



**ผลของ *Beauveria bassiana* และ *Bacillus thuringiensis*
ต่อฮีโมไซต์ระยะตัวอ่อนของด้วงหนอนนก (*Tenebrio molitor* L.)**

**Effect of *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis*
on Hemocytes of Mealworm Beetle Larvae (*Tenebrio molitor* L.)**

เนรุชลา สุวรรณคนธ์, ทิดารัตน์ สินธุโสภา, นิลาวลัย ปะวะเสนะ, นุจิรา ทาทัน และ จตุพร ตั้งจิตวิทย์กุล

Narutchala Suwannakhon^{*}, Tidarat Sintusopha, Nilawan Pawasena, Nujira Tatan and Jatuporn Tungjitwitayakul

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ประเทศไทย

Discipline of Biology, School of Science, University of Phayao, Thailand

Received : 18 April 2023, Received in revised form : 25 January 2024, Accepted : 27 January 2024

Available online : 16 February 2024

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : สารชีวภัณฑ์ถูกนำมาใช้ในการควบคุมและกำจัดแมลงศัตรูพืชอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามข้อมูลการตอบสนองของฮีโมไซต์แมลงต่อสารชีวภัณฑ์ยังมีจำกัด วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อตรวจสอบผลของสารชีวภัณฑ์เชื้อราบีวเวเรีย (*Beauveria bassiana*) และเชื้อบีที (*Bacillus thuringiensis*) ต่อฮีโมไซต์ของแมลงโดยใช้ด้วงหนอนนกเป็นสัตว์ทดลองต้นแบบ

วิธีดำเนินการวิจัย : จำนวน total hemocyte count (THC) และ differential hemocyte count (DHC) ได้ถูกทำการศึกษาล้างจากตัวอ่อนด้วงหนอนนกได้รับสารชีวภัณฑ์ที่มีความเข้มข้น 0.0025, 0.00625 และ 0.0125 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง

ผลการวิจัย : ผลการทดลองพบว่า THC มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญในตัวอ่อนที่ได้รับเชื้อ *B. bassiana* และเชื้อ *B. thuringiensis* ที่เวลา 24 ชั่วโมง และยังคงอยู่ในระดับเดิมหลังจากนั้น นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของค่า THC ถูกตรวจสอบในตัวอ่อนที่ได้รับสารชีวภัณฑ์ความเข้มข้น 0.0125 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 2, 6, 10, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าค่า THC ในตัวอ่อนที่ได้รับเชื้อ *B. bassiana* เริ่มลดลงที่ 6 ชั่วโมง ขณะที่การลดลงของ THC ถูกบันทึกได้ที่เวลา 2 ชั่วโมงหลังจากตัวอ่อนได้รับ *B. thuringiensis* พบ DHC ทั้งหมด 4 ชนิดในตัวอ่อนที่ได้รับสารชีวภัณฑ์ prohemocytes เป็นฮีโมไซต์ชนิดหลักที่พบในตัวอ่อนกลุ่มควบคุม แต่จำนวนของ prohemocytes ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อตัวอ่อนได้รับเชื้อ *B. bassiana* และเชื้อ *B. thuringiensis* ในทุกความเข้มข้นที่ 24 ชั่วโมง จำนวน plasmatocytes เพิ่มขึ้นในทุกความเข้มข้นและระยะเวลาที่ทดสอบ granulocytes ตอบสนองต่อเชื้อ *B. bassiana* และเชื้อ *B. thuringiensis* แตกต่างกัน จำนวนของ granulocytes เพิ่มขึ้นเมื่อตัวอ่อนได้รับ *B. thuringiensis* ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง ขณะที่การลดลงของ granulocyte ถูกพบที่ความเข้มข้นสูงนาน 120-168 ชั่วโมง หลังจากได้รับ *B. bassiana* ในทางตรงกันข้ามจำนวนของ oenocytes ไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากได้รับสารชีวภัณฑ์



สรุปผลการวิจัย : ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารชีวภัณฑ์ส่งผลกระทบต่อ THC และ DHC ในตัวอ่อนด้วงหนอนนก การค้นพบนี้ทำให้มีข้อมูลพื้นฐานของผลกระทบของสารชีวภัณฑ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของแมลง

คำสำคัญ : หนอนนก ; ฮีโมไซต์ ; ฮีโมลิมพ์ ; ยาฆ่าแมลง ; สารชีวภัณฑ์

Abstract

Background and Objectives : Biopesticides have been used to control and eliminate pests widely. However, the information on how insect's hemocytes respond to biopesticides is still limited. The aim of this study was to examine the effect of *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* on insect's hemocytes using the mealworm beetle (*Tenebrio molitor* L.) larva as an animal model.

Methodology : The total hemocyte count (THC) and differential hemocyte count (DHC) were examined after *T. molitor* larvae were treated with biopesticides at concentrations of 0.0025, 0.00625 and 0.0125 g/ml for 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours.

Main Results : Results showed that THC was decreased significantly in the larvae treated with *B. bassiana* and *B. thuringiensis* at 24 hours and remained low thereafter. Moreover, the changes in THC were examined in larvae treated with 0.0125 g/ml of biopesticides for 2, 6, 10, 24, 48 and 72 hours. The THC in larvae treated with *B. bassiana* started to decrease at 6 h, while the decrease in TCH was recorded at 2 h after the larvae were treated with *B. thuringiensis*. The DHC in larvae treated with *B. bassiana* and *B. thuringiensis* were found in 4 types. Prohemocytes was the dominant hemocytes found in the control larvae, but number of prohemocytes decreased significantly when the larvae were treated with *B. bassiana* and *B. thuringiensis* at every concentration for 24 hours. Plasmatocytes increased in all examined concentrations and all periods of treatment. Granulocytes responded differently to *B. bassiana* and *B. thuringiensis*. The number of granulocytes increased when the larvae were treated with *B. thuringiensis* at 48 and 72 hours, while the decrease of granulocytes was recorded with highest concentration at 120-168 hours after *B. bassiana* treatment. In contrast, the number of oenocytes was not changed after biopesticide treatment.

Conclusions : The results indicated the treatment of biopesticides affected the THC and DHC in the *T. molitor* larvae. This finding provides basic information on how biopesticides affected the immune system in insects.

