = 79 μm (63-86), E% = 80. Spicule length = 49 μm (42-53), spicule well or moderately curved, mucron small, D% = 53, SW = 1.10.

Steinernema kari

IJ length = 932 μm (876-982), EP = 74 μm (68-80), T = 74 μm (64-80), E% = 96. Spicule length = 83 μm (73-91), mucron absent, spicule well curved with blunt tip, spicule head twice as long as wide, velum thin. gubernaculum with posterior end bifurcate, cuneus present.

Steinernema neocurtillae

IJ length = 885 μm (741-988), EP = 18 μm (14-22), E% = 23 (18-30), EP extremely short, T = 80 μm (64-97), D% = 12 (10-15). Spicule length = 58 μm

(52-64), GS% = 89 (82-93), spicule short, spicule tip with a prominent depression on ventral side; mucron present, short.

Steinernema feltiae (= *bibionis*)

IJ length = 849 μ m (736-950), EP = 62 μ m (53-67), T = 81 μ m (70-92), E% = 78 (69-86). Spicule length = 70 μ m (65-77), mucron long, GS% = 59 (52-61), spicule slightly curved, spicule head twice as long as wide.

Steinernema bicornutum

IJ length = 769 μ m (648-873), EP = 61 μ m (53-65), T = 72 μ m (63-78), E% = 84 (80-100), D% = 52 (50-60). Spicule length = 65 μ m (53-70), spicule curved, spicule head typified by ventral projection and a width greater than length, blade well curved anteriorly or at mid region, posterior part slightly curved to straight, velum present; in ventral view, cuneus arrowhead-shaped, mucron absent.

Steinernema monticolum

IJ length = 706 μ m (612-821), EP = 58 μ m (54-62), T = 77 μ m (71-95), E% = 76 (63-86), D% = 55 (49-51), excretory pore at the level of the posterior third of metacarpus. Spicule length = 70 μ m (61-80).

Steinernema ceratophorum

IJ length = 706 μ m (591-800), EP = 55 μ m (47-70), T = 66 μ m (56-74), E% = 84. Spicule length = 71 μ m (54-90), mucron absent in first and second generation, spicule curved with blunt tip, velum large extending nearly to spicule tip, gubernaculum boat-shaped with posterior end bifurcate, cuneus small.

Infective-stage juvenile length less than 700 micrometers are as follows :

Steinernema affine

IJ length = 693 μm (608-880), EP = 62 μm (51-69), T = 66 μm (64-74), E% = 94 (74-108), internal spine in IJ tail. Spicule length = 70 μm (67-86), mucron present, small.

Steinernema intermedium

IJ length = 671 μm (608-800), EP = 65 μm (59-69), T = 66 μm (53-74), E% = 96 (89-108), dorsal depression of IJ tail. Spicule length = 91 μm (84-100), mucron absent, spicule well curved with blunt tip, rostrum prominent, velum large.

Steinernema riobrave

IJ length = 622 μm (561-701), EP = 56 μm (51-64), T = 54 μm (46-59), E% = 105 (93-111). Spicule length = 67 μm (63-75), spicule sickle-shaped, spicule head tapering anteriorly, in ventral view, width of neck of gubernaculum large, cuneus Y-shaped, mucron absent, D% = 71 (60-80), SW = 1.14.

Infective-stage juvenile length less than 600 micrometers are as follows :

Steinernema kushidai

IJ length = 589 μm (524-662), EP = 46 μm (42-50), T = 50 μm (44-59), E% = 92 (84-95). Spicule length = 63 μm (48-72), D% = 51, SW = 1.50, spicule head truncate or rounded anteriorly, almost as long as wide, blade with large anterior end, rostrum prominent, velum present; mucron absent.

Steinernema scapterisci

IJ length = 572 μm (517-609), EP = 39 μm (36-48), T = 54 μm (48-60), E% = 73 (60-80). Spicule length = 83 μm (72-92), SW = 2.52 (2.04-2.80), mucron present. Female with large double-flapped epiptygma, and excretory duct with elliptically-shaped structure.

Steinernema carpocapsae

IJ length = 558 μm (438-650), EP = 38 μm (30-60), T = 53 μm (46-61), E% = 60 (54-66). Spicule length = 66 μm (58-77), D% = 41 (27-55), SW = 1.72 (1.40-2.00), spicule head wider than long, ventrally projected, spicule tip pointed or bluntly pointed; in ventral view, cuneus arrowhead-shaped or Y-shaped, mucron present.

Steinernema abbasi

IJ length = 541 μm (496-579), EP = 48 μm (46-51), T = 56 μm (52-61), E% = 86. Spicule length = 65 μm (57-74), mucron absent, spicule curved, velum large, gubernaculum boat-shaped.

Steinernema rarum

IJ length = 511 μm (443-573), EP = 38 μm (32-40), T = 51 μm (44-56), E% = 72 (63-80), morphometrics of this nematode are less than those of other steinernematids. Spicule length = 47 μm (42-52), D% = 50 (44-51), SW = 0.94 (0.91-1.05), mucron present.

Steinernema ritteri

IJ length = 510 μm (470-590), EP = 38 μm (32-40), T = 51 μm (44-56), E% = 88 (79-97). Spicule length = 69 μm (58-75), D% = 47 (44-50), SW = 1.56 (1.44-1.57), mucron absent. Female with epiptygma.

Remarks : Abbreviations used in diagnoses, IJ = infective-stage juvenile; EP = distance from anterior end to excretory pore; T = IJ tail length; E% = EP of IJ divided by tail length x 100; D% = EP of male divided by esophagus length x 100; SW = spicule divided by anal body width; μm = micrometers.

4.2 Molecular taxonomy Molecular characters are becoming increasingly useful for species identification and systematics in nematology. Recent developments in methodology resulting in more convenient, rapid, and specific assays have opened the door to greater use of these tests for detecting and identifying plant parasitic nematodes and entomopathogenic nematodes. Proteins and DNA are particularly useful characters for species identification because they are less subject to environmental effects and investigator interpretation than are many other characters. DNA is the genetic code of the organism and thus its properties are a direct reflection of genetic identity of that organism. Proteins are products of the genetic codes and because of the availability of techniques to directly measure their properties, are also particularly useful as characters (Williamson, 1990).

The rapid development of DNA-based taxonomic techniques provides a fresh impetus to the use of molecular techniques in systematics in the 1980s, and these technologies are being increasingly applied to the resolution of taxonomic problems in economically important nematode groups (Curran and Webster, 1987).

In the Rhabditoidea, within *Steinernema*, species have been recognized by morphological differences, supplemented by cross breeding tests and despite some problems of misidentification and nomenclature, these have been little difficulty in species recognition (Curran, 1990).

5. Biology of steinernematid nematodes

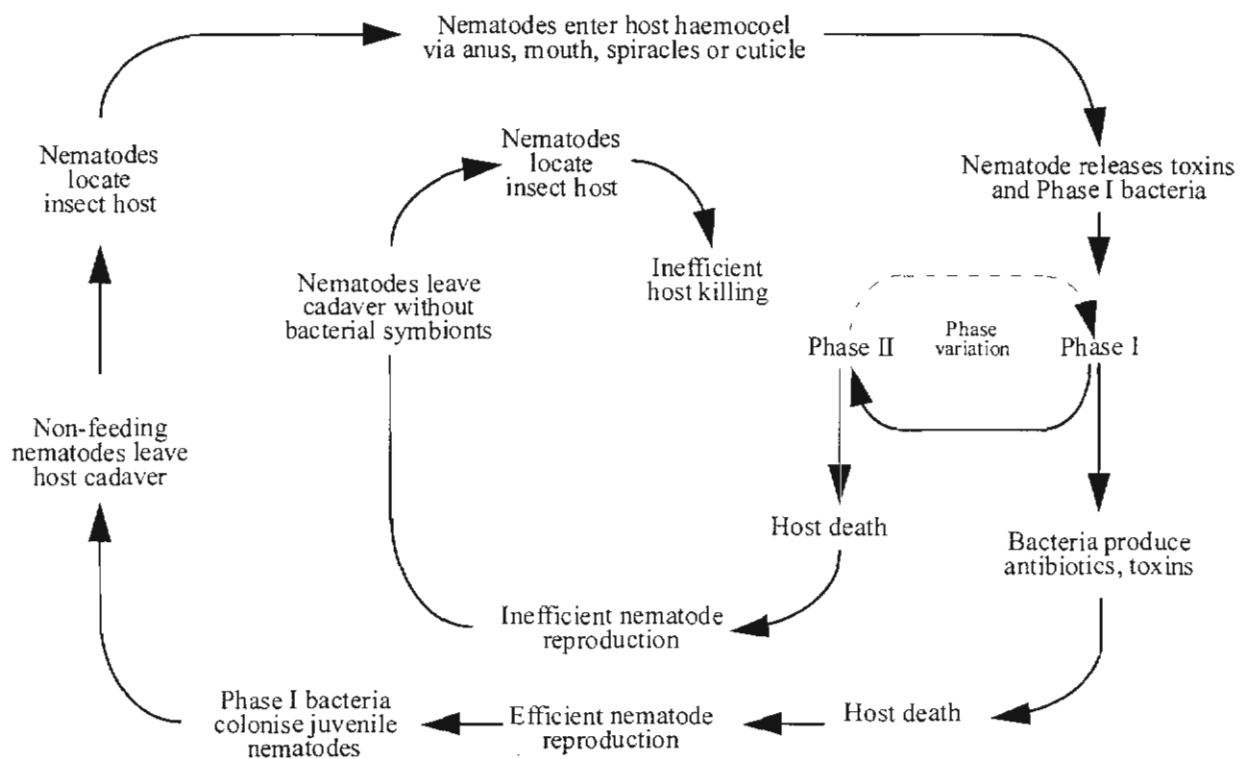
5.1 Infection The infective juveniles (IJs) of the family Steinernematidae are non-feeding, free living stage in the soil. The mouth and the anus of IJs are closed and the digestive tract is non-functional. IJs contain large amounts of energy reserve stored as lipids which supports their prolonged survival in the soil. The third-stage juvenile ensheathed by the second stage cuticle (Poinar, 1979), carries up to 0-250 cells of its bacterial symbiont in the anterior part of intestine (Spiridonov *et al.*, 1991).

The infective juveniles are actively attracted to a host (Bedding and Akhurst, 1975) through gradients of temperature (Byers and Poinar, 1982) and carbon dioxide (Gaugler *et al.*, 1980), and by chemicals and microorganisms associated with the excretory system. The infective juveniles actively invade the host through natural openings-mouth, anus, and sometimes spiracles (Wouts, 1980). IJs of different entomopathogenic nematode species differ in their ecological and behavioral traits. For example, *S. carpocapsae* nictates (Kondo and Ishibashi, 1986), tends to stay near the soil surface and does not disperse far (Moyle and Kaya, 1981), is unresponsive to host cues (Lewis *et al.*, 1992), and is adapted to infecting mobile hosts on the soil surface (sit and wait strategist or ambusher) (Campbell and Gaugler, 1993). *S. glaseri* occurs deeper in the soil and travels much farther (Georgis and Poinar, 1983), responds strongly to host cues (Lewis *et al.*, 1992), and is adapted to infecting sedentary hosts (active foraging strategist or cruiser) (Campbell and Gaugler, 1993).

Once a suitable host is found, the IJs enter the host and penetrate into the haemocoel. There are indications that the penetration process is supported by protease factors produced by the exsheathed infective juvenile (Roque *et al.*, 1994).

Once the IJs entering the insect body, they release the bacterial associate into the haemolymph. Providing the insect's defense mechanisms does not succeed in eliminating the nematode-bacterium complex, the insect dies in 2-4 days after infection. Several authors have summarized the current knowledge of the pathogenicity mechanism of the nematode-bacterium complex and its interactions with the defence system of a insect host (Dunphy and Thurston, 1990).

The life cycle of the nematode-bacterium infection complex is shown below.



From : Connor Thomas (<http://www.microbiology.adelaide.edu.au/>)

5.2 Symbiotic bacteria The enterobacteria are mutualistically associated with steinernematids belonging in the genus *Xenorhabdus* (Thomas and Poinar, 1979). These bacteria are medium to long motile rod with peritrichous flagellae. They are Gram-negative, facultative anaerobes and form spheroplasts ($x = 2.6$

microns diameter) in older cultures. Non-spore formers, *Xenorhabdus* spp. do not have an environmentally resistant stage and have not been naturally found except in the nematode vectors or insect hosts (Woodring and Kaya, 1988). The bacteria may be isolated in primary and secondary forms that are usually distinguished by their colony morphology and absorption of dyes. Primary colonies are generally smaller and more convex than the secondary ones. The most reliable indicator is the primary form's absorption of neutral red from MacConkey agar. Bromthymol blue in NBTA is also often absorbed by colonies in the primary phase (Woodring and Kaya, 1988). The primary form of *Xenorhabdus* differs biochemically from the secondary, supports greater nematode production for both *in vivo* and *in vitro* cultures (Akhurst, 1980), and produces antibiotics (Akhurst, 1982). The primary form is isolated from infective juvenile nematodes and recently infected insects and converts to the more stable secondary form while growing in insects, pure culture and *in vitro* nematode culture. Both forms are equally infectious when injected intrahaemocoelically into insect hosts (Akhurst, 1980).

Xenorhabdus, on the other hand, cannot enter the insect alone; it needs the nematode to serve as a vector. Feeding studies have shown that *Xenorhabdus* is unable to infect insects. (Poinar and Thomas, 1966). The bacterium does not have an environmentally resistant stage. Not surprisingly, *Xenorhabdus* has never been isolated from the soil. The nematodes have also been demonstrated to produce a factor that inhibits the antibacterial enzymes of the insect (Gotz *et al.*, 1981). If axenic nematodes (i.e., without their associated bacterium) are inoculated into the haemocoel of an acceptable host, they are generally unable to kill the host and may develop to adults (Poinar and Thomas, 1966).

5.3 Life cycle The life cycle of species in the genus *Steinernema* as described by previous researcher consists of an egg stage, four juvenile stages, and

an adult stage (males and females). The J2 (second-stage juvenile) may be the pre-infective stage or the non-preinfective stage, and the J3 (third-stage juvenile) may be the infective stage or the non-infective stage (Nguyen and Smart, 1992). Generally two complete generations occur in an insect host but smaller insects may permit only a single generation or perhaps only an incomplete generation to develop (Jackson, 1985). Most researchers agree that some of the eggs produced by the first-generation females develop into IJ (infective J3), but the majority of the egg develop into second-generation adults. The egg produced by the second-generation females develop into IJ. Wouts (1980) presented an updated life cycle and a redescription of *S. feltiae*. He reported that in a fresh host with a low population density, the J1 (first-stage juvenile) developed directly to the J4 (fourth-stage juvenile) without going through the J2 and J3 stages. When the population density increased, however, the J1 developed to J2 and then to IJ.

Nguyen and Smart (1992) showed that life cycle of *S. scapterisci* from IJ to IJ might proceed by one of two routes. If the nutrient supply is sufficient and the population is not overcrowded, the IJ develops to adult males and females of first-generation. Most eggs from these adult females hatch and the juveniles develop through each life stage to become adult males and females of the second-generation. Eggs produced by these females develop to IJ. This cycle takes 8-10 days (long cycle) and takes 6-7 days (short cycle) at 24 °C, but the cycle described requires 10-14 days for *S. feltiae* (Woodring and Kaya, 1988).

5.4 Persistence Natural populations of steinernematid has patchy distribution and nematode numbers are often very low (Stuart and Gaugler, 1994). Occasionally they rise to several millions per m² when epizootics occur. A single insect cadaver may produce over 100,000 juveniles so very high local densities do occur in nature (Smith, 1996). Persistence is solely a measure of number of live

nematodes present in the soil and is distinct from infectivity which is a measure of the ability of these live nematodes to enter an insect host (Curran, 1993). The persistence of applied nematodes differs between strains, species and conditions, such that no two situations are identical or comparable.

Factors of major importance are age and lipid reserves of infective juveniles. These characteristics directly influence the ability of nematodes to survive a period of time without a host and their ability to find and infect a host (Womersley, 1990). If applied as biocontrol agent, the nematodes can also be influenced by its pre-application conditions, such as storage temperatures and storage periods (Fan and Hominick, 1991).

Many studies mainly in laboratories have tested the persistence of nematodes under various conditions in sterile soil. The data generally indicated a survival of weeks, rather than months and a gradual decline in the numbers of living nematodes recovered. Their infectivity potential in some cases, however, did not follow the same pattern because at least some nematode individuals were capable of entering a quiescent stage and then became active again (Womersley, 1990).

Behavioral adaptations and phase of anhydrobiosis or quiescence will influence the pattern of persistence (Womersley, 1990). Most of the data showed a rapid decline in viable nematodes in the first few days after application but after that period the rate of population decline rapidly (Molyneux, 1985). Several factors such as soil type, humidity levels in soil, temperatures and soil pH affect their persistence and infectivity in soil.

6. Steinernematid nematodes as a biological control agent

6.1 Safety The wide host range of steinernematid has given rise to concern about their safety to vertebrates and non-target invertebrates. They are environmentally safe and show no evidence of mammalian pathogenicity (Ehlers and Peters, 1995). Long-term effects on non-target organisms or other environmental impacts following the application of nematodes have not been reported. On the contrary, the environmental safety of nematodes has been exceptionally documented under field conditions (Bathon, 1996). Under experimental conditions, very high dosages of nematodes caused mortality in only young tadpoles of frogs and toads (Poinar, 1990).

Entomopathogenic nematodes are beneficial organisms and although they are symbiotically associated with bacteria, they are not placed in the category of micro-organisms for pest control in most countries. They are exempted from registration in the United States by the Environmental Protection Agency (Gaugler and Kaya, 1990). Many other countries have also exempted nematodes from registration, but some have restrictions or require registration. In the United Kingdom, for example, only indigenous nematodes can be released for biological control (Miduturi, 1997).

6.2 Commercialization

6.2.1 Mass production Large scale commercial yields of entomopathogenic nematodes require economies of scale (Friedman, 1990). Mass production of entomopathogenic nematodes has evolved from the first large-scale *in vitro* solid media production by Glaser *et al.* (1940). He is the first to develop an axenic culture process for *S. glaseri* and later *S. carpocapsae*. Dutky *et al.* (1964)

are referring to the “nematode-bacterium complex” which they maintained on peptone-glucose agar and pork kidney and found that a medium with the bacterial associate, could support the reproduction of *S. carpocapsae* DD136 strain. Bedding, (1981 and 1984) increased the yield of the solid phase monoxenic process from 1 million per Petri dish to 40 millions per flask. Pace *et al.* (1986) reported that ox kidney homogenate-yeast extract or various homogenized offals can serve as media in liquid monoxenic processes. In kidney-yeast medium, they reported yields as high as 90,000 nematodes per milliliter in fermenters in approximately 3 weeks and yields of 190,000 nematodes per milliliter in shake flasks.

A commercial process is economy of scale. Therefore, methods of producing entomopathogenic nematodes have been reviewed and analyzed from the perspective of scale-related costs. In models described, liquid monoxenic culture proves to be the most robust of the current production methods for development to large scale (Friedman, 1990).

6.2.2 Formulation and storage Formulation of nematodes into a stable product has played a significant role in commercialization of these biological control agents. Active nematodes must be immobilized to prevent depletion of their food reserves. This has been accomplished by maintenance of the nematode in aqueous suspensions at low temperature (5-15 °C). This approach, however, is not commercially acceptable. Currently, gel polymers or clay are used in nematode formulations (Georgis and Poinar, 1994) and also as water dispersible granules (Hirsch and Georgis, 1996). Steinernematids, especially *S. carpocapsae*, can be maintained for up to 5 months at room temperature or up to 12 months under refrigeration (Georgis, 1990).

6.2.3 Application The most common application method is to apply nematodes onto the soil surface. Application is carried out using spraying equipment or irrigation systems. No adverse effects of different pumps, strainers or nozzles at standard application pressure have been determined (Klein and Georgis, 1994). Entomopathogenic nematodes are sensitive to ultra violet (UV) light (Gaugler *et al.*, 1992). That is why they are usually applied at low UV radiation onto moist soil surface. Entomopathogenic nematodes are compatible with conventional insecticides and can be integrated into standard chemical control practices (Rovesti and Deseo, 1990).

6.2.4 Field efficacy Entomopathogenic nematodes in the family Steinernematidae possess many qualities that make them excellent biological control agents (Gaugler, 1988). They have a broad host range, can be easily mass produced, possess the ability to seek out their hosts, kill their host rapidly, and are environmentally safe. Availability of commercial entomopathogenic nematodes offer more opportunities to use against wide variety of insects. Targets for nematodes are pest insects in cryptic habitats. Much of the efficacy data have been summarised (Klein, 1990). Entomopathogenic nematodes are also effective against white grubs, larvae of Scarabaeidae, are major pests of turfgrass, pastures, sugarcane and forests throughout the world. They are the most serious pests of turf in the north-eastern U.S. The nematode in genus *Steinernema* has shown that it can be effective biological control agents against these insects (Klein, 1990). Excellent results have been obtained against the blackvine weevil *Otiorhynchus sulcatus* larvae. This summary showed that moderate (50-80 %) to high (> 80%) control occurred when temperatures are above 16 °C (Georgis and Poinar, 1989). Klein (1990) indicated that *S. carpocapsae*, *S. glaseri* and *S. feltiae* provided excellent control of the banana root borer, *Cosmopolites sordidus*, in Puerto Rico. The tropical environment appears to be a logical situation for successfully using these nematodes.

