

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)

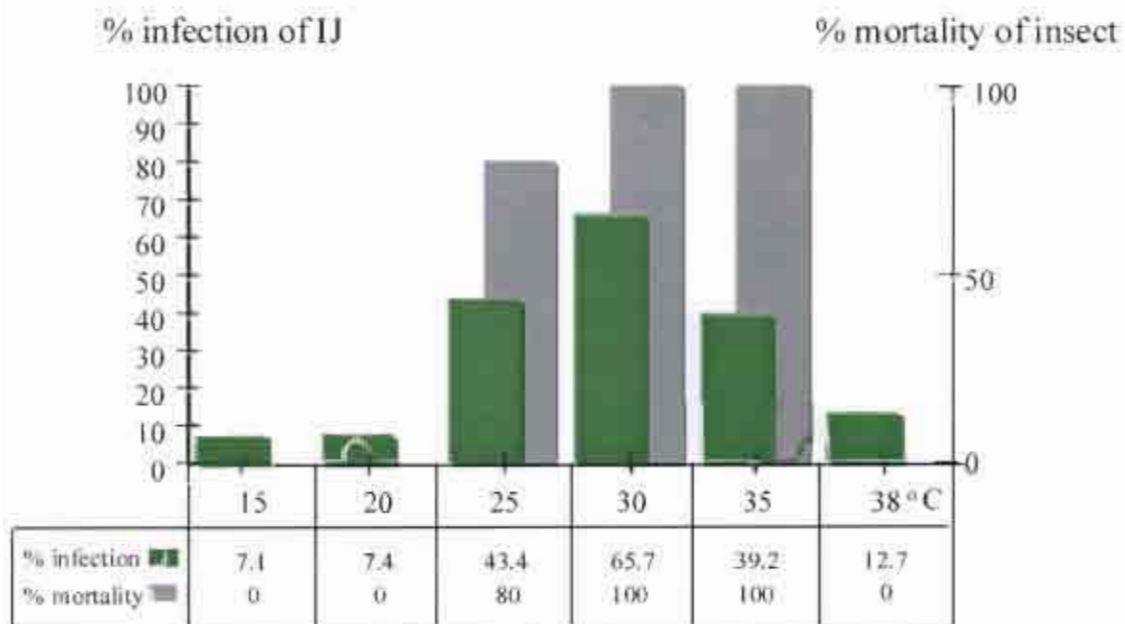


Figure 14 The infection percentage of the infective juvenile (*Steinernema thailandensis* n. sp.) and mortality of the test insect (*Galleria mellonella*) after 24 hours at different temperatures.

