

## เทคนิคการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema riobrave*

Study on Entomopathogenic Nematode,

*Steinernema riobrave* for Utilization in Agriculture

วิไลวรรณ เวชยันต์ สาทิพย์ มาลี อิศเรศ เทียนทัต

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

### รายงานความก้าวหน้า

ศึกษาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ทนอุณหภูมิสูง *Steinernema riobrave* ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างเดือนตุลาคม 2554 ถึงเดือนกันยายน 2555 พบว่าการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง ด้วยแมลงอาศัยหอนกินรังผึ้ง *Galleria melonella* โดยวิธี paper bioassay ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เจริญเติบโตและขยายพันธุ์ออกลูกหลานและพัฒนาเป็นไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) และเริ่มออกจากซากหอนในวันที่ 10 วัน ระยะเวลาในการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ด้วยหอนกินรังผึ้ง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 15-18 วัน ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 200,000 ตัวต่อหอน 1 ตัว มีประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงเมื่อทดสอบตามวิธีการของ Miller (1989) โดยหยดไส้เดือนฝอย 1 ตัว ต่อหอนกินรังผึ้ง 1 ตัว ตรวจสอบผลการทดลองที่ 48 ชั่วโมง พบว่า ไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงด้วยหอนกินรังผึ้ง มีคุณภาพ สามารถเข้าทำลายแมลงและทำให้แมลงตายเท่ากับ 40-41 %

**คำหลัก :** ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, *Steinernema riobrave*, อุณหภูมิ, การผลิตขยาย

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-02-04-01-54

## คำนำ

ไส้เดือนฝอยที่อยู่ในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีการดำรงชีวิตร่วมกับแบคทีเรียที่เป็น symbiotic bacterium โดยไส้เดือนฝอยตัวอ่อนวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (infective juvenile) จะมีแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในลำไส้ส่วนหน้า และจะปลดปล่อยในระบบเลือดของแมลงเมื่อมันสามารถไขเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง (Poinar and Thomas, 1966) ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สกุลนี้เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีศักยภาพสูงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเป็นสารชีวอินทรีย์นำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด (Kaya, 1985; Klein, 1990; Poinar, 1979) สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยแมลงอาศัย เช่น หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella* L.) ซึ่งเป็นหนอนที่เลี้ยงขยายเป็นปริมาณมากได้ง่าย จึงนิยมใช้เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (วัชร, 2540) ไส้เดือนฝอยสามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียมทั้งอาหารแข็ง (Bedding, 1981, 1984) และในอาหารเหลว (Friendman, 1990; Gaugler and Han, 2002) การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช จะต้องผลิตให้ได้ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เป็นระยะเข้าทำลายแมลง ซึ่งเป็นระยะที่สามารถปรับตัวให้อยู่รอดในสภาพที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น สภาพที่ไม่มีอาหารหรือไม่มีแมลงอาศัย ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าสูตรอาหารเทียม และพัฒนาวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณมากแต่ต้นทุนการผลิตต่ำ เพื่อนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่กว้างขวางได้ทุกระดับ การเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยอาหารเทียมระยะแรก เลี้ยงบนอาหารเทียมที่ไม่มีเชื้ออื่นเจือปนเรียกว่า axenic culture ซึ่งส่วนประกอบของอาหารที่ใช้มีราคาแพง เช่น ตับของกระต่ายที่ตั้งท้อง แต่การเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยไม่ดีขึ้น ต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนอาหารเทียมร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารแข็ง เรียกการเลี้ยงแบบนี้ว่า monoxenic culture (Bedding, 1981)

ในประเทศไทยโดยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ทำการทดลองนำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ไปควบคุมแมลงศัตรูพืชต่างๆ หลายชนิดได้เป็นผลสำเร็จ คือ หนอนกินใต้ผิวเปลือกถั่ว (วัชร และคณะ, 2529) ตัวอ่อนของด้วงหมัดผักในผักกาดหัว (วัชร และคณะ, 2534ก) ตัวงวงงมันเทศ (วัชร และคณะ, 2534ข) หนอนกระทู้หอมในดาวเรือง (วัชร และคณะ, 2537) นอกจากนี้ยังได้วิจัยและพัฒนาการเลี้ยงขยายปริมาณมากด้วยอาหารเทียมทั้งชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยปรับปรุงสูตรอาหารบางส่วนให้เหมาะสม และศึกษาวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ติดอยู่ที่ลำไส้ของไส้เดือนฝอยและการเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปผสมในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอย ซึ่งพบว่าสูตรอาหารที่สามารถเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ได้ดีมี 3 สูตร คือสูตรที่ 1 ประกอบด้วยอาหารสุนัขกระป๋องสำเร็จรูป ผสมน้ำ น้ำมันหมู และขี้สุต สูตรที่ 2 เนื้อไก่และเครื่องในไก่ น้ำ NaCl และขี้สุต และสูตรที่ 3 ตับไก่ น้ำ น้ำมันหมู และขี้สุต (วัชร และ

