



生物檢定本土性蟲生線蟲 (*Steinernema taiwanensis* strain T39) 感染昆蟲寄主及其人工繁殖之初探

曾慶慈、侯豐男、唐立正*

國立中興大學昆蟲學系 40227 台中市南區興大路 145 號

* 通訊作者 email: lctang@dragon.nchu.edu.tw

收件日期：2017 年 2 月 12 日 接受日期：2017 年 6 月 10 日 線上刊登日期：2017 年 10 月 12 日

摘 要

本試驗以生物檢定及不同培養法研究台灣本地產蟲生線蟲 (*Steinernema taiwanensis* strain T39) 對昆蟲寄主之殺蟲效力及人工飼育量產上之應用潛能。分別以一對一檢定法接種斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura* Fabricius) 或大蠟蛾 (*Galleria mellonella* Linnaeus) 顯示，不同培養法所得線蟲造成之寄主死亡率彼此間無顯著差異；若同樣接種體外培養線蟲，兩種寄主之死亡率亦無顯著差異。以 *S. taiwanensis* strain T39 接種昆蟲寄主進行活體培養時，平均每公克之斜紋夜蛾六齡幼蟲蟲體能產出 7.36×10^3 IJs (infective juveniles)，大蠟蛾末齡幼蟲則為 2.00×10^4 IJs，此兩結果彼此具顯著差異，顯示大蠟蛾較斜紋夜蛾更適於作為 *S. taiwanensis* strain T39 之活體培養寄主。在檢測共生菌之菌體量時發現，培養 48 h 之菌液 OD_{550nm} 為 0.49 較 72 h 菌液之 0.52 為低，然其於 NBTA 平板上生長之菌落數較多，顯示培養 48 h 之菌液內含活菌數較 72 h 為高。藉由固態及液態人工培養法測試 *S. taiwanensis* strain T39，固態培養之產量約為 3.69×10^5 IJs/mL，液態培養則約為 1.81×10^5 IJs/mL。以不同體外培養方式所得之 *S. taiwanensis* strain T39 懸浮液接種斜紋夜蛾五齡幼蟲，接種 20 IJs/mL 時，液態培養所得之 LT₅₀ 為 28.25 h 較固態培養之 40.71 h 短，而其 72 h 之累積死亡率亦相對較高，然彼此間並無顯著差異，顯示兩種人工培養法所得之線蟲雖於致病速率上有所差異，但皆能有效殺死昆蟲寄主。綜合上述結果證實對昆蟲寄主具感染力；另外，此線蟲可用斜紋夜蛾及大蠟蛾生產，亦能以體外培養法進行人工飼育量產，而所得之後代線蟲仍具有殺蟲效力。

關鍵詞：蟲生線蟲、感染力、生物檢定、人工培養。

前 言

對昆蟲具有致病力之土棲性蟲生線蟲，多隸屬於 *Steinernema* (Steinernematidae) 及 *Heterohabditis* (Heterorhabditidae) 屬，其分類地位為 Nematoda 門·Chromadoria 綱·Rhabditida 目 (Poinar, 1979;

De Ley, 2006)。蟲生線蟲對非標的生物及自然環境安全無害、寄主範圍廣泛及能商業化生產等優點，使其被視為成功之昆蟲病原，並具生物防治潛力 (Akhurst and Smith, 2002; Grewal, 2002; Ehlers, 2005; Lewis and Clarke, 2012; Shapiro-Ilan *et al.*, 2014)。

適用於防治之齡期為體表包覆有二齡幼蟲表皮之蟲生線蟲第三齡幼蟲，一般稱為侵染期幼蟲 (infective juvenile, IJ)，於體內保存大量營養物質而不取食 (Poinar, 1990; Campbell and Gaugler, 1991)，並能耐受如寒冷、乾燥及天敵等外界環境壓力，為其生活史中之唯一具有自由活動且於寄主體外生活之時期。然蟲生線蟲之所以能於在短時間內造成寄主死亡，與其行互利共生之專一性共生性細菌，特稱共生菌 (symbiotic bacteria)，有極大之關係。IJs 經搜尋到合適之昆蟲寄主後，便藉由寄主之自然開口如口、肛門、氣孔或節間膜等處侵入，而後蛻去二齡表皮且釋出自身腸道內之共生菌；共生菌會於寄主之血體腔中增殖，產生大量抗微生物質 (antimicrobial compound) 抑制他種微生物如細菌、真菌等之生長，並於 1~3 天內造成敗血症 (septicemia)、抑或是毒血症 (toxemia) 導致寄主死亡 (Forst *et al.*, 1997; Forst and Clarke, 2002; Boemare and Akhurst, 2006)；同時，蟲生線蟲之第三齡幼蟲會藉由共生菌分解寄主組織獲得營養，發育成第四齡幼蟲，而後蛻皮為成蟲，再行交尾產生下一代，一般可於寄主體內持續 2~3 世代。當寄主體內資源與養分耗盡時，線蟲會發育為 IJs，於潮濕環境下由寄主之節間膜或氣孔移出至外界環境，以待搜尋昆蟲寄主 (Adams and Nguyen, 2002)。

蟲生線蟲之人工生量產方式可分為活體 (*in vivo*) 及體外培養 (*in vitro*) 兩大類：活體培養乃直接以 IJs 感染具高感性之大蠟蛾 (*Galleria mellonella*) 或他種合適之昆蟲寄主；體外培養則可分為固態及液態培養。目前固態培養已由早年之 2D 平面 (培養皿) 飼育及動物性產品，如狗飼料、豬肝等作為培養基發展至於玻璃三角錐瓶內加入海綿塊 (polyether polyurethane foam) (3D 立體空間飼養)，並以酵母萃取物、植物油等商品化製品作為培養基質，以降低生產成本並穩定品質 (House *et al.*, 1965; Bedding, 1981; Wouts, 1981)。