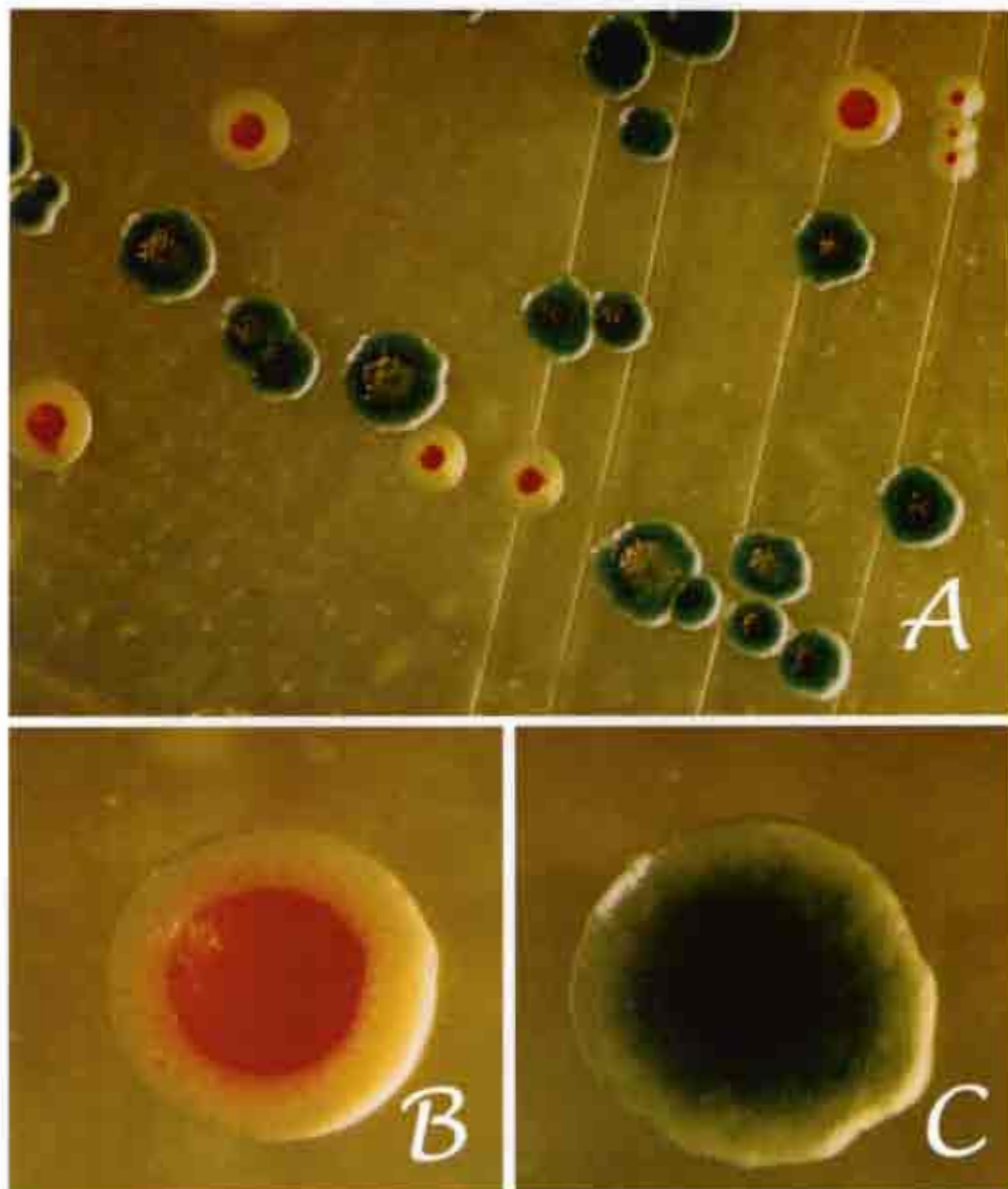


Figure 15 Colony of the symbiotic bacterium (*Xenorhabdus* sp.) isolated from *Steinernema thailandensis* n. sp.

(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.

