



วารสารเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj>



การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema siamkayai* EPNKU70 ด้วยอาหารเทียม

Mass production of the entomopathogenic nematode, *Steinernema siamkayai* EPNKU70 using artificial media

ภาณุรักษ์ ประทับทอง^{1,2}, ประกาย ราชณวงษ์¹, ฉัตรเฉลิม อาชาล¹, ขวัญฤดี คชานันท์¹, รัตนาดี อ่อนวงษ์³ และ อธิราช หนูสีดำ^{1*}

Phanuruk Pratubkong^{1,2}, Prakai Rajnuwong¹, Chatchaloem Arkhan¹, Kwanrudee Kachanan¹, Rattanawadee Onwong³ and Atirach Noosidum^{1*}

¹ ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

² Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

³ สำนักงานเกษตรจังหวัดสุราษฎร์ธานี สุราษฎร์ธานี 84000

² Surat Thani Provincial Agricultural Extension Office, Suratthani 84000

³ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (ไรสุวรรณ) คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครราชสีมา 30320

³ National Corn and Sorghum Research Center, Insechandrastitya Institute for Crop Research and Development, Kasetsart University, Nakhon Ratchasima 30320

บทคัดย่อ: ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นชีวภัณฑ์ที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ในระบบการผลิตพืชจำเป็นต้องผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในปริมาณมากเพื่อลดต้นทุนการผลิต งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบศักยภาพของอาหารเทียม 3 สูตร ได้แก่ อาหารเทียมสูตรวุ้นตับไต อาหารเทียมสูตรวุ้นไขมัน และอาหารเทียมสูตร basal medium ผสมกากถั่วเหลือง ในการเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema siamkayai* EPNKU70 ในห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่าอาหารเทียมสูตร basal medium ผสมกากถั่วเหลืองและชุดควบคุม (วุ้นเปล่า) ไม่สามารถให้ผลผลิตระยะ Infective juveniles (IJs) IJs ในรุ่นถัดไปได้ ในขณะที่อาหารเทียมสูตรวุ้นไขมันมีศักยภาพสำหรับการผลิต *S. siamkayai* EPNKU70 สูงกว่าอาหารเทียมสูตรวุ้นตับไต อาหารเทียมสูตรวุ้นไขมันและอาหารเทียมสูตรวุ้นตับไตให้ผลผลิต IJs เท่ากับ 25,258.00 และ 6,133.93 IJs/มล. ตามลำดับ โดยมีระยะเวลาในการฟักตัวเท่ากับ 3.17 และ 3.23 วัน ตามลำดับ ระยะเวลาการพัฒนาเป็นระยะ IJ รุ่นใหม่เท่ากับ 5.20 และ 6.43 วัน ตามลำดับ ระยะเวลาในการให้ผลผลิตทั้งหมดเท่ากับ 12.13 และ 16.63 วัน ตามลำดับ และมีการรอดชีวิตเท่ากับ 99.02 และ 95.77% ตามลำดับ การประเมินประสิทธิภาพของผลผลิตระยะ IJ ที่มีต่อกับหนอนกินรีงผึ้ง (*Galleria mellonella* L.) ้วยสุดท้ายแสดงให้เห็นว่า ระยะ IJ ที่ผลิตด้วยหนอนกินรีงผึ้งอาหารเทียมสูตรวุ้นไขมัน และอาหารเทียมสูตรวุ้นตับไต มีประสิทธิภาพการเข้าทำลายหนอนกินรีงผึ้งภายใน 72 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 100.00, 95.56 และ 93.33% ตามลำดับ ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าอาหารเทียมสูตรวุ้นไขมันเป็นอาหารเทียมที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการผลิต *S. siamkayai* EPNKU70

คำสำคัญ: การควบคุมโดยชีววิธี; เชื้อก่อโรคแมลง; แมลงศัตรูพืช; การเลี้ยงในหลอดทดลอง

ABSTRACT: Entomopathogenic nematodes (EPNs) are highly promising biocontrol agents for insect pest management. Their application in agricultural production systems necessitates large-scale mass production to reduce costs. This study aimed to investigate three artificial media, including liver-kidney agar, lipid agar, and a basal

* Corresponding author: fagram@ku.ac.th

Received: date; January 16, 2025 Revised: date; March 12, 2025

Accepted: date; March 17, 2025 Published: date; July 16, 2025

medium with soybean residue, to mass-produce *Steinernema siamkayai* EPNKU70 under laboratory conditions. The results showed that neither the basal medium with soybean residue nor the control treatment (agar only) yielded infective juveniles (IJs) in subsequent generations. Conversely, lipid agar demonstrated greater performance compared to liver-kidney agar for the propagation of *S. siamkayai* EPNKU70. Lipid agar and liver-kidney agar yielded 25,258.00 and 6,133.93 IJs/mL, respectively. The recovery times for lipid agar and liver-kidney agar were 3.17 and 3.23 days, respectively, while the developmental times to the next generation of IJs were 5.20 and 6.43 days, respectively. The total production periods were 12.13 and 16.63 days, respectively, with survival rates of 99.02 and 95.77%, respectively. The efficacy of IJs produced on *Galleria mellonella* L. larvae, lipid agar, and liver-kidney agar, was evaluated against the final instar *G. mellonella*. Results indicated no significant differences in infection rates across the treatments within 72 hours, with mortality rates of 100.00, 95.56, and 93.33%, respectively. These findings suggest that lipid agar is a highly effective medium for the mass production of *S. siamkayai* EPNKU70.

Keywords: biological control; insect pathogen; insect pest; in vitro culture

บทนำ

ประเทศไทยมีสภาพพื้นที่และอากาศที่เอื้ออำนวยที่เหมาะสมในการปลูกพืชตลอดทั้งปี จึงส่งผลให้มีแมลงศัตรูพืชเข้าทำลายและแพร่พันธุ์อย่างต่อเนื่อง (Sapbamrer et al., 2023) อย่างไรก็ตามการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชส่วนใหญ่ในประเทศไทยมักใช้สารเคมี เนื่องจากมีความสะดวกและทำให้แมลงตายอย่างรวดเร็ว ซึ่งการใช้สารเคมีมากเกินไปจนความจำเป็นและผิดวิธีส่งผลให้สารเคมีตกค้างในสภาพแวดล้อม ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคและสิ่งมีชีวิตอื่นในห่วงโซ่อาหาร อีกทั้งยังเป็นสาเหตุให้แมลงศัตรูพืชสร้างความต้านทาน (Ruttanaphan et al., 2019) เพื่อลดปัญหาข้างต้นที่เกิดจากการใช้สารเคมีทางการเกษตร การผลิตพืชอาหารปลอดภัยได้รับการส่งเสริมในหลายประเทศทั่วโลกด้วยวิธีการผลิตพืชตามหลักการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (good agricultural practice หรือ GAP) การทำเกษตรอินทรีย์ (organic agriculture) หรือสนับสนุนการใช้ชีวภัณฑ์กำจัดแมลง (bio-insecticides) ร่วมกับการกำจัดแมลงศัตรูพืชในรูปแบบอื่นตามหลักการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (Integrate pest management หรือ IPM) (Damalas and Eleftherohorinos, 2011; Laosutsan et al., 2019) ซึ่งชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อก่อโรคแมลงหลายชนิดในกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงนั้น มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม มีประสิทธิภาพสูงในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืช และสามารถนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์การค้าได้ (Jhala et al., 2020; Koller et al., 2023)

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (entomopathogenic nematodes หรือ EPN) ในวงศ์ Steinernematidae เป็นหนอนตัวกลมก่อโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลากหลายชนิด เช่น หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด หนอนใยผัก ตัวงมหัดผัก ตัวงวงงมันเทศ หนอนชอนกิ่งลองกอง หนอนแมลงวัน ตัวงกินรากสตรอว์เบอร์รี และหนอนผีเสื้อในโรงเห็ด (Hazir et al., 2003; Lewis and Clarke, 2012; Janardhan et al., 2023) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีความปลอดภัยต่อพืช สัตว์เลื้อยคลาน และสิ่งแวดล้อม (Grewal et al., 2005) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ infective juvenile (IJ) เป็นระยะที่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ภายนอกลำตัวแมลงอาศัยและทนทานต่อสภาพแวดล้อม เข้าทำลายแมลงผ่านทางช่องเปิดธรรมชาติของแมลงอาศัย เช่น ปาก ทวารหนัก รูหายใจ (Singh et al., 2022) จึงเคลื่อนตัวเข้าสู่ระบบเลือดของแมลงอาศัย และปลดปล่อยแบคทีเรียร่วมอาศัย (symbiotic bacteria) ในสกุล *Xenorhabdus* ซึ่งบรรจุอยู่ในบริเวณทางเดินอาหารส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Stock and Goodrich-Blair, 2012) ทำให้เลือดของแมลงอาศัยเป็นพิษ (septicemia) และตายภายใน 24-48 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัยจะพัฒนาตัวในแมลงอาศัยประมาณ 2-3 วัน จนสารอาหารในซากแมลงใกล้หมด ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ รุ่นใหม่จะเคลื่อนที่ออกจากซากแมลงอาศัยเพื่อหาเหยื่อตัวใหม่ต่อไป (Poinar, 2018)

ปัจจุบันไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้รับการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์การค้าในหลายประเทศทั่วโลก (Ehlers, 2001) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงกับชีวภัณฑ์เชื้อก่อโรคแมลงในกลุ่มอื่นในประเทศไทย พบว่ายังมีจำนวนและสัดส่วนทางการตลาดค่อนข้างน้อย เนื่องจากผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไม่มีขายตามท้องตลาดทั่วไป อีกทั้งเกษตรกรต้องเก็บรักษาและใช้ให้ถูกช่วงเวลา รวมถึงการเพิ่มปริมาณที่ค่อนข้างยุ่งยากและมีต้นทุนสูงกว่าชีวภัณฑ์เชื้อก่อโรคแมลงในกลุ่มอื่น

การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมี 2 วิธีการหลัก ประกอบด้วย วิธีที่ 1 การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยแมลงอาศัย (*in vivo* production) ซึ่งเป็นการใช้ตัวอ่อนของแมลงเป็นเหยื่อ โดยเฉพาะแมลงในอันดับ lepidoptera สำหรับแมลงอาศัยที่นิยมนำมาใช้คือหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella* L.) หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* F.) และหนอนผีเสื้อข้าวสาร (*Corcyra cephalonica* Stainton) นอกจากนั้นยังมีรายงานการใช้ตัวอ่อนแมลงในอันดับ Coleoptera เช่น ตัวหนอนนก (*Tenebrio molitor* L.) (Glaser and Lewis, 2000; Stock and Goodrich-Blair, 2012) เนื่องจากแมลงดังกล่าวสามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ง่ายด้วยอาหารเทียม (artificial diet) (Chau et al., 2022) ผลผลิตของการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธีนี้มักใช้สำหรับทดลองในห้องปฏิบัติการ หรือใช้ในแปลงทดลองขนาดเล็ก สำหรับวิธีที่ 2 ผลิตในเชิงการค้าจะใช้วิธีการเพิ่มจำนวนในอาหารเทียม (*in vitro* production) ซึ่งเป็นการใช้อาหารสังเคราะห์เลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัยที่จะทำให้เกิดผลผลิตที่มีคุณภาพจำนวนมากและเพียงพอในการใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช โดยรูปแบบการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยอาหารเทียมนั้นมี 2 แบบ คือการผลิตในอาหารแข็ง (solid state culture) และผลิตในอาหารเหลว (liquid state culture) ปัจจุบันนักวิจัยหลายท่านได้เผยแพร่สูตรอาหารเทียมและวิธีการเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไว้หลากหลายวิธี (Shapiro-Ilan et al., 2023) สูตรอาหารเทียมที่นิยมใช้และนำมาดัดแปลงคือ อาหารเทียมสูตรวุ้นตับไต (liver-kidney agar) และอาหารเทียมสูตรไขมัน (lipid agar) ซึ่งหลายประเทศในทวีปยุโรป สหรัฐอเมริกา จีน ออสเตรเลีย และญี่ปุ่นได้มีการนำสูตรอาหารเทียมดังกล่าวมาดัดแปลงและผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในเชิงการค้า (McMullen and Stock, 2014) โดยอาหารเทียมแต่ละสูตรนั้นจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไปในด้านต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง คุณภาพและประสิทธิภาพของผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง การแยกเลี้ยงแบคทีเรียร่วมอาศัย รวมทั้งความยุ่งยากของวิธีการเลี้ยง ซึ่งขึ้นอยู่กับความเฉพาะของชนิดอาหารกับชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอีกด้วย (Shapiro-Ilan et al., 2014)

การใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและการพัฒนาผลิตภัณฑ์เชิงการค้าในประเทศไทยยังไม่แพร่หลายนัก เนื่องจากกระบวนการผลิตและการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยแมลงอาศัยนั้นมีข้อจำกัดในหลายด้าน ประกอบกับการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยอาหารเทียมที่ต้องใช้องค์ความรู้ค่อนข้างลึกและต้องมีอุปกรณ์ที่มีความจำเพาะซึ่งมีราคาแพง การพัฒนาวิธีการเลี้ยงและสูตรอาหารที่เหมาะสมกับชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะเป็นการช่วยส่งเสริมให้มีการใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชได้มากขึ้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารเทียมที่เหมาะสมในการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema siamkayai* EPNKU70 ที่สามารถส่งเสริมให้เกษตรกรนำไปผลิตเพื่อใช้เอง ลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช และนำไปสู่การผลิตสินค้าเกษตรที่ยั่งยืนต่อไป

วิธีการศึกษา

การเพิ่มปริมาณหัวเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

การทดลองนี้ใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินตามการทดลองของ Noosidum et al. (2024) ที่เพิ่มปริมาณด้วยหนอนกินรังผึ้งทุก 2-4 สัปดาห์ และเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 15 ± 2 องศาเซลเซียส ที่ห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ตามวิธีการของ Stock and Goodrich-Blair (2012) โดยนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ปริมาณ 500 IJs/น้ำ 700 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษชรอง Whatman® เบอร์ 1 จำนวน 2 แผ่น ซึ่งวางอยู่ภายในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 ซม. ใส่หนอนกินรังผึ้งวัยสุดท้าย 5 ตัว/จานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อไปเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 5\%$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อหนอนกินรังผึ้งตายและลำตัวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ไม่เอนาเปื่อย นำซากหนอนกินรังผึ้งมาผ่านกระบวนการ modified White trap (White, 1927) โดยนำซากหนอนไปล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายฟอร์มาลิน (formalin) 0.1% วางซากหนอนลงบนกระดาษชรอง Whatman® เบอร์ 1 จำนวน 1 แผ่น ที่บรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 ซม. และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษชรองเพื่อรักษาความชื้น หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อดังกล่าววางลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้น

ผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ที่บรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล. นำจานเพาะเชื้อไปเก็บในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 5\%$ เป็นเวลา 5-7 วัน จะเห็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ I ออกจากซากหนอนแล้วเคลื่อนตัวลงมาอยู่ในน้ำกลั่นที่ใส่ไว้ เก็บผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในน้ำกลั่นในช่วง 5 วันแรก ทำความสะอาดด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ I ที่เก็บได้ด้วยสารละลายฟอร์มาลิน 0.1% ตั้งทิ้งไว้ให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงตกตะกอนแล้วเทน้ำส่วนบนออก จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปล้าง 2-3 ครั้งจนได้หัวเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่สะอาด เก็บไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในขวดเลี้ยงเชื้อพลาสติก (culture flask) ขนาด 250 มล. และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 15 ± 2 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

อาหารเทียมสูตรที่ 1 สูตรวันตับไต (liver-kidney agar) ดัดแปลงจากสูตรของ McMullen and Stock (2014) นำตับวัวสด ปริมาณ 20 ก. และไตวัวสดปริมาณ 20 ก. ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วหั่นเป็นชิ้นลูกเต๋าขนาดประมาณ 2-3 ซม. นำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นขนาดกำลังไฟ 900 วัตต์ (Bosch®, Thailand) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 120 มล. และโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาณ 1 ก. และปั่นให้เข้ากันจนมีลักษณะข้นหนืด นำส่วนผสมมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 80 มล. และผงวุ้น (นางเจ็อก, ประเทศไทย) ปริมาณ 3 ก. ปั่นส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันอีกครั้ง เทส่วนผสมข้างต้นลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) (Speedy®, Japan) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ตั้งไว้จนอุณหภูมิเย็นลง ประมาณ 50 องศาเซลเซียส คนส่วนผสมอีกครั้งด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 ซม. ปริมาตรจานละ 10 มล. วางทิ้งไว้จนอาหารเทียมแข็งตัว