液態培養之發展則略晚於固態培養，首次成功培育為 Stoll (1952) 藉由動物肝臟及搖瓶之方式生產 *S. glaseri*；而後 Pace *et al.* (1986) 藉由使用生物反應器 (bioreactor) 擴大培養之產量，Biosys 公司 (Palo Alto, California) 在 1987 年與其合作並開始製造液態培養線蟲之產品 (Shapiro-Ilan *et al.*, 2014)。目前常見之液態培養基成分極為多樣化，如豆粉、奶粉、蛋黃、酪蛋白、植物油、膽固醇及酵母萃取物等 (Pace *et al.*, 1986; Han *et al.*, 1993; Surrey and Davies, 1996; Ehlers *et al.*, 2000; Yoo

et al., 2000)。

若就資金成本、操作技術、勞力、產量規模等生產因子進行上述三種培養方式之比較，活體培養成本與操作技術之需求極低，然其所需之勞力與昆蟲飼育費用極高，生產規模亦無法與體外培養相比 (Friedman, 1990; Gaugler and Han, 2002; Shapiro-Ilan *et al.*, 2012; Shapiro-Ilan *et al.*, 2014)，故目前多應用於實驗室、家庭工業 (cottage industry) 等小規模生產或開發中國家等勞力較低廉之處 (Shapiro-Ilan and Gaugler, 2002; Shapiro-Ilan *et al.*, 2014)。體外-固態培養之所需成本與操作技術中等，然其所需之密集勞力、培養期間容易受到汙染且不易監控內部情形為其最大之缺點；但此法於開發中國家其優勢依舊高於體外-液態培養，且與體內培養相似均可利用機械化來提升生產效率 (Shapiro-Ilan *et al.*, 2012; Shapiro-Ilan *et al.*, 2014)。而體外-液態培養所需成本與操作技術極高，但由於勞力節省且大規模生產能降低商品價格，故為目前商品化生產上最廣為應用之技術 (Gaugler and Han, 2002; Shapiro-Ilan and Gaugler, 2002; Shapiro-Ilan *et al.*, 2014)。

本試驗在實驗室內以單隻新分離之台灣產蟲生線蟲 (*Steinernema taiwanensis* strain T39) (Unpubl.) IJ 分別接種斜紋夜蛾 (*Spodoptera litura*) 及大蠟蛾幼蟲，進行生物檢定以測定其是否具有致病力，並藉由不同培養基質及方式繁殖線蟲，以檢視其於量產及對昆蟲寄主之致病力差異。

材料與方法

一、供試昆蟲

(一) 大蠟蛾

本試驗所使用之大蠟蛾為中興大學昆蟲系昆蟲病理實驗室累代飼養之品系。大蠟蛾族群集體飼育於盛有人工飼料 (嬰兒麥粉 250 g，奶粉 100 g，甘油 150 g，蜂蜜 150 g) 之塑膠圓桶 (直徑 13 cm，高度 25 cm) 中，上覆以黑布作為頂蓋；置於 30 ± 1°C，光照 L:D = 12:12 h 之生長箱；接種時選取末齡幼蟲進行試驗。

(二) 斜紋夜蛾

本試驗所使用之斜紋夜蛾卵塊來源為台中及南投地區，攜回實驗室後以 1.5% 次氯酸鈉 (NaOCl) 溶液及無菌水浸泡漂洗，並於抽風乾燥後置於玻璃管內待其孵化。幼蟲孵出後，將其與修改自 Ou-Yang and Chu (1988) 之半合成人工飼料共同置於 250

mL 之透明塑膠刻度杯 (直徑 10 cm, 高度 8 cm) 內, 於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 光照 L : D = 12 : 12 h 之生長箱中繼代飼養。幼蟲發育至四齡蛻皮前之時, 為避免互相殘殺之情形, 故將幼蟲移至 30 孔盒塑膠飼育盤 (每孔直徑 3 cm, 高 3 cm) 內進行單獨飼育。每三至四個世代將實驗室之品系與田間所採集之野生蟲源進行雜交, 避免供試族群衰弱。

二、供試蟲生線蟲

本試驗使用之蟲生線蟲 (*S. taiwanensis* strain T39) 為本實驗室於 1998 年自採集於屏東縣旭海大草原之土壤樣本, 藉斜紋夜蛾幼蟲以 Bedding and Akhurst (1975) 之方式誘釣而得; 之後, 於實驗室內以斜紋夜蛾及大蠟蛾末齡幼蟲進行活體繼代培養。將接種線蟲死亡後之昆蟲體以 1.5% 次氯酸鈉溶液及無菌水進行體表消毒後, 置於內襯有 5.5 cm 圓形濾紙 (Advantec[®]) 250 mL 之塑膠杯中, 待 IJs 再行離開寄主時, 以 White trap (White, 1927) 進行蒐集, 經 0.1% formalin 溶液及無菌水清洗後, 置於 40 mL 之塑膠透明罐中保存 ($20 \pm 1^\circ\text{C}$, 全黑暗)。

三、共生細菌之分離純化與培養

選取經 *S. taiwanensis* 線蟲接種、死亡 48 h 之六齡斜紋夜蛾幼蟲, 分別以 1.5% 次氯酸鈉溶液及無菌水進行體表消毒; 以解剖剪切除死亡蟲體之胸足, 再以滅菌過之移植環沾取其體液, 塗抹於 NBTA (nutrient agar 1 L with 1% triphenylterazolium chloride 4 mL and 0.025 g bromothymol blue) 培養基。在 25°C 、全黑暗之環境下培養 48~72 h 後, 取 I 型菌 (藍綠色) 並以 NBTA 培養基進行反覆純化培養; 而後刮取其單一菌落以 NB (nutrient broth) 液態培養基於 25°C 、全黑暗、150 rpm 震盪之環境下培養 48 h 後備用。

四、一對一生物檢定

於 24 孔細胞培養盤 (Corning Incorporated, USA) 中墊入 $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ 正方形濾紙一張, 並於其中分別加入單一隻藉由與接種寄主相同之活體培養或體外固態培養之活體 *S. taiwanensis* strain T39 IJ 及 30 μL 無菌水, 再行置入大蠟蛾末齡幼蟲或斜紋夜蛾五齡幼蟲一隻 (修改自 Miller, 1989; Converse and Miller, 1999); 試驗環境為 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, L : D = 12 : 12 h 的生長箱。每 12 小時觀察並記錄其死亡率, 共計觀察三天。每一 24 孔細胞培養盤為