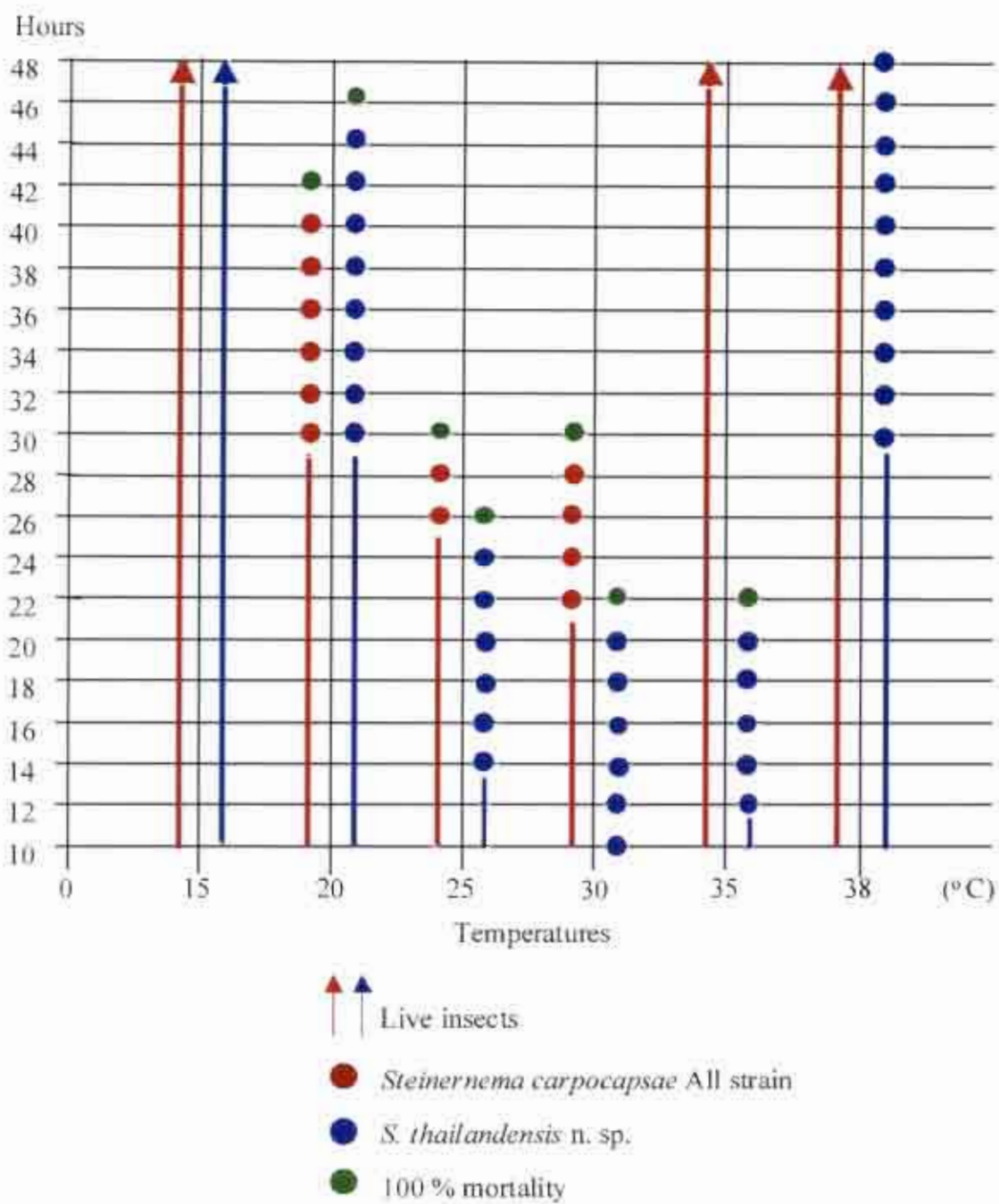


Figure 16. Mortality of *Galleria mellonella* exposed to *Steinernema carpocapsae* All strain and *S. thailandensis* n. sp. at different temperatures.

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 ทดสอบในหนอนคืบในถั่วเหลือง ตัวเต็มวัยของด้วงหมัดกระโดด และหนอนด้วงกัดรากสตรอเบอรี่ 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)

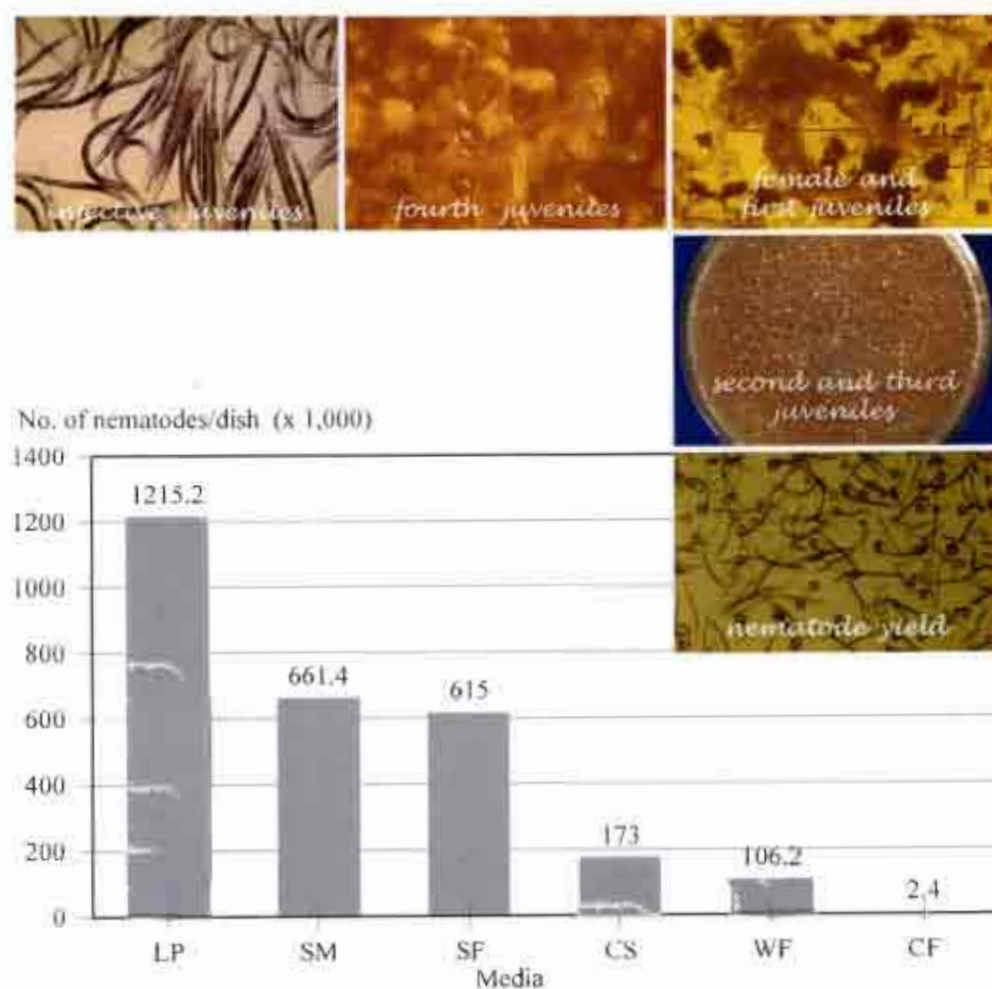


Figure 17 Population count of *Steinernema thailandensis* n. sp. reared on modified culture media compared to lipid agar medium (LP). The modified culture media are soybean milk (SM), soybean flour (SF), corn syrup (CS), wheat flour (WF), and corn flour (CF).