Using *S. carpocapsae* for control of termites (*Reticulitermes* spp.) in buildings has been achieved a success rate of 80-87 % (Poinar and Georgis, 1989). *S. scapterisci* from Uruguay shows its potential for control mole crickets, *Scapteriscus* spp. which are major pests on golf courses where it has been applied, and appears to be reducing population of mole crickets (Smart *et al.*, 1991).

Production and storage capabilities of the most efficacious nematode species and strains need to be developed so that consistent field results can be obtained. As new species and strains are discovered through exploration and developed through genetic manipulation, they can be combined with advances in application techniques to provide reliable pest control to a broad range of consumers (Klien, 1990).

MATERIALS AND METHODS

Materials

1. Standard equipment for soil-sampling, cylindrical soil-core sampling tube (dia. 8 cm, height 80 cm), plastic bucket, plastic bag, cooler, etc.
2. Plastic container (capacity 300 ml)
3. Wax moth, *Galleria mellonella* L.
4. Insect culture
5. Light microscope
6. Chemicals for Light microscopy
7. Scanning electron microscope, JSM-35 CF model (SEM)
8. Chemicals for SEM study
9. DNA thermal cycler
10. Equipments for DNA analysis laboratory, centrifuge, deep freezer, incubator, etc.
11. Equipments for aseptic technique, laminar flow, autoclave, etc.
12. Chemicals for DNA analysis and restriction enzymes
13. Nutritions of the artificial media

Methods

1. Discovery of steinernematid nematodes in Thailand

1.1 Collection sites Sites were chosen to represent ecologically diverse habitats, including fruit crops, field crops, woodland and beach. Soil samples were taken from different parts (13 locations) in the country between June, 1996 to December, 1996 in Rayong, Chanthaburi, Chon Buri, Chiang Mai, Lampang, Chiang Rai, Phetchabun, Ratchaburi, Ranong, Phangnga, Krabi, Chumphon and Kanchana Buri provinces.

1.2 Soil collection Soil samples representing of each site were collected to a depth of 10-15 cm by using a cylindrical soil-core sampling tube. At each site, five random samples were taken over an area of approximately 10 m². They were placed in a plastic bucket and mixed thoroughly. One kilogram of a soil sample was taken from the plastic bucket and placed in a plastic bag. Samples were placed in 18-20 °C coolers during transit to the laboratory and they were stored at 10±1 °C until processed. Location, soil temperature, associated vegetation and insects presence were recorded.

1.3 Isolation Presence of entomopathogenic nematodes in soil samples were tested by baiting with wax moth larvae *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera : Noctuidae) (Bedding and Akhurst, 1975). Ten last instars of *G. mellonella* were placed at the bottom of each 300 ml plastic container, the soils were added and the lids with ventilation holes were positioned. The *Galleria* trap bioassays were incubated at 25 °C, 85 % relative humidity and kept in the dark. After 7 days, the larvae were removed from the soil. The dead larvae with characteristic signs and symptoms of entomopathogenic nematode infection were either dissected or placed

on a wet filter paper which was on a Petri dish cover 55 mm in diameter, then kept in a Petri dish (100 x 15 mm) with 20 ml of sterile distilled water (White, 1927). The emerging infective juveniles were collected, 8 to 10 days after infection. These juveniles were reexposed to *G. mellonella* in Petri dishes to confirm pathogenicity. Soil samples positive to entomopathogenic nematodes were analyzed for their texture and pH.

1.4 Storage The isolated nematode was stored at a concentration of approximately 5,000 infective juveniles per ml distilled water in culture flasks at 25 ± 2 °C. It was recultured every 3 months using *G. mellonella* larvae for culturing. The insect culture was maintained in aerated plastic containers (32.5 x 17.6 x 10 cm) at 25-28 °C on an artificial media containing 100 g rice powder, 200 g soybean milk, 100 ml honey, 5 ml formalin, 20 ml vitamin, 100 ml glycerin, 100 g wax honey and 375 ml distilled water. Approximately 200-300 eggs were placed on a piece of artificial media in plastic containers, then kept at 25-28 °C. The eggs hatched in 3-4 days. After 2 weeks, the larvae were given new media. After 3 weeks, late instar larvae were ready to be collected. Larvae could then be stored on wood shavings for 2-3 weeks at 10 ± 1 °C. Nematodes needed for other experiments were stored no longer than 10 days before being used in the experiment.

2. Identification

2.1 Morphological characters The nematode recovered from the *Galleria* trap was identified to genera and species with its morphological descriptions. First and second generation adults were obtained by dissecting cadavers of *G. mellonella* larvae 4 and 7 days, respectively after infection and infective juveniles were obtained by collecting from the water trap 10 days after infection of the larvae.

Light microscopy : First and second generation adults and infective-stage juveniles were killed by heating in a water bath at 60 °C for 2 minutes. Once the nematodes were killed, add the fixative, TAF (7 ml of 40 % formaldehyde, 2 ml triethanolamine and 91 ml distilled water) and remain in this solution for 12 hours. Fixed nematodes were transferred to a Syracuse watchglass containing 0.5 ml of solution I (20 parts 95 % ethanol, 1 part glycerin, 79 parts distilled water). The watchglass was then placed in a desiccator and enough 95 % ethanol was added to the desiccator to half fill the space below the holding shelf. The desiccator should be placed in an oven at 35 °C for at least 12 hours to allow slow evaporation of the water from solution I in the watchglass. After this, the watchglass was removed from the desiccator and filled with solution II (5 parts glycerin, 95 parts ethanol). The watchglass was placed in a Petri dish, which was partially covered to allow slow evaporation of the ethanol, and was put back in an oven at 40 °C for 3 hours. The ethanol evaporated, leaving the nematodes in pure glycerin, and ready for mounting. The nematodes were mounted in a drop of glycerin under a coverglass and sealed with permount. The examination of morphology and microphotography were performed with an Olympus microscope equipped with differential interference contrast optics.

The following morphometric characters of third-stage infective juveniles of *Steinernema* species were used :- L (body length); W (greatest width); EP (distance from anterior end to excretory pore), ES (distance from anterior end to esophagus); T (tail length). The ratios were calculated using De Man's formula modified by Poinar (1990) and identification criteria proposed by Nguyen (1993) as follows :

$a = \text{body length divided by width (L/W)}$

$b = \text{body length divided by esophagus length (L/ES)}$

$c = \text{body length divided by tail length (L/T)}$

$D\% = EP/ES \times 100$

$E\% = EP/T \times 100$

The following morphometric characters of adults in the first and second generations were used :- L; W; EP; ES; T; anal body width and vulva % in female. The criteria of males used for identification were spicule and gubernaculum lengths (Nguyen, 1993), followed by the ratios :- $D\% = EP/ES \times 100$; $SW = \text{spicule length/body width at cloaca}$; $GS = \text{gubernaculum length/spicule length}$.

Scanning electron microscopy : First generation adults were dissected from *G. mellonella* larvae in Ringer's solution (9 g NaCl, 0.4 g KCl, 0.4 CaCl₂, 0.2 g NaH₂CO₃, 1 liter distilled water). They were rinsed in Ringer's solution for three times (5 minutes each). Infective-stage juveniles were rinsed for three times (15 minutes each) in 0.05 % NaCl. All nematodes were relaxed and killed by heating in water at 60 °C for 2 minutes and then fixed in 3 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 24 hours at 8 °C. Fixed nematodes were rinsed with distilled water three times, post-fixed in 2 % osmium tetroxide for 6-12 hours at 25 °C, rinsed in distilled water again, and dehydrated at 15 minutes intervals through 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 % and 100 % ethanol. They were then critical-point-dried in liquid CO₂, mounted on SEM stubs, coated with gold and scanned using a JSM-35 CF model SEM.

2.2 Molecular taxonomy The polymerase chain reaction (PCR) technique (Joyce *et al.*, 1994) was used and the primers used in this study were specific for the internal transcribed spacer (ITS) region within the ribosomal DNA

(rDNA) repeat (Vrain *et al.*, 1992). The DNA product was digested with 17 restriction enzymes and analyzed by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique.

DNA extraction : Individual infective juvenile of the Thai nematode isolate and *S. carpocapsae* All strain (Nematodik-Thailand Co., Ltd.) was placed in 10 µl drop of worm lysis buffer, WLB (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.45 % tergitol, 0.45% Tween 20, 0.01 % gelatin, 60 µg/ml proteinase K) on a glass slide under a dissecting microscope. The nematodes were then cut into two or more pieces with a sterile needle. The nematode pieces along with the WLB were immediately transferred into a sterile 0.5 ml Eppendorf tube. The tube contents were then frozen at -80 °C for 10 minutes and rapidly thawed. This freezing and thawing cycles disrupt cell membranes and facilitates the release of DNA. The lysis mix were then incubated at 65 °C for 1 hour, boiled at 95°C for 10 minutes, and centrifuged for 1 minute at 12,000 rpm speed to remove debris. Up to 5 µl of the supernatant were then used in PCR reaction.

PCR amplification : PCR reactions were carried out in 0.5 ml Eppendorf tubes in a volume of 50 µl. The reactions were set up on ice and the following added; 5 µl 10x PCR buffer, 0.5 µl dNTP mixture (20mM each), 0.5 µl 18S forward primer (1,000 µg/ml), 0.5 µl 26S reverse primer (1,000 µg/ml), 2U *Taq* Polymerase, distilled water to 45 µl and 5 µl worm lysate.

The primers used in this study were specific to the internal transcribed spacer (ITS) region within the rDNA repeat. Sequences corresponding to the ITS of rDNA from Vrain *et al.* (1992) were amplified and the length polymorphisms among nematode isolates were analysed. The sequences of 18S forward primer and 26S reverse primer proposed by Vrain *et al.* (1992) were :

18S (5'- TTGATTACGTCCCTGCCCTTT - 3')

26S (5'- TTCACTCGCCGTTACTAAGG - 3')

All reactions were topped with two drops of mineral oil and run in a thermocycler pre-heated at 95°C. PCR reaction conditions were as described for ITS primer by Vrain *et al.* (1992), 2 minutes at 94°C, 40 cycles of 30 seconds at 94°C, 60 seconds at 45°C, 90 seconds at 72 °C and a final extension cycle of 5 minutes at 72°C.

The amplified products were tested by running an aliquot of 5 µl of PCR product on a 1 % (w/v) agarose gel in 0.5 x TBE (0.9 M Tris-borate, 0.646 M boric acid, 0.025 M EDTA) at 5 V/cm for 1 hour to determine the presence and the size of the PCR product.

Restriction enzyme digestion and electrophoresis : Five µl of amplified product at 37°C was digested for a minimum of 12 hours with 10 µl of each 17 restriction enzyme. The enzymes used were *Alu* I, *Dde* I, *Eco*R I, *Eco*R II, *Hae* III, *Hha* I, *Hind* III, *Hinf* I, *Hpa* I, *Kpn* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Rsa* I, *Sal* I, *Sau*3A I, *Sau*96 I and *Xba* I. Digested products were run on a 1.5 % (w/v) agarose gel in 0.5 x TBE at 5 V/cm for 3.5 hours. Fragments were visualized by ethidium bromide staining, viewed on UV transilluminator, and photographed. The new Thai isolate nematode was identified by comparing its RFLP to that of *S. carpocapsae* (All strain).

3. Biology of the nematode

3.1 Life cycle A piece of 1 x 1.5 cm filter paper (Whatman # 2) was placed into a 1.5 ml microtube having center-punctured lid. 300 ± 50 infective juveniles of the nematode isolate in 25 μ l of water were inoculated onto the filter paper in the microtube. *G. mellonella* was placed singly in the microtube and then incubated at 30 °C. The development of the nematode was observed every 24 hours by dissecting 5 nematode cadavers until the completion of the nematode's life cycle. There were 35 microtubes prepared for this experiment.

3.2 Effect of temperature on the life cycle To determine the influence of temperature on the life cycle within *G. mellonella*, the nematodes were placed in incubation chambers at different temperatures. Three insects were placed in each of 15 Petri dishes (100 x 15 mm) and exposed to 300 ± 50 infective juveniles. Two of the Petri dishes were placed in incubation chambers at 15, 20, 25, 30, 35 and 38 °C. After 24 hours, 3 insects were dissected daily and the life stages of the nematode determined.

3.3 Effect of temperature on sex ratio To determine the influence of temperature on female/male sex ratio, 10 insects were placed in each of 3 Petri dishes and exposed to 300 ± 50 infective juveniles. Each of the dishes was placed in an incubator at 25, 30 and 35 °C. After 3 days, all insects were dissected and the number of females and males in each insect were counted. The female/male ratio was analyzed with Duncan's Multiple Range Test.

3.4 Effect of temperature on nematode infection To determine the influence of temperature on the infection of infective juveniles of the Thai nematode isolate in *G. mellonella*, 10 insects were placed in the Petri dish and

exposed to 300 ± 50 infective juveniles. Each of the dishes was placed in an incubator at 15, 20, 25, 30, 35 and 38 °C. After 24 hours, 5 insects of each temperature were dissected. The number of nematodes in each insect was counted and its mean number was estimated. Insect mortality was observed in 10 *G. mellonella* 24 hours after inoculation.

3.5 Symbiotic bacteria The bacterium was isolated from a drop of haemolymph of the nematode-infested *G. mellonella* larva. Ten insects were put into a Petri dish with moist filter paper and infected with approximately 1,000 infective juveniles. After 48 hours, cadaver was rinsed with 70 % alcohol for 5-10 minutes. The cadaver was cut through with a scissor or needle and a drop of haemolymph was streaked on NBTA (37 g standard-I-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 with any morphological differences such as size, shape, growth rate, or color were subcultured by streaking them onto a nutrient agar (8 g nutrient broth, 15 g agar, 1,000 ml distilled water) and left at 28 °C for approximately 48 hours. Single colonies were examined to compare general characteristics, colony morphology and absorption of bromthymol blue.

4. Pathogenicity

4.1 Insect bioassay A piece of 1 x 1.5 cm filter paper was placed into a 1.5 ml microtube having center-punctured lid. The infective juveniles of the Thai nematode isolate at different numbers in 25 µl of water then dropped onto the filter paper in the microtube and one *G. mellonella* was placed on the filter paper. The

Completely Randomized Design with 5 treatments and 3 replications were applied. The treatments were 4, 6, 8, and 10 nematodes per one insect. Control treatment contained the test insect without the nematode. The data were calculated in percentages, then subjected to analysis of variance. If significant differences were detected among treatment effects they were separated using Duncan's Multiple Range Test at $P = 0.05$.

4.2 Heat tolerance A piece of 1 x 1.5 cm filter paper was placed into a 1.5 ml microtube having center-punctured lid. 300 ± 50 infective juveniles of the Thai nematode isolate as compared with the isolate from the U.S. (*S. carpocapsae*) in 25 μ l of water, then inoculated onto a filter paper in the microtube. *G. mellonella* was placed singly in the microtube. Fifteen microtubes were placed in the incubation chambers at 15, 20, 25, 30, 35 and 38 °C. The mortality check was carried out 10 hours after inoculation and every two hours until 48 hours.

5. Mass rearing

Mass rearing of this nematode was in artificial media. The medium formulae and techniques were developed in the laboratory at Nematology Section, Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture. The cost-benefit parameter of maximal harvest of infective nematodes and low cost could be adjusted simultaneously and reliably. The Thai nematode isolate was reared on monoxenic culture and on a modified medium when its yield was required.

Nematode inoculum : The nematode was obtained by exposing the larvae of *G. mellonella* to 5,000 infective juveniles of nematode from Thailand in 9 cm Petri dishes lined with two filter papers. Twenty insects were released in each Petri dish and all dishes were maintained in an incubator at 30 °C. Five days after

exposure, the cadavers were transferred onto the White's water trap. Five 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 3 times with distilled water by using high speed micro-centrifuge at 8,000 rpm.

Bacterial inoculum : The primary form of *Xenorhabdus* sp. was isolated from a Thai nematode isolate on NBTA and maintained in an incubator at 28 °C. After 48 hours, single colonies of the bacteria were subcultured by streaking onto nutrient agar at 28 °C for approximately 48 hours. All single colonies were streaked one more time on nutrient agar to ensure its purity. 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 -70 °C.

Culture media : All modified media containing 10 g of either soybean milk (SM), wheat flour (WF), soybean flour (SF), corn syrup (CS) and corn flour (CF) were mixed in 5 g yeast extract, 1 ml sunflower oil, 10 g agar and 1 liter distilled water. The lipid agar was prepared, according to Dunphy and Webster (1989) ; 10 g corn syrup, 5 g yeast extract, 25 g nutrient agar, 2.5 ml cod liver oil, 2 g MgCl₂ and 1 liter distilled water. The media were then autoclaved at 121°C for 20 minutes and then poured aseptically into 9 cm Petri dishes.

Experiment procedure : The bacterial colonies were removed from storage and subcultured to 125 ml Erlenmeyer flasks filled with 20 ml nutrient broth (8 g Bacto nutrient broth, 1,000 ml distilled water) under continuous agitation for 24 hours. Each culture dish was inoculated with 1 ml of the broth. The Petri dishes were incubated at 30°C for 24 hours and then inoculated with 5,000 infective juveniles per dish. All cultures were incubated at 30°C for 10 days.

Harvesting and data analysis : All nematode cultures were harvested 10 days post inoculation by flooding the dishes with 10 ml of distilled water for 10 minutes to dislodge juvenile nematodes from the agar-bacterial matrix. The total collective number of nematodes per dish was estimated based upon the average yield of nematodes in three samples of suspension per dish. Each culture was replicated five times.

6. Potential for biological control

Test insect pest species were : Larvae of Lepidoptera ; common leafworm (*Spodoptera litura*), beet armyworm (*S. exigua*), diamond-back moth (*Plutella xylostella*), American bollworm (*Heliothis armigera*), jasmine flower borer (*Henedecasis duplifacialia*) and wax moth (*G. mellonella*). Grubs and adults of Coleoptera; mushroom beetle (unidentified), flea beetle (*Phyllotreta sinuata*) and scarab beetle (unidentified). The nymph of Homoptera, aphid (*Myzus persicae*). Larva and adult of Isoptera, wet wood termite (*Coptotermes* sp.). Adult of Blattoidea, American cockroach (*Periplaneta americana*).

Each insect pest species was tested in 5 cm Petri dishes each containing two pieces of Whatman # 2 filter paper. Approximately 1,000 infective juveniles of the Thai nematode isolate in 500 µl water were added to each dish. The nematodes were used within 10 days only after they were produced. Control treatment contained the test insects without the nematode. The tests were not conducted simultaneously, and the number of test insect pests varied as follows : 10 : 10 (treated : control), 10 : 10, 45 : 30, 25 : 25, 12 : 10, 50 : 50, 10 : 10, 15 : 15, 5 : 5, 35 : 35, 30 : 30, and 14 : 14, respectively. Dishes were stored in the dark at 25±3 °C. Numbers of dead test insects were counted after 24 hours, except the

American cockroach which were examined after 48 hours. Data analysis was percentage of mortality corrected by Abbott's formula (1925).

7. Places

The experiments were conducted at the Nematology Section, Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok and at the Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Chatuchak, Bangkok. The part of molecular taxonomy was carried out at the Nematology and Soil Zoology, National Institute of Agro-Environmental Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8604, Japan.

8. Duration

The studies were carried out from June, 1996 to January, 1999.

RESULTS

1. Discovery of a steinernematid nematode in Thailand

The soil survey of entomopathogenic nematode was conducted in 13 locations (provinces) of Thailand during June - December 1996. A total of 98 soil samples were extracted using *Galleria* baiting technique (Table 1). A steinernematid nematode was isolated from 1 out of 12 soil samples collected at a coconut plantation in Kanchana Buri province. It represented 1.0 % of the total number of soil samples. The soil type was sandy loam, pH 7.2. The nematode was recovered from the soil sample which had the soil temperatures of 27 °C at the depth of 10-15 cm below the soil surface. The global position of the nematode discovery was latitude 14 °N, longitude 99 °E and altitude 400 m above mean sea level (Figure 1). It was shown that this nematode could survive well in the dry and hot environments in Kanchana Buri province.

G. mellonella parasitized by this nematode isolate turned black with no luminescence in the dark which indicated a form of steinernematid (Figure 2). The insects killed by heterorhabditids turned red, brick-red, purple, orange and sometimes green with luminescence in the dark.

Table 1 Locations, soil textures, and associated habitats or vegetations in which samplings for the steinernematid nematodes were conducted in Thailand during June - December 1996 and the nematode isolated.