1 重複, 每處理 8 重複。

五、不同培養法所培養線蟲產量之比較

(一) 昆蟲活體培養

取蛻皮後餵食一天未含防腐劑飼料之斜紋夜蛾六齡幼蟲或大蠟蛾末齡幼蟲各別秤量其體重, 以 10 隻為一處理, 共計四重複。隨後將其單獨置入內含直徑 5.5 cm 圓形濾紙 (Advantec[®]) 一張之塑膠培養皿 (直徑 5.5 cm, 高 1.5 cm) 或塑膠螺旋蓋指型瓶 (直徑 1.5 cm, 高 4.5 cm) 中, 並滴加 250 IJs/mL 之 *S. taiwanensis* strain T39 IJs 懸浮液。接種兩天後將死亡之蟲體以次氯酸鈉與無菌水體表消毒後移至內襯有潮濕濾紙之塑膠杯中, 回收從寄主體內移行出之線蟲並以 White trap 進行 IJs 之蒐集, 並計算其總量。

(二) 體外培養

1. 共生細菌之菌體量測定

刮取經 NBTA 培養基純化之 I 型菌之單一菌落, 培養於 NB 並置於 25°C 、全黑暗、150 rpm 震盪環境培養 48 及 72 h 後備用。後以新鮮之 NB 進行序列稀釋, 將懸浮液依序調整為 10^{-1} ~ 10^{-6} 等六種濃度。於 96 孔細胞培養盤 (Falcon, USA) 之各孔中分別加入不同濃度之稀釋液各 100 μL , 送入全波長微量盤分光光譜儀 (VersaMax, Molecular Devices[®]) 讀取其吸光值 ($\text{OD}_{550\text{nm}}$) (Barbercheck and Wang, 1996); 同時吸取 100 μL 之菌液, 將其滴加於 NBTA 平板上, 以玻璃珠 (直徑 4 mm, 15 balls/皿) 進行均勻滾動塗佈。待 48 至 72 h 後, 計算各平板上之菌落數目以回推菌液未稀釋前之原始濃度。每一皿為 1 重複, 每濃度 3 重複, 並以不含共生菌之 NB 塗佈 NBTA 平板作為對照組。

2. 不同培養方式對線蟲產量之影響

固態培養方式及配方參照 Han *et al.* (1993)、Lo (2001) 及 Kao (2005)。將單菌培養之 NB 共生菌液 5% (v/v) 1 mL 接入內含有吸附固態培養基 (蛋白胨 0.5 g, 酵母萃取物 0.5 g, 雞蛋 10 g, 黃豆粉 7.5 g, 豬油 2.5 g, 水 24 g, 海棉 5 g, 共計 50 g/bag) 海棉塊之透明 PP 塑膠袋, 再行培養兩天後加入 1 mL 含 30,000 隻 IJs 之 *S. taiwanensis* strain T39 懸浮液, 靜置於 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、全黑暗之環境中; 14 天後以無菌水洗出, 經梨型漏斗及種子瓶沉澱後, 以 White trap 回收計算培養所得之蟲生線蟲產量; 每袋視為一重複, 共計 15 袋。

液態培養則參照 Islas-López *et al.* (2005) 及 Liu (2011) 之配方與流程進行。將單菌培養之 NB

共生菌液 5% (v/v) 1 mL 接入滅菌後盛裝於細胞培養瓶 (#430825, Corning®) 之液態人工培養基 (1.7% (w/v) 酵母萃取物, 27% (w/v) Brix 5.2% 蔗糖溶液, 1.2% (w/v) 食用蛋黃粉, 2.5% (w/v) 玉米胚芽油) 中, 培養 48 h 後加入 1 mL 含 15,000 隻之 *S. taiwanensis* strain T39 懸浮液, 使用搖瓶方式培養於 25 ± 1°C、全黑暗、110 rpm 震盪環境下; 14 天後以布氏漏斗抽氣過濾及 White trap 回收, 以計算培養所得之蟲生線蟲產量; 每瓶視為一重複, 共計 15 瓶細胞培養瓶。

六、不同體外培養方式對蟲生線蟲致病力之影響

於內襯有直徑 5.5 cm 之圓形濾紙 (Advantec®) 一張的塑膠培養皿 (直徑 5.5 cm, 高 1.5 cm) 中, 置入取食未含防腐劑飼料之斜紋夜蛾五齡幼蟲一隻, 並分別滴加以固態或液態培養產出之 *S. taiwanensis* strain T39 IJs 懸浮液 0.5 mL, 試驗環境為 25 ± 1°C, L:D = 12:12 h 之生長箱, 每 4 小時觀察並記錄其死亡率。試驗選用之線蟲濃度為 10、15 及 20 IJs/mL, 每濃度 3 重複, 每重複 20 隻幼蟲, 對照組滴加不含有線蟲的去離子水 0.5 mL。

七、統計分析

試驗觀察所得之數據以 Probit 軟體 (Chi, 1997) 進行半致死時間 (LT₅₀) 計算; 另經由 SPSS system Version 20 進行 *t*-test、ANOVA、Tukey's 變方分析進行事後檢定, 以檢視不同試驗處理間是否具有顯著差異。

結 果

一、一對一生物檢定

本試驗以單隻 *S. taiwanensis* 線蟲接種大蠟蛾及斜紋夜蛾幼蟲, 結果發現確實能造成寄主昆蟲死亡。以 *in vivo* (寄主為大蠟蛾) 及 *in vitro* 培養而得之 *S. taiwanensis* 接種大蠟蛾末齡幼蟲, 分別在施用後 12 及 24 h 後開始有死亡發生, 而死亡率之急速攀升則介於 24~48 h 間; 接種後 72 h 之最終死亡率為 34.38 ± 2.16 及 36.46 ± 6.59% (圖一 A); 由 *t*-test 檢定顯示, 兩種培養方式對大蠟蛾所造成之死亡率彼此間並無顯著差異 ($p > 0.05$)。在斜紋夜蛾試驗組中, 由 *in vivo* (寄主為斜紋夜蛾) 及 *in vitro* 培養之線蟲分別在施用後 36 及 24 h 後開始造成寄主昆蟲死亡, 72 h 後之最終死亡率為 33.33 ±

4.42 及 32.81 ± 4.69% (圖一 B); 其統計分析結果與大蠟蛾組相似, 兩種方式培養出之線蟲所造成之死亡率彼此間無顯著差異 ($p > 0.05$)。若比較 *in vitro* 培養線蟲於此兩種寄主上之死亡率表現, 初始死亡發生時間均為接種後 24 h, 然其後斜紋夜蛾組之死亡率攀升情形相對較慢, 惟兩者之死亡率相近, 且彼此間無顯著差異 ($p > 0.05$)。