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 วุ้น ซึ่งพบว่าไส้เดือนฝอยสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบของ ถั่วเหลืองราคาถูก จากผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จากการเลี้ยงในสูตรนมถั่วเหลืองให้ผลผลิตเท่ากับ 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 ศึกษาวิจัยสายพันธุ์ไทยและพัฒนาเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

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 riobravis* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae) from Texas. *Fundam. Appl. Nematol.* 17 : 123-131.
- Campbell, J.F. and R. Gaugler. 1993. Nictation behavior and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behavior* 126 : 155-169.
- Curran, J. 1991. Application of DNA Analysis to Nematode Taxonomy. 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 : การประชุมวิชาการอภินิหารชีววิทยา 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 Subsak 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 Subsak 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	ข่าวสารโรคพืชและจุลสัตววิทยา 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 จุลสัตววิทยา ประจำปี 2543 โรงแรมทองทิพย์ 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

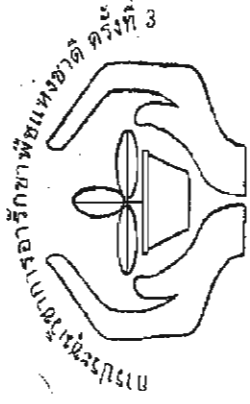
A new entomopathogenic nematode in the family Steinernematidae, genus *Steinernema*, was found in Kanchanaburi province. The morphology and biology of the nematode showed that it was a new species of *Steinernema* which could be distinguished from other *Steinernema* species by the length of infective 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 ได้เสนอผลยาคูแมลงสาบพันธุ์ไทย (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/รัตนาวรรณ พรหมศรัทธา/หรรษา คุณาโท
- ศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อจุลินทรีย์ดินหลังการเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งแห้ง. 199
สมใจ ปฏิบุทธิ
- ผลของอัตราปุ๋ยฟอสเฟต โพแทสเซียม และปูนขาวต่อผลผลิตอ้อย ในดินร่วนทราย
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. 203
สมภพ จงรวยทรัพย์/สมพร เจริญรุ่งเรือง/อุดม รัตนารักษ์
- ระบบพันสารเคมีแก่วัสตุทรงกลม. 212
บัณฑิต จริโมภาส
- แมลงศัตรูข้าวและศัตรูธรรมชาติในนาข้าวญี่ปุ่นที่สถานีทดลองข้าวชัยนาท. 217
สุวัฒน์ รวยอารีย์/ทัศนีย์ สงวนสลั
- การประเมินความเสียหายที่เกิดจากหนอนเจาะผลลิ้นจี่ *Conopomorpha sinensis*
(Lepidoptera: Gracillariidae) และบทบาทของแตนเบียนหนอนเจาะผล. 229
สุพิศรา ดลโสภณ/นันทรัตน์ ศุภกานี/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. riobravisi*, *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 $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ จากการทดสอบศกย- ภาพของไส้เดือนฝอยในระดับอุณหภูมิต่างๆ พบว่ามี ศกยภาพในการฆ่าแมลงทดสอบที่อุณหภูมิสูงถึง 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 Normarwky'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