อาหารเทียมสูตรที่ 2 สูตรวันไขมัน (lipid agar) ดัดแปลงจากสูตรของ McMullen and Stock (2014) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 178 มล. ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (nutrient broth) (Himedia®, India) ปริมาณ 1.6 ก. สารสกัดยีสต์ (yeast extract) (Himedia®, India) ปริมาณ 1 ก. และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ Hexahydrate ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (Kemaus®, Australia) ปริมาตร 2 มล. (แมกนีเซียมคลอไรด์ Hexahydrate ปริมาณ 0.4 ก. ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 2 มล.) ตามด้วยผงวุ้น ปริมาณ 3 ก. คนส่วนผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ตั้งไว้จนอุณหภูมิเย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติมน้ำมันข้าวโพดปริมาตร 0.8 มล. (โกลเด้น ดร็อป ชันปิม®, ประเทศไทย) และน้ำมันข้าวโพดปริมาตร 19.2 มล. (น้ำมันข้าวโพดปริมาตร 1.4 มล. ผสมกับน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 17.8 มล.) คนส่วนผสมให้เข้ากันอีกครั้งก่อนเทลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 ซม. ปริมาตรจานละ 10 มล. วางทิ้งไว้จนอาหารเทียมแข็งตัว

อาหารเทียมสูตรที่ 3 สูตร basal medium (ที่ผลิตจากสารสกัดยีสต์ กลูโคส และ โซเดียมคลอไรด์) ผสมกากถั่วเหลือง ดัดแปลงจากสูตรของ Chairin et al. (2022) นำเมล็ดถั่วเหลืองปริมาณ 200 ก. (ไรทิพย์®, ประเทศไทย) ล้างด้วยน้ำสะอาดแล้วแช่น้ำทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดถั่วเหลืองข้างต้นไปปั่นรวมกับน้ำกลั่นปริมาตร 500 มล. จนเมล็ดถั่วละเอียด กรองด้วยผ้าขาวบาง และนำเอาเฉพาะส่วนที่เป็นกากถั่วเหลืองไปใช้ เตรียม yolk saline solution โดยการนำไข่ไก่เบอร์ 2 มาทำความสะอาดผิวด้านนอก (surface cleaning) ด้วยน้ำเปล่าและแช่ต่อด้วยเอทานอล (ethanol) 70% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกไข่ขาวออกจากไข่แดง แล้วนำเฉพาะส่วนของไข่แดงใส่ลงในถ้วยที่บรรจุสารละลายน้ำเกลือ (sterile sodium chloride solution) 0.6% (w/v) ปริมาตร 20 มล. คนส่วนผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มล. ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. เติมหากถั่วเหลืองปริมาณ 12.5 ก. สารสกัดยีสต์ปริมาณ 5.8 ก. กลูโคส (Himedia®, India) ปริมาตร 6.3 ก. โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 1.3 ก. ผงวุ้น ปริมาตร 0.5 ก. และน้ำมันปาล์มปริมาตร 10 มล. (โอสิน®, ประเทศไทย) คนส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่ตั้งไว้จนอุณหภูมิเย็นลง ประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติม yolk saline solution ที่เตรียมไว้ปริมาตร 37.5 มล. คนส่วนผสมให้เข้ากัน ก่อนเทลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 ซม. จานละ 10 มล. วางทิ้งไว้จนอาหารเทียมแข็งตัว

อาหารชุดควบคุม: เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 มล. ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มล. แล้วเติมผงวุ้นปริมาณ 3 ก. คนให้ผงวุ้นละลาย แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทใส่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 ซม. จานละ 10 มล. วางทิ้งไว้จนอาหารเทียมแข็งตัว

การศึกษาการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ด้วยอาหารเทียม

การประเมินผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเทียม

นำหัวเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ระยะ J1 อายุไม่เกิน 2 สัปดาห์ ล้างด้วย hyamine 0.1% นาน 5 นาที และตามด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้ออีก 3 ครั้ง ปรับความเข้มข้นตามอัตราที่ต้องการด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ เดิมหัวเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 200 IJs/200 ไมโครลิตร ลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 ซม. ที่บรรจุอาหารเทียมแต่ละชนิด ทดสอบด้วยอาหารเทียม 10 จานเพาะเชื้อ/อาหารเทียม และทำซ้ำ 3 ครั้ง (3 รอบของการผลิตอาหารเทียมและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง) นำจานเพาะเชื้อดังกล่าววางลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ปิดฝานำไปเก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 5\%$ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของอาหารเทียม การเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และเมื่อพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J1 เคลื่อนตัวขึ้นขอบจานเพาะเชื้อขนาดเล็ก ให้เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล. ลงในจานเพาะเชื้อขนาดใหญ่ เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J1 เคลื่อนตัวลงน้ำเป็นวันแรก ใช้ไมโครไปเปตดูดน้ำและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งหมดในจานเพาะเชื้อขนาดใหญ่ทุก 2 วัน และเติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อกลับเข้าไปในจานเพาะเชื้อขนาดใหญ่ 5 มล. ทุกครั้งจนครบ 15 วัน โดยนับจากวันที่สังเกตเห็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเคลื่อนที่ลงน้ำวันแรก เก็บผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในน้ำกลั่นในขวดเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 250 มล. และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 15 ± 2 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

สุมนับจำนวนผลิตรวมของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีชีวิต ตามวิธีการของ Glazer and Lewis (2000) โดยใช้ไมโครไปเปตขนาด 20-100 ไมโครลิตร สุ่มดูดผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J1 ที่ได้จากอาหารแต่ละสูตรซึ่งบรรจุอยู่ในขวดเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 250 มล. ออกมาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 ซม. จากนั้นเติมน้ำสะอาดตามลงไป 4 มล. นับจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีชีวิตและที่ไม่มีชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอจำนวน 10 ครั้ง/ขวด จากนั้นนำมาคำนวณผลรวมจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J1 โดยใช้สูตรที่ 1 และ 2 ดังต่อไปนี้

$$\bar{n} = \frac{n_1 + n_2 + \dots + n_{10}}{10} \quad (\text{สูตรที่ 1})$$

$\bar{n}$; ค่าเฉลี่ยจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J1/น้ำ 25 ไมโครลิตร

n_{1-10} ; จำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J1/น้ำ 25 ไมโครลิตร (ครั้งที่ 1, 2, 3...10 ตามลำดับ)

$$N = \frac{V \cdot \bar{n}}{25} \quad (\text{สูตรที่ 2})$$

N ; ผลผลิตรวมของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J1

V ; ปริมาตรของน้ำในขวดเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 250 มล.

การตรวจสอบคุณภาพผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเทียม

ทดสอบความสามารถของผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ระยะ J1 ในการก่อโรครากับหนอนกินรังผึ้งวัยสุดท้าย ด้วยวิธี filter paper bioassays ตามวิธีการ ของ Glazer and Lewis (2000) โดยหยดสารแขวนลอยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J1 อายุไม่เกิน 2 สัปดาห์ ที่ผลิตด้วยอาหารเทียมสูตรวันดับโต อาหารเทียมสูตรวันไขมัน และการใช้หนอนกินรังผึ้งเป็นแมลงอาศัยที่อัตรา 200 IJs ที่บรรจุอยู่ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.27 ซม.) จำนวน 2 แผ่น ที่บรรจุอยู่ใน 24 well-plates จากนั้นนำหนอนกินรังผึ้งวัยสุดท้ายใส่ลงไปในแต่ละหลุมจำนวน 1 ตัว/หลุม และหยดน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ทดสอบด้วยหนอนกินรังผึ้งทั้งหมด 30 ตัว/อาหารเทียม และทำซ้ำ 3 ครั้ง (3 รอบของการผลิตอาหารเทียม

และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง) ปิดฝาและเก็บ 24 well-plates ที่ทดสอบไว้ในห้องมืด อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ $60 \pm 5\%$ บันทึกอัตราการตายของหนอนกินรังผึ้งที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังการทดสอบ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การประเมินผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเทียม และการตรวจสอบคุณภาพผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเทียมที่มีต่อหนอนกินรังผึ้งวัยสุดท้าย วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และนำข้อมูลผลผลิตระยะ IJ และผลการตายของหนอนกินรังผึ้งมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน โดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่กรรมวิธีด้วย Tukey's HSD test ($P=0.05$) และนำข้อมูลจำนวนการรอดชีวิตของระยะ IJ วันที่พัฒนาเป็นตัวเต็มวัย (recovery) และวันที่ให้ผลผลิตระยะ IJ มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ 2 กรรมวิธีด้วย t-test ($P=0.05$) ด้วยโปรแกรม R version 4.1.2 (R Core Team, 2021)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การประเมินผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเทียม

การผลิตรายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ด้วยอาหารเทียมทั้ง 3 สูตร (สูตรวันดับโต สูตรวันไขมัน และสูตรbasal medium ผสมกากถั่วเหลือง) และชุดควบคุม (วัน) ให้ผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ แตกต่างกันอย่างน้อยมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F=1966.9$; $df=3, 119$; $P<0.01$) ซึ่งมีอาหารเทียมเพียง 2 สูตรเท่านั้นที่ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ รุนถัดไป (Figure 1A-1L)

อาหารเทียมสูตรวันไขมันให้ผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ สูงที่สุด มีค่าเท่ากับ $25,258.00 \pm 827.46$ IJs/มล. รองลงมาเป็นอาหารเทียมสูตรวันดับโตให้ผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ มีค่าเท่ากับ $6,133.93 \pm 337.43$ IJs/มล. ในขณะที่อาหารสูตร basal medium ผสมกากถั่วเหลือง และชุดควบคุม ไม่พบผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ (Figure 2) โดยปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการผลิตรายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยอาหารเทียมให้ได้คุณภาพและมีปริมาณสูงนั้นขึ้นอยู่กับ ชนิดของอาหาร ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง แบคทีเรียร่วมอาศัย อุณหภูมิ วิธีการเลี้ยง และโดยเฉพาะแหล่งไขมันในอาหาร (สาทิพย์ และวิไลวรรณ, 2556; ภาณุพงศ์ และคณะ, 2559; Abu Hatab et al., 1998) นอกจากนั้น ความแตกต่างของชนิดไขมันที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเทียมยังส่งผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตระยะ IJ ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น Abu-Hatab and Gaugler (2001) รายงานว่า อาหารเทียมที่มีส่วนผสมของไขมันที่ได้จากไขมันแมลงมีจำนวนลูกและอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าอาหารเทียมที่ใช้ไขมันวัว และน้ำมันหมู ในขณะที่ ภาณุพงศ์ และคณะ (2559) รายงานว่า อาหารเทียมวันที่มีส่วนผสมของน้ำมันดอกทานตะวัน และมีการเติมแบคทีเรียร่วมอาศัยในระหว่างการเลี้ยงให้จำนวนลูกในรุ่นที่ 1 และ 2 สูงกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารเทียมที่มีแหล่งไขมันจากน้ำมันหมูและเลี้ยงด้วยแมลงอาศัย

ทั้งนี้อาหารเทียมสูตรวันไขมันมีผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ระยะ IJ สูงที่สุดเป็นเพราะในอาหารเทียมมีส่วนผสมของน้ำมันข้าวโพด สอดคล้องกับการศึกษาของ Cortés-Martínez et al. (2021) ที่รายงานว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinerner glaseri* (Weiser) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตร P2 agar และ chicken-liver agar ที่มีส่วนผสมของน้ำมันข้าวโพดให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ มากกว่า อาหารเทียมสูตร nutrient MP agar ซึ่งไม่มีส่วนผสมของน้ำมันข้าวโพดในอาหารเทียม เนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ (เป็นระยะที่ไม่กินอาหาร) นั้นจำเป็นต้องใช้พลังงานในการดำรงชีพ โดยพลังงานที่ใช้ส่วนใหญ่มาจากการเผาผลาญไขมัน (Selvan et al., 1993) ในสภาพธรรมชาติไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัยได้รับไขมันจากแมลงอาศัย ดังนั้นการเลี้ยงขยายโดยใช้อาหารเทียมควรเติมส่วนผสมของไขมันที่ได้จากสัตว์หรือพืชลงไปด้วย (Buecher and Popiel, 1989) โดยแหล่งอาหารที่มีส่วนประกอบของไขมันจากสัตว์ เช่น สารสกัดจากเนื้อวัว (beef extract) เปปโตน (peptone) ไข่แดง และนม (Hara et al., 1981) และแหล่งไขมันจากพืชได้แก่ แป้งข้าวโพด น้ำมันข้าวโพด รวมถึงสารสกัดจากยีสต์ เป็นต้น (Friedman, 1990)

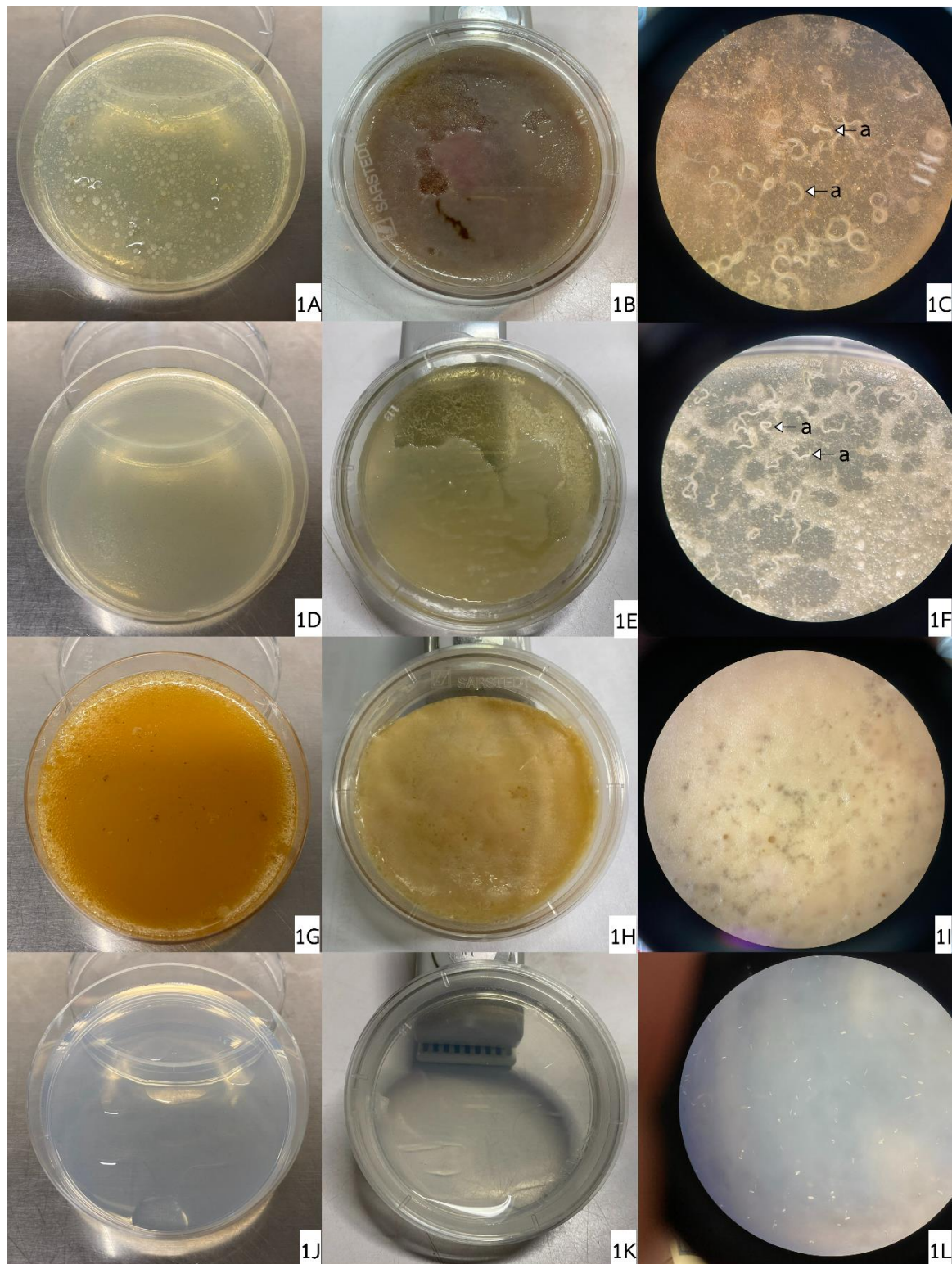


Figure 1 Growth of *Steinernema siamkayai* EPNKU70 cultured on different artificial media: Liver-kidney agar on the initial day (1A), liver-kidney agar at 3 dpi (days post-inoculation) (1B), liver-kidney agar at 7 dpi (1C) with *S. siamkayai* EPNKU70 adults (a), lipid agar on the initial day (1D) with *S. siamkayai* EPNKU70 adults (a), lipid agar at 3 dpi (1E), lipid agar at 7 dpi (1F), basal medium with soybean residue on the initial day (1G), basal medium with soybean residue at 3 dpi (1H), basal medium with soybean residue at 7 dpi (1I), control (agar only) on the initial day (1J), control at 3 dpi (1K), and control at 7 dpi (1L).