二、不同培養法所培養線蟲產量之比較

(一) 昆蟲活體培養

本試驗以 *S. taiwanensis* 之 IJs 懸浮液侵染單隻昆蟲寄主, 以期得知是否具有於寄主體內繁衍後代之能力。斜紋夜蛾試驗組中, 其六齡幼蟲之平均體重為 3.57 g, 平均每隻幼蟲能產出 2.62×10⁴ IJs (約 7.36×10³ IJs/g)。而在大蠟蛾試驗組中, 其末齡幼蟲之平均體重為 2.51 g, 平均產量為 5.03×10⁴ IJs/larva (約 2.00×10⁴ IJs/g) (表一)。比較兩試驗組中之 *S. taiwanensis* 後代 IJs 產量, 結果顯示若以大蠟蛾為寄主時其效果較斜紋夜蛾佳; 而以 *t*-test 檢定進行分析, 則不論是在單隻寄主昆蟲產出或每 g 寄主組織之後代產出量, 兩試驗組間均有顯著差異 ($p < 0.05$)。

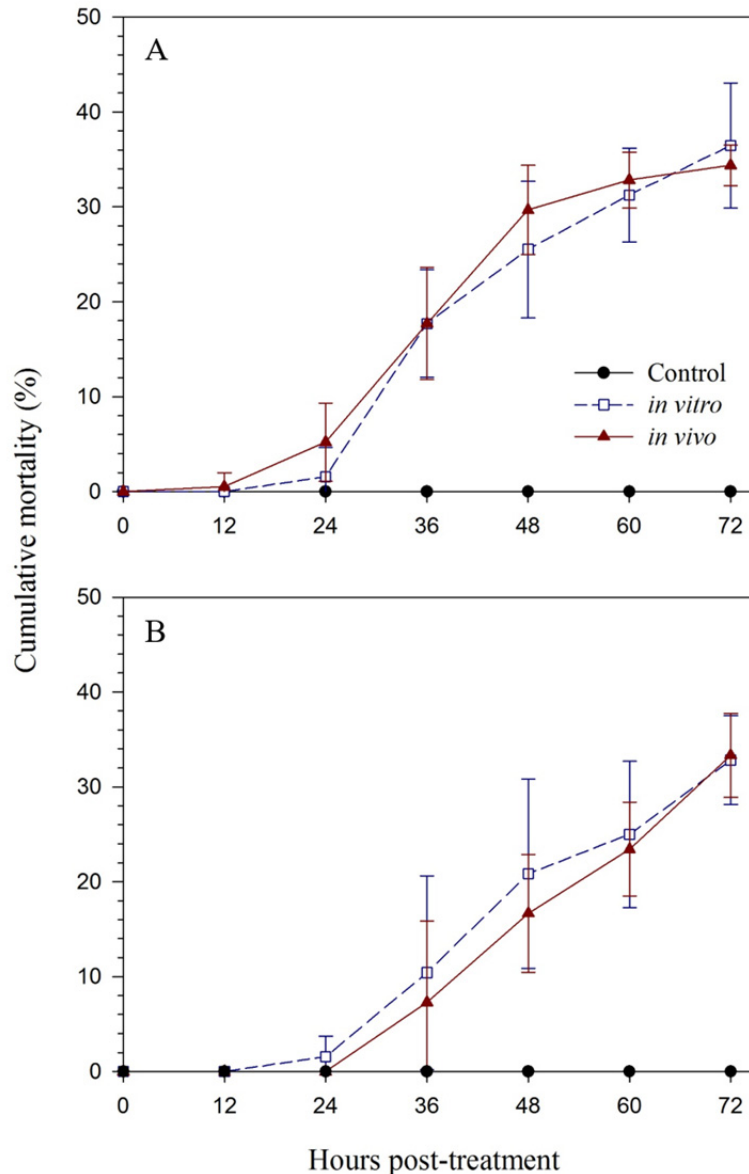
(二) 體外培養

檢視以各稀釋濃度共生菌液塗佈之 NBTA 平板時發現, 於 NB 中培養 48 小時之共生菌液能生長之最低濃度為 10⁻⁴ 組的 40.33 ± 5.51 colonies/medium; 而培養 72 小時者則為 10⁻³ 組的 16.00 ± 5.20 colonies/medium。綜合測定稀釋菌液之吸光值及計算 NBTA 平板上長出之菌落數可知, 培養 48 h 之共生菌液在 OD_{550nm} = 0.49 時, 其原液濃度為 4×10⁶ CFU/mL; 而培養 72 h 者則在 OD_{550nm} = 0.52 時, 其原液濃度為 1.6×10⁵ CFU/mL。

本試驗藉由不同營養成分之固態及液態培養基測試 *S. taiwanensis* 是否能藉體外培養之方式大量繁殖; 結果顯示以固態培養基進行試驗, 培養 14 天後之最終產量介於 9.67×10⁵~2.79×10⁶ IJs/50 mL (約 3.69×10⁵ IJs/mL); 而在液態培養基試驗組中, 培養 14 天後回收之累積總產量則介於 1.70×10⁵~1.55×10⁶ IJs/30mL (約 1.81×10⁵ IJs/mL) (表一)。

三、不同體外培養法對蟲生線蟲致病力之影響

以固態培養所得之 *S. taiwanensis* 接種斜紋夜蛾之五齡幼蟲, 結果顯示開始有明顯死亡情形出現之時間為接種後 24 h, 其後死亡率之攀升情形和緩;



圖一 體內培養 (*in vivo*) 及體外培養 (*in vitro*) 之蟲生線蟲 *Steinerinema taiwanensis* strain T39，單一隻侵染期幼蟲感染昆蟲寄主造成之死亡率。A：大蠟蛾；B：斜紋夜蛾。

Fig. 1. Cumulative mortality (mean \pm SD) of the insect hosts inoculated with the *in vivo* or *in vitro* cultures of *Steinerinema taiwanensis* strain T39 IJs by using a one-on-one bioassay. A, *Galleria mellonella*; B, *Spodoptera litura*. According to the *t*-test, no significant difference at the 5% level was observed between the two treatments at any observation point in both insect hosts.