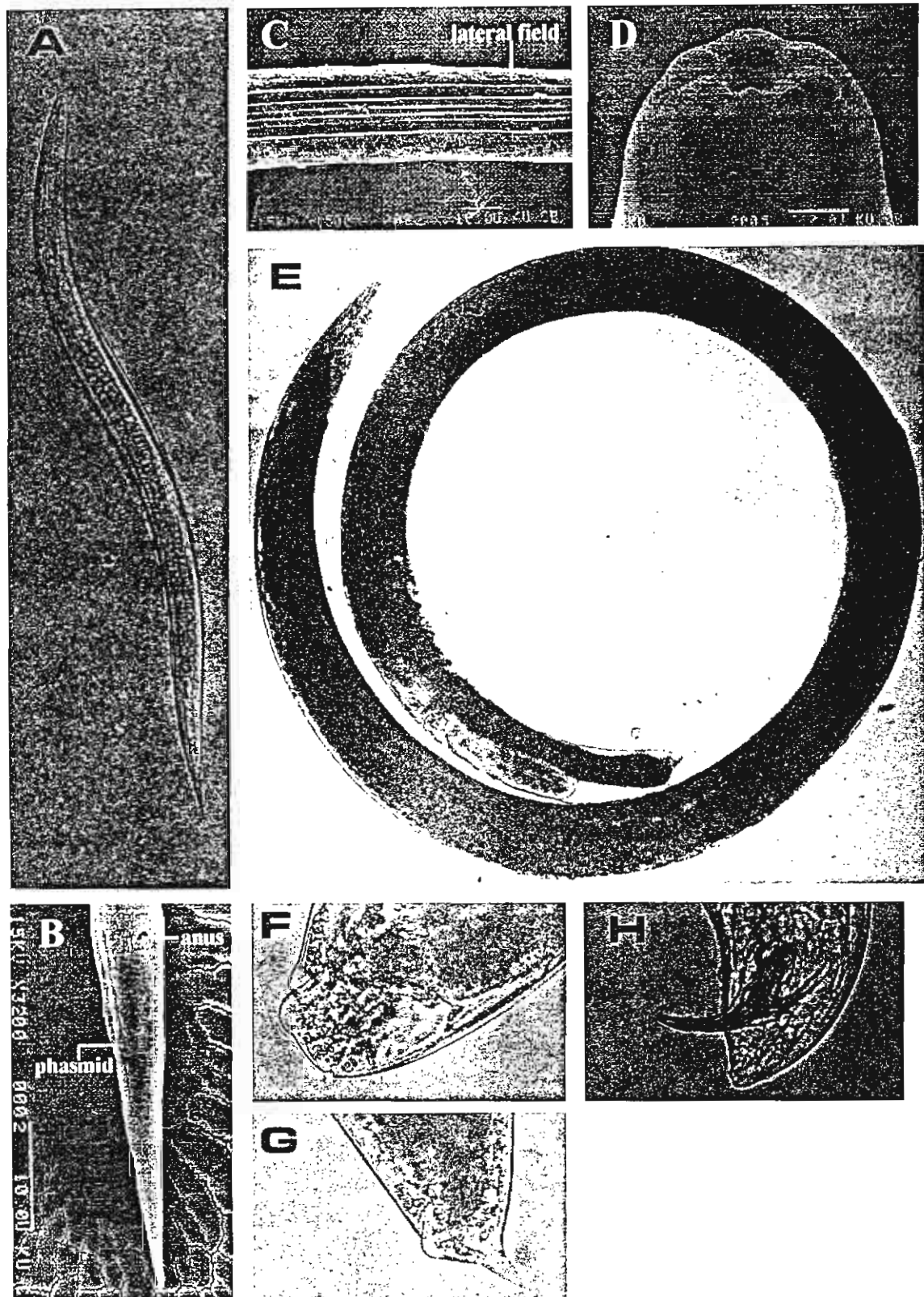


Figure 1. LM and SEM photographs of some structures of *Steinernema thailandensis* n.sp. Infective juveniles, A : Entire body; B : Tail; C : Lateral field. Females, D : Anterior region; E : Entire body; F : 1st generation tail; G : 2nd generation tail. Males, H : Posterior region.

