

- | | |
|---------------------------|---|
| 1. ชุดโครงการวิจัย | วิจัยการพัฒนาอารักขาพืช |
| 2. โครงการวิจัย | วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี |
| กิจกรรม | การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช |
| กิจกรรมย่อยที่ | การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช |
| 3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) | เทคนิคการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง <i>Steinernema riobrave</i> |
| ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) | Production techniques on Entomopathogenic Nematode, <i>Steinernema riobrave</i> |
| 4. คณะผู้ดำเนินงาน | |
| หัวหน้าการทดลอง | วีไลวรรณ เวชยันต์ |
| ผู้ร่วมงาน | สาทิพย์ มาลี อิศเรศ เทียนทัต |
| | กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |

5. บทคัดย่อ

ศึกษาเทคนิคการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema riobrave* ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยดำเนินการ 3 การทดลอง คือ 1. ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculum) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ในการเลี้ยงขยายด้วยแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) ด้วยวิธี Paper bioassay ใช้จานแก้วภายในวางกระดาษกรอง 1 แผ่น หยดไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เริ่มต้น 3 อัตรา คือ 2,000 3,000 และ 4,000 ตัวต่อน้ำกลั่น 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร พบว่า ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* อัตรา 2,000-4,000 ตัวต่อน้ำ 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร พบหนอนกินรังผึ้งตาย 82-100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เจริญเติบโตและขยายพันธุ์ออกลูกหลานและพัฒนาเป็นไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) และเริ่มออกจากซากหนอนวันที่ 10 ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 210,000 – 360,000 ตัวต่อหนอน 1 ตัว การใช้ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ความเข้มข้นเริ่มต้น 4,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตรต่อหนอน 10 ตัว ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ยสูงสุด 360,000 ตัวต่อหนอน 1 ตัว 2. ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculum) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว พบว่า การเลี้ยงไส้เดือนฝอยร่วมกับแบคทีเรียโดยใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอย 10,000 ตัว/อาหาร 40 กรัม ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าและแตกต่างทางสถิติกับการใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอย 20,000 และ 30,000 ตัว 3. ศึกษาวัสดุที่ใช้ในการเก็บรักษาต่ออายุและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* พบว่า ฟองน้ำ เป็นวัสดุที่ใช้ในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ให้รอดชีวิตได้สูงกว่าผงดิน และโพลีเมอร์ เมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 15 องศาเซลเซียส