接種後 72 h 三種試驗濃度之得最終死亡率雖有相當之落差 (圖二 A)，然經統計分析顯示彼此間並無顯著差異 ($p > 0.05$)；而 10、15 及 20 IJs/mL 之 *S. taiwanensis* 所造成之斜紋夜蛾五齡幼蟲 LT_{50} 則分別為 70.82、49.68 及 40.71 h。

液態培養試驗組中，不論試驗濃度為何，其死亡率曲線之急速攀升始於接種後 24 h，72 h 時所得之最終死亡率相近 (圖二 B)。然 10 IJs 與 15 IJs 所得之結果彼此間無顯著差異 ($p > 0.05$)，15 及 20

IJs、10 及 20 IJs 彼此間則具有顯著差異 ($p < 0.05$)。而此三種濃度 *S. taiwanensis* IJs 所造成之斜紋夜蛾五齡幼蟲之 LT_{50} 分別為 48.01、32.68 及 28.25 h。

綜合上述試驗結果顯示，液態培養所得之 *S. taiwanensis* 在各試驗濃度所造成之 LT_{50} 皆較固態培養為短，且其最終死亡率也多半較高；然若在濃度相同之條件下，則可發現不論試驗濃度為何，兩種培養方式之線蟲所造成之昆蟲寄主死亡率彼此間

表一 不同培養方式所得之蟲生線蟲 *Steinernema taiwanensis* strain T39 後代侵染期幼蟲 (infective juveniles) 產量
Table 1. Average yields of the IJs of *Steinernema taiwanensis* strain T39 produced using different culture methods

Culture methods	Hosts	Average yields ⁽¹⁾	Average yields per unit ⁽¹⁾
<i>in vivo</i>	<i>Spodoptera litura</i>	2.62×10 ⁴ IJs/larva a	7.36×10 ³ IJs/g A
<i>in vivo</i>	<i>Galleria mellonella</i>	5.03×10 ⁴ IJs/larva b	2.00×10 ⁴ IJs/g B
<i>in vitro</i> -- solid	---	9.67×10 ⁵ ~2.79×10 ⁶ IJs/bag	3.69×10 ⁵ IJs/mL
<i>in vitro</i> -- liquid	---	1.70×10 ⁵ ~1.55×10 ⁶ IJs/flask	1.81×10 ⁵ IJs/mL

(1) Means within the *in vivo* culture method followed by different letters are significantly different at the 5% level according to *t*-test.

皆無顯著差異 ($p > 0.05$)。

討 論

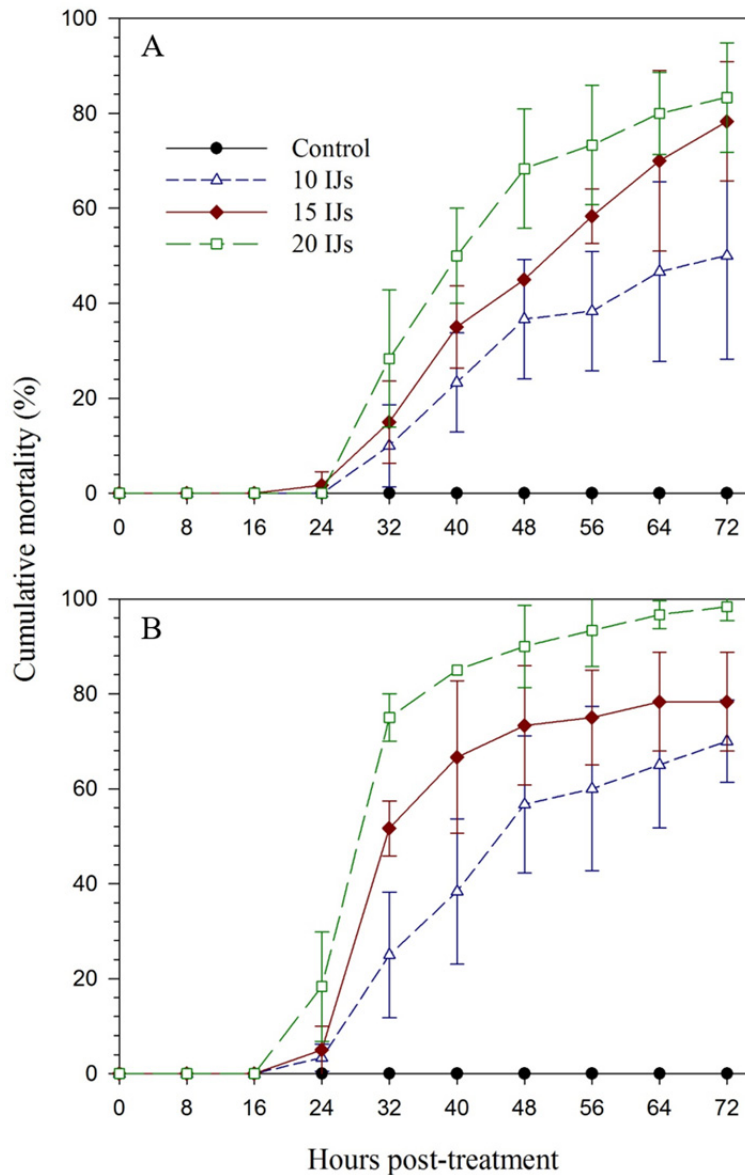
為評估蟲生線蟲對寄主昆蟲之效力、對環境因子之耐受性或經商業化生產後之品質，注射、感染率及入侵率等皆為常見之生物檢定方式 (Griffin *et al.*, 1989; Fan and Hominick, 1991; Glazer, 1992; Sims *et al.*, 1992)。然在寄主族群呈現過離散狀態 (over dispersion) 時，非所有個體皆遭受感染之可能性或多寄主/多寄生者間之交互作用可能導致其效力之判定失準 (Converse and Miller, 1999; Grewal *et al.*, 1999)。