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

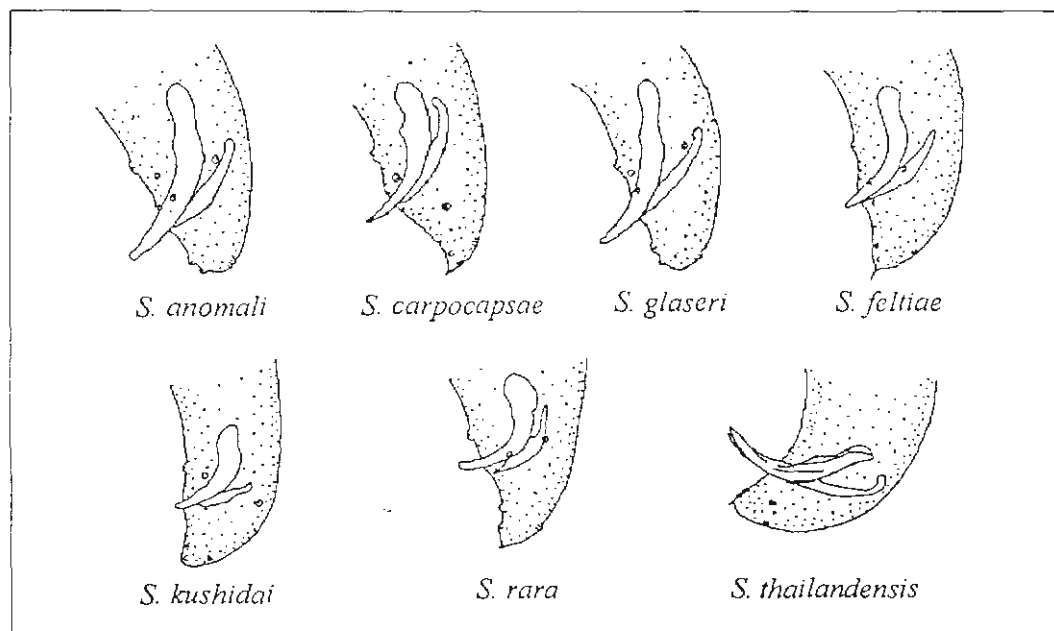


Figure 2. Schematic drawings of male tails of *Steinernema thailandensis* n. sp. compared with other *Steinernema* species.

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

Male, second generation : ผลการวัดขนาดสัดนักกลับมาใช้กับแมลงศัตรูพืชในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ความทนทานและศักยภาพในการทำลายย้อมดีกว่าสายพันธุ์จากแหล่งอื่น แต่อย่างไรก็ตาม การคัดเลือกสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่พบในประเทศไทยและเป็น new species เพื่อนำไปผลิตเป็นการค้า นั้นมีข้อพิจารณาอื่นๆ 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

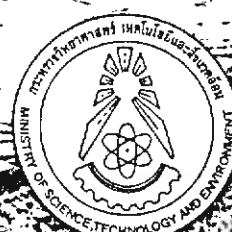
ร่วมกับ

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 Srinophakun 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).