6. คำนำ

ไส้เดือนฝอยที่อยู่ในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีการดำรงชีวิตร่วมกับแบคทีเรียที่เป็น symbiotic bacterium โดยไส้เดือนฝอยตัวอ่อนวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (infective juvenile) จะมีแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในลำไส้ส่วนหน้า และจะปลดปล่อยในระบบเลือดของแมลงเมื่อมันสามารถไชเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง (Poinar and Thomas, 1966) ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สกุลนี้เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีศักยภาพสูงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเป็นสารชีวอินทรีย์นำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยแมลงอาศัย เช่น หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella* L.) ซึ่งเป็นหนอนที่เลี้ยงขยายเป็นปริมาณมากได้ง่าย จึงนิยมใช้เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (วัชรี, 2540) ไส้เดือนฝอยสามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียมทั้งอาหารแข็ง (Bedding, 1981) และในอาหารเหลว (Friendman, 1990) การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช จะต้องผลิตให้ได้ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เป็นระยะเข้าทำลายแมลง ซึ่งเป็นระยะที่สามารถปรับตัวให้อยู่รอดในสภาพที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น สภาพที่ไม่มีอาหารหรือไม่มีแมลงอาศัย ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าสูตรอาหารเทียม และพัฒนาวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณมากแต่ต้นทุนการผลิตต่ำเพื่อนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่กว้างขวางได้ทุกระดับ การเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยอาหารเทียมระยะแรก เลี้ยงบนอาหารเทียมที่ไม่มีเชื้ออื่นเจือปนเรียกว่า axenic culture ซึ่งส่วนประกอบของอาหารที่ใช้มีราคาแพง เช่น ตับของกระต่ายที่ตั้งท้อง แต่การเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยไม่ดึ้นัก ต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนอาหารเทียมร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารแข็ง เรียกการเลี้ยงแบบนี้ว่า monoxenic culture (Bedding, 1981) ในประเทศไทยโดยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ทำการทดลองนำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ไปควบคุมแมลงศัตรูพืชต่างๆ หลายชนิดได้เป็นผลสำเร็จ คือ หนอนกินใต้ผิวเปลือกองุ่น ตัวอ่อนของด้วงหมัดผักในผักกาดหัว ด้วงวงมันเทศ หนอนกระทู้หอมในดาวเรือง นอกจากนี้ยังได้วิจัยและพัฒนาการเลี้ยงขยายปริมาณมากด้วยอาหารเทียมทั้งชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยปรับปรุงสูตรอาหารบางส่วนให้เหมาะสม และศึกษาวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ติดอยู่ที่ลำไส้ของไส้เดือนฝอยและการเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปผสมในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอย และต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวโดยวัชรี และสุทธิชัย (2544) เป็นผลสำเร็จและเทคโนโลยีดังกล่าวได้ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชนผลิตเป็นการค้าแล้ว จากรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งพบในเขตภูมิอากาศใกล้เคียงร้อนที่มลรัฐเท็กซัส (Cabanillas, 1994) ซึ่งภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มี *Xenorhabdus cabanillasii* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (Poinar and Thomas, 1965) โดยไส้เดือนฝอยทำหน้าที่เป็นพาหะนำแบคทีเรียเข้าสู่ภายในลำตัวแมลงทางช่องเปิดต่างๆ เช่น ปาก ทวาร ช่องรูหายใจ จากนั้นจะไชผ่านเข้าไปสู่ช่องว่างของลำตัว (haemocoel) และจะปลดปล่อย

แบคทีเรียออกมาสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง แบคทีเรียจะมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วและทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง เพราะเลือดเป็นพิษ (septicemia) ในขณะเดียวกันแบคทีเรียก็จะสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยต่อไปจนอาหารภายในตัวแมลงหมด ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 35 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีประสิทธิภาพสามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ได้ ในขณะที่ *S. carpocapsae* ไม่สามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิดังกล่าว และพบว่า *S. riobrave* สามารถเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมสูตรอาหารสุนัขผสมพองน้ำได้ แต่ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง IJ ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเทียมยังไม่คงที่ จากข้อมูลดังกล่าวจึงควรพัฒนาวิธีการเลี้ยงและศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. riobrave* ด้วยแมลงอาศัยและด้วยอาหารเทียมทั้งอาหารเหลวและอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาการผลิตขยาย *S. riobrave* ให้มีปริมาณมากสำหรับการนำไปใช้ป้องกันกำจัดแมลงในสภาพไร่อต่อไปในอนาคตต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- ไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง
- หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* (L.)
- แบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus cabanillasii*
- อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ ตู้บ่มไข่เชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องเขย่า กล้องจุลทรรศน์
- เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ flask, beaker, cylinder, petri dish และ test tube
- อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Ys broth, Yeast extract, และ Tryptic soy broth
- สารเคมีต่างๆ ได้แก่ alcohol, formalin, hyamine

วิธีการ

1. ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculums) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่ใช้เลี้ยงด้วยแมลงอาศัย โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ มี 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 2,000 ตัว/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 2,000 ตัว/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 3,000 ตัว/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 3,000 ตัว/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 4,000 ตัว/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 6 ไล่เดือนฝอยเข้มข้น 4,000 ตัว/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เตรียมไล่เดือนฝอย *S. riobrave* ให้มีความหนาแน่นตามกรรมวิธี หยดไล่เดือนฝอยลงบนกระดาษกรองในงานทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม. ภายในวางกระดาษกรอง 1 แผ่น ใส่หนอนกินรังผึ้ง *G. mellonella* จำนวน 10 ตัว/งานทดลอง ทำกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ (งาน) จากนั้นนำงานทดลองเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หลังการทดลองนาน 48 ชั่วโมง นำซากหนอนที่ตายในแต่ละกรรมวิธีมาล้างด้วยน้ำกลั่น ก่อนนำมาวางเรียงบนผ้าขาวบางที่ปูอยู่บนงานแก้วที่คว่ำอยู่ในกล่องพลาสติก ภายในหล่อด้วยน้ำกลั่นให้ระดับน้ำสูงประมาณ 3/4 ของความสูงของงานแก้ว เพื่อล่อไล่เดือนฝอย (Trap) หลังจากนั้นประมาณ 10 วัน เทเก็บน้ำที่มีไล่เดือนฝอยทุกวัน นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นและนับจำนวนไล่เดือนฝอยที่ผลิตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในแต่ละกรรมวิธี ก่อนเทเก็บไล่เดือนฝอยในชั้นฟองน้ำสังเคราะห์ในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ จึงนำไล่เดือนฝอยมาทดสอบคุณภาพของไล่เดือนฝอยที่ผลิตได้ตามวิธีการของ Miller (1989) โดยใช้ไล่เดือนฝอย 1 ตัว/หนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ (ภาค) ๆ ละ 24 ตัว ตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนตายภายในเวลา 48 ชั่วโมง

การบันทึกผล

บันทึกจำนวนหนอนกินรังผึ้งที่ตายในแต่ละกรรมวิธี ที่เวลา 48 ชั่วโมง

จำนวนไล่เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง ในแต่ละกรรมวิธี

2. ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculum) ของไล่เดือนฝอย *S. riobrave* ต่อผลผลิตไล่เดือนฝอยในอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไล่เดือนฝอยเริ่มต้น 10,000 ตัว

กรรมวิธีที่ 2 ไล่เดือนฝอยเริ่มต้น 20,000 ตัว

กรรมวิธีที่ 3 ไล่เดือนฝอยเริ่มต้น 30,000 ตัว

กรรมวิธีที่ 4 ไล่เดือนฝอยเริ่มต้น 40,000 ตัว

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เตรียมอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวสูตรอาหารไข่ ประกอบด้วย ไข่ไก่ 10 ฟอง น้ำมันหมู 220 มล. น้ำกลั่น 331 มล. และฟองน้ำ 140 กรัม ผสมส่วนผสมต่างให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร แล้วนำมาขย่ำรวมกับชั้นฟองน้ำสังเคราะห์ซึ่งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดลูกเต๋า ซึ่งอาหารเทียมใส่ในใส่ขวดแก้ว (flask) ขนาด 500 มล. ขวดละ 40 กรัม ปิดจุกสำลี และนำเข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำเข้าอบริสุทธ์แบบคที่เรียร่วมอาศัย *X. cabanillasii* และนำไล่เดือนฝอยลงเลี้ยงใน

อาหารเทียมด้วยวิธีปลอดเชื้อตามกรรมวิธี ตั้งขวดเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 °ซ
บันทึกการพัฒนาของไส้เดือนฝอยจนไส้เดือนฝอยพัฒนาเจริญเติบโตเป็นวัย 3 ระยะ U 95-100% จึงทำการ
ล้างเก็บผลผลิตและนับจำนวน

การบันทึกข้อมูล

บันทึกจำนวนไส้เดือนฝอย ที่เพาะเลี้ยงได้ในแต่ละวิธีการในทุกการกรรมวิธี

3. ศึกษาวัสดุที่ใช้ในการเก็บรักษาต่ออายุและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เตรียมไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ระยะเข้าทำลายแมลง อัตรา 10 ล้านตัว/น้ำ 10
มล. นำมาผสมกับวัสดุที่ใช้ในการเก็บรักษา 3 ชนิด คือ ฟองน้ำสังเคราะห์ ดินเหนียว และโพลีเมอร์ ผสมให้
ไส้เดือนฝอยเข้ากับวัสดุเก็บในถุงพลาสติกขนาด 4x6 นิ้ว ปิดปากถุงให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิ 10 และ 25 องศา
เซลเซียส ทุก 30 วัน ทำการตรวจการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยใน
แต่ละกรรมวิธี ทำกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ

เวลาและสถานที่

เวลา : เดือนตุลาคม 2554 – เดือนกันยายน 2558

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1. ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculums) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave*
ที่เหมาะสมในการเลี้ยงด้วยแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) ต่อคุณภาพและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย
ดำเนินการทดลองด้วยวิธี Paper bioassay ใช้จานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม. ภายในวางกระดาษ
กรอง 1 แผ่น โดยหยดไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJs) เข้มข้น 3 อัตรา คือ 2,000 3,000 และ
4,000 ตัวในน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร และที่อัตราความเข้มข้นของไส้เดือนฝอย 2,000 3,000 และ 4,000 ตัวใน
น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง พบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เข้าทำลายและทำให้
หนอนกินรังผึ้งตาย เท่ากับ 82-100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบหนอนกินรังผึ้งตายสูงสุดเมื่อใช้ไส้เดือนฝอยเข้มข้น
เริ่มต้น 4,000 ตัวในน้ำ 0.4 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร เท่ากับ 97 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
รองลงมาคือไส้เดือนฝอยเข้มข้นเริ่มต้น 3,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตร และ 0.4 มิลลิลิตร เท่ากับ 89 และ 93
เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่อัตราความเข้มข้นเริ่มต้นของไส้เดือนฝอย 2000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตร และ

0.4 มิลลิลิตร พบหนอนกินรังผึ้งตายเท่ากับ 88 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 1) ปริมาณน้ำที่ใช้ในทุกความเข้มข้นมีผลในการทำให้หนอนกินรังผึ้งตายแตกต่างกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไส้เดือนฝอยเริ่มต้น แต่ลดปริมาณน้ำลง พบหนอนกินรังผึ้งตายลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ปริมาณน้ำที่ลดลงหมายถึงความชื้นต่อหน่วยพื้นที่ที่ลดลง ส่งผลให้การเคลื่อนที่ค้นหาแมลงและเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เป็นไปได้ไม่ง่ายและล่าช้าลง ทั้งนี้การทำให้แมลงตายของไส้เดือนฝอยจะเกิดขึ้นภายหลังจากไส้เดือนฝอยค้นหาแมลงพบและเจาะผ่านเข้าสู่ตัวแมลงโดยผ่านทางช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ช่องว่างระหว่างข้อปล้องของหนอน ปาก เป็นต้น ภายหลังจากไส้เดือนฝอยผ่านเข้าสู่ตัวแมลงสำเร็จแล้ว ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงจะพัฒนาเป็นไส้เดือนฝอยระยะต่างๆ จนเป็นตัวเต็มวัยขยายพันธุ์ อยู่ภายในซากของแมลงโดยอาศัยของเหลวในตัวแมลงเป็นอาหาร ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่เข้าสู่ตัวหนอนกินรังผึ้ง เจริญเติบโตอยู่ภายในซากหนอนกินรังผึ้งวัย 5 นั้น ใช้เวลาประมาณ 10-12 วัน ภายหลังจากการล่อให้ไส้เดือนฝอยที่พัฒนาอยู่ภายในซากแมลงจนเป็นไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงออกจากซากแมลงเคลื่อนที่ลงสู่ที่ที่ล่อไว้ในกล่องขึ้น โดยพบการเคลื่อนย้ายของไส้เดือนฝอยออกจากซากแมลงลงสู่ที่ที่ล่อไว้ในวันที่ 10 หลังหนอนตาย ซึ่งได้ทำการเทเก็บไส้เดือนฝอยที่อยู่ในน้ำสะอาดที่ล่อไว้ทุกวัน นำน้ำไส้เดือนฝอยมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดเศษซากหนอนที่อาจปนเปื้อนมา จากนั้นนำสารแขวนลอยที่มีไส้เดือนฝอยที่สะอาดอยู่มานับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในแต่ละกรรมวิธี พบว่าจำนวนไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงที่เลี้ยงขยายด้วยหนอนกินรังผึ้ง เมื่อใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้นแตกต่างกัน ได้ผลผลิตเฉลี่ยต่อหนอนหนอนกินรังผึ้งหนึ่งตัว เท่ากับ 2.10×10^5 - 3.60×10^5 ตัว เมื่อใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 4,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง สูงสุด 3.60×10^5 ตัว รองลงมาคือ ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 3,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง 2.80×10^5 ตัว และไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 2,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง 2.40×10^5 ตัว เมื่อลดปริมาณน้ำที่ใช้ลงพบว่า การใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 4,000 ตัวในน้ำ 0.4 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง สูงกว่ารองลงมาคือ ใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 3,000 และ 2,000 ตัวในน้ำ 0.4 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง เท่ากับ 3.40×10^5 , 2.60×10^5 และ 2.10×10^5 ตัว ตามลำดับ (Figure 2) เมื่อนำไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงขยายได้จากทุกกรรมวิธี นำมาทดสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ตามวิธีการของ Miller (1989) โดยใช้ไส้เดือนฝอย 1 ตัว/หนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ (ภาค) ๆ ละ 24 ตัว ตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนตายภายในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าไส้เดือนฝอยเลี้ยงขยายได้จากทุกกรรมวิธี มีคุณภาพโดยทำให้แมลงตายไม่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculums) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว พบว่า เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ร่วมกับ แบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวสูตรอาหารไข่ โดยการใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอย 10,000 ตัว สามารถผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงได้สูงสุดเท่ากับ 2.2×10^6 ตัวต่ออาหาร 40 กรัม มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอย 20,000-30,000 ตัว ซึ่งสามารถผลิตไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ระยะเข้าทำลายแมลงได้เท่ากับ 1.6×10^6 ตัว การเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้นเป็น 40,000 ตัวต่ออาหาร 40 กรัม สามารถผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงได้เท่ากับ 1.95×10^6 ตัวต่ออาหาร 40 กรัม (Figure 3) ทั้งนี้จะเห็นว่าการเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้นและปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงอาจมีความสัมพันธ์ต่อจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอย

การทดลองที่ 3 ศึกษาวัสดุที่ใช้ในการเก็บรักษาต่ออายุและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* พบว่า วัสดุอุ้มความชื้น 3 ชนิด ได้แก่ ฟองน้ำสังเคราะห์ ดินเหนียว และ โพลีเมอร์ ที่ใช้ในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ระยะเข้าทำลายแมลงซึ่งได้จากกการเลี้ยงด้วยอาหารเทียม พบว่า ที่ 10 องศาเซลเซียส วิธีการเก็บไส้เดือนฝอยในชั้นฟองน้ำสังเคราะห์ และ โพลีเมอร์ ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีชีวิตรอดดีและมีแนวโน้มเก็บได้นานกว่าวิธีการเก็บไส้เดือนฝอยในผงดินในถุงพลาสติกซึ่งผงดินมีการสูญเสียความชื้นภายในถุงสูงกว่าโพลีเมอร์และฟองน้ำ และที่ 25 องศาเซลเซียส การเก็บไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ในโพลีเมอร์ไส้เดือนฝอยมีแนวโน้มมีชีวิตรอดสูงกว่าในดินและฟองน้ำที่ระยะเวลาการเก็บเท่ากัน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง ด้วยแมลงอาศัยหอนกินรังผึ้ง *Galleria melonella* โดยวิธี paper bioassay โดยใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้นตั้งแต่ 2,000 – 4,000 ตัวต่อน้ำ 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เจริญเติบโตและขยายพันธุ์ออกลูกหลานและพัฒนาเป็นไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) และเริ่มออกจากซากหอนวันที่ 10 วัน ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 210,000 – 360,000 ตัวต่อหอน 1 ตัว ไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ในทุกวิธีมีคุณภาพและมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงไม่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อทดสอบตามวิธีการของ Miller (1989) โดยหัดไส้เดือนฝอย 1 ตัว ต่อหอนกินรังผึ้ง 1 ตัว ตรวจผลการทดลองที่ 48 ชั่วโมง แม้ว่าการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ด้วยหอนกินรังผึ้ง *G. melonella* จะให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงถึง 360,000 ตัวต่อหอนกินรังผึ้ง 1 ตัว สำหรับการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเทียมจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอาหาร

และจำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้นที่ใช้ซึ่งอาจมีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงที่ผลิตได้ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการพัฒนารูปแบบและวิธีการผลิตอื่นที่เหมาะสมทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลผลิตปริมาณมากเพียงพอสำหรับความต้องการของเกษตรกรในการนำไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง ไปใช้ควบคุมแมลงในสภาพไร่ รูปแบบการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงในวัสดุอุ้มความชื้น 3 ชนิด ที่ทำการศึกษา พบว่า การเก็บไส้เดือนฝอยในโพลีเมอร์ และฟองน้ำสังเคราะห์ ในถุงพลาสติก ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีชีวิตรอดได้สูงกว่าการเก็บในผงดินในถุงพลาสติก เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 และ 25 องศาเซลเซียส

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ข้อมูลที่ได้นำไปพัฒนารูปแบบและวิธีการผลิตไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ไปใช้ควบคุมแมลงในสภาพไร่ต่อไป เป็นทางเลือกให้กับเกษตรกร ในการเลือกใช้วิธีการป้องกันกำจัดแมลงโดยชีววิธี นอกเหนือจากวิธีการกำจัดแมลงโดยการใช้สารเคมี

11. คำขอขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณนางสาวประยูร จันทร์นาม และพนักงานราชการ งานไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานสำเร็จได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

วัชรีย์ สมสุข. 2540. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* (L.). วารสารกีฏและสัตววิทยา ปีที่ 19 (2):107-109

วัชรีย์ สมสุข. 2544. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, หน้า 209-244. ใน การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อ

การเกษตรยั่งยืน. เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

วัชรีย์ สมสุข และสุทธิชัย สมสุข. 2544. รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่องผลงานวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้าจัดพิมพ์โดย กรมวิชาการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ 172 หน้า.

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.

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

Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development. pp. 153-172 In R. Gaugler and H.K. Kaya, eds.. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press.

- Miller, R. W. 1989. Novel pathogenicity assessment technique for *Steinernema* and *Heterorhabditis* Entomopathogenic nematodes. *J. Nematol.* 21:574.(abstr.)
- Poiner, 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.
- Poinar, G. O. 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). *J. Parasitol.* 56:385-390.

13. ภาคผนวก

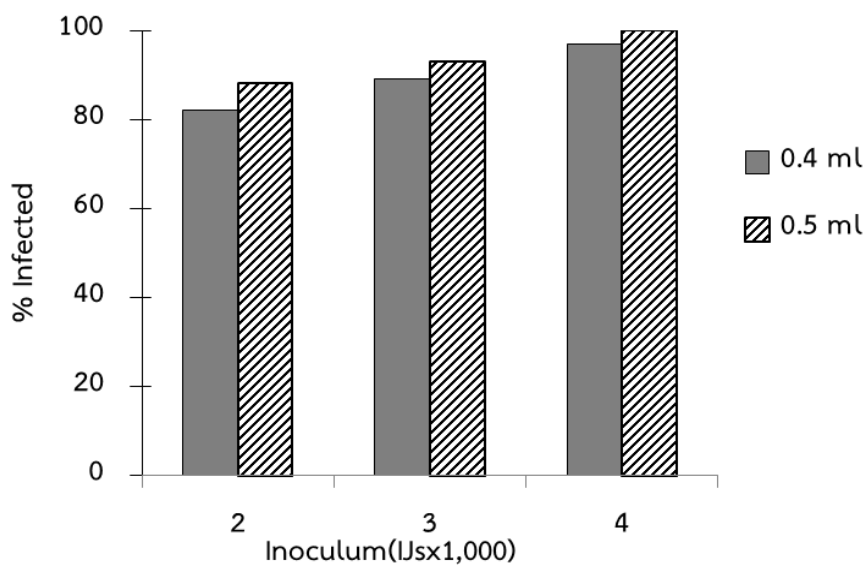


Figure 1 Effects of *Steinernema riobravae* inoculum concentration on infection in *Galleria mellonella*.

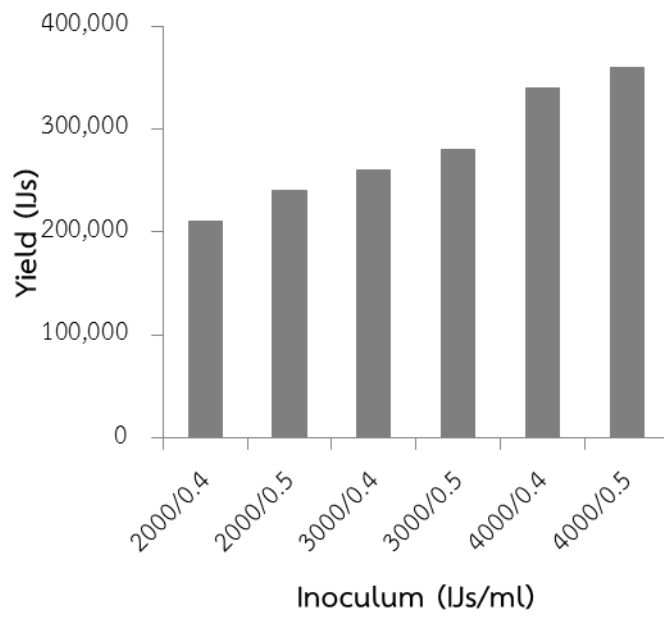


Figure 2 Number of *Steinerinema riobrave* infective juveniles reproduced per insect host

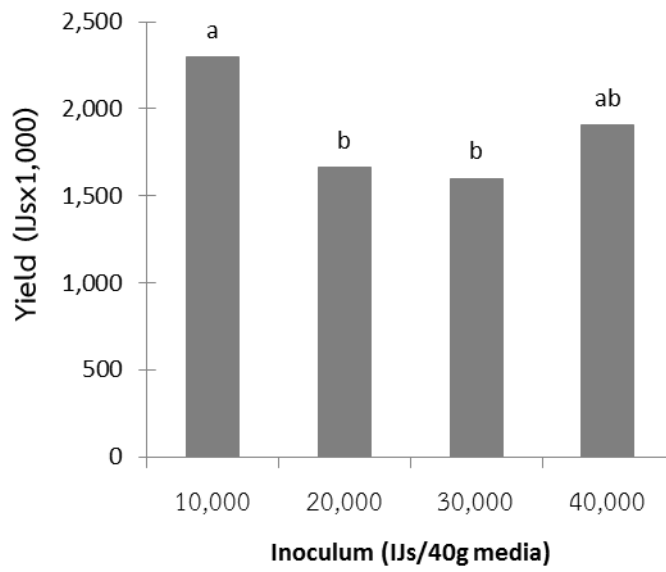


Figure 3 Number of *Steinerinema riobrave* infective juveniles reproduced per media.