一對一生物檢定可適用於 Steinernematidae 及 Heterohabditidae 科，能確實推定線蟲之品質效力，並比較種內及種間之差異，此乃因此試驗方式能避免寄主行為性及生態性造成之障礙，排除線蟲天敵、病原及土壤結構、種類、溼度等對線蟲致病力之影響，並能避免多寄主同時感染同一寄主或侵染順序可能導致之誤差 (Converse and Miller, 1999)。本試驗以單隻 *S. taiwanensis* strain T39 IJ 分別接種單隻斜紋夜蛾或大蠟蛾結果顯示，不論以活體或體外培養之線蟲進行試驗，72 h 時各組之死亡率介於 32.81~36.46%，彼此間無顯著差異，顯示活體與體外-固態培養所得線蟲之致病力相當。Converse and Miller (1999) 以 *in vivo* 及 *in vitro* 之 *S. carpocapsae*、*S. feltiae*、*S. glaseri* 及 *S. riobrave* 等 4 種 7 個品系接種大蠟蛾，發現大多數試驗組 72 h 時之累積死亡率約為 50% 或更低。Hirao and Ehlers (2009) 以液態培養之 *S. carpocapsae* 接種大蠟蛾，5 天後之死亡率僅約 30%。Lo (2001) 以 *in vivo* (同受測寄主) 及固態培養之 *S. abbasi* 分別接種大蠟蛾及斜紋夜蛾五齡幼蟲，結果顯示以固態

培養線蟲接種後 72 h 之死亡率為 40 及 20%，*in vivo* 試驗組則為 10 及 13%，然在寄主相同之情形下，兩種培養方式所得之死亡率彼此間無顯著差異。Liu (2011) 則取 *in vivo* 及液態培養之 *S. abbasi* 感染斜紋夜蛾五齡幼蟲，72 h 時死亡率分別為 34 及 26%，彼此間無顯著差異。本試驗所得結果與上述試驗各項大致相符。

以大蠟蛾及斜紋夜蛾幼蟲進行活體培養試驗，乃因大蠟蛾對蟲生線蟲之感受性極高，飼育容易且子代產量大，常應用於相關之研究及商業化生產上 (Dutky *et al.*, 1964; Woodring and Kaya, 1988)，而斜紋夜蛾則為台灣地區經常性大發生之重要經濟害蟲，因而極具試驗價值。試驗結果顯示，以 *S. taiwanensis* 懸浮液接種大蠟蛾其後代線蟲總產量較斜紋夜蛾為佳。Kondo and Ishibashi (1986) 以 *S. feltiae* 接種斜紋夜蛾可得產量 5.9×10^4 IJs/larva。Grewal *et al.* (1994) 則以大蠟蛾為寄主飼育 *S. riobrave* 及 *S. glaseri*，分別可得約 3×10^5 IJs/larva 與 5×10^4 IJs/larva。Lo (2001) 以 *S. abbasi* 接種斜紋夜蛾可得 2.9×10^4 IJs/larva (7.4×10^5 IJs/g)，然以大蠟蛾為寄主時，*S. abbasi* 所能回收之 IJs 卻僅有 3510 IJs/larva；本試驗所得之結果與上述各項試驗大致相近。

昆蟲寄主種類不同而所能提供之營養成分亦有所差異。一般而言，脂質為線蟲生長發育之必需營養 (Abu Hatab *et al.*, 1998)，然每種線蟲之感受性及其對養分之需求有高低落差，因而並非所有線蟲皆能以大蠟蛾成功飼育，如 *S. scapterisci* 對直翅目昆蟲之專一性極高，導致以大蠟蛾繼代時之產量低落 (Nguyen and Smart, 1990)；且由不同寄主所培養出之線蟲亦有品質上之差異 (Abu Hatab *et al.*, 1998)。因此可知於體內培養時，寄主昆蟲之種類為影響產量及生產效率之關鍵因素，選擇合適之寄主



圖二 不同培養方式之蟲生線蟲 *Steinernema taiwanensis* strain T39 於 25°C 下對斜紋夜蛾五齡幼蟲之累積死亡率。A：固態培養；B：液態培養。

Fig. 2. Cumulative mortality (mean \pm SD) of *Spodoptera litura* fifth instar larvae inoculated with *Steinernema taiwanensis* strain T39 produced using different culture methods. A, Solid medium. According to the Tukey's range test, no significant difference at the 5% level was observed between treatments at 72 h posttreatment. B, Liquid medium. According to the Tukey's range test, significant differences at the 5% level were observed for 10 and 15 IJs/mL compared with 20 IJs/mL but not between 10 and 15 IJs/mL at 72 h posttreatment.

能提升產能並降低成本 (Shapiro-Ilan *et al.*, 2014)。

不論以固態或液態方式進行 *in vitro* 培養，均須先以單菌培養 (monoxenic culture) 使共生細菌於培養基質中立足，除提升細菌本身生長及分解環境養分之能力外，亦可避免培養基質被他種微生物污染之可能性，並建立合適線蟲生長之環境，而後方能有效提高其產量 (Bedding, 1981; Poinar, 1990; Shapiro-Ilan *et al.*, 2014)；故選取合適培養時期之共生細菌有助於大量培養之進行。本試驗藉

由吸光值測試發現，培養 72 h 之共生細菌液其 OD_{550nm} 較培養 48 h 者高，因而推定其中所含菌體量較多；然若由 NBTA 平板上之菌落計算其活菌數，卻發現 72 h 之活菌數反而較 48 h 為低。因而推論培養 72 h 共生細菌液中之菌體總含量雖然較高，然其中所含之活體菌量較 48 h 相對為低；因此於進行 *S. taiwanensis* 體外培養前之單菌培養時，應選取活菌數較高之 48 h 共生菌液，除節省培養時間外，尚能使大量族群迅速於培養基中建立族群。

本試驗以固態及液態培養進行 *S. taiwanensis*

飼育，結果顯示在培養 14 天後，兩種方式每培養單位（袋及瓶）所得之線蟲數量最高均可達 10^6 IJs，如換算為每 mL 之產量，則固態培養會略高於液態培養；若與本試驗先前行之活體培養相比，固態培養所得產量分別是以斜紋夜蛾及大蠟蛾為寄主之 5.01 及 1.85 倍，液態培養則約為 2.46 及 0.91 倍。

Han *et al.* (1993) 以 $3 \times 10^2 \sim 3 \times 10^6$ IJs/mL 等不同接種濃度之 *S. carpocapsae* 進行固態培養，所得最高產量為濃度 3×10^5 IJs 時之 7.7×10^5 IJs/g。Lo (2001) 將接種濃度為 3×10^4 IJs/mL 之 *S. abbasi* 接入與 Han *et al.* (1993) 相似添加雞蛋之固態培養基中，可得 6.5×10^5 IJs/g 之產量。Islas-López *et al.* (2005) 以約 500 IJs/mL 濃度之 *S. carpocapsae* 接種於 M4 培養基中，所得產量為 2.49×10^5 IJs/mL；而 Liu (2011) 則以蔗糖溶液取代 M4 培養基中龍舌蘭汁飼育 *S. carpocapsae* 及 *S. abbasi*，所得產量分別 6.7×10^4 及 3×10^4 IJs/mL。本試驗所得結果與上述各試驗雖略有差異但大致上相近，然不同種類之線蟲其生殖潛能及對養分之需求彼此有所差異，即便使用相同培養基，其所得產量仍可能有落差 (Shapiro-Ilan *et al.*, 2014)；因此應更進一步試驗改良培養基成分，以提升 *S. taiwanensis* 於人工培養時之產量。