No.	Province	No. of samples	Sampling time (month)	Soil texture	Habitat or vegetation	No. of samples with nematode
1	Rayong	15	June	Sandy loam	Fruit crop	0
				Sand	Beach	0
2	Chantha Buri	3	June	Sand	Beach	0
3	Chon Buri	5	June	Sand	Beach	0
4	Chiang Mai	5	August	Sandy loam	Field crop	0
5	Lampang	5	September	Sandy loam	Woodland	0
6	Chiang Rai	5	October	Clay loam	Woodland	0
7	Phetchabun	5	October	Clay loam	Woodland	0
8	Ratcha Buri	3	November	Clay loam	Fruit crop	0
9	Ranong	4	November	Sandy clay loam	Fruit crop	0
10	Phangnga	17	November	Sandy loam	Fruit crop	0
11	Krabi	3	November	Sandy loam	Guava	0
12	Chumphon	16	November	Sandy loam	Fruit crop	0
13	Kanchana Buri	12	December	Sandy loam	Coconut	1
Total	13	98				

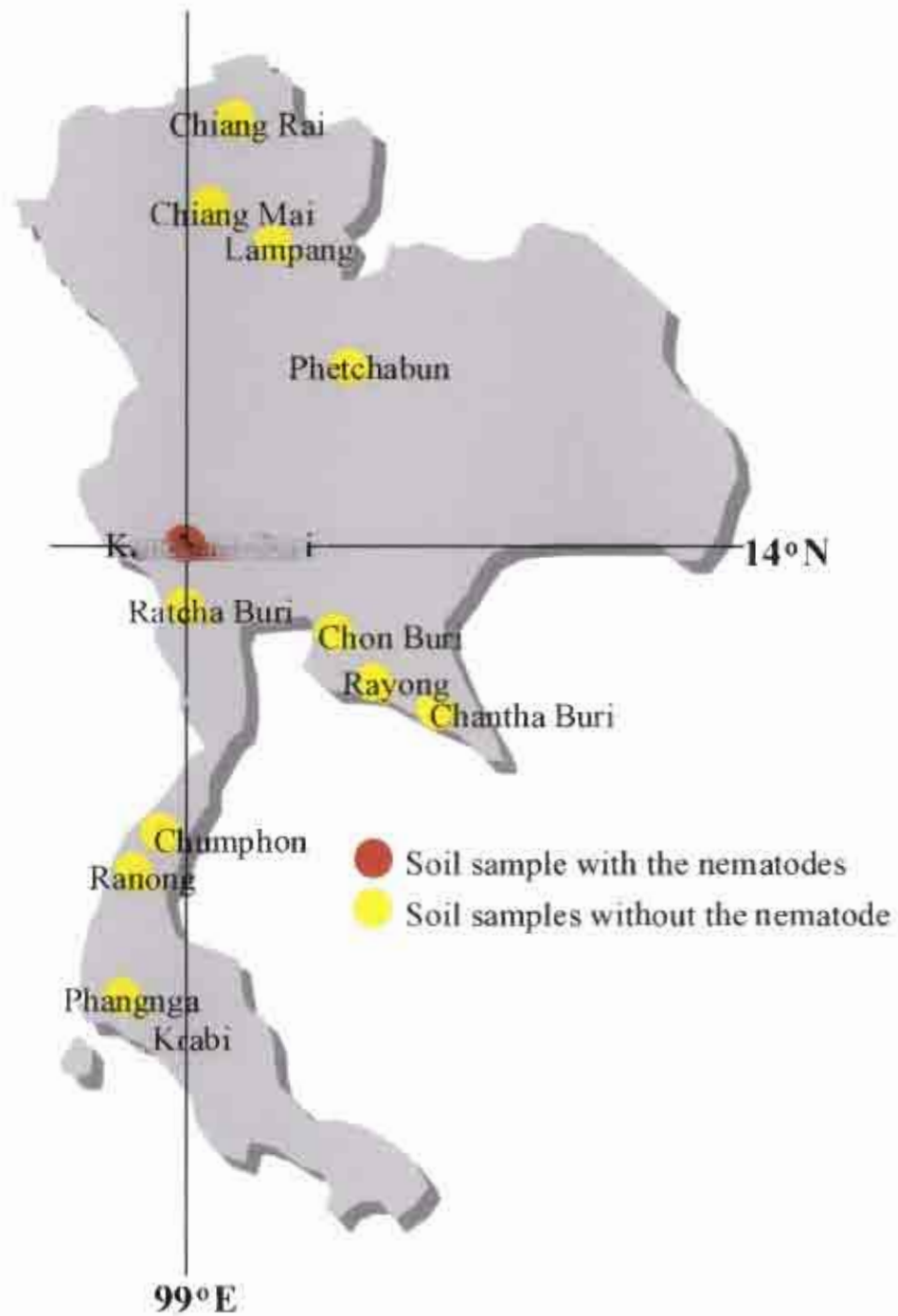


Figure 1 Locations and global position where samplings for the steinernematid nematodes were conducted.

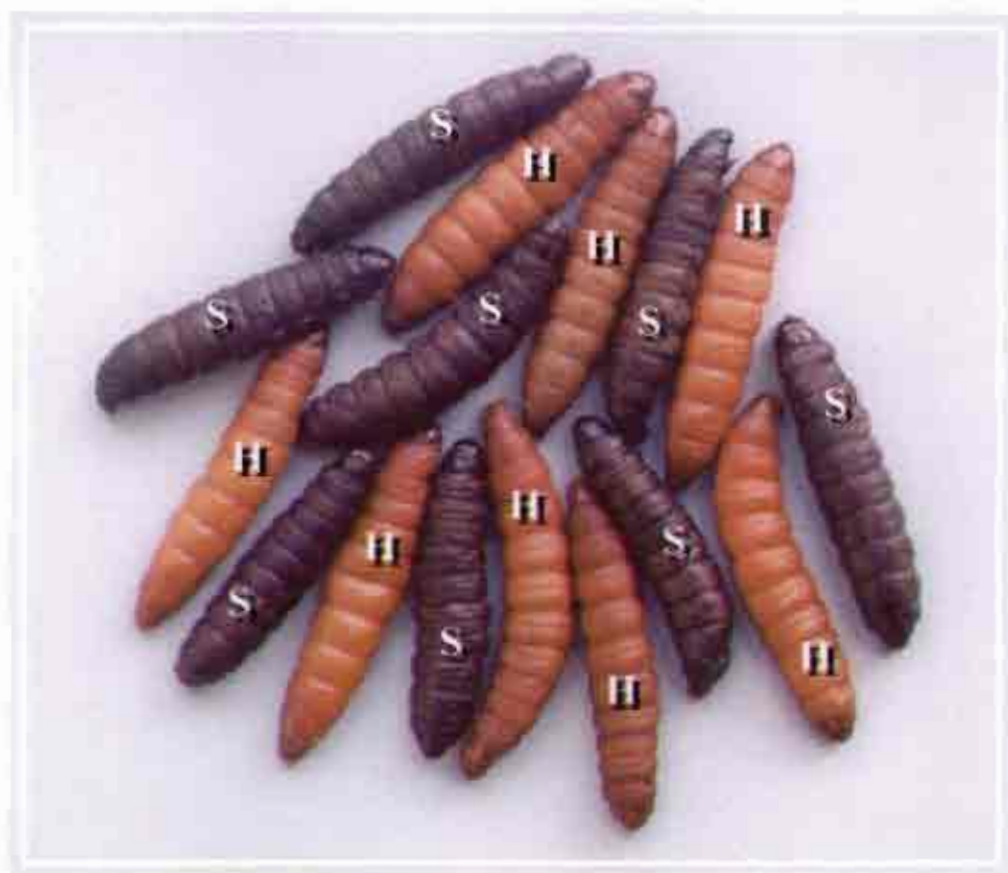


Figure 2 Coloration of *Galleria mellonella* cadavers infected by steinernematids (S) and heterorhabditids (H)

2. Identification

2.1 Morphological characters

The results from morphological studies indicated that the *Steinernema* nematode found in Kanchana Buri province is a new species. It was named *S. thailandensis* n. sp. and its descriptions are as follows :

Type host : unknown in nature; from bait-insect (*G. mellonella*).

Type locality : in sandy loam soil under a coconut tree (*Cocos nucifera* L.) at Kanchana Buri Horticultural Experiment Station, in Kanchana Buri province, Thailand.

Type specimens :

Holotype (male, first-generation) : Recovered from haemocoel of *G. mellonella*. Slide number KU-01.

Allotype (female, first-generation) : Recovered from haemocoel of *G. mellonella*. Slide number KU-02.

Paratype (first-generation males and females and infective-stage juveniles) : Recovered from haemocoel of *G. mellonella*. Twenty males, 20 females and 10,000 IJs fixed in TAF in Vial number KU-03.

All specimens were deposited at the Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

SYSTEMATICS : *Steinernema thailandensis* n. sp.

Infective juveniles (third-stage juvenile) (Figure 3-5)

Measurements : (n = 20). All measurements showed total length of range (mean $\pm$ SD) in micrometers.

Total body length 404-460 (432 ± 13). Greatest width 22-24 (22 ± 0.6). Distance from anterior end to excretory pore 34-39 (35 ± 2). Distance from anterior end to esophagus base 99-112 (106 ± 4). Tail length 37-47 (42 ± 2). a 18-21 (20 ± 0.8). b 3.8-4.3 (4 ± 0.1). c 9-11 (10 ± 0.4). D % 30-37 (33 ± 1.7). E % 75-91 (83 ± 5).

Description : Body slender and small size, 404 to 460 μ m long. Body straight and a gradual reduction in breadth of an elongate body (Figure 3A). Cuticle smooth, slightly annulated. Cuticle of second-stage juvenile, as a sheath, present or absent (may be lost). Excretory pore in anterior 1/3 of esophagus. Esophagus long and narrow, distinctly narrower at level of nerve ring, terminating in a valvate basal bulb (Figure 3B). Cardia present. Anterior portion of intestine with dorsally displaced pouch containing symbiotic bacteria. Lumen of intestine narrow, rectum long, narrow, anus distinct. Tail conical with pointed terminus (Figure 3C). Lip region smooth, generally not set off. Head non-annulated, four cephalic papillae and amphids distinct, labial papillae not developed (Figure 4A). Mouth openings closed. Lateral fields with six incisures (Figure 4B). The phasmids are located about 35 % of the tail length, posterior to the anus (Figure 5A). Posterior region of a living third-stage juvenile, the typical ventral curvature of the tail region forming an angle 110 degrees with body (Figure 5B).

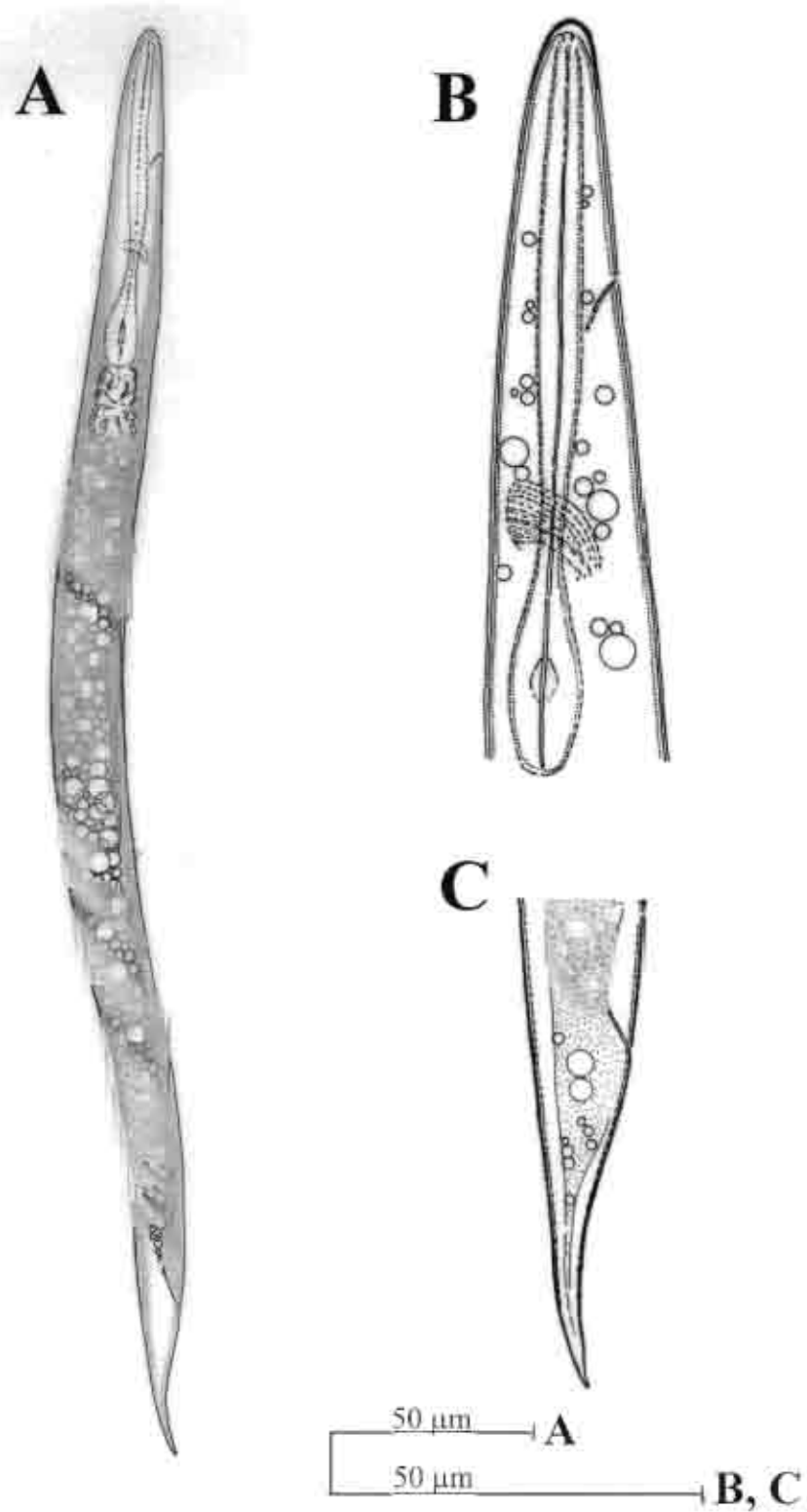


Figure 3 *Steinernema thailandensis* n. sp., third-stage infective juvenile. A) Entire body. B) Anterior end. C) Posterior end.

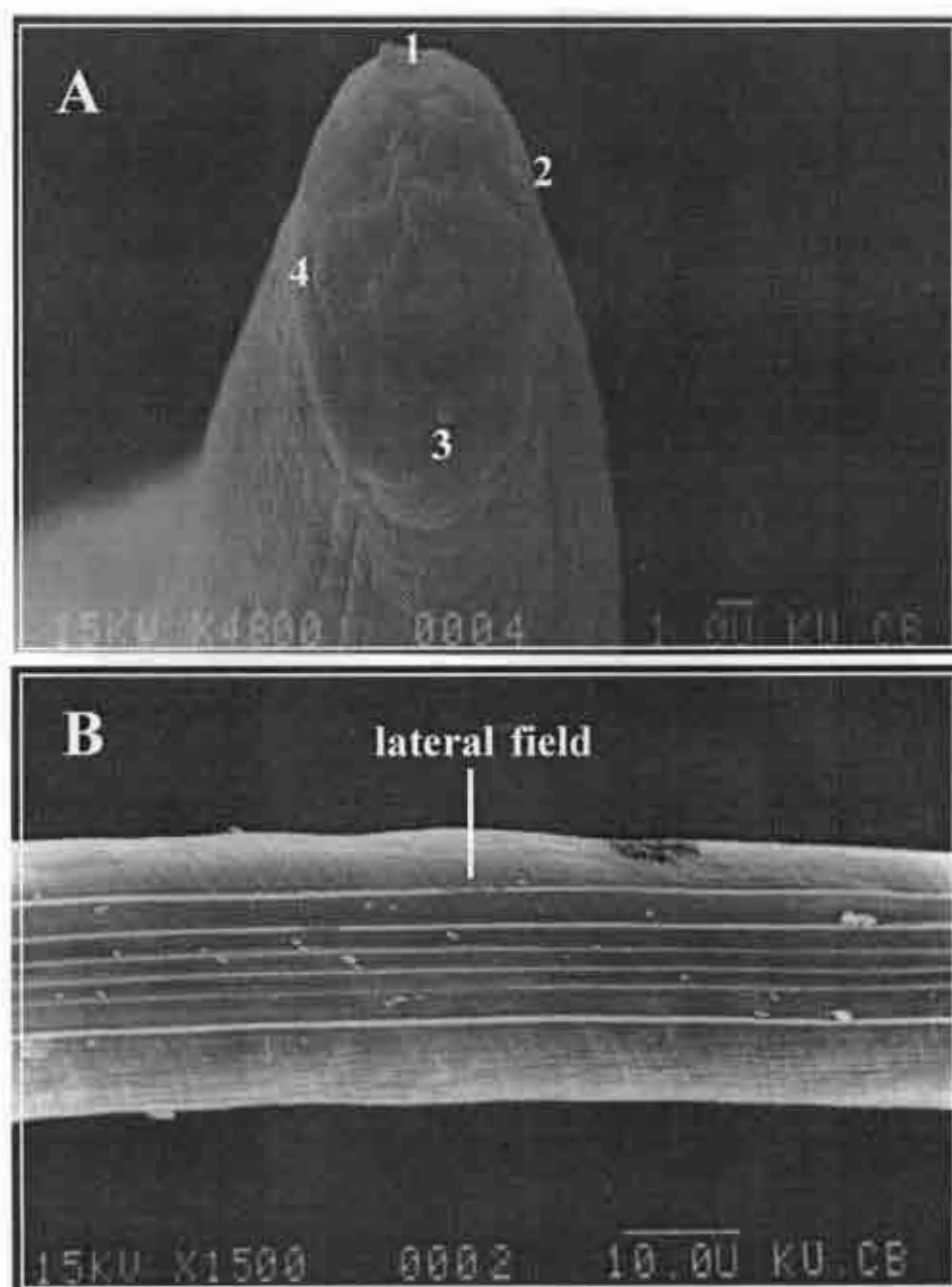


Figure 4 SEM micrographs of *Steinernema thailandensis* n. sp., infective-stage juvenile. A) Anterior region showing four cephalic papillae. B) Lateral field with six ridges.

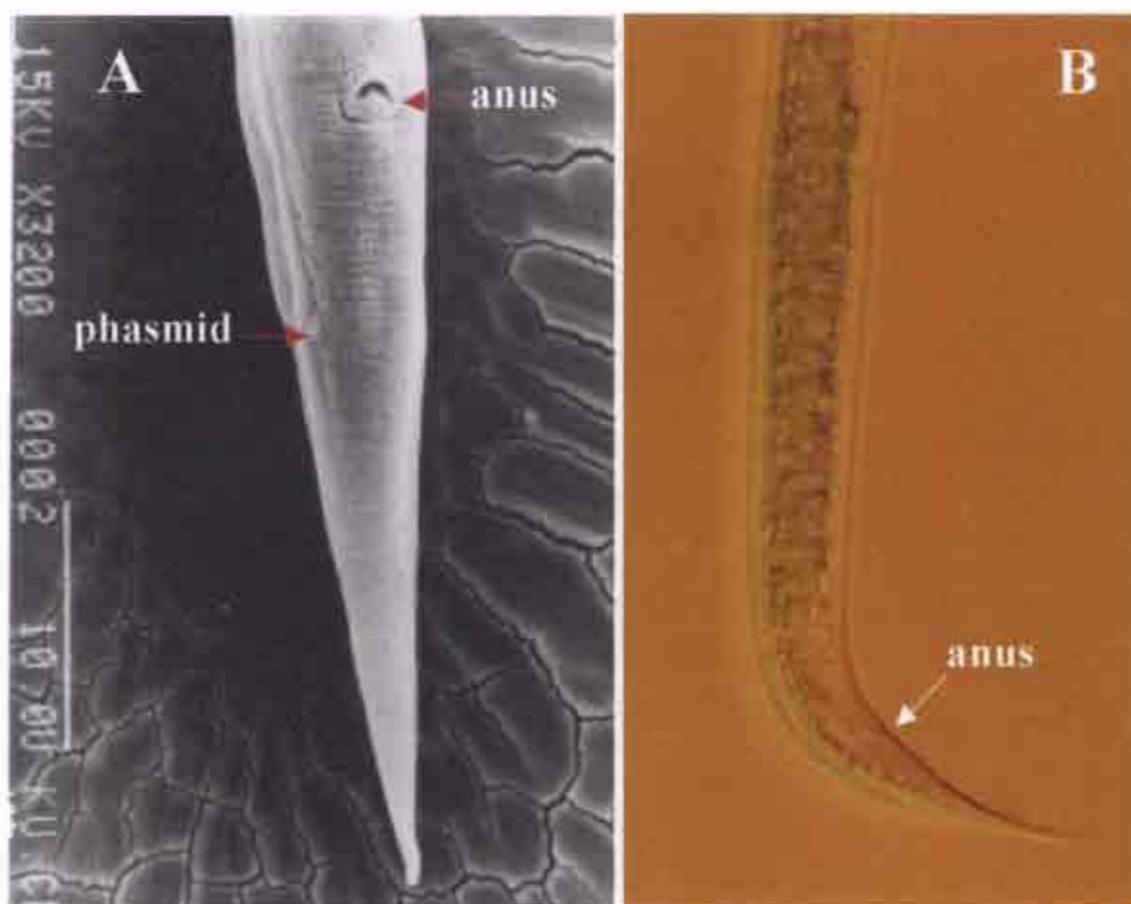


Figure 5 SEM and light micrographs of *Steinernema thailandensis* n. sp., infective-stage juvenile. A) Phasmid. B) Posterior region of a living but inactive nematode. Typical ventral curvature of the tail region.