พิมลพร, 2535) และต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวโดยวัชรี และสุทธิชัย (2544) เป็นผลสำเร็จและเทคโนโลยีดังกล่าวได้ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชนผลิตเป็นการค้าแล้ว

จากรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งพบในเขตภูมิอากาศกึ่งแล้งร้อนที่มลรัฐเท็กซัส (Cabanillas, 1994) ซึ่งภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มี *Xenorhabdus* sp. เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (Poinar and Thomas, 1965) โดยไส้เดือนฝอยทำหน้าที่เป็นพาหะนำแบคทีเรียเข้าสู่ภายในลำตัวแมลงทางช่องเปิดต่างๆ เช่น ปาก ทวาร ช่องรูหายใจ จากนั้นจะไชผ่านเข้าไปสู่ช่องว่างของลำตัว (haemocoel) และจะปล่อยแบคทีเรียออกมาสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง แบคทีเรียจะมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วและทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง เพราะเลือดเป็นพิษ (septicemia) ในขณะเดียวกันแบคทีเรียก็จะสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยต่อไปจนอาหารภายในตัวแมลงหมด ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 35 °C จากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีประสิทธิภาพสามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิ 35 °C ได้ ในขณะที่ *S. carpocapsae* ไม่สามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิดังกล่าว และพบว่า *S. riobrave* สามารถเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมสูตรอาหารสุนัขผสมฟองน้ำได้ แต่ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง J ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเทียมยังไม่คงที่ จากข้อมูลดังกล่าวจึงควรพัฒนาวิธีการเลี้ยงและศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง เช่นแบคทีเรียร่วมอาศัย การเจริญเติบโตของแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารเลี้ยงเชื้อและในอาหารเหลวเลี้ยงไส้เดือนฝอย รวมทั้งต้นเชื้อไส้เดือนฝอยที่นำมาใช้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตขยายในอนาคตต่อไป

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง
2. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
3. แบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus cabanillasii*
4. อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ ตู้บ่มไข่เชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องเขย่า กล้องจุลทรรศน์
5. เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ flask, beaker, cylinder, petri dish และ test tube
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Ys broth, Yeast extract, และ Tryptic soy broth
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ alcohol, formalin, hyamine, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl Ringer's solution, Sterile egg's solution ฯลฯ
8. วัสดุและอุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ สำลี กระดาษขอลูมิเนียม ปากคีบ ถาดนับไส้เดือนฝอย ฝากรองขนาด 48 ไมครอน เข็มเขี่ย จุกสำลี จุกยาง petridish

## วิธีการ

การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ด้วยแมลงอาศัย

ทำการทดลองโดยใช้หนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella* L.) เป็นแมลงทดสอบ ทำการทดลองในงานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม. ภายในวางกระดาษกรอง 1 แผ่น โดยหยดไส้เดือนฝอยระยะ U อัตรา 2,000 ตัว/น้ำ 1 มล. ลงบนกระดาษกรอง ก่อนใส่หนอนกินรังผึ้งวัย 5-6 ลงไปงานละ 10 ตัว ปิดฝาและนำเก็บที่ 25 °ซ นาน 48 ชั่วโมง นำซากหนอนที่ตายมาล้างด้วยฟอร์มาลิน 0.1% และวางเรียงบนผ้าขาวบางที่ปูอยู่บนงานแก้วที่คว่ำอยู่ในกล่องพลาสติก ภายในหล่อด้วยน้ำกลั่นให้ระดับน้ำสูงประมาณ 3/4 ของความสูงของงานแก้ว ปิดฝากล่องและนำเก็บที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 10 วัน จึงทำการเก็บไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงที่ออกจากตัวหนอนมาอยู่ในน้ำที่หล่อไว้ทุกวัน และบรรจุไส้เดือนฝอยลงฟองน้ำในถุงพลาสติกเก็บที่อุณหภูมิ 15 °ซ

## เวลาและสถานที่

**เวลา** : เดือนตุลาคม 2553 – เดือนกันยายน 2554

**สถานที่** : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ด้วยแมลงอาศัย

ดำเนินการทดลองด้วยวิธี Paper bioassay ในงานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม. ภายในวางกระดาษกรอง 1 แผ่น โดยหยดไส้เดือนฝอยระยะ U อัตรา 2,000 ตัว/น้ำ 1 มล. ลงบนกระดาษกรอง ใส่หนอนกินรังผึ้งน้ำหนักประมาณ 0.4-0.5 มิลลิกรัม 10 ตัว ภายใน 48 ชั่วโมง หนอนที่ตายจะนำมาผ่าเพื่อตรวจดูไส้เดือนฝอยและการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า หลังการ inoculation ตัวอ่อนไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ระยะเข้าทำลายแมลง (Infective juvenile ; IJS) ไส้เดือนฝอยใช้เวลาในการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียประมาณ 4-5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* โดยมีการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้ร้อยละ 67 และตัวเต็มวัยเพศเมียร้อยละ 33 ไส้เดือนฝอยมีการเจริญเติบโต ขยายพันธุ์ออกลูกหลาน และเริ่มออกจากซากหนอนในวันที่ 10 และไส้เดือนฝอยออกจากซากหนอนเนื่องจากอาหารในตัวแมลงหมดใช้เวลาประมาณ 15-18 วัน เมื่อเทเก็บผลผลิตไส้เดือนฝอย ระยะเข้าทำลายแมลง ได้ผลผลิตเฉลี่ย 200,000 ตัวต่อหนอน 1 ตัว เก็บ เทเก็บผลผลิตไส้เดือนฝอย ล้างน้ำและตกตะกอน ก่อนเทเก็บในฟองน้ำสังเคราะห์เก็บที่ 15 °ซ นาน 30 วัน จึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงตามวิธีการของ Miller (1989) ทำการทดสอบในถาดหลุม 24 หลุมต่อถาด โดยการหยดไส้เดือนฝอย 1 ตัว ต่อหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว ตรวจ

ผลการทดลองที่ 48 ชั่วโมง พบว่า ไข่เดือนฝอยที่เลี้ยงด้วยหนอนกินรังผึ้ง มีคุณภาพ สามารถเข้าทำลายแมลงและทำให้แมลงตายเท่ากับ 40-41 %

### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ไข่เดือนฝอย *Steinernema riobrave* สามารถเลี้ยงขยายตามวิธีการเลี้ยง *S. carpocapsae* ได้ อาจต้องปรับปรุงเทคนิคเพื่อให้เหมาะสมกับ ไข่เดือนฝอย *S. riobrave* ที่ทนอุณหภูมิสูง ซึ่งมีขนาดและพฤติกรรมแตกต่างจากไข่เดือนฝอย *S. carpocapsae* การเลี้ยงขยายไข่เดือนฝอยด้วยหนอนทำได้โดยวิธีการ paper bioassay โดยการหยดไข่เดือนฝอยอัตรา 2,000 ตัว บนกระดาษกรองในจานพลาสติก ที่ใส่หนอนกินรังผึ้ง *Galleria melonera* จานละ 10 ตัว เก็บจานพลาสติกที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้น 48 ชั่วโมง นำซากหนอนมา Trap ในกล่องขึ้น การเลี้ยงไข่เดือนฝอยด้วยวิธีนี้ ไข่เดือนฝอยที่ได้ จะมีประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงเมื่อทดสอบตามวิธีการมาตรฐานของ Miller (1989) เท่ากับ 40-41%

### เอกสารอ้างอิง

- วัชร สมสุข และสุทธิชัย สมสุข. 2544. ศึกษาอาหารเหลวเลี้ยงไข่เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ใน “ผลงานวิจัย โครงการวิจัยและพัฒนากการผลิตไข่เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า” หน้า 28-40. จัดพิมพ์โดยกรมวิชาการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- Cabanillas, H.E., G.O. Jr. Poinar and J.R. Raulston. 1994. *Steinernema riobrave* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. Fundam. Appl. Nematol. 17:123-131
- Poinar, G.O. and G.M. Thomas 1965. A new bacterium, *Achromobacter nematophilus* sp. NOV (Achromobacteriaceae : Eubacteriales) associated with a nematode. International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy Vol. 15: 4, 249-252.