不同培養方式所得之蟲生線蟲之品質優劣差異一直有所爭議，以固態培養為例，部分學者認為固態培養之線蟲，其品質較活體培養為佳，但也有較差者 (Friedman, 1990; Yang *et al.*, 1997)，然大多數研究顯示此二者間之致病力並無顯著差異 (Gaugler and Georgis, 1991; Abu Hatab *et al.*, 1998)，液態培養上也有相似之情形 (Gaugler and Georgis, 1991; Shapiro and McCoy, 2000)；故而目前普遍認為活體及體外培養所得之線蟲間，彼此並無品質或致病力上之差異 (Shapiro-Ilan *et al.*, 2014)。本試驗以不同濃度之固態及液態培養之 *S. taiwanensis* IJs 接種斜紋夜蛾五齡幼蟲，結果顯示相同接種濃度下，液態培養線蟲所造成之 LT_{50} 雖均較固態培養為短，然死亡率大致相近，且彼此間並無顯著差；顯示由固態或液態所培養之 *S. taiwanensis* 致病力相當。

綜合上述試驗結果可知，此蟲生線蟲確實對大蠟蛾及斜紋夜蛾具有毒效能導致死亡，亦能以活體或體外培養方式進行大量繁殖，且藉由體外培養所得之後代線蟲仍對昆蟲寄主具有致病力，因此應進一步研究其於應用時所需之濃度及溫度等環境條件，期能有利於害蟲防治之應用。

引用文獻

- Abu Hatab M, Gaugler R, Ehlers RU. 1998. Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids. *J Parasitol* 84: 215-221.
- Adams BJ, Nguyen KB. 2002. Taxonomy and systematics. pp 1-34. In: Gaugler R (ed). *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, New York.
- Akhurst RJ, Smith K. 2002. Regulation and safety. pp 311-332. In: Gaugler R (ed). *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, New York.
- Barbercheck ME, Wang J. 1996. Effect of cucurbitacin D on *in vitro* growth of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp., symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. *J Invertebr Pathol* 68: 141-145.
- Bedding R. 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27: 109-114.
- Bedding RA, Akhurst RJ. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21: 109-110.
- Boemare NE, Akhurst RJ. 2006. The genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. pp 451-494. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds). *The Prokaryotes*. Springer Science & Business Media, New York.
- Campbell LR, Gaugler R. 1991. Role of the sheath in desiccation tolerance of two entomopathogenic nematodes. *Nematologica* 37: 324-332.
- Chi H. 1997. Computer program for the probit analysis. National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan.
- Converse V, Miller RW. 1999. Development of the one-on-one quality assessment assay for entomopathogenic nematodes. *J Invertebr Pathol* 74: 143-148.
- De Ley P. 2006. A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode

- phylogeny. (January 25, 2006). In Wormbook (ed), The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi: 10.1895/wormbook.1.41.1, <http://www.wormbook.org>.
- Dutky S, Thompson J, Cantwell G.** 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *J Insect Physiol* 6: 417-422.
- Ehlers RU.** 2005. Forum on safety and regulation. pp 107-114. In: Grewal P, Ehlers RU, Shapiro-Ilan DI (eds). *Nematodes as Biocontrol Agents*. CABI Publishing, Wallingford.
- Ehlers RU, Niemann I, Hollmer S, Strauch O, Jende D, Shanmugasundaram M, Mehta U, Easwaramoorthy S, Burnell A.** 2000. Mass production potential of the bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica-Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol Sci Technol* 10: 607-616.
- Fan X, Hominick WM.** 1991. Efficiency of the *Galleria* (wax moth) baiting technique for recovering infective stages of entomopathogenic rhabditids (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from sand and soil. *Revue Nématol* 14: 381-387.
- Forst S, Clarke D.** 2002. Bacteria-Nematode Symbiosis. pp 57-77. In: Gaugler R (ed). *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, New York.
- Forst S, Dowds B, Boemare NE, Stackebrandt E.** 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu Rev Microbiol* 51: 47-72.
- Friedman MJ.** 1990. Commercial production and development. pp 153-172. In: Gaugler R, Kaya HK (eds). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Gaugler R, Georgis R.** 1991. Culture method and efficacy of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Biol Control* 1: 269-274.
- Gaugler R, Han R.** 2002. Production technology. pp 289-310. In: Gaugler R (ed). *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, New York.
- Glazer I.** 1992. Invasion rate as a measure of infectivity of steinernematid and heterorhabditid nematodes to insects. *J Invertebr Pathol* 59: 90-94.
- Grewal PS.** 2002. Formulation and application technology. pp 265-287. In: Gaugler R (ed). *Entomopathogenic Nematology*. CABI Publishing, New York.
- Grewal PS, Converse V, Georgis R.** 1999. Influence of production and bioassay methods on infectivity of two ambush foragers (Nematoda: Steinernematidae). *J Invertebr Pathol* 73: 40-44.
- Grewal PS, Selvan S, Gaugler R.** 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *J Therm Biol* 19: 245-253.
- Griffin CT, Simons W, Smits P.** 1989. Activity and infectivity of four isolates of *Heterorhabditis* spp. *J Invertebr Pathol* 53: 107-112.
- Han R, Cao L, Liu X.** 1993. Effects of inoculum size, temperature and time on *in vitro* production of *Steinernema carpocapsae* Agriotes. *Nematologica* 39: 366-375.
- Hirao A, Ehlers RU.** 2009. Effect of temperature on the development of *Steinernema carpocapsae* and *Steinernema feltiae* (Nematoda: Rhabditida) in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84: 1061-1067.
- House H, Welch H, Cleugh T.** 1965. A food medium of prepared dog biscuit for the mass-production of the nematode DD136 (Nematoda: Steinernematidae). *Nature* 206: 847.
- Islas-López MA, Sanjuan-Galindo R, Rodríguez-Hernández AI, Chavarría-Hernández N.** 2005. Monoxenic production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using culture media containing agave juice (aguamiel) from Mexican maguey-pulquero (*Agave* spp). Effects of the