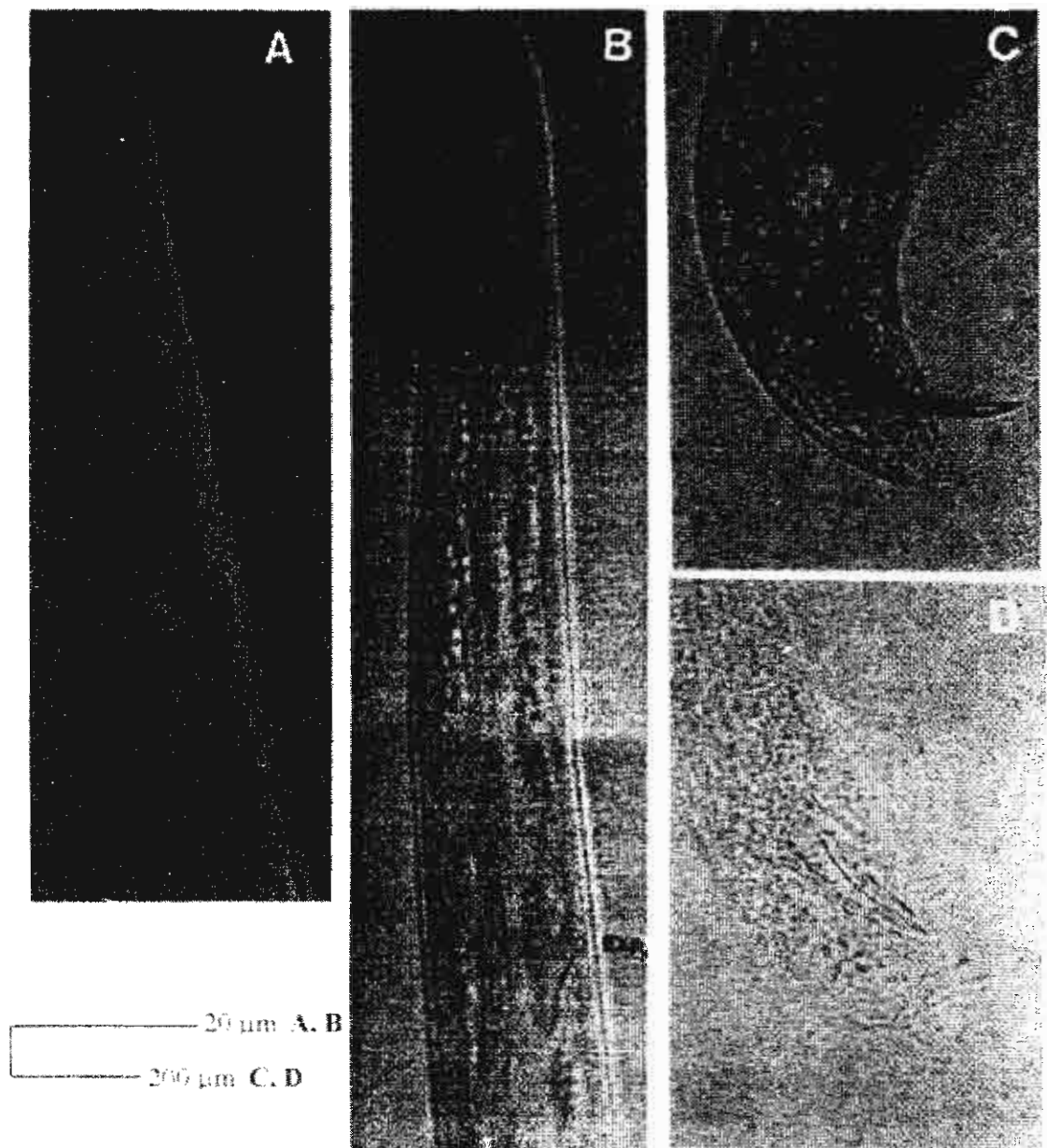


Figure 2 Light micrographs of steinernematid and heterorhabditid. Infective-stage juveniles of steinernematid (A) and heterorhabditid (B) showing excretory pore (Exp.), anterior and posterior to nerve ring (N). Males of steinernematid (C) and heterorhabditid (D) with and without bursa.

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).

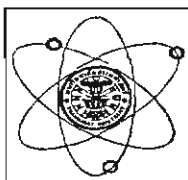
LITERATURE CITED

- 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.

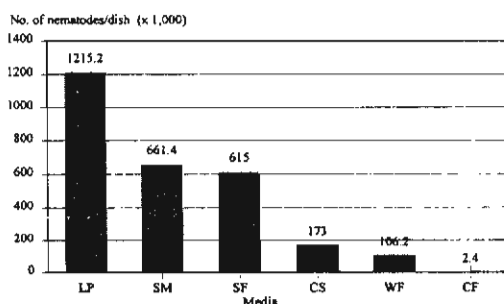


Figure 1. Comparison of modified media (SM, SF, CS, WF and CF) with lipid agar medium (LP) in the number of infective juveniles (*Steinernema* sp. KB strain) produced.

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.