Male (Figure 6-7)

Measurements : All measurements showed total length of range (mean $\pm$ SD) in micrometers.

Male, first generation (n = 10). Total body length 1,784-2,260 ($2,008 \pm 120$). Greatest width 145-172 (155 ± 8). Distance from anterior end to excretory pore 85-103 (93 ± 6). Distance from anterior end to esophagus base 175-197 (188 ± 7). Anal body width 39-63 (51 ± 7). Tail length 24-41 (33 ± 4). Spicule length 83-99 (94 ± 5). Gubernaculum length 61-79 (67 ± 4). D % 44-56 (50 ± 4). SW (spicule length divided by anal body width) 1.3-2.5 (1.9 ± 0.3). GS (gubernaculum length divided by spicule length) 0.6-0.8 (0.7 ± 0.05).

Male, second generation (n = 10). Total body length 1,047-1,530 ($1,360 \pm 130$). Greatest width 70-94 (85 ± 8). Distance from anterior end to excretory pore 67-98 (87 ± 8). Distance from anterior end to esophagus base 130-159 (147 ± 8). Anal body width 27-33 (29 ± 2). Tail length 17-27 (20 ± 3). Spicule length 78-92 (85 ± 4). Gubernaculum length 43-69 (58 ± 7). D % 42-64 (59 ± 6). SW 2.4-3.3 (2.9 ± 0.3). GS 0.5-0.8 (0.7 ± 0.01).

Description : Body enlarged and curved posteriorly, first generation males larger than second generation males (1st generation, 2,008 μ m and 2nd generation males, 1,360 μ m), C-shaped when heat-killed (Figure 6A). Head truncate to slightly round, continuous with the body. Cuticle smooth, lateral field not observed. Lip region with six fused lips, with a characteristic rhabditoid. Mouth opening triangular, stoma reduced, short and wide. Esophagus muscular cylindrical procorpus; metacarpus slightly swollen; an indistinct isthmus and basal bulb enlarged. Cardia well developed. Excretory pore located at posterior 1/2 of esophagus length. Nerve ring crossing isthmus (Figure 6A). Testis single and

reflexed. Manubrium (head) of spicules short, shaft distinct, manubrium comprised about 30 % of the spicule length (Figure 6B). Laminar (blade) long and narrow bearing with two ridges. Velum present. Gubernaculum slender and long about 3/4 length of spicules. Tail conoid and mucronate, 23 genital papillae (11 pairs and a single ventral preanal) (Figure 7A). Spicules paired, light brown in color (Figure 7B).

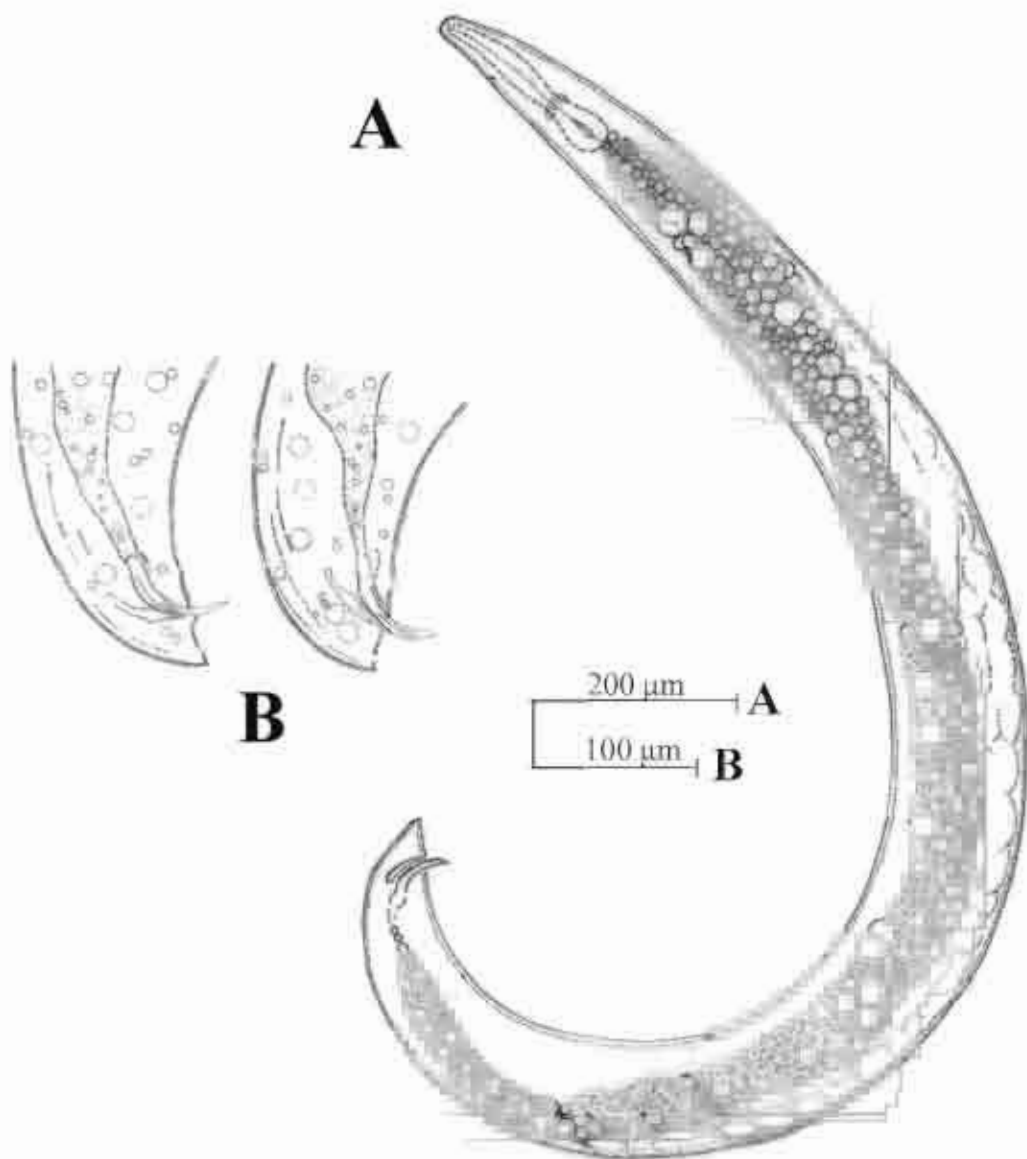


Figure 6 *Steinernema thailandensis* n. sp., first-generation male. A) Entire body.
B) Tail shape.

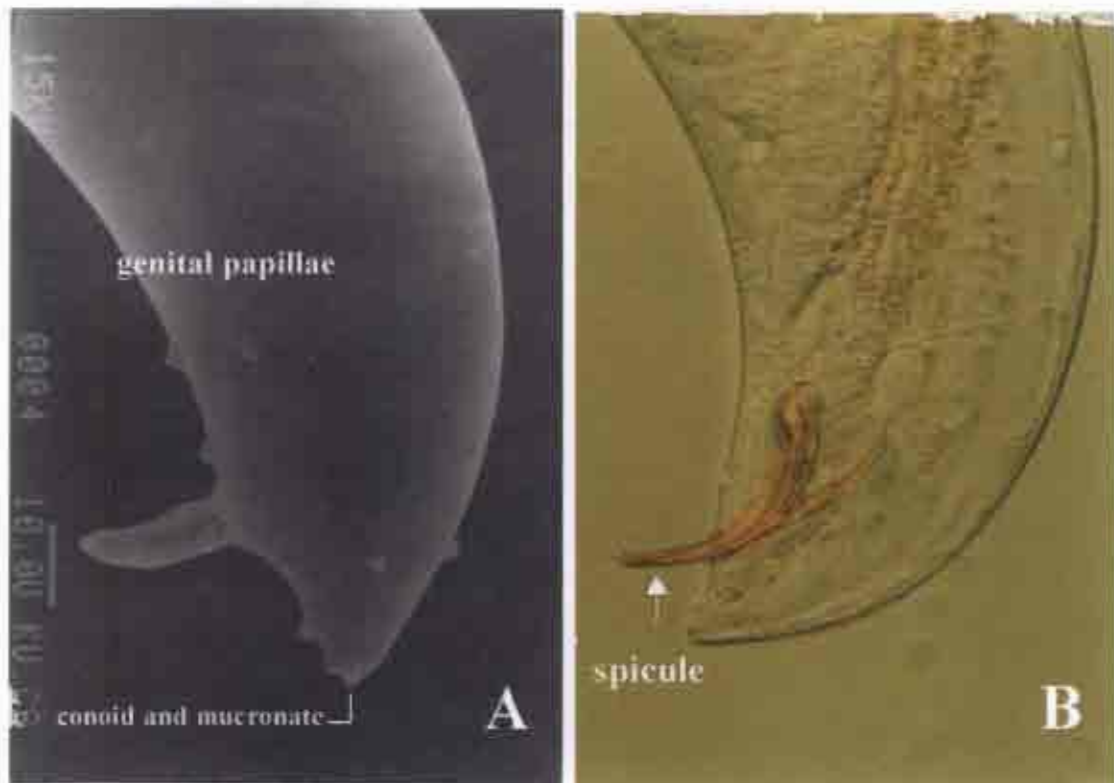


Figure 7 SEM and light micrographs of *Steinernema thailandensis* n. sp., male

A) Posterior region showing shape, genital papillae and conoid and mucronate. B) Spicule paired, light brown in color

Female (Figure 8-10)

Measurements : All measurements showed total length of range (mean $\pm$ SD) in micrometers.

Female, first generation (n = 10). Total body length 5,332-8,332 ($6,926 \pm 871$). Greatest width 206-259 (230 ± 16). Distance from anterior end to excretory pore 94-153 (129 ± 16). Distance from anterior end to esophagus base 255-294 (275 ± 11). Anal body width 75-106 (91 ± 11). Tail length 20-35 (28 ± 5). Vulva % 52-55 (53 ± 0.9).

Female, second generation (n = 10). Total body length 2,857-3,854 ($3,318 \pm 332$). Greatest width 204-243 (219 ± 10). Distance from anterior end to excretory pore 71-94 (86 ± 7). Distance from anterior end to esophagus base 255-290 (271 ± 11). Anal body width 39-59 (51 ± 7). Tail length 36-47 (42 ± 4). Vulva % 53-58 (56 ± 1.6).

Description : Body elongate, spiral shaped when heat-killed (Figure 8A and 10A). First generation females larger than second generation females (1st generation, 6,926 μ m and 2nd generation, 3,318 μ m). Cuticle slightly and easily to crack in water. Cuticle smooth under light microscopy, but annules faint under SEM. Esophagus typical of family, procorpus cylindrical, muscular; metacarpus slightly swollen, non-valvate; isthmus distinct; basal bulb muscular, with small size (Figure 8B). Cardia well developed. Nerve ring surrounding isthmus. Esophago-intestinal junction large, prominent (Figure 8B). Excretory pore anterior to mid-metacarpus. The first and second generation females had protruding vulval lips and both with double-flapped epiptygmas (Figure 8C). Vagina short, muscular; genital tracts amphididelphic, Filling much of the body. Vulva located near middle of body. Head truncated to slightly round, continuous with the body. Six labial,

four cephalic. Six lips, distinct, each with one papilla (Figure 9A). Cephalic papillae sometimes obscure. Amphids not observed. Stoma shallow, stoma circular anteriorly (Figure 9A). Cheilorhabdions prominent, heavily thickened (Figure 9B). Tail of female first generation, blunt tail tip with mucronate (Figure 10B), but female second generation, pointed tail tip (Figure 10C).

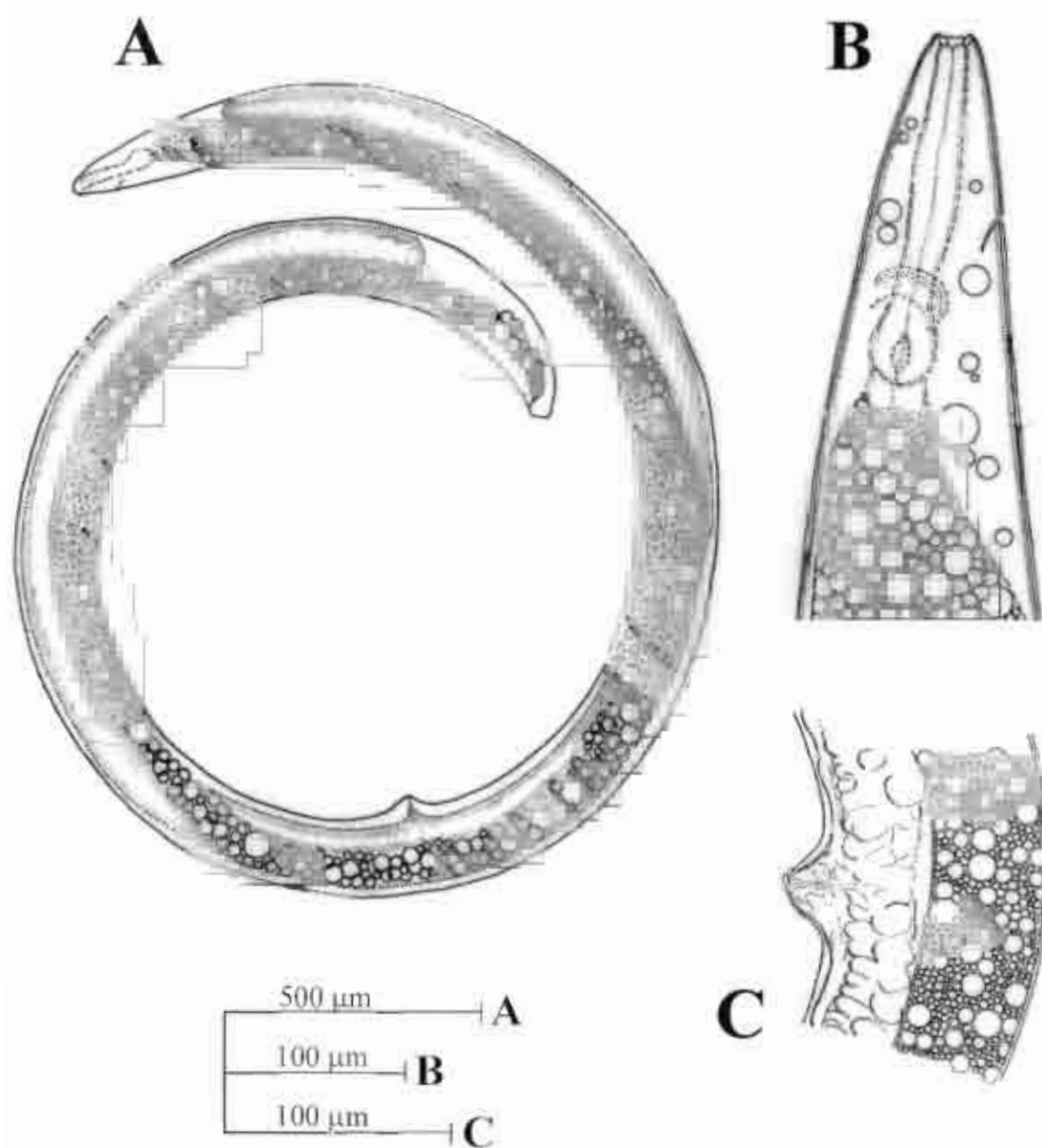


Figure 8 *Steinernema thailandensis* n. sp., first-generation female. A) Entire body. B) Anterior end. C) Double-flapped epiptygma on vulva.

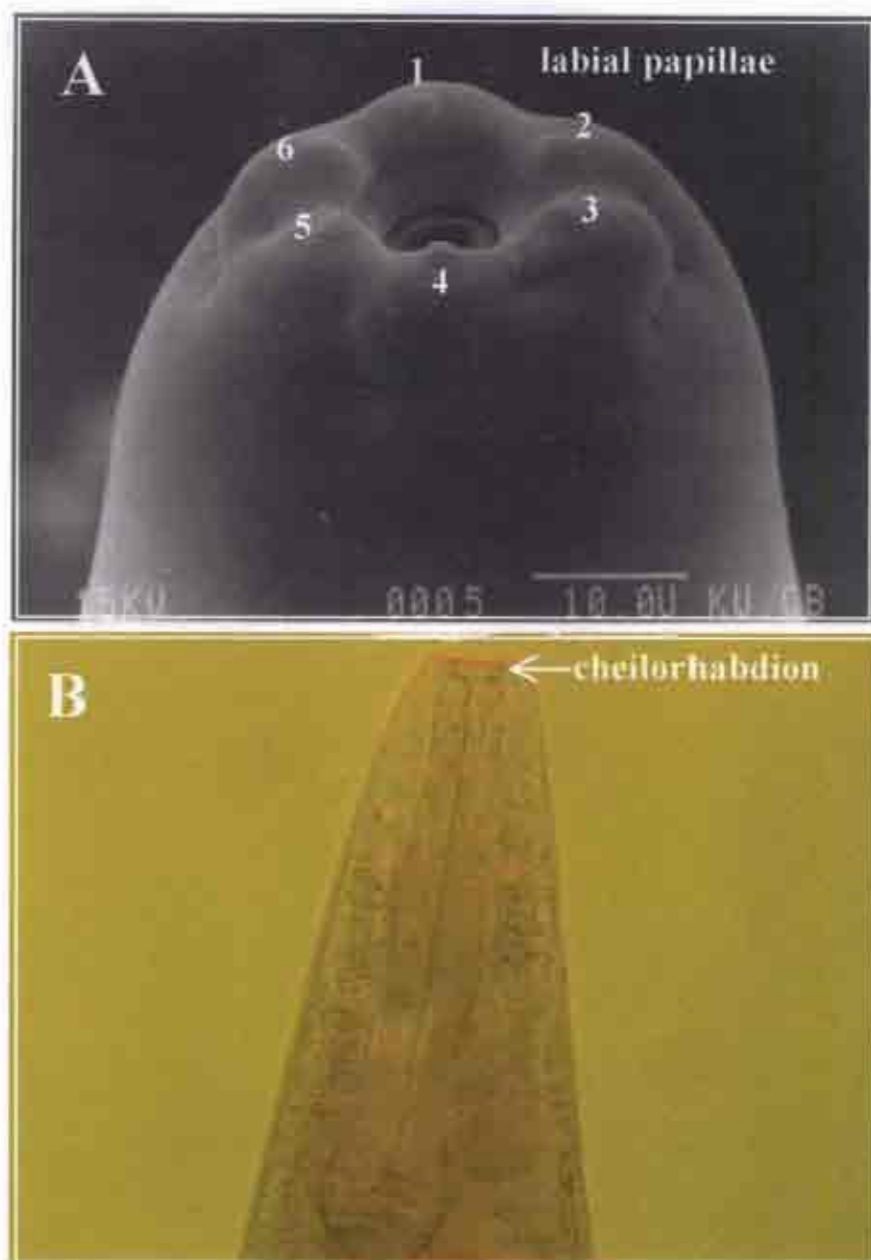


Figure 9 SEM and light micrographs of *Steinernema thailandensis* n. sp., female. A) Anterior region showing six labial papillae. B) Head of the first-generation female showing thickened cheilorhabdions.

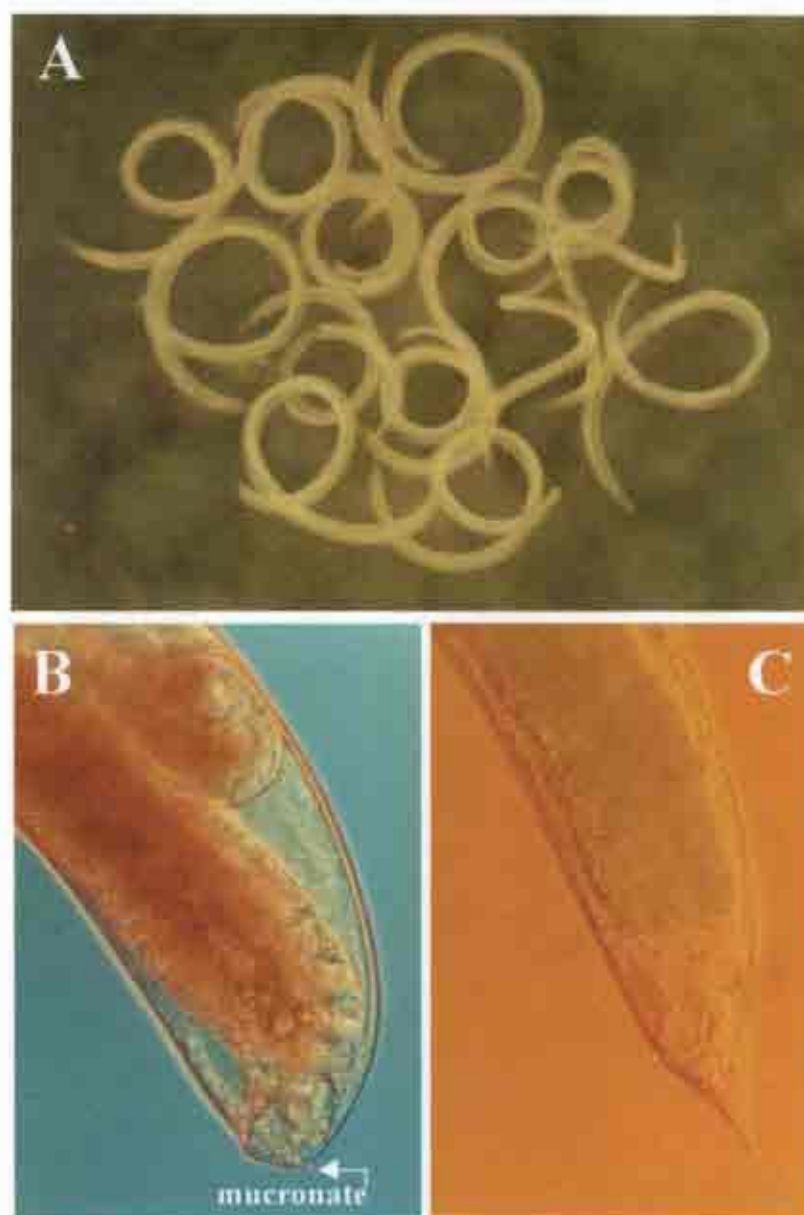


Figure 10 Light micrographs of *Steinernema thailandensis* n. sp., female. A) Spiral-shaped bodies when heat-killed. B) Tail of the first generation female. C) Tail of the second generation female.

2.2 Molecular taxonomy

The restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region of the rDNA repeat produced restriction fragment bands unique to the new species when compared to that of *S. carpocapsae* (Figure 11). PCR amplified products from the ITS region digested with 17 restriction enzymes showed that the RFLP pattern of *S. thailandensis* n. sp. was obviously different from that of *S. carpocapsae*.

Although the majority of the restriction enzyme profiles for *S. thailandensis* n. sp. were identical to that of the *S. carpocapsae*, its *Alu* I, *Dde* I, *Hind* III, *Rsa* I, and *Xba* I profiles were distinct. The Thai steinernematid nematode was similar to *S. feltiae* in its profile yielded by digestion with *Alu* I, while that of *S. carpocapsae* was different.

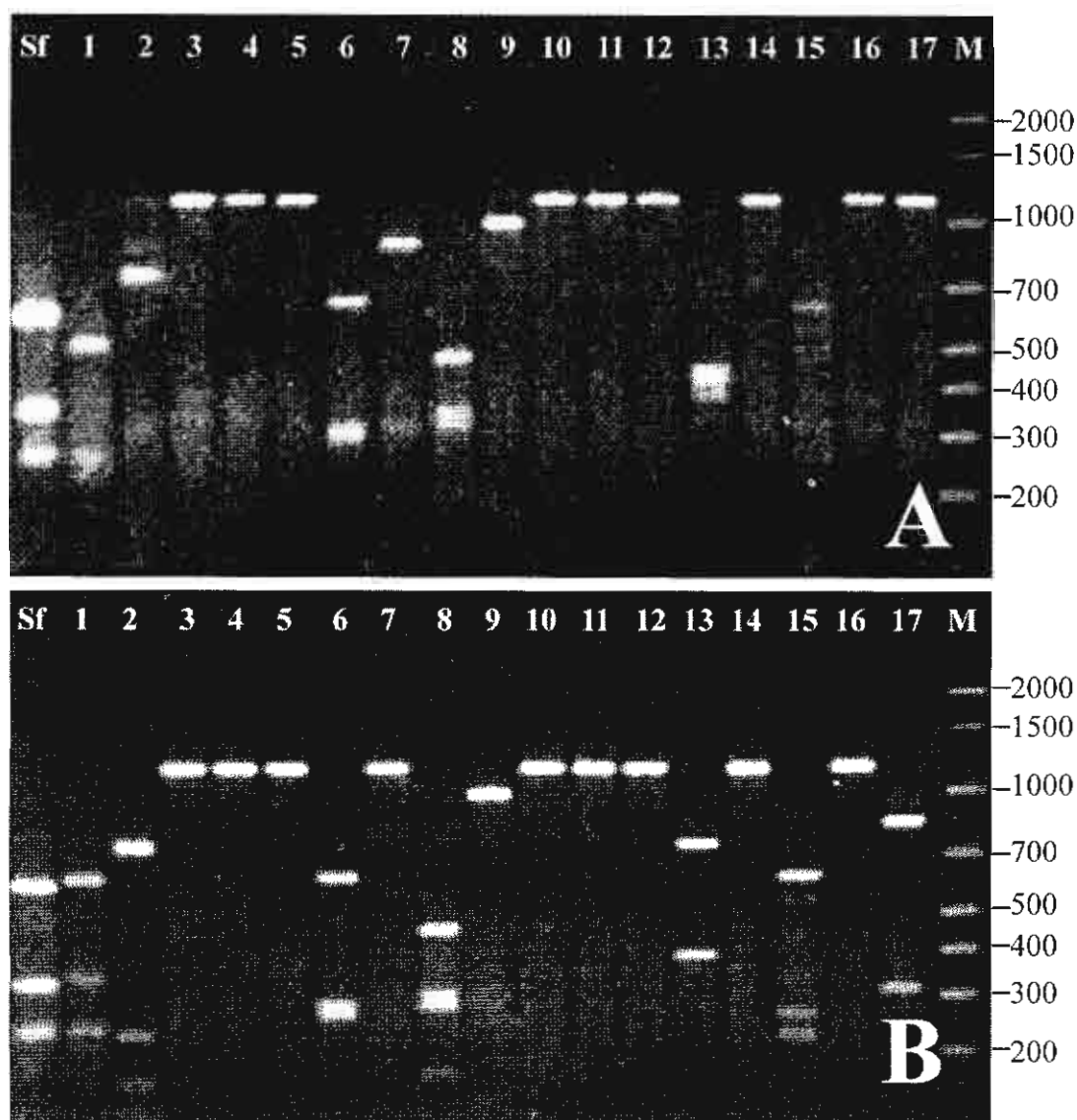


Figure 11 RFLP profiles of two steinernematid isolates digested with 17 different restriction enzymes. (A) *Steinernema carpocapsae*. (B) *S. thailandensis* n. sp. Sf lane is the digest of *S. feltiae* with *Alu* I. Lane 1-17 are digested of each isolate with the following restriction enzymes : 1, *Alu* I; 2, *Dde* I; 3, *EcoR* I; 4, *EcoR* II; 5, *Hae* III; 6, *Hha* I; 7, *Hind* III; 8, *Hinf* I; 9, *Hpa* II; 10, *Kpn* I; 11, *Pst* I; 12, *Pvu* II; 13, *Rsa* I; 14, *Sal* I; 15, *Sau3A* I; 16, *Sau96* I; and 17, *Xba* I. M, molecular weight marker. A band sizes are shown in base pairs.

Diagnosis and relationships

Steinernema thailandensis n. sp. can be separated from *S. kushidai* (Mamiya), *S. scapterisci* (Nguyen and Smart), *S. carpocapsae* (Weiser), *S. abbasi* (Elawad, Ahmad and Reid), *S. rarum* (De Doucet) and *S. ritteri* (Doucet & Doucet) which are members of a group with the length less than 600 μm by morphological characters.

Morphologically, the average length of *S. thailandensis* n. sp. (432 μm) infective juveniles was different from those of *S. kushidai* (589 μm), *S. scapterisci* (572 μm), *S. carpocapsae* (558 μm), *S. abbasi* (541 μm), *S. rarum* (511 μm), and *S. ritteri* (510 μm) (Table 2). It was the shortest of all the currently described *Steinernema* spp. E% (distance from the anterior end to the excretory pore divided by the tail length x 100) of the infective juveniles of *S. thailandensis* n. sp. did not overlap those of *S. carpocapsae*, *S. rarum* and *S. kushidai*, but it somewhat overlapped those of *S. scapterisci* and *S. abbasi*. The juvenile of *S. thailanensis* n. sp. was short-tailed and its lateral field composing of 6 longitudinal ridges. The male can be separated from those of the other *Steinernema* species by the long spicule lengths of 84 and 74 μm in first and second generations, respectively, and by the strongly curved spicules. Its gubernaculum was large and slender, 3/4 of the length of the spicule. The first and second generation females had protruding vulval lips and both with double-flapped epiptygmas.

Morphological characterization results of the infective-stage juveniles and adults of the Thai nematode isolate did not fit the descriptions of currently recognized species of steinernematid nematodes.

Thus conclusively, identification of species of the Thai steinernematid nematode was determined on the basis of the following characteristics : 1) average length of infective-stage juveniles, 2) tail length of infective-stage juveniles, 3) the D% (the distance from the anterior end to the excretory pore divided by the esophagus x 100) and E% (the distance from the anterior end to the excretory pore divided by the tail length x 100) of infective juveniles, 4) spicule length of males, 5) spicule shape, and 6) double-flapped epiptygma of first and second generation females.

From the studies, this nematode species could be identified as a new species on morphological characters as well as on the DNA characters. DNA examination indicated the distinctness of *S. thailandensis* n. sp. when compared with populations of *S. carpocapsae*.

Table 2 Comparison of morphometric characters of infective-stage juveniles and males of *Steinernema thailandensis* n. sp. and other *Steinernema* spp.

Species	Infective-stage juveniles			Males		Reference
	Body length (μm)	Tail length (μm)	D% (μm)	E% (μm)	Gubernaculum (μm)	
<i>S. kushidai</i>	589 (524-662)	50 (44-59)	41 (38-44)	92 (84-95)	63 (48-72)	44 (39-60) Mamiya, 1988
<i>S. scapterisci</i>	572 (517-609)	54 (48-60)	31 (27-40)	73 (60-80)	83 (72-92)	65 (59-75) Nguyen & Smart, 1990
<i>S. carpocapsae</i>	558 (438-650)	53 (46-61)	26 (23-28)	60 (54-66)	66 (58-77)	47 (39-55) Weiser, 1955
<i>S. abbasi</i>	541 (496-579)	56 (52-61)	53 (51-58)	86 (79-94)	65 (57-74)	45 (33-50) Elawad <i>et al.</i> , 1997
<i>S. rarium</i>	511(443-573)	51 (44-56)	35 (30-39)	72 (63-80)	47 (42-52)	34 (23-38) De Doucet, 1986
<i>S. ritteri</i>	510 (470-590)	49 (44-54)	46 (44-50)	88 (79-97)	69 (58-75)	44 (33-50) Doucet & Doucet, 1990
<i>S. thailandensis</i> n. sp.	432 (404-460)	42 (37-47)	33 (30-37)	83 (75-91)	84 (73-89)	67 (61-79) -

Notes : D%, distance from anterior end to excretory pore divided by distance from anterior end to esophagus x 100; E%, distance from anterior end to excretory pore divided by the tail length x 100.

3. Biology of the nematode

3.1 Life cycle

The life cycle of *S. thailandensis* n.sp. is comparable to existing species of *Steinernema*, including an egg, four juvenile stages, and adults (male and female). It took four days at 30°C for the infective juvenile (IJ) to enter the haemocoel of *G. mellonella*, release its associated bacterium, complete its first generation and develop to become the IJ again (Figure 12).

The IJ invaded the host through the mouth or spiracles, and penetrated into the haemocoel. The body of the IJ became wider, and its stoma were open. It secreted toxin which inhibited the insect inducible immune system. It also released its insect-pathogenic bacterial symbiont through the anus into the haemocoel of the host. This process took less than 12 hours after the IJ entered the host. The insect died 16-20 hours after infection. After 24 hours, IJ molted to the fourth-stage juvenile (J4). The body width of the J4 increased much faster than its length did until it became almost as wide as the young male and female. Then the young male and female developed to become the first generation adult males and females in 48 hours after entering the host. These adults mated and the female laid eggs initially, but later the eggs were retained and hatched in her body. Some 12-24 hours later, the first-stage juvenile (J1) molted and broke out of female body and moved into the haemocoel of the insect. Some of the J1 molted to second-stage juvenile (J2), which later became preinfective J2 and to the IJ in 12-24 hours.

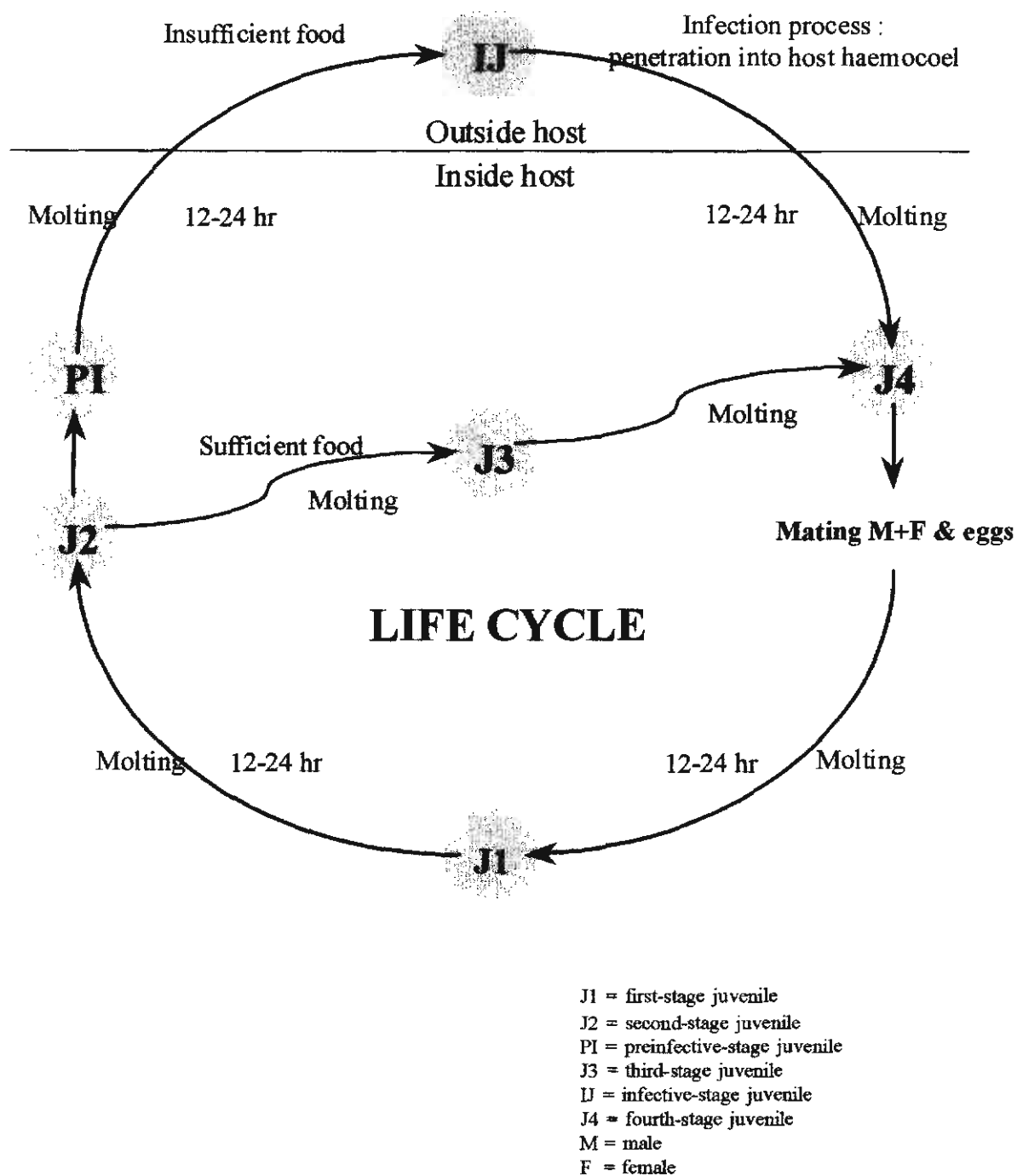


Figure 12 Life cycle of *Steinernema thailandensis* n. sp. at 30 °C.

3.2 Effect of temperature on the life cycle

Temperature was found effecting the growth rate and maturation of *S. thailandensis* n. sp. in *G. mellonella* (Table 3).

At 15 °C, the IJs poorly developed into the J4 stages. The J4 first appeared at 3.6 % after 48 hours and they never reached the adult stage because all died within 144 hours after exposure to the hosts. The infected host did not die after 144 hours.

At 20 °C, the IJs developed into the J4, and the first-generation males and females at 85.8 % and 14.2 %, respectively, in 48 hours. After 96 hours, most of the first-generation adults had already mated, and laid some eggs . The J1 emerged from the female bodies, and the J2 and J3 were observed inside the *Galleria* cadavers within 120 hours after exposure.

At 25 °C, the IJs developed into the J4 at 52.5 % within 24 hours and then developed into the first-generation males and females in 48 hours after exposure. In 144 hours, the second-generation adults were observed at 1.7 %.

At 30 °C, the IJs developed into adult males and females at 4.3 % in 24 hours after exposure to the hosts. J1 and J2 from the first-generation females first appeared in 72 hours and J3 were found in 96 hours. In 144 hours, 2.9 % of the second-generation adults were present and some of these females contained J1.

At 35 °C, the first-generation males and females first appeared in 24 hours at 2.6 %. Adults started mating and produced eggs in 72 hours after exposure. The J1, J2 and J3 were found inside the *Galleria* cadavers within 96 hours. The

Table 3 Development of *Steinernema thailandensis* n. sp. in *Galleria mellonella* at different temperatures.

Temperatures °C	Stages of nematode	Development percentage at different durations (hours)					
		24	48	72	96	120	144
15	IJ	100	96.4	80.0	72.2	66.7	63.3
	J4	0	3.6	20.0	27.8	33.3	36.7
20	IJ	84.2	0	0	0	0	0
	J4	15.8	85.8	53.6	27.0	23.0	17.4
	Adults (G1)	0	14.2	46.4	73.0	97.4	52.2
	J1 & J2	0	0	0	0	2.4	13.0
	J3	0	0	0	0	0.2	17.4
25	IJ	47.5	0	0	0	0	0
	J4	52.5	11.1	17.7	6.7	11.0	12.3
	Adults (G1)	0	88.9	82.3	93.3	85.4	13.4
	J1 & J2	0	0	0	0	2.4	60.0
	J3	0	0	0	0	1.2	12.6
	J4	0	0	0	0	0	0
	Adults (G2)	0	0	0	0	0	1.7
30	IJ	18.8	9.9	0	0	0	0
	J4	76.9	23.2	0	0	0	0
	Adults (G1)	4.3	66.9	78.8	5.2	2.0	0
	J1 & J2	0	0	21.2	93.0	88.2	72.6
	J3	0	0	0	1.8	5.8	20.0
	J4	0	0	0	0	4.0	4.5
	Adults (G2)	0	0	0	0	0	2.9
35	IJ	62.1	21.7	0	0	0	0
	J4	35.5	0	0	0	0	0
	Adults (G1)	2.6	78.3	100.0	40.0	30.8	30.9
	J1 & J2	0	0	0	50.7	42.3	55.6
	J3	0	0	0	9.3	7.7	10.3
	J4	0	0	0	0	19.2	2.2
	Adults (G2)	0	0	0	0	0	1.0
38	IJ	100.0	42.8	16.7	22.8	34.6	20.0
	J4	0	28.6	60.3	58.6	38.9	45.7
	Adults (G1)	0	38.6	23	18.6	26.5	34.3

Notes : G1 = first-generation; G2 = second-generation.

second-generation adults were present in 144 hours at 1.0 % and some of these females contained J1.

At 38 °C, the IJs did not develop in 24 hours after exposure to the hosts. This temperature affected the development cycle of the nematodes. However, the nematodes reached the adult stage but males and females became adults without mating and producing eggs. Some of the dead adults were found in dissected *Galleria*.

It was shown from the results that 30 °C was the optimum temperature for the enhancement of the growth rate and maturation of *S. thailandensis* n. sp.

3.3 Effect of temperature on the sex ratio

Temperature also affected the sex ratio of *S. thailandensis* n.sp. in *G. mellonella*. The ratios of the total number of first-generation females to that of the males developed in dissected *Galleria* at different temperatures were significantly different according to Duncan's Multiple Range Test (Table 4).

At 20, 25, 30 and 35 °C, the first-generation female/male ratio was 2.2 : 1 (13/6), 1.8 : 1 (83/46), 4.6 : 1 (106/23) and 3.2 : 1 (71/22), respectively. The total number of females was highest at the 30 °C. From microscopic observations, it was shown that one male could mate with more than one female. Consequently, the greater number of females at 30 °C could produce more of the IJ.

At lower temperature, the total number of adults was found to be increased when the temperature was increased, i.e. from 20 °C to 25 °C, the total number of adults increased from 19 to 129 per one dissected *Galleria*. On the

Table 4 Number of first-generation females and males of *Steinernema thailandensis* n. sp. at 20, 25, 30 and 35 °C in *Galleria mellonella*.

Temperature °C	Total adults/insect ^{1/}	No. of first generation adults $\pm$ SE ^{1/} Range ^{2/}	
		Female	Male
20	19	13 $\pm$ 3 d ^{3/} (9-19)	6 $\pm$ 3 c (2-12)
25	129	83 $\pm$ 11 b (59-101)	46 $\pm$ 7 a (36-58)
30	129	106 $\pm$ 17 a (76-132)	23 $\pm$ 6 b (15-33)
35	93	71 $\pm$ 10 c (56-86)	22 $\pm$ 4 b (17-30)

^{1/} = mean, averaged from 10 insects; ^{2/} = a range of numbers found in 10 insects; ^{3/} = numbers with the same letters in the same column are not significantly different at 5 % level, according to Duncan's Multiple-Range Test.

other hand, the total number of adults decreased when the temperature was increased at higher temperature, i.e. from 30 °C to 35 °C, the total number of adults decreased from 129 to 93 per one dissected *Galleria*.

3.4 Effect of temperature on the nematode infection

At the temperatures of 15, 20, 25, 30, 35, and 38°C, the number of infective juveniles per insect found were 7.1, 7.4, 43.4, 65.7, 39.2 and 12.7 %, respectively. The mortality percentages at those temperatures after 24 hours exposure were 0, 0, 80, 100, 100 and 0 %, respectively. At 38 °C, the infection percentage was decreased. The nematode infected well at 25, 30 and 35 °C as shown by the average numbers of infective juveniles of 130, 197 and 118, respectively in the dissected *Galleria* within 24 hours. The greatest average number of the infective juveniles was found at 30 °C at 65.7 % of infective juveniles per insect (Figure 13).

Laboratory studies indicated that *S. thailandensis* n. sp. caused high mortality against the test insect under different temperature ranges. At lower temperatures of 15 and 20 °C and at higher temperature of 38 °C, the nematode could not kill the insect within 24 hours but at 25, 30 and 35 °C it caused 80, 100 and 100 % mortality, respectively (Figure 13).

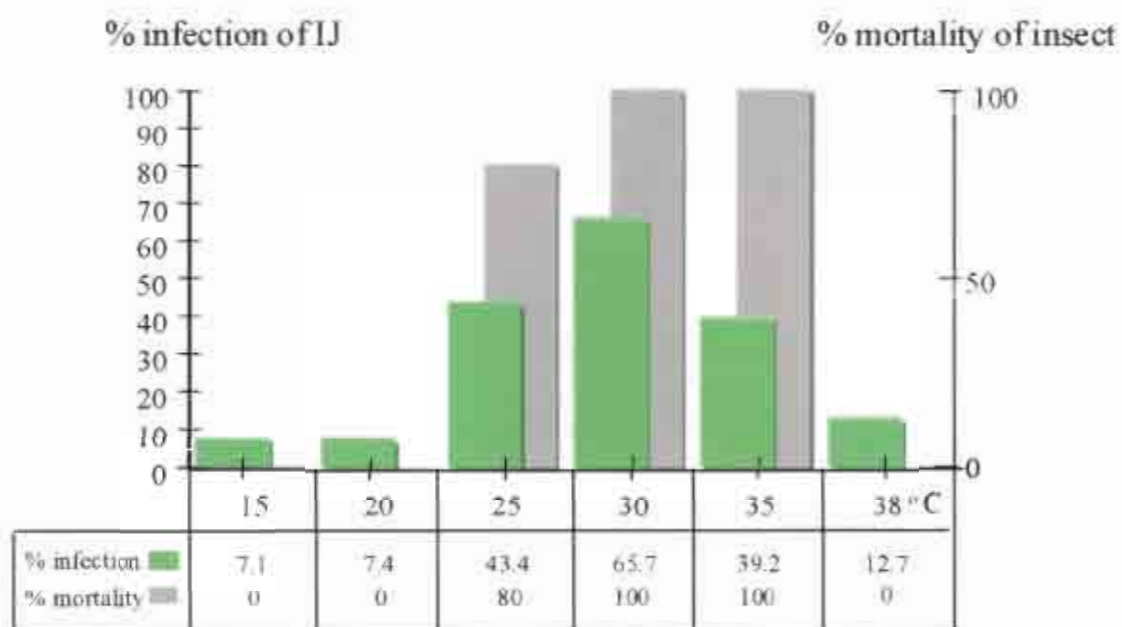


Figure 13 The infection percentage of the infective juvenile (*Steinernema thailandensis* n. sp.) and mortality of the test insect (*Galleria mellonella*) after 24 hours at different temperatures.

3.5 Symbiotic bacteria

The bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematode, *S. thailandensis* n. sp. was examined. The third-stage infective juveniles of *S. thailandensis* n. sp. contained the cells of a symbiotic bacterium in the intestine lumen. The bacterium was isolated from a drop of haemolymph of nematode-infected *G. mellonella* larvae. It was found similar to *Xenorhabdus* sp. The morphological characters of the colony were granulate, convex, opaque and circular with irregular margin. The primary form of the symbiotic bacterium of *S. thailandensis* n. sp. was characterized by the absorption of bromthymol blue (BTB) from NBTA medium and with clear zone around the colony (Figure 14). The secondary form performed no BTB absorption, red colony and no clear zone. Insect cadavers parasitized by this nematode-bacterium complex presented a black coloration.



Figure 14 Colony of the symbiotic bacterium (*Xenorhabdus* sp.) isolated from *Steinernema thailandensis* n. sp. showing bromthymol blue (BTB) absorption and clear zone around the colony.

4. Pathogenicity

4.1 Insect bioassay

Pathogenicity test indicated that *S. thailandensis* n. sp. with the symbiotic bacterium was highly virulent against *G. mellonella*. The effect of different nematode dosages on the insect mortality was significant, as summarized in Table 5.

A new nematode isolate from Thailand was highly pathogenic in its host. At a dosage of 10 : 1 (IJs/insect), most number of nematodes were moving towards the opening of the test insect and killed 53 % of the insect in the shortest time of 24 hours. This treatment was significantly different from the other treatments. From the treatments with 4 : 1, 6 : 1 and 8 : 1 IJs per insect, the insects were killed at least 50 % within 36 hours. Figure 15 showed the relationships among time, insect mortality and nematode population. The nematode could kill the insect more rapidly when its number was increased. The mortality percentage was also increased when the time exposed to the insect was increased.

Table 5 Mortality of *Galleria mellonella* infected with *Steinernema thailandensis* n. sp. at different doses and times.

Doses (IJ : insect)	Mortality of <i>Galleria mellonella</i> (%)			
	12 hours	24 hours	36 hours	48 hours
0 : 1 (control)	0 c ¹	0 d	0 c	0 d
4 : 1	6.7 c	13.3 c	50.0 b	53.3 c
6 : 1	20.0 b	26.7 b	56.7 b	63.3 b
8 : 1	23.3 b	33.3 b	56.7 b	63.3 b
10 : 1	43.3 a	53.3 a	73.3 a	83.3 a
CV. (%)	24.0	26.3	13.4	9.8

¹ Numbers with the same letters in the same column are not significantly different at 5 % level, according to Duncan's Multiple-Range Test.

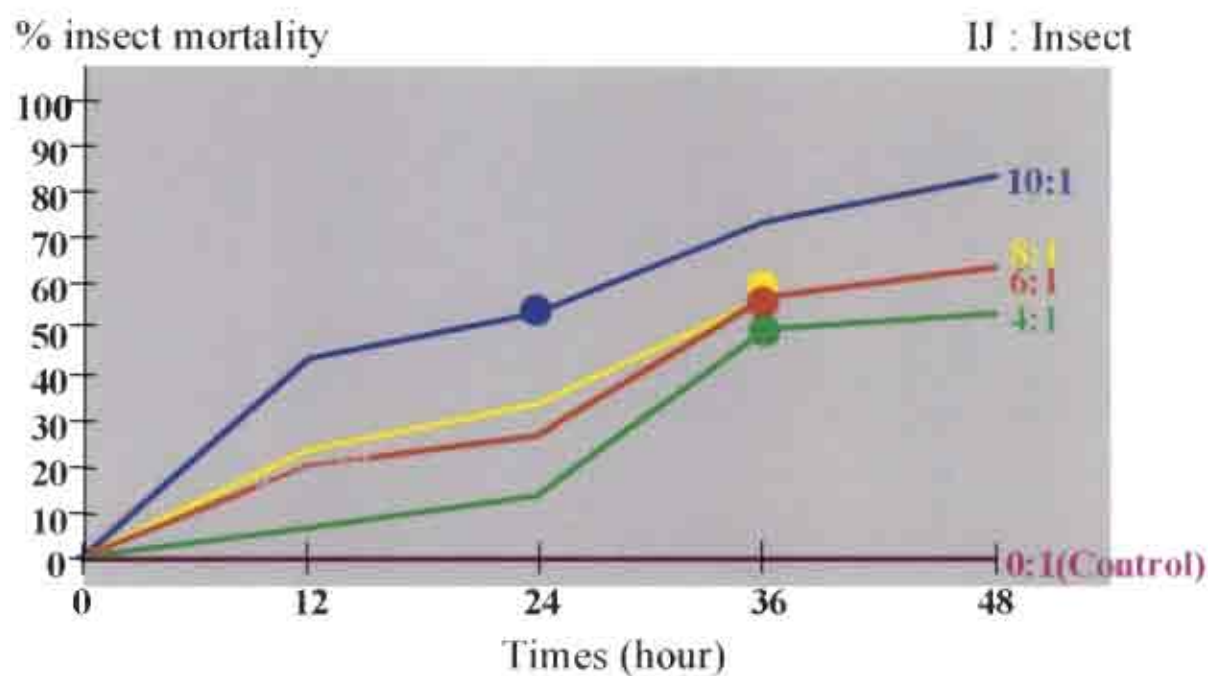


Figure 15 Relationships among time, mortality percentage of *Galleria mellonella*, and population of *Steinernema thailandensis* n. sp.

4.2 Heat tolerance

Heat tolerance test of *S. thailandensis* n. sp. and *S. carpocapsae* from the U.S. was investigated against *G. mellonella* at various temperatures. From the results, temperature seemed to have high effect on insect death. At both 30 and 35 °C, *S. thailandensis* n. sp. caused insect death of 100 % within 22 hours, while *S. carpocapsae* caused insect death 100 % at 30 °C within 30 hours. At both 35 and 38 °C, none of *S. carpocapsae* died within 48 hours. At 15 °C, none of both *S. thailandensis* n. sp. and *S. carpocapsae* died within 48 hours. At the highest temperature of 38 °C, the infective juveniles of *S. thailandensis* n. sp. still could kill the insect at 30 hours, but no 100 % mortality at 48 hours (Figure 16).

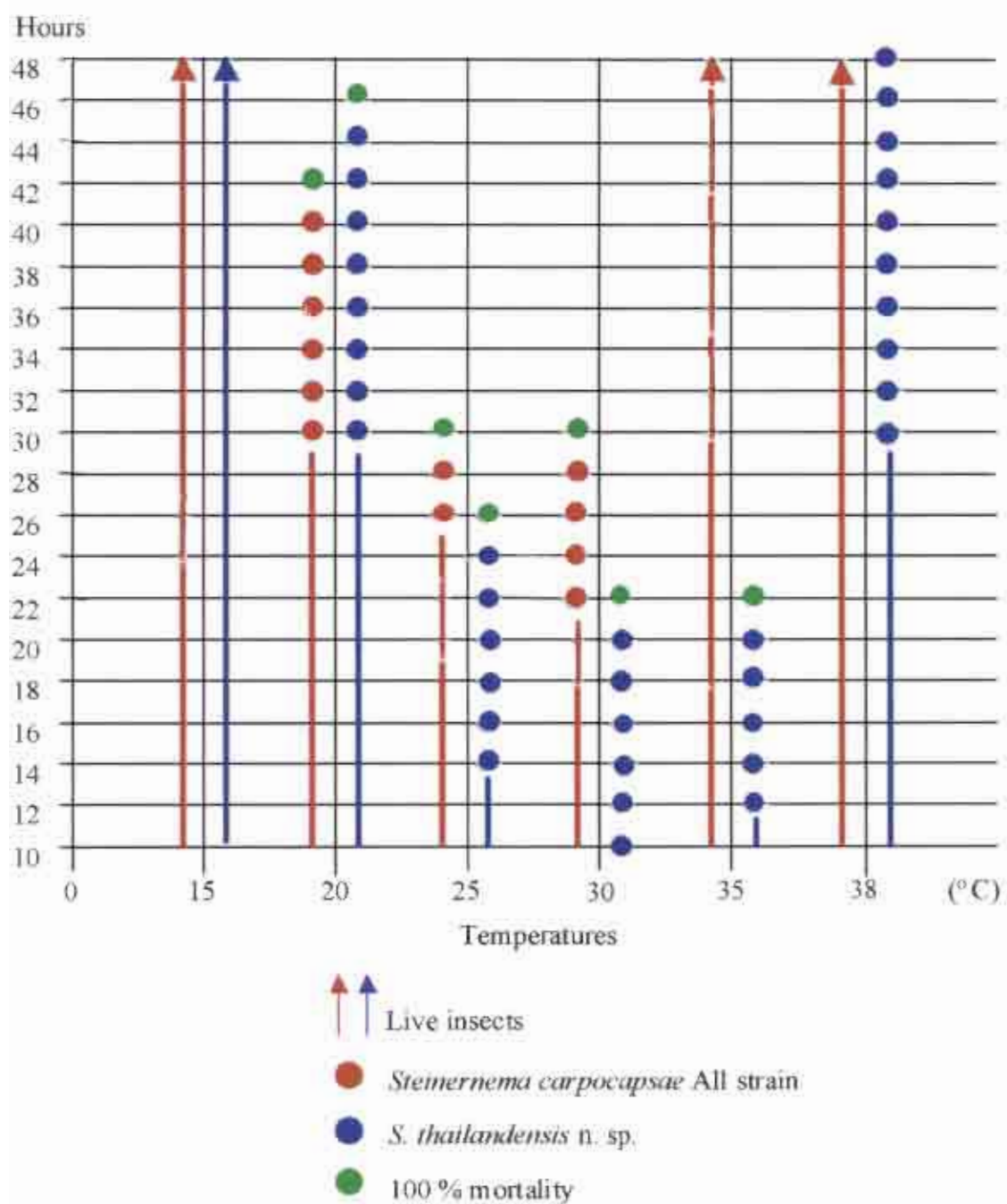


Figure 16 Mortality of *Galleria mellonella* exposed to *Steinernema carpocapsae* All strain and *S. thailandensis* n. sp. at different temperatures.

5. Mass rearing

Nematode counts of infective-stage juveniles were conducted in five samples collected from modified culture media compared with those in lipid agar (LP). The numbers of infective juveniles produced in 20 g medium of soybean milk (SM), wheat flour (WF), soybean flour (SF), corn syrup (CS) and corn flour (CF) were shown in Figure 17.

The yield of infective juveniles was very high in the media containing soybean, reaching approximately 6×10^5 per 20 g medium. The major components of SM and SF were proteins and lipids which were necessary for the production of nematode progeny. Soybean milk and soybean flour at a concentration of 10 g per liter were supplemented to the media. Both culture media supported greater nematode reproduction than did the wheat or corn medium.

The bacterial symbionts are essential for successful mass culture of the nematodes. These bacteria multiplied on artificial media and the nematodes feed on the bacterial cells and other necessary nutrients to reproduce large numbers of offsprings. *S. thailandensis* n. sp. could be reared in soybean media. However, the yield of this nematode in lipid agar was higher than that in modified media. The nematode yield in SM and SF media were 661,400 and 615,000 per 20 g medium, respectively while in the lipid agar, the yield was 1,215,200 (Figure 17).

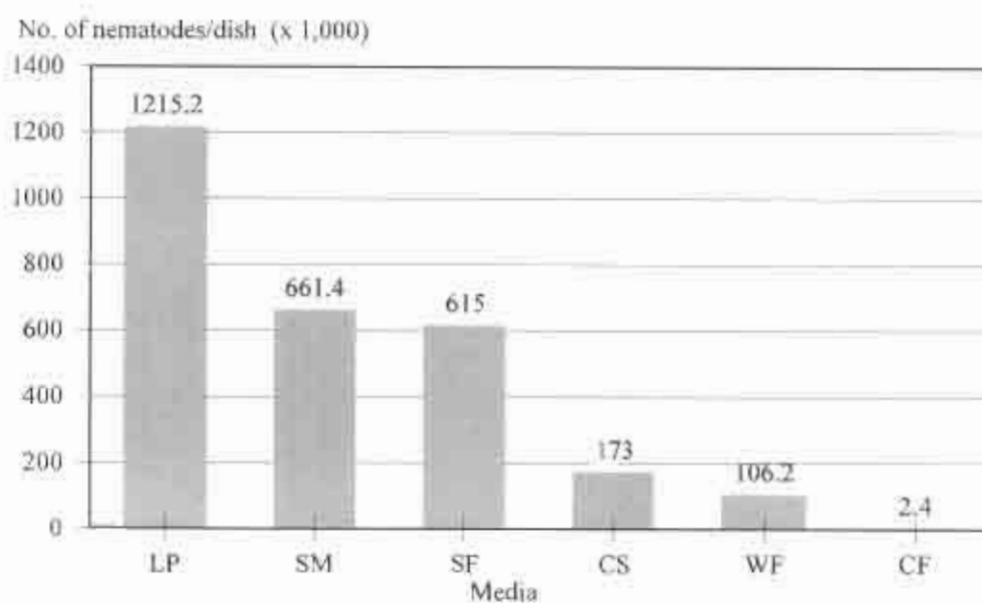


Figure 17 Population count of *Steinernema thailandensis* n. sp. reared on modified culture media compared to lipid agar medium (LP). The modified culture media are soybean milk (SM), soybean flour (SF), corn syrup (CS), wheat flour (WF), and corn flour (CF).

6. Potential for biological control

The infective juveniles of entomopathogenic nematodes have been observed to destroy a wide range of insect pests under laboratory conditions. The results of this experiment indicated that *S. thailandensis* n. sp. and its symbiotic bacterium had high potential to be a biological control agent of seven species of Lepidoptera, three species of Coleoptera, and one species each of Isoptera, Homoptera and Blattoidea. The nematode was effective in killing all of these insect pests species in the laboratory tests (Table 6).

S. thailandensis n. sp. exhibited a higher degree of controlling insects in the order Lepidoptera than controlling those in the other orders. The percentage of mortality in an insect was achieved after exposure to the infective juveniles for 24 hours. One hundred percent mortality was individually found in the larvae of *H. duplifacialia* and *G. mellonella*. The larvae of *S. litura*, *S. exigua*, *P. xylostella* and *H. armigera* died at 55.6, 60.0, 88.9 and 91.7 %, respectively. In Lepidoptera, dissection of infected insect larva showed that the first generation of nematode could develop within 3-4 days. In dead or infected insect larva, it could be seen in all parts of the cadaver when the host cuticle was partially removed to expose the nematodes (Figure 18). In Coleoptera, the mortality percentage of an unidentified mushroom beetle, the flea beetle (*P. sinuata*) and an unidentified scarab beetle were approximately 100, 33.0 and 20.0 %, respectively. The cadavers of unidentified scarab beetle when parasitized by this nematode produced wrinkled and black coloration in its body (Figure 19). In Homoptera, the mortality percentage of the aphid, *Myzus persicae* was 44.4 %. The infective juveniles of this nematode entered the natural openings and penetrated into the body cavity of the aphid, and caused insect death. The household affecting insects, *Coptotermes* sp. and *P. americana* also died at 42.1 and 57.1 % at 24 and 48 hours, respectively (Figure 20).

Table 6 Mortality of various insect species when exposed to *Steinernema thailandensis* n. sp.

Insect species	Treated			Control			Mortality (%) ^E
	Tested (n)	Dead (n)	Alive (n)	Tested (n)	Dead (n)	Alive (n)	
Lepidoptera							
<i>Spodoptera litura</i>	10	6	4	10	1	9	55.56
<i>S. exigua</i>	10	6	4	10	0	10	60.00
<i>Plutella xylostella</i>	45	42	3	30	3	27	88.89
<i>Heliothis armigera</i>	25	23	2	25	1	24	91.67
<i>Henedecasis duplifacialis</i>	12	12	0	10	2	8	100.00
<i>Galleria mellonella</i>	50	50	0	50	0	50	100.00
Coleoptera							
mushroom beetle	10	10	0	10	0	10	100.00
<i>Phyllotreta sinuata</i>	15	5	10	15	0	15	33.33
scarab beetle	5	1	4	5	0	5	20.00
Homoptera							
<i>Myzus persicae</i>	35	20	15	35	8	27	44.44
Isoptera							
<i>Coptotermes</i> sp.	30	19	11	30	11	19	42.11
Blattoidea							
<i>Periplaneta americana</i>	14	8	6	14	0	14	57.14

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

Lepidoptera



Figure 18 Mortality of some Lepidopterous insects infected by *Steinernema thailandensis* n. sp.

Coleoptera



Figure 19 Mortality of unidentified mushroom beetle and scarab beetle, and *Phyllotreta sinuata* infected by *Steinernema thailandensis* n. sp.

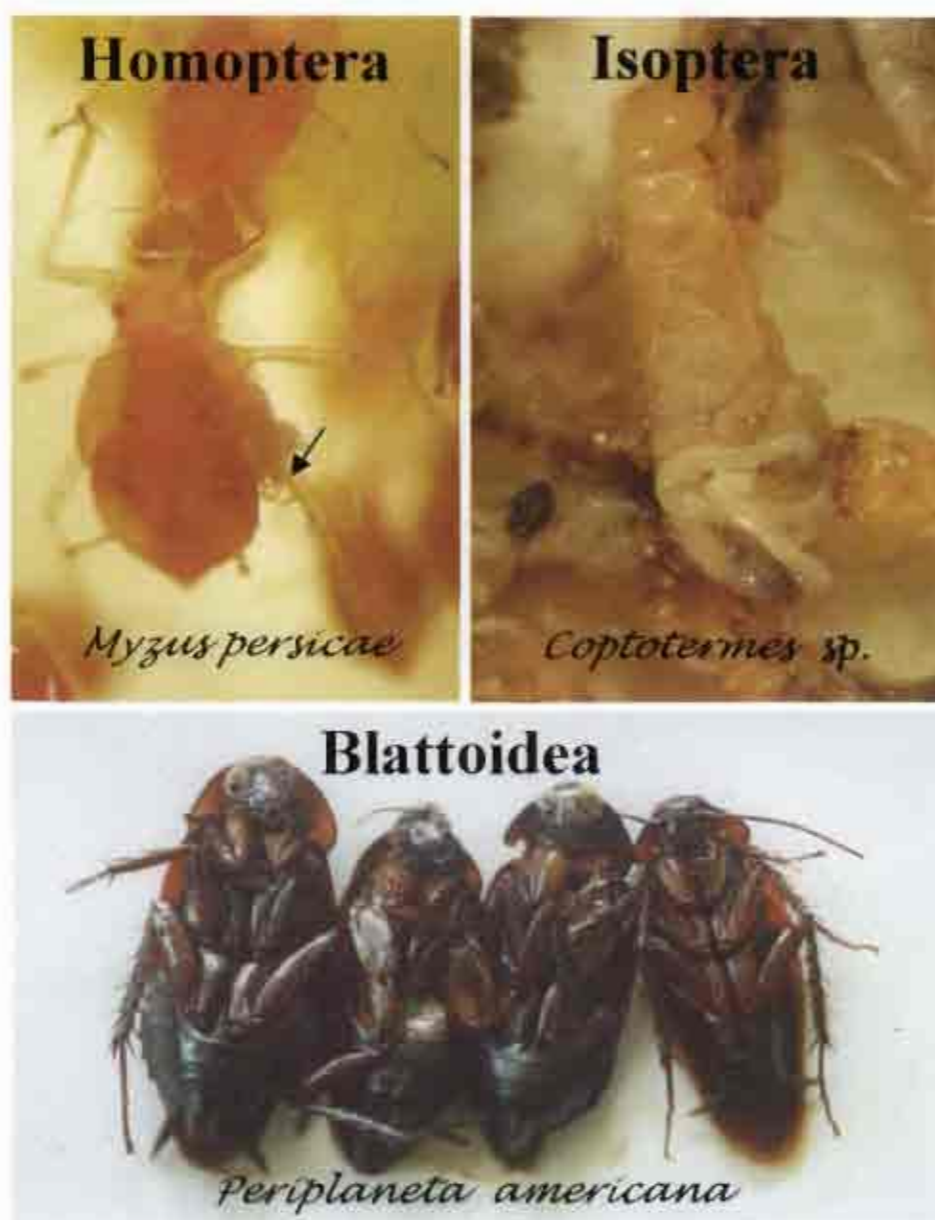


Figure 20 Mortality of *Myzus persicae*, *Coptotermes* sp. and *Periplaneta americana* infected by *Steinernema thailandensis* n. sp.

DISCUSSION

The aim of this study was to obtain a tropically adapted entomopathogenic nematode from Thailand. It was the first extensive survey in Thailand and the first record of the Thai species of *Steinernema* which proved to be a potential biological control agent of certain insect pests in the tropical region. Occurrence of this entomopathogenic nematode was low and restricted to a coconut field in which it was recovered from 1 out of 98 soil samples. The recovery rate of this entomopathogenic nematode was considerably lower than those of 37-48 % which were obtained from the surveys conducted in the European temperate zone (Hominick *et al.*, 1995). The steinernematid was recovered from the high temperature soil and it could survive well in the dry and hot environments in Kanchana Buri province, western Thailand. Soil temperature was one of the important factors determining the abundance of nematodes in the soil. Since the nematode was recovered from the high temperature soil (33 °C at soil surface and 27 °C at 10-15 cm soil depth), this collected isolate may be considered as a heat tolerant strain. It is similar to *S. riobrave* from Texas, USA where its global positions were latitude 26 degrees 08.155'N, longitude 97 degrees 57.366'W, and altitude 21.7 m above mean sea level (Cabanillas *et al.*, 1994).

The new nematode described here was named *S. thailandensis* n.sp. after the country where the species was discovered. It belongs to the same steinernematid as *S. kushidai*, *S. scapterisci*, *S. carpocapsae*, *S. abbasi*, *S. rarum*, and *S. ritteri*, which can be easily distinguished from the other species by the length of the infective-stage juveniles (Nguyen and Smart, 1996). Also, they were separated as a new group because of morphological differences in the body length, D% and E% of the third-stage infective juvenile.

S. thailandensis n. sp. was most similar to *S. carpocapsae* (Weiser, 1955) and *S. scapterisci* (Nguyen and Smart, 1990) in the general morphology of the infective juveniles, adult males and females, but it can be separated from these species by a combination of certain morphological characters. The average length of the infective juveniles of *S. thailandensis* n.sp. (432 μm) was different from those of *S. carpocapsae* (558 μm) and *S. scapterisci* (572 μm). However, range of the total length of *S. thailandensis* n. sp. (404-460 μm) overlapped more or less with *S. carpocapsae* (438-650 μm) and *S. rarum* (443-573 μm).

The third-stage juveniles of *S. thailandensis* n. sp. differed from *S. carpocapsae* in the tail length (37-47 μm vs 46-61 μm), by the ratio b (3.8-4.3 vs 4.0-4.8), D% (30-37 vs 23-28) and E% (75-91 vs 54-66) values. The third-stage infective juveniles of this Thai species could be separated from *S. scapterisci* by the tail length (37-47 μm vs 48-60 μm). Males could also be distinguished from both *S. carpocapsae* and *S. scapterisci* by the shape and size of the spicule and gubernaculum. The first and second generation females of the new species had protruding vulval lips and both with double-flapped epiptygmas which is different from females of *S. carpocapsae*.

S. thailandensis n. sp. is morphologically similar to *S. siamkayai*, a Thai steinernematid previously recovered from Phetchabun province, northern Thailand (Stock *et al.*, 1997). *S. thailandensis* n. sp. differed from *S. siamkayai* in the tail length of the infective-stage juvenile (37-47 μm vs 31-41 μm) and the E% (75-91 vs 85-112). Morphological characters are not always reliable because many characters have wide ranges in size, especially when dealing with very small samples (Reid, 1994).

DNA examination indicated the distinctness of a new species. Obviously, the RFLP profiles for *S. thailandensis* n. sp. were distinct from those of *S. carpocapsae* (All strain), *S. siamkayai* (Stock *et al.*, 1997), *S. monticolum* (Yoshida *et al.*, 1998) and those of the uncharacterized *Steinernema* sp. from Malaysia (Stock *et al.*, 1997). From the comparison among the five steinernematids, *Steinernema* sp. (Malaysian isolate) revealed the most similarity of its RFLP profiles to those of *S. thailandensis* n. sp. Only its profiles yielded by those digestion with *Alu* I, *Hinf* I, and *Xba* I were distinct from those of *S. thailandensis* n. sp. *S. carpocapsae* was the second-most similar to *S. thailandensis* n. sp. in its profiles yielded by digestion with *Alu* I, *Dde* I, *Hind* III, *Rsa* I, and *Xba* I.

However, the new Thai steinernematid was different from *S. siamkayai* and *S. monticolum* when their DNAs were both digested with eight enzymes. The enzymes which showed different profiles of *S. siamkayai* were *Alu* I, *Dde* I, *Eco*R I, *Hha* I, *Hinf* I, *Rsa* I, *Sau*96 I, and *Xba* I (Stock *et al.*, 1997) while those showed different profiles of *S. monticolum* were *Alu* I, *Dde* I, *Hha* I, *Hinf* I, *Pst* I, *Sal* I, *Sau*3A I, and *Xba* I (Yoshida *et al.*, 1998).

Results from this study indicated that there is a natural distribution of steinernematids in Thailand the same as in Japan (Yoshida *et al.*, 1998) due to the climatic and geographic variations. Since it is shown that the genomic DNA of *S. thailandensis* n. sp. which was recovered from the soil under a coconut tree in the hot and dry Kanchana Buri province is greatly different from that of *S. siamkayai* which was recovered from the soil under a sweet tamarind tree in the cooler Phetchabun province.

The use of RFLP analysis or DNA-band molecular technique was proved to be helpful to first determine the unidentified nematode isolate in this study. This technique is most reliable because it allows the examination of any stages of the life cycle as the genomic DNA of an organism remains constant throughout its life (Reid, 1994).

The life cycle of *S. thailandensis* n. sp. was similar to those of all other *Steinernema* species already described including eggs, four juvenile stages and adults. The third-stage infective juvenile entered the haemocoel of the insect to deliver the associated bacterium and completed at least two generations before emerging from the cadaver as infective juveniles. Its life cycle was temperature-dependent, it was not completed at lower temperature (15 °C) or at higher temperature (38 °C). The optimum temperature was approximately 30 °C, particularly in the *G. mellonella* adult where it developed within 36 hours and completed its life cycle in 4 days after initial infection. The optimum temperature and time for *S. arenarium* to complete its life cycle in both *G. mellonella* and *Otiorhynchus sulcatus* were 23 °C and 132 hours (Poinar and Kozodoi, 1988; Kakouli, 1995). Those for *S. carpocapsae* in the larch sawfly, *Cephalcia lariciphila* were 25 °C and 11 days (Georgis, 1981). Elawad *et al.* (1999) reported that the optimum temperature range for establishment of *S. abbasi* and *S. riobrave* was 25-30 °C. *S. abbasi* completed its development at 30 °C in 108 hours after initial infection. It was the shortest life cycle so far reported for a steinernematid. *S. riobrave* completed its life cycle after 5 days. Both species were the only steinernematids isolated from the semi-arid tropics.

S. thailandensis n. sp. appeared to be more active at higher temperature than *S. carpocapsae*. This nematode species was more high temperature tolerable and less low temperature tolerable than was *S. carpocapsae*. Kaya (1977) reported that *S. carpocapsae* strain DD-136 did not reproduce at 10, 15, or 30 °C and above.

At 15 °C, he found all stages of the nematode in dissected infected *Galleria* larvae, but no infective juvenile emerged up to 21 days. It reproduced well at 20 and 25 °C, with 25 °C was the optimum temperature. Danilov (1976) reported that the life cycle of *S. carpocapsae* strain Agriotos was completed at temperatures from 15 to 28 °C, but the cycle took 60 days to complete at 15 °C. The optimum temperature was 25 °C.

The greatest average number of the first generation females and males of *S. thailandensis* n. sp. produced in *Galleria* at both 25 and 30 °C was 129. It was approximately seven and one fold of the numbers produced at 20 and 35 °C, respectively.

This experiment studied the effect of different temperatures on infection ability of infective juveniles of *S. thailandensis* n. sp. Temperatures affected the number of infecting nematodes and the mortality of the test insect (*G. mellonella*). The numbers of infective juveniles which were found in the test insects at 15 and 20 °C were less than those found at the other temperatures. At 38 °C, the infection percentage was decreased. The infective juveniles infected well at 25, 30 and 35 °C. The greatest average number of infective juveniles in one insect was 197 at 30 °C. Under laboratory conditions, this new nematode species caused high mortality up to 100 % in the test insect at the temperature over 25 °C.

The reported bacterial symbionts of all known species of the family Steinernematidae are in the genus *Xenorhabdus* (Akhurst and Boemare, 1990). The symbiotic bacteria obtained are highly pathogenic to the host insects when released into the haemolymph by the nematodes. They supported nematode reproduction by producing nutrients and antimicrobial agents that inhibited the growth of a wide range of organisms (Akhurst, 1982). Four species have been described : *X. nematophilus*, *X. bovienii*, *X. poinarii* and *X. beddingii* (Akhurst and Boemare,

1990). The *Steinernema* has a specific natural association with only one *Xenorhabdus* species. But, the *Xenorhabdus* sp. may be associated with more than one nematode species, *X. bovienii* associated with *S. feltiae*, *S. kraussei*, *S. intermedia*, and *S. affinis* (Akhurst and Boemare, 1988). The bacterium from *S. thailandensis* n. sp. was isolated and cultured in the laboratory. It was identified as *Xenorhabdus* sp. by morphological characterization of its colony on NBTA agar-medium. Each steinernematid species has its own specific symbiotic bacterial strain or subspecies (Akhurst, 1982). Further studies on *Xenorhabdus* sp., associated with *S. thailandensis* n. sp. will be conducted to provide a more specific identification.

To determine the potential of a nematode as a biological control agent, it is essential to determine its bio-control level. Although 0-250 cells of the bacteria were found in the foregut of the nematode (Ehlers and Peters, 1995) and the entomopathogenic nematode at infective-stage juvenile is associated with the bacteria in inducing disease in the insect, the rapidity in killing the insect is not dependent solely upon the bacteria. It also depends upon the ability of the nematode to search the host insects as well as how fast the nematode can carry the bacteria into the insect blood system. From the laboratory bioassay, the least number of the infective juveniles of *S. thailandensis* n. sp. that could kill a *Galleria* at 50 % in 24 hours was 10. This capability was consistent in the three reported experiments. However, further bioassays on the methods for determining control quality of this nematode species is needed prior to field trials.

Bioassays on the selection of a heat tolerant Thai steinernematid were conducted to search an effective biological control agent of tropical insect pests. Temperature was one of the criteria affecting its success. *S. thailandensis* n. sp. is a heat-tolerant isolate which is similar to the species from Texas (*S. riobrave*) and Oman (*S. abbasi*) (Elawad *et al.*, 1999). It is a high temperature nematode, effective in killing

insects at the temperature above 35 °C. Other species from Europe, North USA, Japan, China, Russia, Australia, and New Zealand are not heat-tolerant because they are found in the temperate zone.

Steinernematids can be cultured on synthetic diet (Dutky *et al.*, 1964). Monoxenic mass culture techniques with the goal of producing, cost effectively, large numbers of infective nematodes have been used for several years (Dunphy and Webster, 1989). However, the effects of dietary components on nematode culture under monoxenic conditions were insufficiently known to enable optimum culture of nematodes. Throughout the study, as exemplified by the data from the modified media, monoxenic culture of the new Thai entomopathogenic nematode exhibited qualitative and quantitative differences in its response to 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 *G. mellonella* or on dog biscuit was 1 US\$ per million nematodes (Poinar, 1972). This experiment demonstrated that the cost of nematode production by using soybean milk and soybean flour was less than 41 baht per 50 dishes (1 liter). The total nematode yield was 33×10^6 and 31×10^6 in soybean milk and soybean flour, respectively. Consequently, the nematodes must be produced in very large number and at low cost.

The potential of *S. thailandensis* n. sp. against larvae and adults of 12 insect pests was tested under laboratory conditions. From the results, this nematode species could kill the insects in the order Lepidoptera better than those in the other orders. This ability is accounted by the nematode's own capable of causing disease towards the insects, and by its association with the symbiotic bacterium, *Xenorhabdus* sp., which

was usually found in the intestinal lumen of the infected insect species. Generally, the use of entomopathogenic nematodes has been against the feeding stages of various insect pests. These results indicate that this nematode will kill larvae and adults of insects. Thus, utilization of *S. thailandensis* n. sp. against various kinds of insect pests is feasible for the field control. Further research is necessary to be able to use *S. thailandensis* n. sp. more practically and effectively as a biocontrol agent against harmful insect pests in the tropics.

CONCLUSION

A new entomopathogenic nematode was collected from a coconut field in Kanchana Buri province, Thailand. Studies had shown that the nematode did not fit nominal species, and it is described herein as *S. thailandensis* n. sp. This nematode species can be distinguished from the other species in its unique characteristics as follows : The body length of the third-stage juvenile was the shortest of all the currently described *Steinernema* spp. The juvenile was short-tailed and its lateral field comprised 6 longitudinal ridges. The spicules of male had long and strongly curved spicules. Its gubernaculum was large and slender. The first and second generation females had protruding vulval lips and both with double-flapped epiptygma. The RFLP banding pattern was also unique when compared to that of *S. carpocapsae* (All strain).

The life cycle at the optimum temperature of 30 °C was four days. The growth rate, sex ratio and infection ability of this nematode were influenced by the temperature. Its life cycle was not completed at 15 and 38 °C. At 20-35 °C, the number of females in the population was greater than that of males, but at 30 °C, the number of females constituted 82 % of the population. At lower (15 and 20 °C) and high temperatures (38 °C), the nematode could not kill the test insects within 24 hours but at 25, 30 and 35 °C, it caused 80, 100 and 100 % mortality in the insects, respectively.

A symbiotic bacterium was isolated from a drop of haemolymph of a nematode infected *G. mellonella* larva. Like other *Xenorhabdus* sp., the phase I of this bacterium was characterised by the adsorption of bromthymol blue from NBTA medium. Insect cadavers parasitized by this nematode-bacterium complex presented a black coloration.

Pathogenicity test indicated that *S. thailandensis* n. sp. with its symbiotic bacterium was highly virulent against *G. mellonella*. The nematode at a dosage of 10 infective juveniles per test insect caused 53 % mortality of the insect in 24 hours. This nematode was a heat-tolerant isolate, still effective in killing insects even at soil temperature above 35 °C. It could kill 100 % of *G. mellonella* in 22 hours at 30 and 35 °C and was still effective even at 38 °C.

This pathogenic nematode could be mass produced *in vitro* on culture medium containing soybean under the laboratory condition. 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 (*S. litura*), beet armyworm (*S. exigua*), diamond-back moth (*P. xylostella*), American bollworm (*H. armigera*), jasmine flower borer (*H. duplifacialia*), mushroom beetle (unidentified), wax moth (*G. mellonella*), flea beetle (*P. sinuata*), grub of scarab beetle (unidentified), aphid (*Myzus persicae*), wet wood termite (*Coptotermes* sp.) and American cockroach (*P. american*). The mortality percentage of 12 insects were 20-100 %, depending on species of test insect. *S. thailandensis* n. sp. exhibited a higher degree of controlling the insects in the order Lepidoptera than the insects in the other orders. One hundred percent insect mortality was found in the larvae of jasmine flower borer as well as in wax moth. In the insect pests of vegetable crops such as aphid, leaf worm, beet armyworm, diamond-back moth and American bollworm, the percentages of mortality were 44, 56, 60, 89 and 92 %, respectively. The mortality of the Coleoptera such as mushroom beetle, scarab beetle and flea beetle were 100, 20 and 33 %, respectively. Also, some household insects such as termite and cockroach died at 42 and 57 %, respectively.

LITERATURE CITED

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18 : 165-267.
- 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.
- _____. 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., 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.
- Bathon, H. 1996. Impact of entomopathogenic nematodes on non-target hosts. Biocontrol Sci. and Technol. 6 : 421-434.
- 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. *Annals of Applied 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.
- Blackshaw, R.P. 1988. A survey of insect parasitic nematodes in Northern Ireland. *Annals of Applied Biol.* 113 : 561-565.
- Boag, B., R. Neilson and S.C. Gordon. 1992. Distribution and prevalence of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in Scotland. *Annals of Applied Biol.* 121 : 355-360.
- 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., K. Abrahamsson, J. Ascard, A. Sjöberg 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.
- Byers, J.A. and G.O. Poinar, Jr. 1982. Location of insect hosts by the nematode, *Neoaplectana carpocapsae*, in response to temperature. *Behavior* 79 : 1-10.
- Cabanillas, H.E., G.O. Poinar, Jr. and J.R. Raulston. 1994. *Steinernema riobravise* 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. 1990. Molecular techniques in taxonomy, pp. 63-74. *In* R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- _____. 1993. Post-application biology of entomopathogenic nematodes in soil, pp. 67-78. *In* R.A. Bedding and R. Akhurst and H.K. Kaya (eds.). *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. CSIRO Publications, East Melbourne, Australia.
- Curran, J. and J.M. Webster. 1987. Identification of nematodes using restriction fragment length differences and species-specific DNA probes. *Canadian J. Plant Pathol.* 9 : 162.
- Danilov, L.G. 1976. The effect of temperature on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Neoaplectana carpocapsae* Weiser, 1955 "agriotos", and on the development of the nematode in the insect host. *Byulleten' Vsesoyuznogo Nauchno Issledovatel'skogo Instituta Zashchity Rastenii* 37 : 17-21 (In Russian; English summary).
- 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 G.S. Thurston. 1990. Insect immunity, pp. 301-318. *In* R. Gaugler and H.K.Kaya (eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

- 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 and G.E. Cantwell. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *J. Insect Pathol.* 6 : 417-422.
- Ehlers, R.U., K.V. Deseo and E. Stackebrandt. 1991. Identification of *Steinernema* spp. (Nematoda) and their symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. from Italian and German soils. *Nematologica* 37 : 360-366.
- Ehlers, R.U. and A. Peters. 1995. Entomopathogenic nematodes in biological control : feasibility, perspectives and possible risks, pp. 119-136. *In* H.M.T. Hokkanen and J.M. Lynch (eds.). *Biological Control, Benefits and Risks*. OECD, Cambridge University Press, Cambridge.
- 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.
- Fan, X. and W.M. Hominick. 1991. Effects of low storage temperature on survival and infectivity of two *Steinernema* species (Nematoda : Steinernematidae). *Revue de Nematologie* 14 : 407-412.
- Filipjev, I.N. 1934. *Micellanea Nematologica* 1. Eine neue Art der Gattung *Neoaplectana* Steiner nebst Bemerkungen über die systematische Stellung der letzteren. (English translation from Russian). *Magazine de Parasitologie de l'Institut Zoologique de l'Académie de l'URSS* 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., Boca Raton, Florida.
- Gaugler, R. 1988. Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture Ecosystems and Environment* 24 : 351-360.
- Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 365 p.
- Gaugler, R., A. Bednarek and J.F. Campbell. 1992. Ultraviolet inactivation of heterorhabditid and steinernematid nematodes. *J. Invertebrate Pathol.* 59 : 155-160.
- Gaugler, R., L. LeBeck, B. Nakagaki and G.M. Boush. 1980. Orientation of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* to carbon dioxide. *Environmental Entomol.* 9 : 649-652.
- Georgis, R. 1981. Studies on *Neoaplectana carpocapsae* in the web-spinning larch sawfly, *Cephalcia lariciphila*. Ph.D. thesis, University of Reading, UK.
- _____. 1990. Formulation and application technology, pp. 173-191. *In* R. Gaugler and H.K.Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Georgis, R. and G.O. Poinar, Jr. 1983. Effect of soil texture on the distribution and infectivity of *Neoaplectana glaseri* (Nematoda : Steinernematidae). *J. Nematol.* 15 : 329-332.
- _____. 1989. Field effectiveness of entomophilic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*, p. 213. *In* A.R. Leslie and R.L. Metcalf (eds.). Integrated Pest Management for Turfgrass and Ornamentals. U.S. EPA, Washington, D.C.

- Georgis, R. and G.O. Poinar, Jr. 1994. Nematodes as bio insecticides in turf and ornamentals, pp. 477-489. *In* A.R. Leslie (ed.). Integrated Pest Management for Turf and Ornamentals. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Glaser, R.W., E.E. McCoy and H.B. Girth. 1940. The biology and economic importance of a nematode parasite in insects. *J. Parasitol.* 26 : 479-495.
- Gotz, P.G., A. Boman and H.G. Boman. 1981. Interactions between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proc. Roy. Soc. Seri. B* 212 : 333-350.
- 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.
- Griffin, C.T., M.J. Downes and W. Block. 1990. Test of Antarctic soils for insect parasite nematodes. *Antarctic Sci.* 2 : 221-222.
- Han, R. 1994. Advances in the research of entomopathogenic nematodes *Steinernema* and *Heterorhabditis* in China. *Entomologia Sinica* 1 : 346-364.
- Haukeland, S. 1993. Entomopathogenic nematodes found in Norway. *Norwegian J. Agr. Sci.* 7 : 17-27.
- Hirsch, D.K. and R. Georgis. 1996. Virus and nematodes. *Soc. of Invertebrate Pathol. News Letter* 28 (3) : 26.
- Hominick, W.M. and B.R. Briscoe. 1990 a. Survey of 15 sites over 28 months for entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae). *Parasitol.* 100 : 289-294.
- _____. 1990 b. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae) in British soils. *Parasitol.* 100 : 295-302.

- Hominick, W.M., A.P. Reid and B.R. Briscoe. 1995. Prevalence and habitat specificity of steinernematid and heterorhabditid nematodes isolated during soil surveys of the UK and the Netherlands. *J. Helminthol.* 69 : 27-32.
- Jackson, J.J. 1985. Parasitism of the Western corn rootworm with the nematode *Steinernema feltiae*. Ph.D. thesis, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota.
- 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.
- Joyce, S.A., A.P. Reid, E. Driver and J. Curran. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes, pp. 178-187. *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, Manooch, Co. Kildare, Ireland.
- Kakouli, T. 1995. Biological control of the black vine weevil *Otiorhynchus sulcatus* (F) (Coleoptera : Curculionidae) with entomopathogenic nematodes (Nematoda : Rhabditida). Ph.D. Thesis, University of Reading, UK.
- Kaya, H.K. 1977. Development of DD-136 strain of *Neoalectana carpocapsae* at constant temperature. *J. Nematol.* 9 : 346-349.
- 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.
- Klein, M.G. and R. Georgis. 1994. Application techniques for entomopathogenic nematodes, pp. 483-484. *In* Proceedings of the Sixth International Conference on Invertebrate Pathology, Montpellier.

- Kondo, E. and N. Ishibashi. 1986. Nictating behavior and infectivity of the entomogenous nematode, *Steinernema* spp., to the larvae of common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae), on the soil surface. *Applied Entomol. Zool.* 21 : 553.
- 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).
- Lewis, E.E., R. Gaugler and R. Harrison. 1992. Entomopathogenic nematode host finding : response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitol.* 105 : 103-107.
- Liu, J. and R.E. Berry. 1996. *Steinernema oregonensis* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae) from Oregon. *Fundam. Appl. Nematol.* 19 : 375-380.
- Mamiya, Y. 1988. *Steinernema kushidai* n.sp. (Nematoda : Steinernematidae) associated with scarabaeid beetle larvae from Shizuoka, Japan. *Applied Entomol. Zool.* 23 : 313-320.
- Miduturi, J.S. 1997. Bionomics of naturally occurring entomopathogenic nematodes in Belgium. Ph.D. thesis, University of Gent, Gent.
- Molyneux, R.S. 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp., and *Steinernema* spp. (Nematoda : Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. *Revue de Nematologie* 8 : 165-170.
- Moyle, P.L. and H.K. Kaya. 1981. Dispersal and infectivity of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser (Rhabditida : Steinernematidae), in sand. *J. Nematol.* 13 : 295-300.

- 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. and J.M. Webster. 1993. Survey of Heterorhabditidae and Steinernematidae (Rhabditida, Nematoda) in Western Canada. *J. Nematol.* 25 : 710-717.
- 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. 1993. Identification to Entomopathogenic Nematode Species of the Genus *Steinernema*. Department of Entomology & Nematology, IFAS, University of Florida, Gainesville. 24 p.
- Nguyen, K.B. and G.C. Smart, Jr. 1990. *Steinernema scapterisci* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae). *J. Nematol.* 23 : 187-199.
- _____. 1992. *Steinernema neocurtillis* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae) and a key to the genus *Steinernema*. *J. Nematol.* 24 : 463-477.
- _____. 1996. Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata : Rhabditida). *J. Nematol.* 28 : 286-300.
- Pace, G.W., W. Grote, D.E. Pitt and J.M. Pitt. 1986. Liquid Culture of Nematodes. International Patent Number WO86/01074.
- Poinar, G.O., Jr. 1972. Nematodes as facultative parasites of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 17 : 103-122.

Poinar, G.O., Jr. 1979. Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press, Boca Raton, Florida. 112 p.

_____. 1985. *Neoaplectana intermedia* n.sp. (Steinernematidae : Nematoda) from South Carolina. Revue de Nematologie 8 : 321.

_____. 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.

_____. 1992. *Steinernema feltiae* (Steinernematidae : Rhabditida) parasitizing adult fungus gnats (Mycetophilidae : diptera) in California. Fundam. Appl. Nematol. 15 : 427-430.

Poinar, G.O., Jr. and E.M. Kozodi. 1988. *Neoaplectana glaseri* and *N. anomali* : sibling species or parallelism. Revue de Nematologie 11 : 13-19.

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. and G.M. Thomas. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae : Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoaplectana* sp. Steinernematidae). Parasitol. 56 : 385-390.

_____. 1984. Laboratory Guide to Insect Pathogens and Parasites. Plenum Press, New York. 392 p.

Poinar, G.O., Jr. and R. Georgis. 1989. Biological control of social insects with nematodes, pp. 255. In A.R. Leslie and R.L. Metcalf (eds.). Integrated Pest Management for Turfgrass and Ornamentals. U.S. EPA, Washington, D.C.

- Reid, A.P. 1994. Molecular taxonomy of *Steinernema*, pp. 49-58. 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.
- 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.
- Roque, P., C. Ribeiro, N. Cruz and N. Simoes. 1994. Chemical factor released by *Steinernema carpocapsae* correlated with the penetration in the insect host, p. 277. In Sixth International Colloquium on Invertebrate Pathology and microbial control - Second International Conference on *Bacillus thuringiensis*, Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France 28 August - 2 September, 1994.
- Rovesti, L. and K.V. Deseo. 1990. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* Weiser and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda : Steinernematidae). Nematologica 36 : 237-245.
- 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, Commonwealth Agricultural Bureaux, London. 645 p.
- Smart, G.C., Jr., B. Nguyen, J.P. Parkman and J.H. Frank. 1991. Biological control of mole crickets in the genus *Scapteriscus* with the nematode *Steinernema scapterisci* Nguyen and Smart, 1990, pp.151-155. In Rencontres Caraibes en Lutte biologique, Guadeloupe, 5-7 November 1990. INRA, Paris.

- Smiths, P.H. 1996. Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Sci. and Technol.* 6 : 379-388.
- Spiridonov, S.E., E.N. Akhmedov and F.N. Belostotskaya. 1991. Proliferation of symbiotic bacteria in the intestinal vesicle of invasive larvae of *Neoaplectana* spp. (Nematoda, Steinernematidae). *Helminthologie* 28 : 141-142.
- Steiner, G. 1923. *Aplectana kraussei* n.sp. der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematoden-form, nebst Bemerkungen uber 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 nemic 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., 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.
- Stuart, R.J. and R. Gaugler. 1994. Patchiness in populations of entomopathogenic nematodes. *J. Invertebrate Pathol.* 64 : 39-45.
- 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.

- Thomas, G.M. and G.O. Poinar, Jr. 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. International J. Systematic Bacteriol. 29 : 352-360.
- 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.
- Vrain, T.C., D.A. Wakarchuk, A. Levesque and R.I. Hamilton. 1992. Intraspecific DNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphenema americanum* group. Fundam. Appl. Nematol. 15 : 563-573.
- Waturu, C.N., D.J. Hunt and A.P. Reid. 1997. *Steinernema karii* 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.
- White, G.F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Sci. 66 : 302-303.
- Williamson, V.M. 1990. Molecular Techniques for Nematode Species Identification. University of California, Davis, California. 10 p.
- Womersly, C.H. 1990. Dehydration survival and anhydrobiotic potential, pp. 117-137. In R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Woodring, J.L. and H.K. Kaya. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes : a Handbook of Techniques. Southern Cooperative Series Bulletin. 331. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas. 30 p.

- Wouts, W.M. 1980. Biology, life cycle and rescription of *Neoaplectana bibionis* Bovien, 1937 (Nematoda : Steinernematidae). J. Nematol. 12 : 62-72.
- Xu, Z., G. Wang and X. Li. 1991. A new species of genus *Steinernema* (Rhabditida : Steinernematidae). Zoological Research 12 : 17-20.
- Yang, H.W., Y.Y. Zhou and S.G. Zhang. 1990. Biological studies on an indigenous entomopathogenic nematode *Steinernema* sp. found in Hebei, China. Idem 6(1) : 13-17.
- 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.
-

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ของโครงการ

วัตถุประสงค์เดิม	วัตถุประสงค์ใหม่
1. เพื่อทราบการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย	1. เพื่อการสำรวจและค้นหาไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลง ครอบคลุมทุกภาคของประเทศไทย
2. เพื่อเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่พบในประเทศไทย	2. เพื่อการจัดเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยสายพันธุ์พื้นเมืองในแต่ละพื้นที่แบ่งแยกเป็นไอโซเลตและกำหนดรหัสไส้เดือนฝอย
3. เพื่อการจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ โดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้อง LM และการศึกษา protein เพื่อการจัดจำแนก	3. เพื่อการจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ โดยวิธีการผสมข้ามชนิด (cross mating) ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้อง LM และ SEM การตรวจสอบสายพันธุ์ในระดับยีนด้วยเทคนิคทางอนุชีวโมเลกุล
4. เพื่อศึกษาศักยภาพของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในการเป็น obligate parasite ในแมลง โดยวิธี pathogenicity test	4. เพื่อศึกษาความสามารถของไส้เดือนฝอย Thai isolate ในการทำให้เกิดโรคกับแมลง โดยวิธี pathogenicity test และ heat tolerance test
	5. เพื่อศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย Thai isolate โดยศึกษาวงจรชีวิต ผลของอุณหภูมิต่อวงจรชีวิต sex ratio และการเข้าทำลาย ศึกษาการแยกเชื้อบริสุทธ์ของ symbiotic bacteria จากไส้เดือนฝอย Thai isolate
	6. เพื่อศึกษาการขยายปริมาณไส้เดือนฝอย Thai isolate ในอาหารเทียมในสภาพ monoxenic culture
	7. เพื่อทดสอบศักยภาพในการทำแมลงสำคัญใน order Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera, Isoptera และ Blattoidea

กิจกรรมที่วางแผน/ที่ได้ดำเนินการ และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ได้ดำเนินการ	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
1. การสำรวจเก็บตัวอย่างดิน - ในพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ ห้วยป่าไม้ พื้นที่เพาะปลูก - ไม่ได้ระบุจำนวนตัวอย่างดิน	1. การสำรวจเก็บตัวอย่างดิน - ในพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ ห้วยป่าไม้ พื้นที่เพาะปลูกพื้นที่ต่างๆ และพื้นที่ทำการเกษตร ครอบคลุมทุกภาคของประเทศ - จำนวน 306 ตัวอย่างดิน 42 จังหวัด (location)	1. การสำรวจเก็บตัวอย่างดิน - แยกได้ได้ดินผอมจากดินชั้นผิวบนทราย ในพื้นที่ไม่ได้ทำการเกษตร และแปลงปลูกไม้ผล มีอุณหภูมิดิน ณ จุดเก็บ เท่ากับ 24-29 °ซ มีระดับ pH เท่ากับ 6.8-7.9 - แยกได้จากดินในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี พิจิตร อุทยา กาฬสินธุ์ มหาสารคาม ขอนแก่น หนองคาย ร้อยเอ็ด และสระแก้ว - มีการกระจายตัวสูงในเขตตอนกลางของประเทศ ไม่พบในเขตตอนเหนือและใต้
2. การแยกไส้เดือนฝอยโดยวิธี Galleria bait technique	2. การแยกไส้เดือนฝอยโดยวิธี Galleria bait technique	2. แยกได้ไส้เดือนฝอยจำนวน 9 ไอโซเลท แบ่งเป็น 2 สกุลคือ <i>Steinernema</i> sp. 8 ไอโซเลท และ <i>Heterorhabditis</i> sp. 1 ไอโซเลท
3. การเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยในน้ำกลั่นใน culture flask และกำหนดรหัสไส้เดือนฝอยตามแหล่งที่พบ	3. การเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยในน้ำกลั่นใน culture flask และกำหนดรหัสไส้เดือนฝอยตามแหล่งที่พบ - กำหนดรหัสไส้เดือนฝอยโดยใช้ตัวพิมพ์ใหญ่ภาษาอังกฤษจำนวน 2 ตัวอักษร ของชื่อจังหวัดที่ค้นพบ - ศึกษาการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย <i>Steinernema</i> และ <i>Heterorhabditis</i> ให้คงความมีชีวิตรอดได้นาน	3. เก็บรวบรวมไส้เดือนฝอย - <i>Steinernema</i> Thai isolate ในน้ำกลั่นใน culture flask จำนวน 8 ไอโซเลท คือ KB, PC, AY, KS, MK, KK, NK และ SK code และ <i>Heterorhabditis</i> Thai isolate จำนวน 1 ไอโซเลท คือ RE code - การเก็บรักษาให้คงความมีชีวิตได้นาน ที่อุณหภูมิเหมาะสมของ <i>Steinernema</i> คือ อุณหภูมิ 25 °ซ และ <i>Heterorhabditis</i> ที่ 15 °ซ

กิจกรรมที่วางแผน/ที่ได้ดำเนินการ และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ได้ดำเนินการ	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
4. การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย - การศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้อง light microscope (LM) เปรียบเทียบกับ key มาตรฐาน - การศึกษา protein เพื่อการจัดจำแนกชนิด	4. การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย - โดยวิธีผสมข้ามชนิด (cross mating) - การศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้อง LM และ SEM เปรียบเทียบกับ key มาตรฐาน - การตรวจสอบชนิดและสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR-RFLP	4. การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย - จัดแบ่งชนิดของไส้เดือนฝอย <i>Steinernema</i> spp. Thai isolate เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คือ KB, KS, MK, KK และ NK code กลุ่มที่ 2 คือ AY code และกลุ่มที่ 3 คือ SK code - จัดจำแนกได้ไส้เดือนฝอยชนิดใหม่สายพันธุ์ไทยของกลุ่มที่ 1 ให้ชื่อคือ <i>Steinernema thailandensis</i> n. sp. - ไส้เดือนฝอย <i>Heterorhabditis</i> sp. RE code มีความใกล้เคียงกับ <i>H. indica</i> ที่แยกได้จากประเทศไทย
5. การศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย Thai isolate - ไม่ได้วางแผน	5. การศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย Thai isolate - การศึกษาวงจรชีวิต - การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อวงจรชีวิต ต่อ sex ration และการเข้าทำลาย - การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ symbiotic bacteria	5. การศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย <i>S. thailandensis</i> n. sp. Thai isolate - ไส้เดือนฝอย <i>S. thailandensis</i> n. sp. มีวงจรชีวิตสั้น (4 วัน) ที่อุณหภูมิ 30 °ซ - อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อวงจรชีวิตในแมลงอาศัย อัตราการเป็นเพศผู้-เพศเมีย และความสามรถในการเข้าทำลายแมลงเหยื่อ อยู่ในช่วงระหว่าง 25-35 °ซ - แยกได้เชื้อบริสุทธิ์ของ symbiotic bacteria จากไส้เดือนฝอย <i>S. thailandensis</i> n. sp. จำแนกเป็นแบคทีเรียในสกุล <i>Xenorhabdus</i> sp.

กิจกรรมที่วางแผน/ที่ได้ดำเนินการ และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ได้ดำเนินการ	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
6. การศึกษาความสามารถของไลต์เคอโนฟอย Thai isolate ในการทำให้เกิดโรคในแมลง - การทดสอบ pathogenicity test ในอัตราไลต์เคอโนฟอย 5 ตัวต่อหนอนทดสอบ 1 ตัว	6. การศึกษาความสามารถของไลต์เคอโนฟอย Thai isolate ในการทำให้เกิดโรคในแมลง - การทดสอบ pathogenicity test ในอัตราไลต์เคอโนฟอย 4 6 8 และ 10 ตัวต่อหนอนทดสอบ 1 ตัว - การทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิเปรียบเทียบกับสายพันธุ์จากต่างประเทศ	6. การศึกษาความสามารถของไลต์เคอโนฟอย Thai isolate ในการทำให้เกิดโรคในแมลง - ไลต์เคอโนฟอยมีความสามารถในการฆ่าแมลงทดสอบตาย 50 % ภายในเวลา 24 ชม. ในอัตราไลต์เคอโนฟอย 10 ตัวต่อหนอน 1 ตัว - ไลต์เคอโนฟอย Thai isolate มีความทนทานต่ออุณหภูมิสูง 35 °ซ จัดเป็นสายพันธุ์ทนร้อน (heat tolerant isolate) ที่มีศักยภาพในการฆ่าแมลง
7. การขยายปริมาณไลต์เคอโนฟอย Thai isolate ในอาหารเทียม - ไม่ได้วางแผน	7. การขยายปริมาณไลต์เคอโนฟอย Thai isolate ในอาหารเทียม - ศึกษาการขยายปริมาณในอาหารเทียมชนิดอื่นในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ monoxenic culture จำนวน 5 สูตรอาหารดัดแปลง เปรียบเทียบกับสูตรอาหารสังเคราะห์ (lipid agar)	7. การขยายปริมาณไลต์เคอโนฟอย Thai isolate ในอาหารเทียม - ไลต์เคอโนฟอย <i>S. thailandensis</i> n. sp. สามารถเพาะเลี้ยงขยายปริมาณได้ในอาหารเทียมที่มีองค์ประกอบของนมแก้วเหลือง ให้ผลผลิตเท่ากับ 6.6×10^5 ตัวต่ออาหาร 20 กรัม หรือ 33×10^5 ตัวต่ออาหาร 1 ลิตร
8. การทดสอบ pathogenicity กับแมลงศัตรูสำคัญ - ไม่ได้วางแผน	8. การทดสอบ pathogenicity กับแมลงศัตรูสำคัญ - ทดสอบกับแมลง 12 ชนิด คือ หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทุ้ม หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนเจาะดอกมะลิ หนอนกินรังผึ้ง หนอนด้วงในเนื้อเห็ด ตัวงมหัดกระโดด หนอนด้วงกินรากสตรอเบอรี่ เพลี้ยอ่อน ปลวก และแมลงสาป ในระดับห้องปฏิบัติการ	8. การทดสอบ pathogenicity กับแมลงศัตรูสำคัญ - ไลต์เคอโนฟอย <i>S. thailandensis</i> n. sp. สามารถฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อได้ตั้งแต่ 55-100 % และกลุ่มหนอนด้วงเท่ากับ 20-100 % ในเพลี้ยอ่อน 44 % และปลวก 42 % ภายในเวลา 24 ชม. นอกจากนั้น ฆ่าแมลงสาปตาย 57 % ภายในเวลา 48 ชม.