- contents of nitrogen, carbohydrates and fat on infective juvenile production. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 91-97.
- Kao HI.** 2005. Improvement in mass production and storage of entomopathogenic nematodes, *Steinernema abbasi* and *S. carpocapsae* [Master's thesis]. Taichung (Taiwan): National of Chung Hsing University. 56 pp. (in Chinese)
- Kondo E, Ishibashi N.** 1986. Infectivity and propagation of entomogenous nematodes, *Steinernema* spp., on the Common Cutworm, *Spodoptera litura*: Lepidoptera: Noctuidae. *Appl Entomol Zool (Jpn.)* 21: 95-108.
- Lewis E, Clarke D.** 2012. Nematode parasites and entomopathogens. pp 395-424. In: Vega FE, Kaya HK (eds). *Insect Pathology*. Academic Press, London, UK.
- Liu YH.** 2011. The preliminary studies on culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema abbasi*, using a liquid medium [Master's thesis]. Taichung (Taiwan): National Chung Hsing University. 56 pp. (in Chinese)
- Lo JC.** 2001. Artificial culture of the entomopathogenic nematode, *Steinernema abbasi* [Master's thesis]. Taichung (Taiwan): National Chung Hsing University. 59 pp. (in Chinese)
- Miller R.** 1989. Novel pathogenicity assessment technique for *Steinernema* and *Heterorhabditis* entomopathogenic nematodes. *J Nematol* 21: 574.
- Nguyen KB, Smart GC.** 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae). *J Nematol* 22: 187.
- Ou-Yang SC, Chu YI.** 1988. The comparison of the development of the tobacco cutworm (*Spodoptera litura* (F.)) reared with natural and artificial diets. *Chinese J Entomol* 8: 143-150.
- Pace WG, Grote W, Pitt DE, Pitt JM.** 1986. Liquid culture of nematode. Int Patent No. WO 86/01074.
- Poinar GO.** 1979. Nematodes for Biological Control of Insects. Boca Raton: CRC Press. 277 pp.
- Poinar GO.** 1990. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. pp 23-61. In: Gaugler R, Kaya HK (eds). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press, Boca Raton.
- Shapiro-Ilan DI, Gaugler R.** 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 137-146.
- Shapiro-Ilan DI, Han R, Dolinski C.** 2012. Entomopathogenic nematode production and application technology. *J Nematol* 44: 206-217.
- Shapiro-Ilan DI, Han R, Qiu X.** 2014. Production of entomopathogenic nematodes. pp 321-356. In: Morales-Ramos JA, Rojas MG, Shapiro-Ilan DI (eds). *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens*. Academic Press, London.
- Shapiro DI, McCoy CW.** 2000. Effects of culture method and formulation on the virulence of *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae) to *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *J Nematol* 32: 281-288.
- Sims SR, Downing AS, Pershing JC.** 1992. Comparison of assays for the determination of entomogenous nematode infectivity. *J Nematol* 24: 271-274.
- Stoll NR.** 1952. Axenic cultivation of the parasitic nematode, *Neoplectana glaseri*, in a fluid medium containing raw liver extract. *J Parasitol* 39: 422-444.
- Surrey MR, Davies RJ.** 1996. Pilot-scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. *J Invertebr Pathol* 67: 92-99.
- White GF.** 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science* 66: 302-303.
- Woodring JL, Kaya HK.** 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: a handbook of biology and techniques.

Fayetteville, AK: Arkansas Agricultural Experiment Station. 30 pp.

Wouts W. 1981. Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on artificial media. *J Nematol* 13: 467-469.

Yang H, Jian H, Zhang S, Zhang G. 1997.

Quality of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* produced on different media. *Biol Control* 10: 193-198.

Yoo S, Brown I, Gaugler R. 2000. Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: lipid source and concentration. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 759-763.

Bioassay on the Infectivity of the Endogenous Entomopathogenic Nematode, *Steinernema taiwanensis* Strain T39, against Insects and its Mass Production

Ching-Tzu Tseng, Roger F. Hou, and Li-Cheng Tang*

Department of Entomology, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan

* Corresponding email: lctang@dragon.nchu.edu.tw

Received: 12 February 2017

Accepted: 10 June 2017

Available online: 12 October 2017

ABSTRACT

Infectivity of the entomopathogenic nematode, *Steinernema taiwanensis* strain T39, isolated from Taiwan was investigated using a one-on-one assay against two insect hosts, *Spodoptera litura* and *Galleria mellonella*, and its mass production was carried out by *in vivo* and *in vitro* culture methods in this study. The inoculation of *S. litura* and *G. mellonella* larvae with the *in vivo* and *in vitro* cultures of infective juveniles (IJs) revealed no significant differences in cumulative mortalities among various treatments. The average yield of *S. taiwanensis* was lower when cultured with *S. litura* sixth instar larvae than with *G. mellonella* (ca. 7.36×10^3 vs 2.00×10^4 IJs/g), indicating that *G. mellonella* is more suitable for *S. taiwanensis* production. The OD_{550nm} values of symbiotic bacteria cultured for 48 and 72 h in nutrient broth were 0.49 and 0.52, respectively. However, the number of bacterial colonies cultured in nutrient bromothymol blue agar for 48 h was significantly higher, indicating that the viability of the 48-h culture was higher than that of the 72-h culture. The solid and liquid cultures of *S. taiwanensis* yielded an average of 3.69×10^5 and 1.81×10^5 IJs/mL, respectively. The median lethal time (LT₅₀) values of *S. litura* fifth instar larvae inoculated with 20 IJs/mL of *S. taiwanensis* produced in the liquid and solid cultures were 28.25 and 40.71 h, respectively. Although the cumulative mortality of the larvae inoculated with liquid-cultured nematodes was slightly higher, it was not significantly different from that of the larvae inoculated with solid-cultured nematodes. Therefore, nematodes produced by both *in vitro* methods differed only in the time to kill insects. In conclusion, *S. taiwanensis* exhibits infectivity against insects and can be cultured artificially to produce virulent offspring.

Key words: entomopathogenic nematode, infectivity, bioassay, mass production