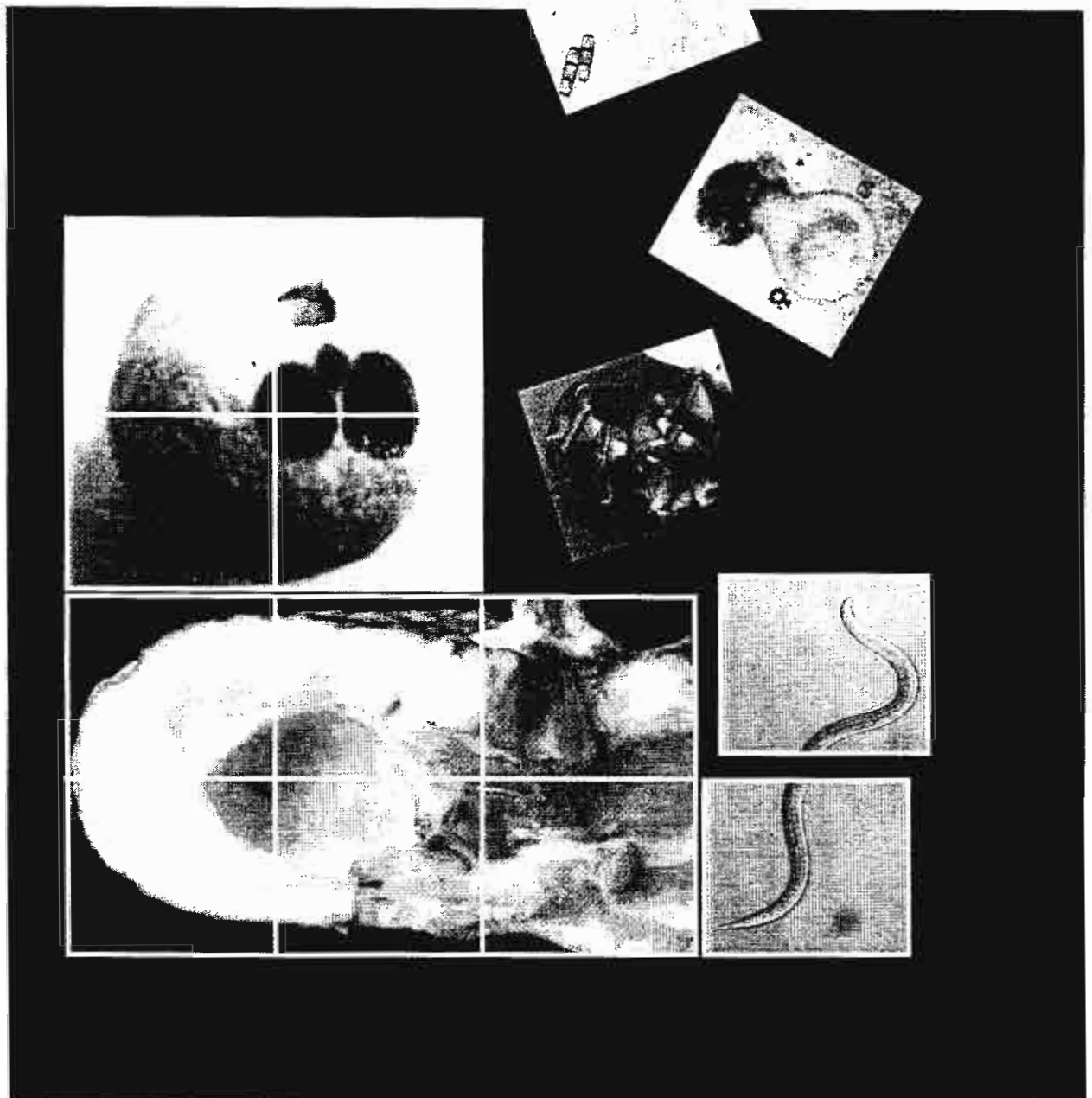
References

- [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 ค่าของขนาดสัดส่วนและรูปร่างลักษณะที่สำคัญต่างๆ 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

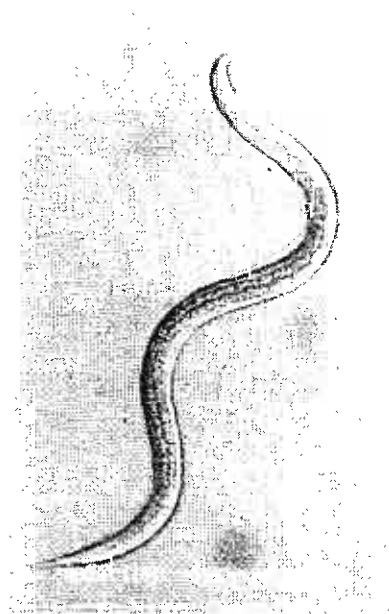
การนำเทคนิคทางด้านอนุชีววิทยา มาใช้ในการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ของจังหวัดอยุธยา พิจิตร และสระแก้ว ได้เลือกใช้เทคนิค PCR-RFLPs โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจัดจำแนกในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ และหาความแตกต่างหรือความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ของไส้เดือนฝอยที่พบในประเทศไทย 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 และบันทึกภาพด้วยกล้องโฟลลอลอยด์

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

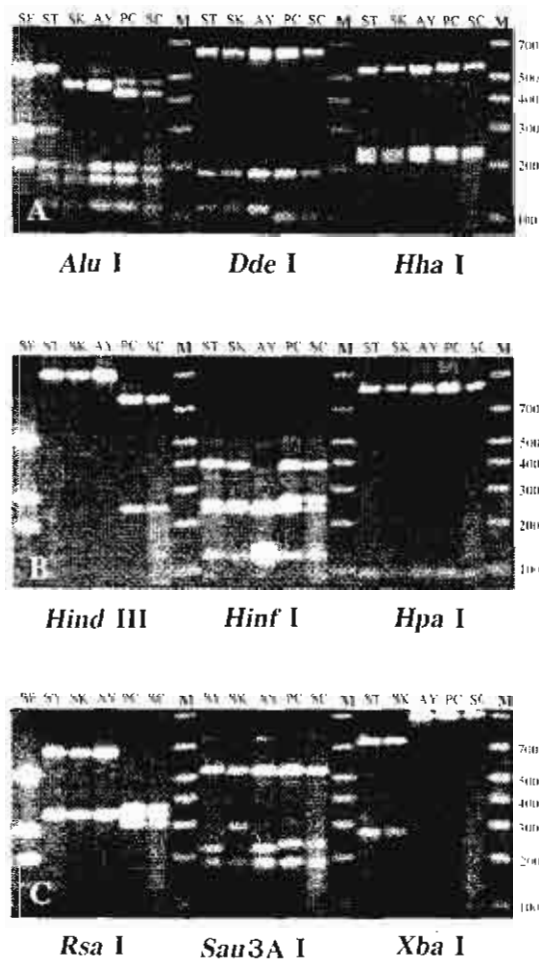


Figure 1 RFLPs pattern by digestion of three isolates with 9 different restriction enzymes. SF lane is the digest of *Steinernema feltiae* with *Alu* I. ST lane is *S.thailandensis* n. sp., SK lane is SK isolate, AY lane is AY isolate, PC lane is PC isolate, SC lane is *S. carpocapsae*. M, molecular 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 *Sau3A* 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 โรงแรมดอนปิ่น อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี