

線蟲殺蟲劑之生產與 產品開發

撰文/蕭文鳳

摘要

Steinernema 屬和 *Heterorhabditis* 屬的蟲生線蟲近年來已逐漸被用在不同作物上各種害蟲的綜合管理上。此二屬線蟲有共生菌 *Xenorhabdus* 及 *Photorhabdus*，它們的生活環包含自由生活期和寄生期。在自然界中，侵染性幼蟲在土壤找尋昆蟲寄主，經自然開口進入、穿透寄主體腔，釋出共生菌於 2 天內殺死寄主昆蟲，並在罹病個體內完成生活史。至今有 32 種蟲生線蟲已被描述，其中 9 種已商品化。本土種 *Steinernema abbasi* 則利用海綿貯存可達數月之久。但 *Heterorhabditis brevicaudis* 仍需進一步探討。

一、前言

近數十年來因環保意識高漲，全球有識之士體認到地球上的人工添加物質需減量，否則會對地球造成無可恢復之破壞，其中包含農用化學藥劑及肥料，特別是被用於土壤燻蒸及儲存期病蟲害防治的溴化甲烷更因其會破壞臭氧層，自 2000 年被美國列為禁用對象及必得優先找尋替代物質，我國環保署於 1998 年將之建議不用於環境。高清文等人於「農政與農情」112 期的「邁進 21 世紀之植物防疫檢疫措施」文章中，提到強化植物疫病蟲害生物防治技術示範與推廣，應持續推動作物病蟲害生物防治，如寄生蜂、草蛉、捕植蟻等之應用，降低農藥的使用量，減少農產品中

農藥的殘留，以提高農產品品質。我國 2002~2006 年來的農藥銷售額為新台幣 59.45、60.42、53.34、51.43 及 52.02 億。2006 年的殺蟲劑 21.69 億為銷售總額的 42%，因而有努力減量之空間。

就減用化學農藥方面，植物保護專家們將施用植物性殺蟲劑、生物防治、生物化學物質、機械物理防治、生態管理等措施納入考量。其中生物防治就是利用捕食性天敵、寄生性天敵及微生物病原。

舉凡利用細菌、真菌、病毒、原生動物及線蟲本身或其產物及基因轉殖之產品來防治有害生物者稱之為微生物防治。其中，蟲生線蟲因為沒有口針，故不會為害植物，因而不需擔憂施用它後會對植物造成損害的可能性。加之蟲生線蟲是利用所攜帶的共生細菌以殺死昆蟲寄主，故可稱之具有病原性及寄生捕食天敵的雙重特性。

將蟲生線蟲列為防治土壤害蟲之考量是根據下列特性：(1) 線蟲具移動性會受到二氧化碳、水分及昆蟲排出之含氮廢物吸引而趨近寄主。(2) 共生菌是致死肇因，毒力強、致死時間短，寄生範圍廣。(3) 可用非生物體物質培養，繁殖力強。(4) 對脊椎動物、植物、非目標的生物很安全 (Georgis *et al.* 1991)，因而在美國可免註冊。(5) 施用方便：能採用一般農藥施藥設備噴灑，且可與化學農藥混合施用。

Steinernema glaseri 感染日本金龜子，且本線

蟲可以人工培養基培養；DD-136 對蘋果舞蛾具高致病力，此後展開一連串的研究；國內朱耀沂及其學生於 1970 年初期嘗試大量培養 DD-136 及利用來防治白粉蝶幼蟲；Poinar (1975) 發現 *Heterorhabditid* 線蟲；Romanermis (1976) 發現 *Culicivorax nielsenii* 可感染蚊子，並有商品問市，但很可惜隨即被蘇力菌以色列變種取代。吳輝榮博士 (1988) 再度將蟲生線蟲帶入台灣；1990 年起有蕭文鳳，侯豐男、唐立正博士及其研究生陸續投入 *Steinernematid* 屬的研究；2000 年初採集到本土線蟲 *Steinernematidae abbasi* 及高穗生、謝奉家博士及團隊採集到 *Heterorhabditis brevicaudis*，使得我們有適應本土環境條件的蟲生線蟲可供應用。