Keywords : mealworm ; hemocyte; hemolymph; insecticide; biopesticides

*Corresponding author. E-mail : narutchala@gmail.com

บทนำ

จากปัญหาทางการเกษตรที่เกี่ยวข้องกับศัตรูพืช เกษตรกรมีการใช้สารเคมีในการแก้ปัญหาดังกล่าว ซึ่งเป็นต้นทุนในการทำการเกษตร ในปี พ.ศ. 2562 ประเทศไทยมีพื้นที่ทางการเกษตร 149,252,451 ไร่ โดยปี พ.ศ. 2557 มีปริมาณการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชทุกชนิดเท่ากับ 134,377,000 กิโลกรัม มูลค่ารวม 19,357 ล้านบาท ผู้ป่วยจากพิษสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเท่ากับ 12.25 ต่อประชากร 100,000 คน หน่วยงานที่เกี่ยวข้องจึงมีการศึกษาและส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารชีวภัณฑ์ในการกำจัดศัตรูพืชสำหรับช่วยลดปัญหาต้นทุนในการทำเกษตร นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาทางสุขภาพและสิ่งแวดล้อม สารชีวภัณฑ์ที่นิยมใช้ส่วนใหญ่เป็น bacteria, fungi, viruses และ nematode เช่น *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*; BT), ไล่เดือนฝอย, *Trichoderma* (Nawaz *et al.*, 2016; Department of Agricultural Extension, 2020) การใช้สารชีวภัณฑ์เหล่านี้มีผลต่อแมลงศัตรูพืช และส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของแมลง โดยแมลงจะมีการตอบสนองภายใน 10 ชั่วโมง โดยสารชีวภัณฑ์มักส่งผลกระทบต่อปริมาณและชนิดของฮีโมไซต์ (Heimpel & Harshbarger, 1965) โดย *Beauveria bassiana* (*B. bassiana*) สามารถทำลายแมลงได้หลากหลายชนิด โดยผลิตเอนไซม์ที่เป็นพิษต่อศัตรูพืช ทำให้เกิดโรค white muscardine และ *B. thuringiensis* มีการสร้าง δ -endotoxins ที่มีฤทธิ์เป็นสารกำจัดแมลง จึงมีการใช้เป็นสารกำจัดแมลงทางชีวภาพอย่างกว้างขวาง (Kumar *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021)

ฮีโมไซต์มีบทบาทหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง รวมถึงการ phagocytosis, encapsulation, และ cytotoxic reactions ในการศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีต่อฮีโมไซต์มักพิจารณาจากค่า total hemocyte count (THC) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงจำนวนฮีโมไซต์ต่อมิลลิเมตรของฮีโมลิม์ และ differential hemocyte count (DHC) เป็นค่าที่แสดงถึงสัดส่วนของฮีโมไซต์แต่ละชนิด โดยถ้ามีการเปลี่ยนแปลงในระบบภูมิคุ้มกันของแมลงจะส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงของจำนวนฮีโมไซต์และลักษณะของฮีโมไซต์แต่ละชนิด (Rajitha *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2002) ในการศึกษาผลของ *B. bassiana* ต่อระบบภูมิคุ้มกันของ *Musca domestica* L. ส่งผลให้ค่า THC, prohemocyte (PRs) และ granulocyte (GRs) ลดลง ส่วน plasmotocytes (PLs) เพิ่มขึ้น (Mishra *et al.*, 2015) และ *B. bassiana* มีผลต่อ *Aedes aegypti* โดยค่า THC ลดลงภายใน 24 ชั่วโมง แต่มีจำนวนของ GRs และ oenocytoids (OEs) เพิ่มขึ้น (de Oliveira Barbosa Bitencourt *et al.*, 2023) สำหรับผลของ *B. thuringiensis* ต่อ *Agrotis ipsilon* ทำให้ค่า THC และ PRs ลดลง แต่มีจำนวน SPs, PLs, and GRs เพิ่มขึ้น (El-Aziz & Awad, 2010)

ตัวอ่อนดักแด้ของหนอนนกมีฮีโมไซต์ 4 ชนิด คือ PRs, PLs, GRs และ OEs (Vommaro *et al.*, 2021) ระยะตัวเต็มวัยของดักแด้หนอนนก (*Tenebrio molitor* L.) เป็นแมลงปีกแข็ง ปัจจุบันนิยมเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของดักแด้หนอนนกเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ และยังเป็นแมลงที่มีการนำมาใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาด้านชีววิทยาของแมลง (de Souza *et al.*, 2015) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อศึกษาผลของเชื้อ *B. bassiana* และเชื้อ *B. thuringiensis* ต่อความผันแปรของ total hemocyte count และ differential hemocyte count ในระยะตัวอ่อนของดักแด้หนอนนก

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้ได้รับรองการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของโครงการวิจัยของคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา (คกส.มพ.) เลขที่รับรอง UP-AE64-01-04-032

ตัวอย่างด้วงหนอนนก

ตัวอย่างด้วงหนอนนกได้รับจากสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา โดยเลี้ยงตัวอย่างของด้วงหนอนนกที่อุณหภูมิห้อง ในภาชนะกล่องเลี้ยงแมลงเส้นผ่าศูนย์กลาง 23 เซนติเมตร สูง 10.5 เซนติเมตร จำนวน 200 ตัว/กล่อง โดยให้อาหารเป็นรำข้าวสาลีผ่านการอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณ 200 กรัม/กล่อง สัปดาห์ละสองครั้ง และเสริมด้วยผัก เช่น แครอท สัปดาห์ละหนึ่งครั้ง เลี้ยงจนกว่าจะได้ขนาดตัวหนอนนกประมาณ 20-30 มิลลิเมตร ก่อนทำการทดสอบบดให้อาหารประมาณ 12 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างด้วงหนอนนกมาเลี้ยงในภาชนะที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ใส่อาหารคลุกด้วยสารชีวภัณฑ์ที่ทำการทดสอบปริมาณ 20 กรัม/การทดสอบ/ตัวอย่างด้วงหนอนนก 10 ตัว สำหรับกลุ่มควบคุมให้อาหารคลุกด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

ตัวอย่างเชื้อ *B. bassiana* และเชื้อ *B. thuringiensis* (BT)

เชื้อ *B. bassiana* (บูเวริน, แอปพลายเค็ม, ประเทศไทยจำกัด) และเชื้อ *B. thuringiensis* (ไลทิงค์, แอปพลายเค็ม, ประเทศไทยจำกัด) อยู่ในรูปแบบผง เตรียมโดยทำการผสมในน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง และจากนั้นนำมาผสมในรำข้าวสาลี ผึ่งให้แห้ง บั่นให้ละเอียด แล้วจึงนำมาใช้ในการทดลอง โดยกลุ่มควบคุมใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ

กลุ่มตัวอย่างที่ทำการทดลอง

1) ความเข้มข้นและระยะเวลาหลังจากตัวอย่างด้วงหนอนนกได้รับเชื้อ *B. bassiana* และเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ความเข้มข้น 0.0025 g/ml, 0.00625 g/ml และ 0.0125 g/ml ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, และ 168 ชั่วโมง โดยนับค่า THC (total hemocyte count) และ DHC (differential hemocyte count) จำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ตัวอย่างด้วงหนอนนกจำนวน 5 ตัว

2) ความเข้มข้นและระยะเวลาหลังจากด้วงหนอนนกได้รับเชื้อ *B. bassiana* และเชื้อ *B. thuringiensis* ที่ความเข้มข้น 0.00125 g/ml ระยะเวลา 0, 2, 6, 10, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยนับค่า THC (total hemocyte count) จำนวน 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ตัวอย่างด้วงหนอนนกจำนวน 5 ตัว

การเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์และการเตรียมสไลด์

Total hemocyte count

การเก็บตัวอย่างฮีโมลิมฟ์สำหรับการนับจำนวน THC โดยการใช้กรรไกรขนาดเล็กตัดบริเวณขาเทียม (proleg) 2 คู่หน้าของตัวอย่างด้วงหนอนนก แล้วปล่อยให้ฮีโมลิมฟ์หยดลงบนแผ่นพาราฟิล์มจากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดฮีโมลิมฟ์ผสมกับสารละลาย phosphate buffer saline และ 0.37% β -mercaptoethanol ให้มีอัตราส่วน 1 ต่อ 100 ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex จากนั้นเตรียมสไลด์โดยนำ cover chamber มาปิดบริเวณที่ใช้นับบน hemocytometer นำฮีโมลิมฟ์ที่ผสมกับสารละลาย phosphate buffer saline รวมกับ 0.37% β -mercaptoethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนร่อง hemocytometer โดยให้ปลายไมโครปิเปตแตะบริเวณขอบของ cover chamber และนับจำนวน total hemocyte ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ

ใช้แสง (Olympus CX21, Japan) กำลังขยาย 100 เท่า โดยนับเม็ดเลือดจำนวน 4 ช่อง จากนั้นนำจำนวนที่นับได้มารวมกันเพื่อหาค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดต่อฮีโมลิฟท์ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร เมื่อนับจำนวน total hemocyte แล้วจึงทำความสะอาด hemocytometer และ cover chamber ด้วย 95% ethanol แล้วเช็ดให้สะอาด

Differential hemocyte count

การเก็บฮีโมลิฟท์ของตัวอ่อนด้วงหนอนนกสำหรับการศึกษา DHC โดยการนำตัวอ่อนด้วงหนอนนกมาตัดขาเทียม 2 คู่หน้า แล้วหยดฮีโมลิฟท์ลงบนสไลด์และทำการ smear โดยใช้ cover glass จากนั้นทิ้งสไลด์ให้แห้งเป็นเวลา 1-2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง การเตรียมสไลด์สำหรับการตรวจเพื่อแยกชนิดของฮีโมไซต์ ทำโดยการนำสไลด์ที่ smear ฮีโมลิฟท์มาคงสภาพด้วย methanol โดยการจุ่มสไลด์ลงใน methanol จำนวน 4 ครั้ง แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาย้อมด้วยสีย้อม Giemsa ที่ผสมด้วย phosphate buffer saline ในอัตราส่วน 1:9 เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น และจุ่มลงใน 0.02% acetic acid จำนวน 10 ครั้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 วัน และทำการเคลือบสไลด์ด้วย permount และทำการแยกชนิดฮีโมไซต์ของตัวอ่อนด้วงหนอนนก โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง (Olympus CX21, Japan) พร้อมชุดถ่ายภาพ (Optika digital camera และ Optikam WiFi 7083, Italy) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบ total hemocyte count และ differential hemocyte count ของตัวอ่อนด้วงหนอนนกเมื่อได้รับ *B. bassiana* และเชื้อ *B. thuringiensis* กับกลุ่มควบคุม โดยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยสถิติ One way ANOVA (IBM SPSS Statistics 25) ที่ $P < 0.05$

ผลการวิจัย

Total hemocyte count (THC)

ในการทดสอบเชื้อ *B. bassiana* พบว่ากลุ่มควบคุมมีค่า THC อยู่ระหว่าง $37.60 \pm 1.66 \times 10^6$ ถึง $40.28 \pm 1.37 \times 10^6$ cell/ml สำหรับค่า THC ของตัวอ่อนด้วงหนอนนกได้รับเชื้อ *B. bassiana* ที่ความเข้มข้น 0.0025 g/ml, 0.00625 g/ml และ 0.0125 g/ml มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมง ($8.31 \pm 1.38 \times 10^6$ cell/ml, $6.81 \pm 1.34 \times 10^6$ cell/ml $5.12 \pm 1.03 \times 10^6$ cell/ml ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้แต่ละความเข้มข้นที่ทดสอบมีค่า THC ลดลง 4 ถึง 7 เท่า โดยค่า THC ลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นและระยะเวลาที่ตัวอ่อนด้วงหนอนนกได้รับเชื้อนานขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ได้รับการทดสอบเชื้อ *B. thuringiensis* พบว่าค่า THC ลดลงมากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีแนวโน้มลดลงหลังจากได้รับเชื้อที่เวลาและปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น โดยค่า THC ตัวอ่อนด้วงหนอนนกในกลุ่มควบคุมมีค่าอยู่ระหว่าง $37.46 \pm 1.67 \times 10^6$ cell/ml ถึง $40.35 \pm 1.96 \times 10^6$ cell/ml ส่วนค่า THC ของตัวอ่อนหนอนนกที่ได้รับเชื้อ *B. thuringiensis* ความเข้มข้น 0.0025 g/ml, 0.00625 g/ml และ 0.0125 g/ml มีค่าเท่ากับ $8.73 \pm 1.45 \times 10^6$ cell/ml, $6.85 \pm 1.60 \times 10^6$ cell/ml และ $5.21 \pm 1.01 \times 10^6$ cell/ml ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยค่า THC ลดลงมากที่สุดภายในเวลา 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ได้รับเชื้อ *B. bassiana* ($P < 0.05$) (Figure 1 A, B) และเมื่อทำการทดสอบการได้รับสารชีวภัณฑ์ของ

ตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ความเข้มข้นที่มากที่สุด (0.00125 g/ml) ที่เวลา 0, 2, 6, 10, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าค่า THC ของตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ได้รับเชื้อ *B. bassiana* มีค่า THC ที่เริ่มลดลงต่างจากกลุ่มควบคุมในเวลา 6 ชั่วโมง (กลุ่มควบคุม; $36.08 \pm 6.25 \times 10^6$ cell/ml, *B. bassiana*; $15.04 \pm 5.29 \times 10^6$ cell/ml) ส่วนค่า THC ของตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ได้รับเชื้อ *B. thuringiensis* มีค่า THC ต่างจากกลุ่มควบคุมตั้งแต่ 2 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อและมีค่า THC ลดลงเป็น 2 เท่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง (กลุ่มควบคุม; $31.00 \pm 12.60 \times 10^6$ cell/ml, BT; $13.06 \pm 2.62 \times 10^6$ cell/ml) ($P < 0.05$) (Figure 2 A, B)

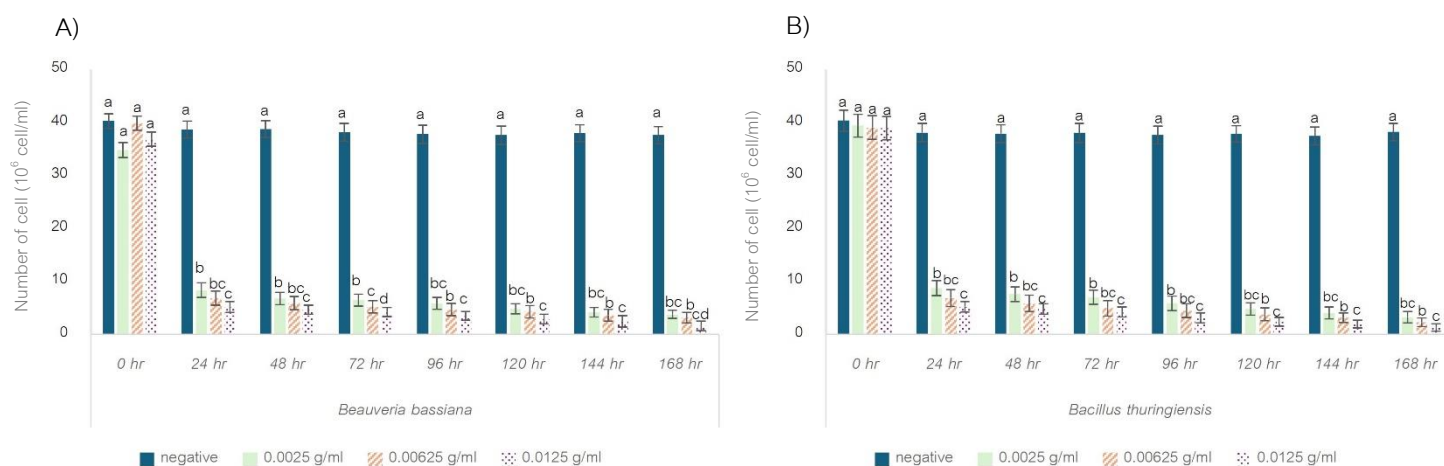


Figure 1 Mean of THC of *T. molitor* L. treated with microbial pesticides, *B. bassiana* (A) and *B. thuringiensis* (B), at 0.0025 g/ml, 0.00625 g/ml and 0.0125 g/ml for 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, and 168 hours.

a-d The bars labeled with different letters are significantly different in each period of treatment ($p < 0.05$).

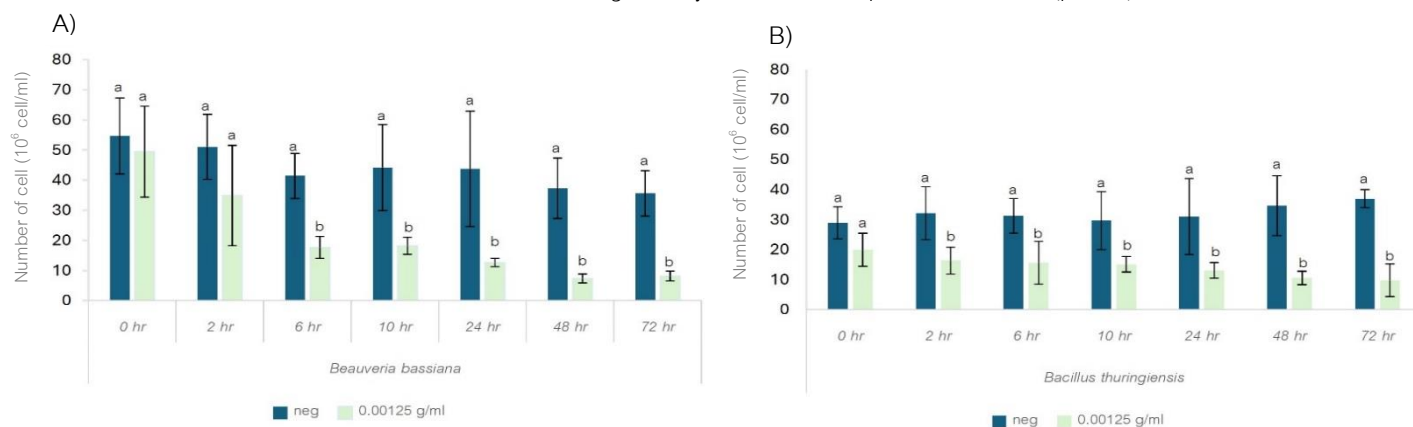


Figure 2 Mean of THC in *T. molitor* L. treated with microbial pesticides, *B. bassiana* (A) and *B. thuringiensis* (B), at 0.00125 g/ml for 0, 2, 6, 10, 24, 48 and 72 hours.

a-b The bars labeled with different letters are significantly different in each period of treatment ($p < 0.05$).

Differential hemocyte count (DHC)

ฮีโมไซต์ของด้วงหนอนนกที่พบในการศึกษานี้มี 4 ชนิด (Figure 5) โดยในกลุ่มควบคุมพบปริมาณของฮีโมไซต์แต่ละชนิด ดังนี้ PRs มีจำนวนมากที่สุด ($44.50 \pm 5.45\%$ - $50.83 \pm 3.90\%$) รองลงมา คือ PLs ($17.83 \pm 5.00\%$ - $21.67 \pm 2.76\%$), GRs ($23.50 \pm 6.47\%$ - $28.83 \pm 6.53\%$) และ OEs พบจำนวนน้อยสุด ($3.50 \pm 1.50\%$ - $8.00 \pm 4.28\%$) เมื่อทำการทดสอบด้วยเชื้อ *B. bassiana* พบว่าจำนวนของฮีโมไซต์แต่ละชนิดหลังจากได้รับเชื้อมีการเปลี่ยนแปลง ดังนี้ PRs มีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงเมื่อได้รับเชื้อเป็นเวลานานขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเชื้อ *B. bassiana* ในตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ได้รับเชื้อมากขึ้น พบจำนวน PRs มีการลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน มีจำนวนน้อยกว่าชุดควบคุม 5 เท่า (Figure 3A) ในทางตรงกันข้ามพบ PLs มีจำนวนเพิ่มขึ้นโดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามปริมาณเชื้อและเวลาที่ได้รับเชื้อ โดยเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุมถึง 3.5 เท่า (Figure 3B) ส่วน OEs มีจำนวนไม่ต่างกันในทุกชุดการทดลอง (Figure 3C) สำหรับ GRs ในกลุ่มที่ได้รับเชื้อ *B. bassiana* มีจำนวน GRs ลดลงที่เวลา 24, 72, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง โดยลดลงประมาณ 1.6 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ดัง Figure 3D ในการทดสอบตัวอ่อนด้วงหนอนนกด้วยเชื้อ *B. thuringiensis* ฮีโมไซต์แต่ละชนิดของตัวอ่อนด้วงหนอนนกมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าในกลุ่มควบคุมมี PRs มากที่สุด ($38.83 \pm 1.62\%$ - $50.83 \pm 1.44\%$) มีจำนวนรองลงมา คือ PLs ($17.83 \pm 3.06\%$ - $29.17 \pm 8.07\%$), GRs ($18.17 \pm 5.52\%$ - $25.50 \pm 5.11\%$) และ OEs ($4.66 \pm 2.20\%$ - $11.50 \pm 6.56\%$) ตามลำดับ โดยพบจำนวนฮีโมไซต์ชนิด PRs มีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมประมาณสองเท่า จากนั้นจะมีค่าคงที่ในช่วงเวลาอื่น ๆ (Figure 4A) สำหรับ PLs มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลาหลังรับเชื้อ *B. thuringiensis* โดยเริ่มมีจำนวนเพิ่มขึ้นในเวลาตั้งแต่ 24 ชั่วโมง ประมาณ 0.7-2 เท่า (Figure 4B) ส่วน OEs ในตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ได้รับเชื้อมีจำนวนไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม (Figure 4C) สำหรับจำนวน GRs ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง โดยมีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุม พบมี GRs เพิ่มขึ้น 1.4 และ 1.5 เท่า ($P < 0.05$) ดัง Figure 4D

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลองพบว่าค่า THC ของตัวอ่อนด้วงหนอนนกในกลุ่มควบคุมมีจำนวนสอดคล้องกับรายงาน THC ของด้วงหนอนนกที่มีขนาดตัว 20-30 mm มีค่าอยู่ระหว่าง 44×10^6 – 57×10^6 cell/ml (Jones & Tauber, 1951) โดยในด้วงหนอนนกที่ได้รับเชื้อ *B. bassiana* และ *B. thuringiensis* มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ เชื้อทั้งสองชนิดส่งผลให้ค่า THC ของตัวอ่อนด้วงหนอนนกลดลง เป็นที่น่าสังเกตว่าค่า THC ในกลุ่มควบคุมมีค่าไม่คงที่ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการแยกเพศของตัวอ่อนด้วงหนอนนกในการทดสอบ ซึ่งมีรายงานถึงค่า THC แตกต่างกันได้ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (Vigneron *et al.*, 2019) เมื่อตัวอ่อนด้วงหนอนนกได้รับเชื้อทำให้มีค่า THC ลดลง แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. bassiana* และ *B. thuringiensis* ในความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถเข้าทำลายฮีโมไซต์ของตัวอ่อนด้วงหนอนนก โดยการลดกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจระดับเซลล์ โดยฮีโมไซต์เกี่ยวข้องกับ cellular immune responses และมีรายงานเกิดการจับตัวและรวมกลุ่มของ hemocytes โดยการทำงานของ phenoloxidase (Jones, 1957; Lee *et al.*, 1999; Janssen *et al.*, 2017) โดย

ตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ได้รับเชื้อ *B. bassiana* และ *B. thuringiensis* ในความเข้มข้นต่าง ๆ มีจำนวน THC ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B. bassiana* และ *B. thuringiensis* สามารถเข้าไปทำลายฮีโมไซด์และระบบภูมิคุ้มกันของด้วงหนอนนกได้นอกจากนี้ในการศึกษาสารชีวภัณฑ์ชนิดเชื้อ *B. bassiana* และ *B. thuringiensis* ในแต่ละการทดลอง พบว่าสารชีวภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการเข้าทำลายฮีโมไซด์ภายในร่างกายของตัวอ่อนด้วงหนอนนกจากการที่พบว่าจำนวนฮีโมไซด์ของตัวอ่อนด้วงหนอนนกลดลงตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารที่ได้รับ สอดคล้องกับการศึกษาใน *Ades aegypti* เมื่อได้รับ *B. bassiana* ส่งผลให้มี THC ลดลง (Siddiqui & AL-Khalifa, 2014; de Oliveira Barbosa Bitencourt *et al.*, 2023) อย่างไรก็ตามค่า THC มีการเปลี่ยนแปลงตาม pathogen และชนิดของเซลล์เจ้าบ้าน โดยใน *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) ที่ได้รับพวกปรสิตที่มี biotypes ต่างกันมีค่า THC ที่ต่างกัน (Mochiah *et al.*, 2003) เมื่อ *Musca domestica* ได้รับเชื้อ *B. bassiana* L. ส่งผลให้ค่า THC, PRs และ GRs ลดลง ส่วน PLs เพิ่มขึ้น (Mishra *et al.*, 2015) เชื้อ *B. thuringiensis* ส่งผลต่อ *Agrotis ipsilon* ทำให้ค่า THC และ PRs ลดลง แต่มีจำนวน SPs, PLs และ GRs เพิ่มขึ้น (El-Aziz & Awad, 2010) การศึกษาใน *Rhynchophorus ferrugineus* ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน โดยมี THC และ PLs ลดลง แต่สำหรับ OEs มีจำนวนเพิ่มขึ้นในระยะตัวหนอน และ GRs เพิ่มขึ้นในตัวเต็มวัยเพศผู้ ส่วนในเพศเมียนั้นทุกชนิดของฮีโมไซด์มีค่าลดลง (Celi *et al.*, 2022) นอกจากนี้ในการศึกษาในผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) ที่ได้รับยาฆ่าแมลงทำให้ THC ลดลงเช่นกัน โดยมี PLs และ GRs เพิ่มขึ้น ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับแมลงประเมินจากความผิดปกติของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแมลงโดยดูจากการเกิด agglutination, denucleation และ cell shape distortion (Perveen & Ahmad, 2017) จำนวนฮีโมไซด์ที่ลดลงอาจเกิดจากความแตกต่างในสภาวะที่ใช้การทดสอบแมลง สารที่ใช้ทดสอบและความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ (Vigneron *et al.*, 2019) ฮีโมไซด์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในช่วงแรกและช่วงท้ายจะทำให้เกิดกลไกการป้องกันตัวเองขึ้น พบว่าเมื่อสารชีวภัณฑ์เข้าสู่ hemocoel แมลงจะตอบสนองทันทีเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามา โดยการสร้างเซลล์ห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม เรียกกระบวนการนี้ว่า encapsulation แต่หากมีการปล่อย symbiotic bacteria ออกมาก่อนที่จะเกิด encapsulation แมลงจะมีการป้องกันตัวเองโดยกระบวนการ phagocytosis (Shukla & Bahadur, 1986; Wang *et al.*, 1994) ในงานวิจัยนี้ครั้งนี้พบมี PRs ลดลง แต่มี PLs เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงภายหลังได้รับสารชีวภัณฑ์ทั้งสองชนิด ซึ่งสอดคล้องกับหน้าที่ของ PLs ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ phagocytosis ในขณะที่ GRs และ OEs มีจำนวนไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ซึ่งอาจเกิดจาก GRs มีหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการเกิด melanisation cascade หรือ aggregation process ด้วยการหลั่ง cytokines ส่วน OEs มี phenoloxidase activity เกี่ยวข้องกับการเกิด melanization, wound healing และ encapsulation (Moyetta *et al.*, 2021; Vommaro *et al.*, 2021) นอกจากนี้พบว่า PRs มีจำนวนมากที่สุดในตัวหนอนนกกลุ่มควบคุม จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถสรุปความสัมพันธ์ได้โดย PRs ในตัวอ่อนด้วงหนอนนกจะสามารถพบได้มากที่สุดในฮีโมลิมฟ์และยังเป็นเซลล์เดียวที่พบในกระบวนการ cytokinesis แสดงให้เห็นถึงบทบาทการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของฮีโมไซด์ (Arnold, 1979; Grigorian & Hartenstein, 2013) ในการศึกษาในหนอนไหม (*Bombyx mori* L.) ภายหลังจากได้รับเชื้อ *B. bassiana* แล้วมีการลดลงของ THC สำหรับ DHC มี PLs และ OEs ลดลง (Rajitha *et al.*, 2013) ในการศึกษา โดย PLs และ GRs มีบทบาทในกระบวนการ phagocytosis ซึ่งเป็นกระบวนการหนึ่งในการที่แมลงใช้สำหรับต่อต้านสิ่งที่เข้ามาบุกรุก แต่การตอบสนองของแมลงในแต่ละ