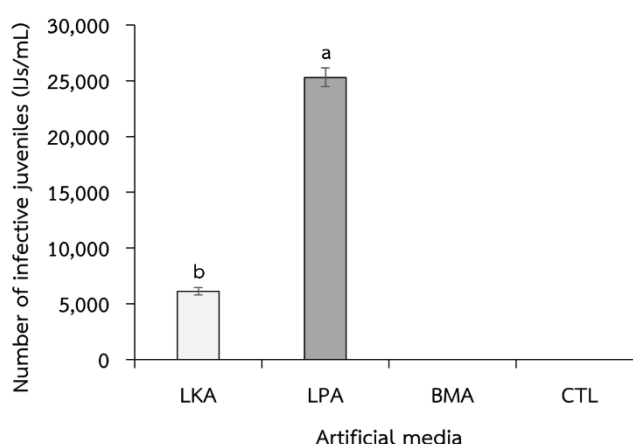


Figure 2 Productivity (mean±SE) of *Steinerema siamkayai* EPNKU70 (infective juvenile stage = IJ) reared on different artificial media after 20 days of exposure; LKA = liver-kidney agar, LPA = lipid agar, BMA = basal medium with soybean residue, and control (agar only). Different letters indicate statistically significant differences in IJ productivity of *S. siamkayai* EPNKU70 among the artificial media. Statistical analysis was performed using ANOVA, followed by Tukey's HSD test ($P < 0.05$).

อย่างไรก็ตาม จำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ระยะ IJ ที่ผลิตด้วยอาหารเทียมสูตรไขมันในครั้งนี้มีจำนวนน้อยกว่าการทดลองของขุนารถ และบัญชา (2542) ที่พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทย *Steinerema* sp. ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมไขมันมีผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinerema* sp. ระยะ IJ เฉลี่ย 65,840 ตัว/อาหาร 1 ก. แต่เมื่อพิจารณาต้นทุนพบว่าต้นทุนการผลิตสูงกว่าอาหารเทียมสูตรไขมันในการทดลองครั้งนี้ 4.1 เท่า เพราะมีส่วนประกอบและอัตราส่วนผสมแตกต่างไปจากอาหารเทียมสูตรไขมันในครั้งนี้ คือ น้ำมันข้าวโพด 10 ก. สารสกัดยีสต์ 5 ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ NA (nutrient agar) 25 ก. น้ำมันตับปลา (cod liver oil) 2.5 มล. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2 ก. และน้ำกลั่น 1 ลิตร และยังเป็นการเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัย อีกทั้งมีการเติมหัวเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระหว่างการเลี้ยงด้วย ในขณะที่การศึกษารังนี้อาหารเทียมทั้ง 3 สูตรจะไม่มีแบคทีเรียร่วมอาศัยระหว่างการทดลอง ซึ่งจะเป็นการลดขั้นตอนที่ยุ่งยากและลดต้นทุนการผลิต

ในขณะที่อาหารเทียมสูตรไขมันดิบให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ระยะ IJ น้อยกว่าการเลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตรไขมัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของวัชร และ พิมลพร (2535) ที่ผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinerema carpocapsae* (Weiser) โดยเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารสูตรตับไก่ ซึ่งประกอบด้วย ตับไก่ 70% น้ำ 20% น้ำมันหมู 10% และ ไขมัน 1% ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ เพียง 2,000 IJs/มล. ซึ่งอาจเป็นเพราะการเกิดผลึกไขมันระหว่างการเลี้ยงเมื่อเวลาผ่านไป 5-7 วันหลังเติมหัวเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยการเกิดผลึกไขมันเป็นผลมาจากสัดส่วนกรดไขมันอิ่มตัวซึ่งมีปริมาณมากในแหล่งไขมันที่ได้จากสัตว์ ส่งผลให้ปริมาณไขมันไม่เพียงพอต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง สอดคล้องกับการทดลองของ Abu Hatab and Gaugler (2001) ที่พบว่า การเติมไขมันจากสัตว์ที่มีกรดไขมันอิ่มตัวสูงในอาหารเทียมที่มีส่วนประกอบหลักเป็นยีสต์แห้ง 11 ก. โปรตีนสกัดแบคโตเปปโตเน (bacto peptone) 10 ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (tryptic soy broth) 5 ก. แป้งข้าวโพด 10 ก. และ น้ำประปา 100 มล. ทำให้ผลผลิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar ระยะ IJ ลดลง และยังกระตุ้นให้เกิดผลึกไขมันที่ส่งผลให้ปริมาณไขมันที่สะสมในตัวไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. bacteriophora* ลดลงตามไปด้วย

อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่สามารถผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ด้วยอาหารเทียมสูตร basal medium ผสมกากถั่วเหลืองได้ ซึ่งตรงกันข้ามกับรายงานของ Chairin et al. (2022) ที่สามารถใช้อาหารเทียมสูตรนี้ในการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinerema* sp. และให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ รุ่นถัดไปได้ อาจเนื่องมาจากปัจจัยด้านความ

แตกต่างของชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่นำมาทดสอบที่เป็น *Steinernema* sp. NR01 นอกจากนั้นแหล่งที่มาและกระบวนการผลิตกากถั่วเหลืองที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ยังส่งผลให้มีความแตกต่างในด้านคุณค่าทางอาหาร จึงส่งผลต่อความสามารถในการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอีกด้วย (Strydom et al., 2024) นอกจากนั้น สูตรอาหารที่แตกต่างกันอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยในแต่ละชนิด เช่น สาทิพย์ และวิไลวรรณ (2556) เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. glaseri* ด้วยอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวที่ประกอบด้วยอาหารสุนัข น้ำมันหมู หนอนกินรังผึ้ง และน้ำ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน สามารถผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. glaseri* ระยะ J2 ได้เฉลี่ย 1.3 ล้านตัวต่อ 500 มล. แต่ไม่สามารถเลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. glaseri* ด้วยอาหารเหลวที่สูตรที่ใช้เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. carpocapsae* ที่ประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต 0.75% วิตามินและเกลือแร่ 0.50% ไขมัน 0.20% Emulsifier 6.67% และน้ำสะอาด 91.88% ได้ ซึ่งทั้ง 2 สูตรมีการเติมแบคทีเรียร่วมอาศัยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกเลี้ยงขยายปริมาณใน Ys broth ในระหว่างการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ระยะเวลาที่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงใช้ในการฟื้นตัว (recovery) จากหัวเชื้อระยะ J2 ไปจนถึงระยะตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตรวันดับโตและอาหารเทียมสูตรวันไขมันใช้เวลาไม่แตกต่างกัน ($t=1.6$; $df=58$; $P=0.53$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.23 ± 0.08 และ 3.17 ± 0.07 วัน ตามลำดับ (Figure 3A) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตรวันไขมันมีการพัฒนาตัวเป็นระยะ J2 รุนใหม่เร็วกว่าอาหารเทียมสูตรวันดับโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($t=15.1$; $df=58$; $P<0.01$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.20 ± 0.07 และ 6.43 ± 0.13 วัน ตามลำดับ (Figure 3B) ในทำนองเดียวกัน ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตรวันไขมันใช้ระยะเวลาในการผลิตแต่ละรอบ (เต็มหัวเชื้อ-ผลผลิตหมด) สั้นกว่าอาหารเทียมสูตรวันดับโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($t=6.8$; $df=58$; $P<0.01$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.13 ± 0.29 และ 16.63 ± 0.25 วันตามลำดับ (Figure 3C)

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Upadhyay et al. (2015) ที่พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. bacteriophora* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมแบบเหลวในถังบ่มเชื้อใช้เวลา 3 วันในการฟื้นตัวเป็นตัวเต็มวัย และใช้เวลา 7 วัน ในการให้ผลผลิตระยะ J2 ส่วนเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงแต่ละรอบการผลิตคือ 15 วัน ซึ่งระยะเวลาในการฟื้นตัว และจำนวนวันแต่ละรอบการผลิตเป็นสิ่งสำคัญในการตัดสินใจคัดเลือกค่าทางเศรษฐกิจ (Strauch and Ehlers, 1998) อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตรวันไขมันใช้เวลาในการพัฒนาตัวเป็นระยะ J2 และระยะเวลาในการผลิตแต่ละรอบน้อยกว่าอาหารเทียมสูตรวันดับโต ทั้งนี้ในอาหารเทียมวันไขมันมีแหล่งไขมันที่มาจากน้ำมันข้าวโพดที่ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวน้อยกว่าแหล่งไขมันที่มาจากสัตว์ โดยแหล่งไขมันที่มีความเข้มข้นของกรดไขมันอิ่มตัวสูง (ไขมันจากสัตว์) อยู่ในอาหารเทียมจะขัดขวางการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทำให้เจริญเติบโตช้า ส่วนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เลี้ยงในอาหารเทียมที่มีแหล่งไขมันจำพวกกรดไขมันไม่อิ่มตัว (น้ำมันข้าวโพด) ทำให้มีกสะสมไขมันในลำตัวไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเร็วกว่าจึงเจริญเติบโตได้เร็วกว่า (Abu Hatab and Gaugler (2001)

การรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J2 ที่เป็นผลผลิตจากอาหารเทียมสูตรวันไขมันมีการรอดชีวิตสูงกว่าอาหารเทียมสูตรวันดับโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($t=5.1$; $df=58$; $P<0.01$) โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J2 ที่ได้จากอาหารเทียมสูตรวันไขมันและอาหารเทียมสูตรวันดับโตมีค่าเท่ากับ 99.02 ± 3.17 และ $95.77 \pm 3.23\%$ ตามลำดับ (Figure 3D) ปัจจัยที่สำคัญต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J2 คือไขมัน เพราะระยะ J2 ไม่มีการกินอาหาร แต่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะนี้ยังดำรงชีพอยู่ได้โดยอาศัยพลังงานจากไขมันที่สะสมไว้ และการเปลี่ยนแปลงของค่าไขมันเพียงเล็กน้อยมีผลมากต่อการเปลี่ยนแปลงผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญที่ห่อหุ้มอวัยวะอื่นภายในร่างกายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ซึ่งแหล่งที่มาของไขมันที่สะสมในร่างกายและผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงนั้นได้มาจากอาหารที่ได้รับ ดังนั้นไขมันจึงเป็นตัวกำหนดเรื่องความคงทนของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง Abu Hatab and Gaugler (2001) อธิบายว่า การใช้แหล่งไขมันจากแมลง น้ำมันมะกอก และน้ำมันพืชบางชนิดเป็นส่วนประกอบในอาหารเทียม ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสะสมไขมันในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับไขมันจากสัตว์ โดยมีการสะสมไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดโอเลอิก (oleic acid) มากกว่า แหล่งไขมันจากสัตว์ซึ่งมีกรดสเตียริก (stearic acid) สูง ซึ่งผลที่ได้ก็เป็นไปในทิศทางเดียวกับการทดลองครั้งนี้

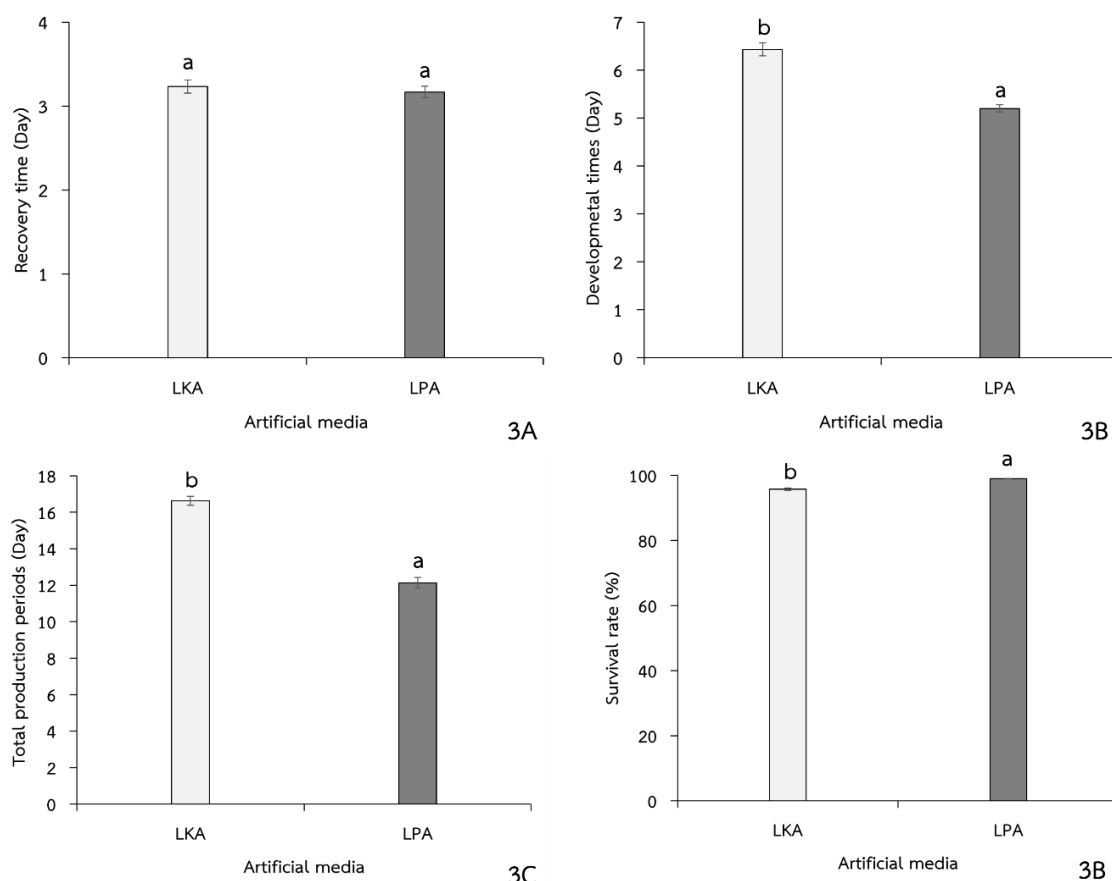


Figure 3 Growth (mean±SE) of *Steinernema siamkayai* EPNKU70 cultured on two artificial media; LKA = liver-kidney agar and LPA = lipid agar. Different letters indicate statistically significant differences in recovery times (3A), developmental times (3B), total production periods (3C) and survival rates (3D) among two artificial media. Statistical analysis was performed using T-test ($P<0.05$).

การตรวจสอบคุณภาพผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเทียม

เมื่อนำผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ระยะ J1 ที่ได้จากอาหารเทียม 2 สูตร (อาหารเทียมสูตรวันดับไตและอาหารเทียมสูตรวันไขมัน) และการผลิตโดยใช้หนอนกิ้งมั่งเป็นแมลงอาศัย มาทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายหนอนกิ้งมั่ง (*G. mellonella*) วัยสุดท้าย ผลการทดลองไม่พบการตายของหนอนกิ้งมั่งในชุดควบคุมทั้ง 3 ช่วงเวลา เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง การตายของหนอนกิ้งมั่งมีความแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง ($F=69.8$; $df=3, 35$; $P<0.01$) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ที่เลี้ยงด้วยหนอนกิ้งมั่งทำให้หนอนกิ้งมั่งวัยสุดท้ายตายมากที่สุด เท่ากับ $95.50\pm2.89\%$ ในขณะที่อาหารเทียมสูตรวันดับไตและอาหารเทียมสูตรวันไขมันทำให้หนอนกิ้งมั่งวัยสุดท้ายตายเท่ากับ 66.67 ± 2.89 และ $72.22\pm5.96\%$ ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง การตายของหนอนกิ้งมั่งมีความแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง ($F=148.5$; $df=3, 35$; $P<0.01$) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ที่เลี้ยงด้วยหนอนกิ้งมั่งทำให้หนอนกิ้งมั่งวัยสุดท้ายตายมากที่สุด เท่ากับ $98.90\pm1.10\%$ ในขณะที่อาหารเทียมสูตรวันดับไตและอาหารเทียมสูตรวันไขมันทำให้หนอนกิ้งมั่งวัยสุดท้ายตายเท่ากับ 85.56 ± 1.76 และ $90.00\pm2.89\%$ ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง การตายของหนอนกิ้งมั่งที่เกิดขึ้นจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและชุดควบคุมมีความแตกต่างกัน ($F=122.25$; $df=3, 35$; $P<0.01$) อย่างไรก็ตาม ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ที่ได้รับการเลี้ยงด้วยหนอนกิ้งมั่ง อาหารเทียมสูตรวันไขมัน และอาหารเทียมสูตรวันดับไตทำให้หนอนกิ้งมั่งตายไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีเท่ากับ 100.00 ± 0.00 , 95.56 ± 1.76 และ $93.33\pm2.56\%$ ตามลำดับ (Figure 4)

ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J2 ที่ผลิตด้วยอาหารเทียมมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้งได้ต่ำกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J2 ที่ผลิตด้วยแมลงอาศัยในช่วง 48 ชั่วโมงแรก ซึ่งสอดคล้องกับ Gaugler and Georgis (1991) ที่รายงานว่าการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar ด้วยอาหารเทียมแบบเหลว มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลาย Japanese beetle, *Popillia japonica* Newman ได้ต่ำกว่าการผลิตด้วยหนอนกินรังผึ้ง ในทำนองเดียวกัน ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis zealandica* Poinar (Ferreira et al., 2014) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema yirgalemense* Tesfamariam, Gozel, Gaugler & Adams (Ferreira et al., 2016) ที่ผลิตด้วยอาหารเทียมแบบเหลว มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้งได้ต่ำกว่าการผลิตด้วยแมลงอาศัย (Shapiro-Ilan et al., 2012) ความแตกต่างดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J2 ที่ผลิตด้วยแมลงอาศัยมีปริมาณไขมันสูงกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียม (Molyneux, 1985) ซึ่งปริมาณของไขมันนั้นมีผลในเชิงบวกกับการก่อโรครักกับแมลงอาศัย ดังนั้นปริมาณไขมันที่ลดลงจึงส่งผลให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema feltiae* Filipjev and *H. bacteriophora* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมก่อโรครักกับตัวอ่อนหนอนกลดลงด้วย (Vanninen, 1990)

อย่างไรก็ตาม เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ระยะ J2 ที่ผลิตด้วยอาหารเทียมและหนอนกินรังผึ้งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. carpocapsae* (Grewal et al., 1999) และ *S. jeffreyense* Malan, Knoetze & Tiedt (Steyn et al., 2019) ด้วยอาหารเทียมแบบเหลว พบว่าประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J2 ที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันกับการผลิตด้วยหนอนกินรังผึ้ง นอกจากนั้น หลายการทดลองพบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J2 ที่ผลิตด้วยอาหารเทียมมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายเหยื่อได้ดีกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ J2 ที่ผลิตด้วยแมลงอาศัย เช่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. scapterisci* Nguyen & Smart ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมแบบเหลว (Grewal et al., 1999) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* sp. JAP1 ที่ผลิตด้วยอาหารเทียมแบบแข็งสูตรดับโกและสูตรไข่แดง (Cortés-Martínez et al. (2021) ทำให้หนอนกินรังผึ้งตายได้ดีกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ผลิตด้วยแมลงอาศัย และนอกจากนั้น Dunn et al. (2020) รายงานว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. jeffreyense* ที่ผลิตด้วยอาหารเทียมเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้งได้ดีกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ผลิตด้วยแมลงอาศัย โดยในระหว่างการเลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในอาหารเทียมทั้ง 2 แบบ จะมีการเติมแบคทีเรียร่วมอาศัยลงในอาหารเทียมก่อนนำไปบ่มในที่มืด ส่งผลให้แบคทีเรียร่วมอาศัยมีจำนวนมากพอและส่งเสริมไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ผลิตได้มีความสามารถในการเข้าทำลายเหยื่อได้รุนแรงกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ผลิตด้วยแมลงอาศัย ในการศึกษาอาหารเทียมทั้ง 2 สูตรนั้น ไม่มีการเติมแบคทีเรียร่วมอาศัยระหว่างการเลี้ยง อาจส่งผลให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีแบคทีเรียร่วมอาศัยจำนวนไม่มาก จึงส่งผลให้เหยื่อแสดงการตายไม่แตกต่างกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ผลิตด้วยแมลงอาศัย

ทั้งนี้ ความสำเร็จของการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยอาหารเทียมและประสิทธิภาพของผลผลิตนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ชนิดของแบคทีเรียร่วมอาศัย สูตร/รูปแบบอาหารเทียม และยักรวมถึงปัจจัยอื่นๆ ที่

เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการผลิตด้วย เช่น อัตราเริ่มต้นของหัวเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง อุณหภูมิ ระยะเวลาการบ่มเพาะ การผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวนมากด้วยอาหารเทียมในแต่ละสูตรจึงมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน (Shapiro-Ilan et al., 2023) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีศึกษาและพัฒนาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและลดต้นทุนการผลิตให้มากขึ้น

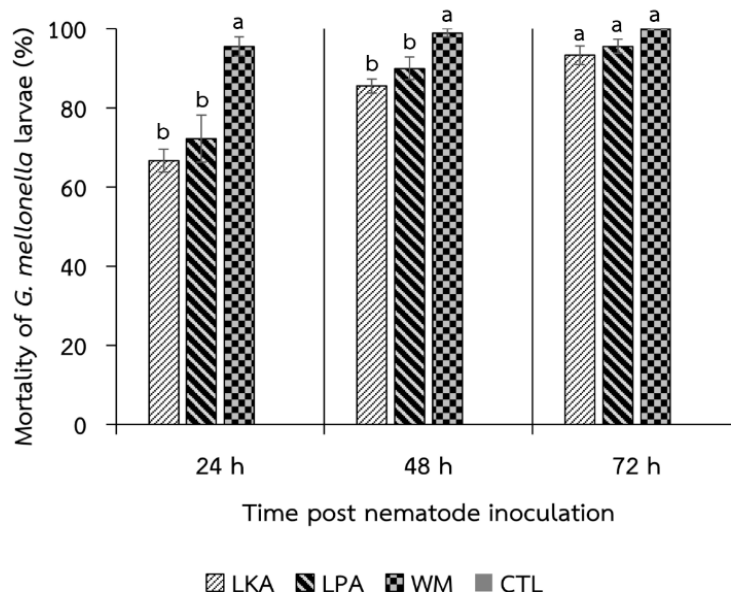


Figure 4 Mortality (mean±SE) of the 3rd instar of *Galleria mellonella* infected by *Steinernema siamkayai* EPNKU70 at 25 IJ/cm² by filter paper bioassays under laboratory conditions. Different letters indicate statistically significant differences in insect mortality among *S. siamkayai* EPNKU70 produced by different artificial media at different times after exposure; LKA = liver-kidney agar medium, LPA = lipid agar medium, WM = produced by *G. mellonella* larva, and Control (untreated treatment). The statistical analysis was performed using ANOVA, followed by Tukey's HSD test ($P < 0.05$).

สรุป

อาหารเทียมสูตรวันไขมันสามารถใช้เพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ได้ดีกว่าอาหารเทียมสูตรวันตับโต โดยอาหารเทียมสูตรวันไขมันมีปริมาณผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ 1J มากกว่าอาหารเทียมสูตรวันตับโตถึง 4.77 เท่า อย่างไรก็ตาม ผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากอาหารเทียมทั้ง 2 สูตรมีระยะเวลาการฟักตัว ระยะเวลาการพัฒนาเป็น 1J และประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนกิ้งมั่งไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาหารเทียมทั้ง 2 สูตร แสดงศักยภาพที่ดีสำหรับการนำไปใช้ผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 เพราะมีวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยากและสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดได้ ในขณะที่อาหารเทียมสูตร basal medium ผสมกากถั่วเหลือง ไม่สามารถให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* EPNKU70 ระยะ 1J ได้นอกจากนั้นการเตรียมอาหารเทียมสูตร basal medium ผสมกากถั่วเหลืองนับว่าเป็นสูตรอาหารที่มีความซับซ้อนมากที่สุดในการทดลองครั้งนี้ โดยเฉพาะขั้นตอนการเตรียม yolk saline solution ซึ่งใช้เวลานานและเสี่ยงต่อการปนเปื้อนได้ง่ายเพราะวัตถุดิบที่ใช้ (ไข่แดง) ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และต้องทำด้วยความระมัดระวังเพราะไข่แดงที่แยกออกจากไข่ขาวจะแตกง่าย ประกอบกับอาหารสูตรดังกล่าวค่อนข้างมีกลิ่น ดึงดูดให้แมลงหิวมาวางไข่บริเวณภาชนะหากจัดการไม่ดี เมื่อตัวอ่อนแมลงหิวฟักออกจากไข่แล้วจะเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อและเกิดการปนเปื้อนเชื้อโรคอื่นตามมา จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นสูตรอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่จะนำไปถ่ายทอดให้เกษตรกรผลิตใช้เอง อาหารเทียมสูตรดังกล่าวจึงเหมาะกับการพัฒนาเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ หรือใช้ทางการค้าที่มีนักวิชาการที่มีความเชี่ยวชาญมาควบคุมการผลิต

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) รหัสโครงการ PRP6705030130 และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ รหัสโครงการ FFS-KU 51.68

เอกสารอ้างอิง

- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และบัญชา ชินศรี. 2542. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp.) บนอาหารเทียมชนิด lipid agar. น. 320–325. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 สาขาพืช สาขาส่งเสริมเทคโนโลยีเกษตร 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ภานุพงศ์ แสนบุตดา, ทิพย์สุคนธ์ อนุภาพ, นุชรี ศรี และประกายจันทร์ นิมกังรัตน์. 2559. ผลของอาหารที่มีต่อศักยภาพในการสืบพันธุ์และความรุนแรงในการเข้าทำลายเหยื่อของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง. เกษตร. 44: 669–676.
- วัชร สมสุข และพิมลพร นันทะ. 2535. การผลิตไส้เดือนฝอยปราบแมลงศัตรูพืชด้วยอาหารเทียม. วารสารวิชาการเกษตร. 10: 1–4.
- สาทิพย์ มาลี และวิไลวรรณ เวชยันต์. 2556. วิจัยและพัฒนาการผลิตขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช. น. 721–731. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- Abu Hatab, M. A., and R. Gaugler. 2001. Diet composition and lipids of in vitro-produced *Heterorhabditis bacteriophora*. Biological Control. 20: 1–7.
- Abu Hatab, M. A., R. Gaugler, and R.-U. Ehlers. 1998. Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids. Journal of Parasitology. 84: 215–221.
- Buecher, E. J., and I. Popiel. 1989. Liquid culture of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. Journal of Nematology. 21: 500–504.
- Chairin, T., N. Piromkarn, N. Wandee, K. Chaiyadit, and J. Anothai. 2022. The use of soybean residue, an alternative low-cost substrate, for culturing entomopathogenic nematode. Biological Control. 174: article ID 105021.
- Chau, N. N., L. T. Anh, N. H. Vu, and H. K. Phuc. 2022. The reproduction potentials of four entomopathogenic nematode strains related to cost-effective production for biological control. Journal of Asia-Pacific Entomology. 25: article ID 101880.
- Cortés-Martínez, C., A. Rodríguez-Hernández, M. López-Cuellar, and N. Chavarria-Hernández. 2021. Surface culture of *Steinernema* sp. on two solid media and their pathogenicity against *Galleria mellonella*. Journal of Helminthology. 95: article ID e63.
- Damalas, C. A., and I. G. Eleftherohorinos. 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. International Journal of Environmental Research and Public Health. 8: 1402–1419.
- Dunn, M. D., P. D. Belur, and A. P. Malan. 2020. In vitro liquid culture and optimization of *Steinernema jeffreyense* using shake flasks. BioControl. 65: 223–233.
- Ehlers, R. U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Applied Microbiology and Biotechnology. 56: 623–633.
- Ferreira, T., M. F. Addison, and A. P. Malan. 2014. In vitro liquid culture of a South African isolate of *Heterorhabditis zealandica* for the control of insect pests. African Entomology. 22: 80–92.

- Ferreira, T., M. F. Addison, and A. P. Malan. 2016. Development and population dynamics of *Steinernema yirgalemense* (Rhabditida: Steinernematidae) and growth characteristics of its associated *Xenorhabdus indica* symbiont in liquid culture. *Journal of Helminthology*. 90: 364–371.
- Friedman, M. J. 1990. Commercial production and development. P. 153–172. In: R. Gaugler and H. K. Kaya. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Gaugler, R., and R. Georgis. 1991. Culture method and efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Biological Control*. 1: 269–274.
- Glazer, I., and E. E. Lewis. 2000. Bioassays for entomopathogenic nematodes. P. 229–247. In: A. Navon and K. R. S. Ascher. *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Grewal, P. S., V. Converse, and R. Georgis. 1999. Influence of production and bioassay methods on infectivity of two ambush foragers (Nematoda: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 73: 40–44.
- Grewal, P. S., R. U. Ehlers, and D. I. Shapiro-Ilan. 2005. *Nematodes as biocontrol agents*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Hara, A. H., J. E. Lindegren, and H. K. Kaya. 1981. Monoxenic mass production of the entomogenous nematode, *Neoaplectana carpocapsae* Weiser, on dog food/agar medium. *USDA Advances in Agriculture W-16*.
- Hazir, S., H. K. Kaya, S. P. Stock, and N. Keskin. 2003. Entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for biological control of soil pests. *Turkish Journal of Biology*. 27: 181–202.
- Janardhan, H. N., T. H. Askary, A. H. Bhat, A. Rana, I. Ahad, and W. H. Al-Qahtani. 2023. Morphological and molecular profiling of an entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*: Unlocking its biocontrol potential against vegetable insect pests. *Zootaxa*. 5351: 202–220.
- Jhala, J., A. S. Baloda, and V. S. Rajput. 2020. Role of bio-pesticides in recent trends of insect pest management: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 9: 2237–2240.
- Koller, J., L. Sutter, J. Gonthier, J. Collatz, and L. Norgrove. 2023. Entomopathogens and parasitoids allied in biocontrol: A systematic review. *Pathogens*. 12: article ID 957.
- Laosutsan, P., G. P. Shivakoti, and P. Soni. 2019. Agricultural and natural resources adaptations to climate change: Factors influencing the adoption of good agricultural practices and export decision of Thailand's vegetable farmers. *International Journal of the Commons*. 13: 867–880.
- Lewis, E. E., and D. J. Clarke. 2012. Nematode parasites and entomopathogens. P. 395–424. In: F. Vega, and H. K. Kaya. *Insect Pathology*, 2nd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- McMullen, J. G., and S. P. Stock. 2014. In vivo and in vitro rearing of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Journal of Visualized Experiments*. 91: article ID e52096.
- Molyneux, A. S. 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp., and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity for insects. *Revue de Nématologie*. 8: 165–170.
- Noosidum, A., R. Onwong, N. H. Sumaya, N. Khwanket, and C. Arkhan. 2024. Identification and biocontrol potential of entomopathogenic nematodes, *Steinernema siamkayai* occurring in western Thailand against the common cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory and screenhouse conditions. *Journal of Applied Entomology*. 148: 667–680.

- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ruttanaphan, T., W. Pluempunapat, C. Aungsisawat, P. Boonyarit, G. L. Goff, and V. Bullangpoti. 2019. Effect of plant essential oils and their major constituents on cypermethrin tolerance associated detoxification enzyme activities in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. 112: 2167–2176.
- Sapbamrer, R., A. Kitro, J. Panumasvivat, and P. Assavanopakun. 2023. Important role of the government in reducing pesticide use and risk sustainably in Thailand: current situation and recommendations. *Frontiers in Public Health*. 11: article ID 1141142.
- Selvan, S., R. Gaugler, and E. E. Lewis. 1993. Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. *The Journal of Parasitology*. 79: 167–172.
- Shapiro-Ilan, D. I., R. Han, and C. Dolinski. 2012. Entomopathogenic nematode production and application technology. *Journal of Nematology*. 44: 206–217.
- Shapiro-Ilan, D. I., R. Han, and X. Qiu. 2014. Production of entomopathogenic nematodes. P. 321–356. In: J.A. Morales-Ramos, M.G. Rojas, and D.I. Shapiro-Ilan. *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Shapiro-Ilan, D. I., L. G. Leite, and R. Han. 2023. Production of entomopathogenic nematodes. P. 293–315. In: J.A. Morales-Ramos, M.G. Rojas, and D.I. Shapiro-Ilan. *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Singh, A. K., M. Kumar, A. Ahuja, B. Vinay, K. K. Kommu, S. Thakur, A. U. Paschapur, B. Jeevan, K. Mishra, and R. P. Meena. 2022. Entomopathogenic nematodes: A sustainable option for insect pest management. P. 73–92. In: A. Rakshit, V. S. Meena, P. C. Abhilash, B. K. Sarma, H. B. Singh, L. Fraceto, M. Parihar, and A. K. Singh. *Biopesticides Vol. 2: Advances in Bio-Inoculants*. Elsevier, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Steyn, V., A. P. Malan, and P. Addison. 2019. Control of false codling moth, *Thaumotobia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae), using in vitro-cultured *Steinernema jeffreyense* and *S. yirgalemense*. *Biological Control*. 138: article ID 104052.
- Stock, S. P., and H. Goodrich-Blair. 2012. Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. P. 373–426. In: L.A. Lacey. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 2nd ed. Elsevier, Washington, USA.
- Strauch, O., and R. U. Ehlers. 1998. Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50: 369–374.
- Strydom, E., A. Erasmus, H. D. Plessis, and J. van den Berg. 2024. Suitability of different artificial diets for mass rearing of six lepidopteran pest species. *International Journal of Tropical Insect Science*. 44: 2403–2415.
- Upadhyay, D., S. Mandjiny, R. Bullard-Dillard, M. Storms, M. Menefee, and L. D. Holmes. 2015. Lab-scale in vitro mass production of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* using liquid culture fermentation technology. *American Journal of Bioscience and Bioengineering*. 3: 203–207.

- Vanninen, I. 1990. Depletion of endogenous lipid reserves in *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* and effect on infectivity. P. 232. In: Proceedings of the 5th International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaide, Australia.
- White, G. F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science. 66: 302–303.