ระยะ โดยในตัวหนอนต่างเพศกันมีการตอบสนองที่ต่างกัน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัด ตัวหนอนของสารชีวภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิด เช่น สภาพอากาศ ความชื้น แสงแดด ระยะเวลาในการทดลองวิธีการที่ได้รับสาร ชีวภัณฑ์ และวิธีเก็บรักษา (Dailey, 1978; Siddiqui & AL-Khalifa, 2014; Vigneron *et al.*, 2019)

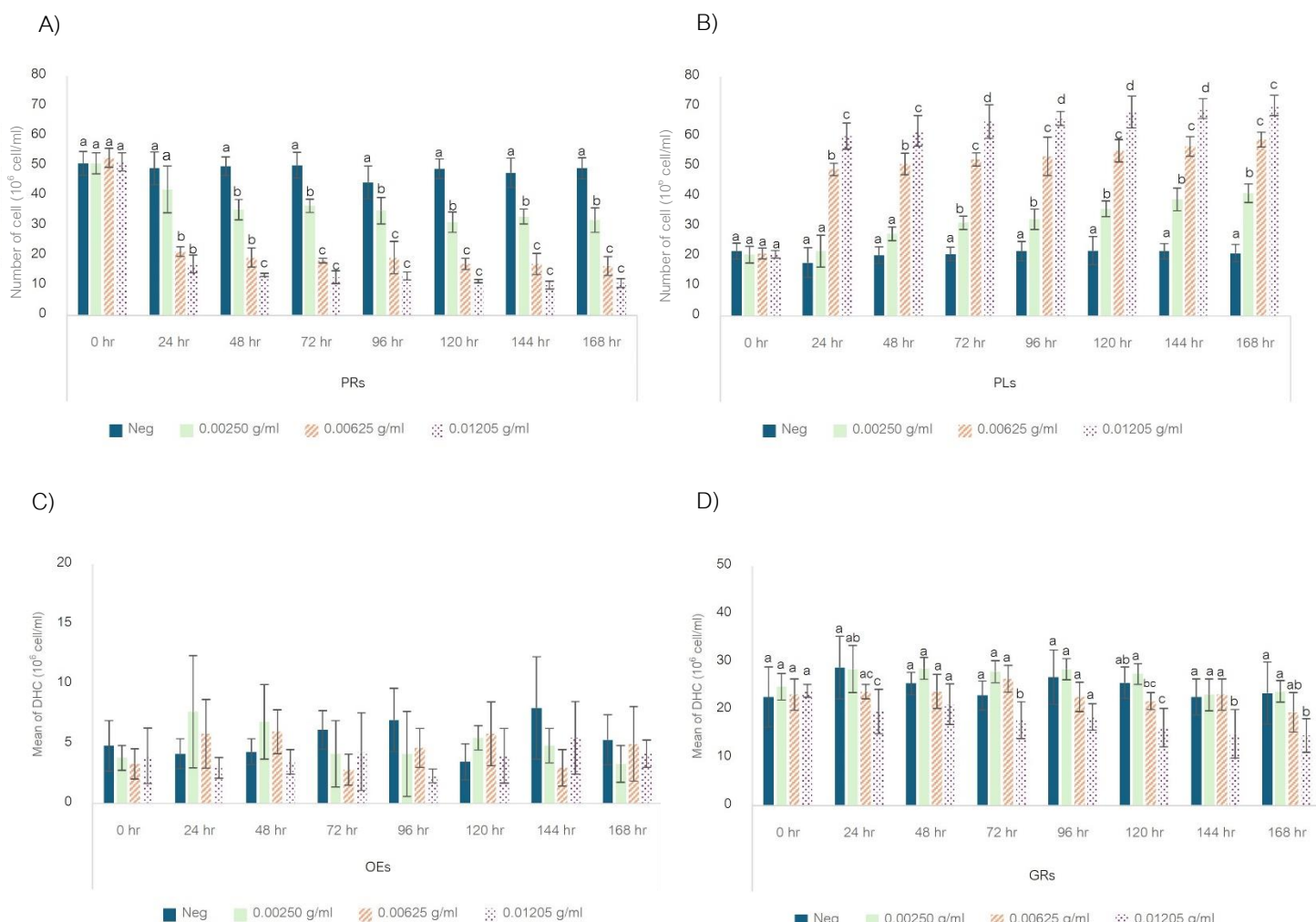


Figure 3 Mean of DHC prohemocytes (A), Plasmotocytes (B), oenocytes (C), Granulocytes (D) in *T. molitor* L. treated with *B. bassiana* at 0.0025 g/ml, 0.00625 g/ml and 0.0125 g/ml for 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, and 168 hours.

a-d The bars labeled with different letters are significantly different in each period of treatment ($p < 0.05$).

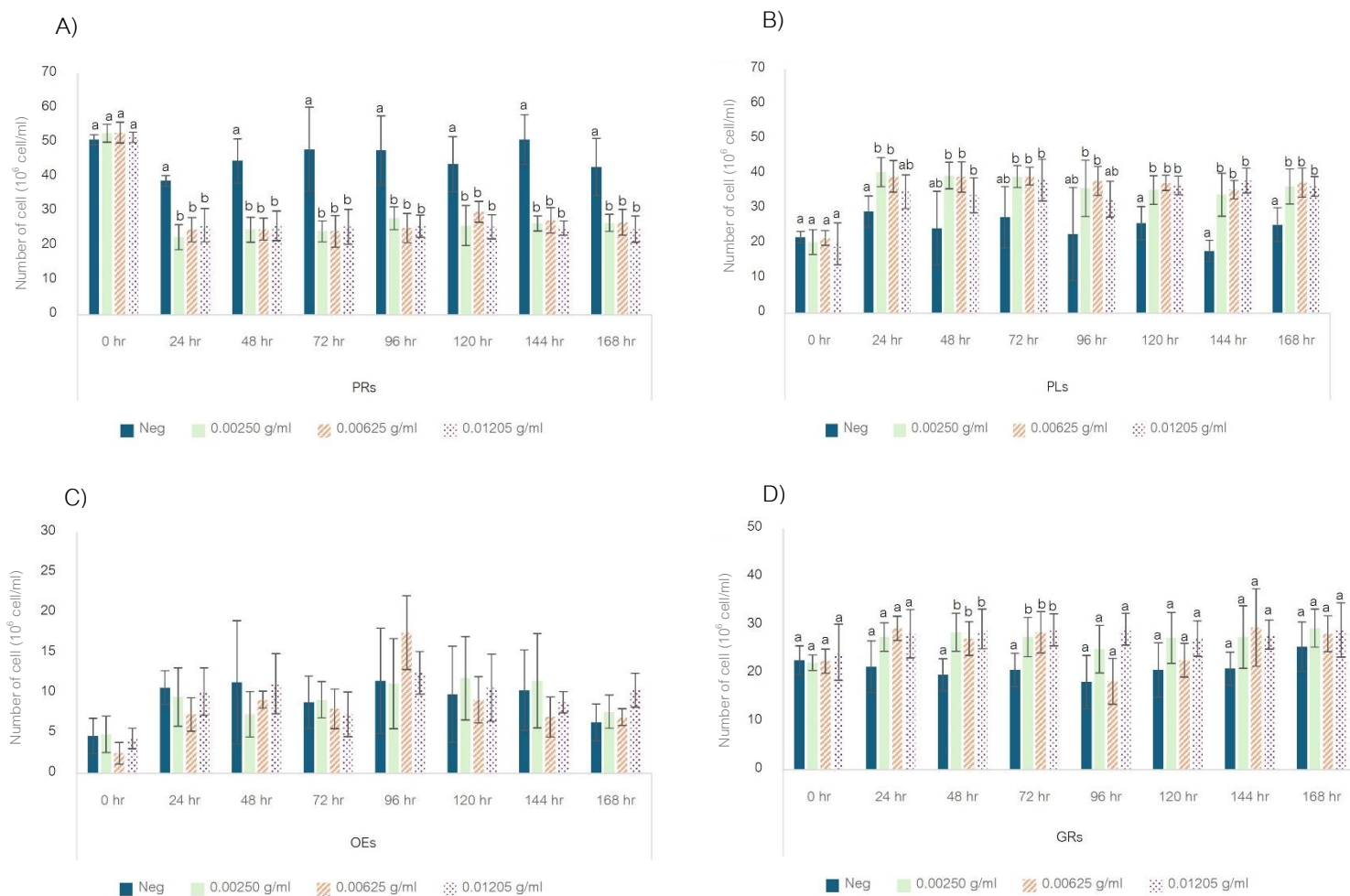


Figure 4 Mean of DHC prohemocytes (A), Plasmotocytes (B), oenocytes (C), Granulocytes (D) in *T. molitor* L.

treated with *B. thuringiensis* at 0.0025 g/ml, 0.00625 g/ml and 0.0125 g/ml for 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, and 168 hours.

^{a-b} The bars labeled with different letters are significantly different in each period of treatment ($p < 0.05$).

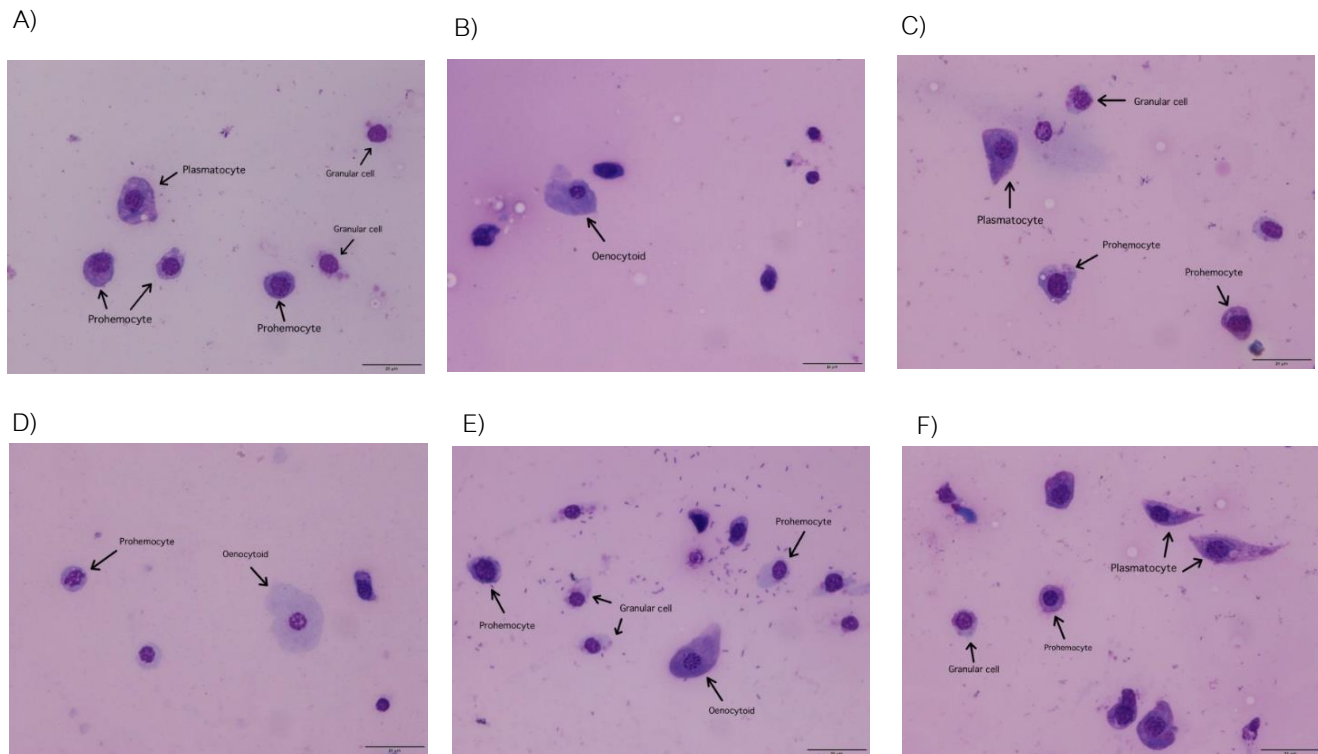


Figure 5 Light microscopy images of the hemocytes types of *T. molitor* L. The larvae treated with sterilized distilled water (A and B), the larvae treated with *B. bassiana* at 0.0125 g/ml (C and D), the larvae treated with *B. thuringiensis* at 0.0125 g/ml (E and F). Scale bars = 20 μ m.

สรุปผลการวิจัย

เมื่อตัวอ่อนด้วงหนอนนกได้รับเชื้อ *B. bassiana* และ *B. thuringiensis* ส่งผลให้ค่าเฉลี่ย THC ลดลงตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสารชีวภัณฑ์ โดยมีการลดลงอย่างรวดเร็วในเวลา 6 และ 2 ชั่วโมง สำหรับตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ได้รับเชื้อ *B. bassiana* และ *B. thuringiensis* ตามลำดับ ในส่วนของค่าเฉลี่ย DHC ของด้วงหนอนนกหลังจากได้รับเชื้อ *B. bassiana* และ *B. thuringiensis* มีทิศทางเช่นเดียวกัน โดยจำนวน PRs ของตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ได้รับเชื้อมีจำนวนลดลงในเวลา 24 ชั่วโมง ส่วน PLs มีจำนวนเพิ่มขึ้นในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากที่ได้รับเชื้อ สำหรับ OEs ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม ในส่วนของ GRs ของตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ได้รับเชื้อ *B. bassiana* มีแนวโน้มลดลงที่เวลา 24, 72, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง และ GRs ของตัวอ่อนด้วงหนอนนกที่ได้รับเชื้อ *B. thuringiensis* มีจำนวนลดลงที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการศึกษานี้ทำให้ทราบการตอบสนองของฮีโมไซตินในตัวอ่อนด้วงหนอนนกต่อสารชีวภัณฑ์ประเภทเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ที่ได้รับความนิยมในหมู่เกษตรกรที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืช ซึ่งผลการวิจัยที่ได้จะสามารถใช้ประโยชน์ในการจัดการการใช้สารชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ



กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่สัญญา FF65-RIM0052 จากกองทุนส่งเสริม ววน. และขอขอบพระคุณ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Arnold, J. W. (1979). Controversis about hemocyte types in insects. In: A. P. Gupta, *Insect hemocytes: development, forms, functions, and techniques* (pp 231-258). New York, Cambridge University Press.
- Celi, M., Russo, D., Vazzana, M., Arizza, V., & Manachini, B. (2022). Does *Bacillus thuringiensis* Affect the Stress and Immune Responses of *Rhynchophorus ferrugineus* Larvae, Females, and Males in the Same Way?. *Insects*, 13(5), 437. <https://doi.org/10.3390/insects13050437>
- Dailey, P. J. (1978). *Biological Investigations of Insect Haemocytes*. (Doctoral dissertation). Bowling Green State University. http://rave.ohiolink.edu/etdc/view?acc_num=bgsu1566463066600033
- Department of Agricultural Extension, Ministry of Agriculture and Cooperatives. (2020) The use of microorganisms (biopesticides) in pest control. Bangkok: New Thammada Press (Thailand) CO., LTD.
- de Oliveira Barbosa Bitencourt, R., Corrêa, T. A., Santos-Mallet, J., Santos, H. A., Lowenberger, C., Moreira, H. V. S., Gôlo, P. S., Bittencourt, V. R. E. P., & da Costa Angelo, I. (2023). Beauveria bassiana interacts with gut and hemocytes to manipulate Aedes aegypti immunity. *Parasites & vectors*, 16(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05655-x>.
- de Souza, P. C., Morey, A. T., Castanheira, G. M., Bocate, K. P., Panagio, L. A., Ito, F. A., Furlaneto, M. C., Yamada-Ogatta, S. F., Costa, I. N., Mora-Montes, H. M., & Almeida, R. S. (2015). *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *Journal of microbiological*
- El-Aziz, N. M., & Awad, H. H. (2010). Changes in the haemocytes of Agrotis ipsilon larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to dimilin and Bacillus thuringiensis infections. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 41(3), 203–209.



- Grigorian, M., & Hartenstein, V. (2013). Hematopoiesis and hematopoietic organs in arthropods. *Development genes and evolution*, 223(1-2), 103–115. <https://doi.org/10.1007/s00427-012-0428-2>
- Heimpel, A. M., & Harshbarger, J. C. (1965). Symposium on microbial insecticides. V. Immunity in insects. *Bacteriological reviews*, 29(3), 397–405. <https://doi.org/10.1128/br.29.3.397-405.1965>
- Janssen, R. H., Lakemond, C. M. M., Fogliano, V., Renzone, G., Scaloni, A., & Vincken, J. P. (2017). Involvement of phenoloxidase in browning during grinding of *Tenebrio molitor* larvae. *PloS one*, 12(12), e0189685
- Jones, S J. C. (1957). DDT and the hemocyte picture of the mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Journal of cellular and comparative physiology*, 50(3), 423–428.
- Jones, J. C., & Tauber, O. E. (1951). Normal total hemocyte counts of *Tenebrio molitor*. *Annals of the Entomological Society of America*, 44(4), 539-545.
- Kumar, J., Ramlal, A., Mallick, D., & Mishra, V. (2021). An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1185.
- Lee, H. S., Cho, M. Y., Lee, K. M., Kwon, T. H., Homma, K., Natori, S., & Lee, B. L. (1999). The pro-phenoloxidase of coleopteran insect, *Tenebrio molitor*, larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. *FEBS letters*, 444(2-3), 255–259.
- Mishra, S., Kumar, P., & Malik, A. (2015). The effect of *Beauveria bassiana* infection on cell mediated and humoral immune response in house fly, *Musca domestica* L. *Environmental science and pollution research international*, 22(19), 15171–15178.
- Mochiah, M. B., Ngi song, A. J., Overholt, W. A., & Botchey, M. (2003). Variation in Total and Differential Haemocyte Count of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) Parasitized by Two Biotypes of *Cotesia sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae) and Larval Growth Responses. *Environmental Entomology*, 32(2), 247-255. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-32.2.247>



- Moyetta, N. R., Ramos, F. O., Leyria, J., Canavoso, L. E., & Fruttero, L. L. (2021). Morphological and Ultrastructural Characterization of Hemocytes in an Insect Model, the Hematophagous *Dipetalogaster maxima* (Hemiptera: Reduviidae). *Insects*, 12(7), 640.
- Nawaz, M., Mabubu, J. M., & Hua H. (2016). Current status and advancement of biopesticides: Microbial and botanical pesticides. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(2), 241-6.
- Perveen, N., & Ahmad, M. (2017). Toxicity of some insecticides to the haemocytes of giant honeybee, *Apis dorsata* F. under laboratory conditions. *Saudi journal of biological sciences*, 24(5), 1016–1022.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.011>
- Rajitha, K., Savithri, G., & Sujathamma, P. (2013). Haemocyte population dynamics in fifth instar silkworm bombyx mori I inoculated with beauveria bassiana (bals.) Vuill. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 3(2), 265-275.
- Shukla, K., & Bahadur, J. (1986). Total haemocyte count in male *Poekilocerus pictus* under the influence of dichlorvos and phosphamidon. *Journal of animal morphology and physiology*, 33, 87.
- Siddiqui, M. I., & AL-Khalifa, S. M. (2014). Review of haemocyte count, response to chemicals, phagocytosis, encapsulation and metamorphosis in insects. *Italian journal of Zoology*, 81(1), 2-15.
- Silva, J. E., Boleli, I. C., & Simões, Z. L. (2002). Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. *Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia*, 62(4A), 689–699. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400017>
- Vigneron, A., Jehan, C., Rigaud, T., & Moret, Y. (2019). Immune Defenses of a Beneficial Pest: The Mealworm Beetle, *Tenebrio molitor*. *Frontiers in physiology*, 10, 138. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00138>
- Vommaro, M. L., Kurtz, J., & Giglio, A. (2021). Morphological Characterisation of Haemocytes in the Mealworm Beetle *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Insects*, 12(5), 423.
<https://doi.org/10.3390/insects12050423>



- Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., & Gong, M. (2021). The Toxins of *Beauveria bassiana* and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. *Frontiers in microbiology*, 12, 705343.
- Wang, Y., Gaugler, R., & Cui, L. (1994). Variations in Immune Response of *Popillia japonica* and *Acheta domesticus* to *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema* Species. *Journal of nematology*, 26(1), 11–18.