二、蟲生線蟲的生物學及生態學

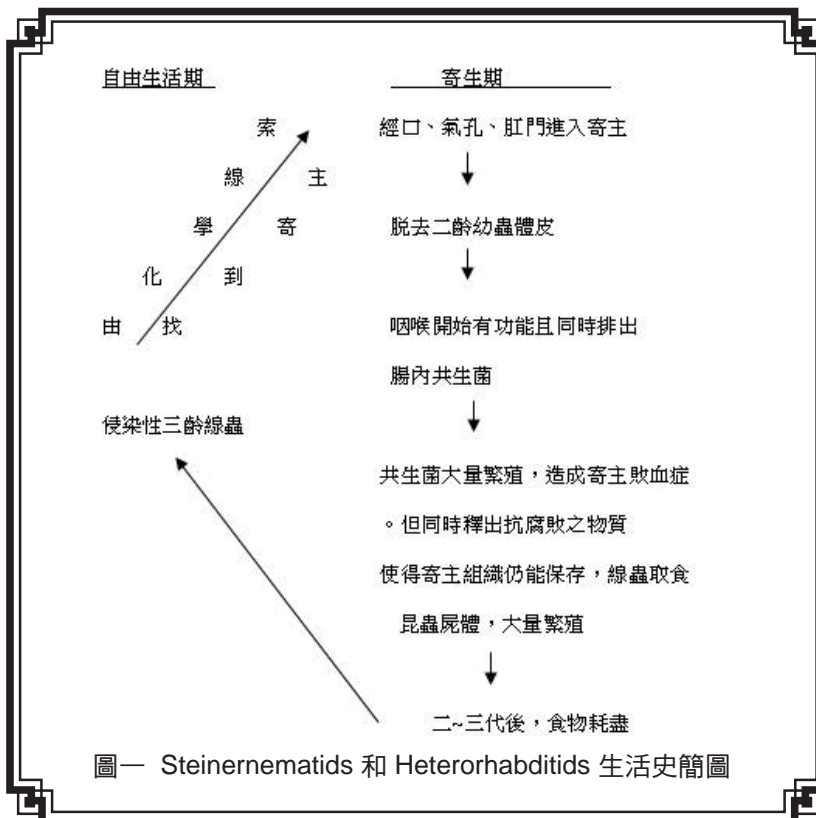
與昆蟲有關的線蟲大抵分為絕對寄生 / 共生、兼性寄生和絕對寄生。當線蟲寄生在昆蟲可能會

引起不孕、生殖力下降、壽命減少、飛行能力下降、發育延遲或改變昆蟲其他行為、形態或生理的不正常之效應。早在 1980 年初 *Steinernematidae* 及 *Heterorhabditidae* 科的線蟲在產官學界就引起極大的迴響，並有商品上市。此二科的寄主範圍寬廣，含鱗翅目 32 科、鞘翅目 18 科、雙翅目 20 科及直翅目、等翅目、半翅目、同翅目、脈翅目、膜翅目等。並能在二天內藉由共生菌快速殺死昆蟲，以下僅就此二科作一介紹。

(一) 線蟲/共生菌生物學

現今 *Steinernematidae* 科內 *Steinernema* 屬有 24 種及 *Neosteinernema* 屬 1 種；*Heterorhabditidae* 科內 *Heterorhabditis* 屬有 7 種，但每年仍續有新種被發現 (表一) 而有上市商品 (表二)。包被在第二齡幼蟲體壁內的第三齡幼蟲，在土壤中自由找尋新奇主並開始進行感染，因為具有侵入性故稱侵染性幼蟲 (Infective juvenile, IJ)。Steinernematids 及 Heterorhabditids 可經由昆蟲的口、肛門及氣孔

或是薄的體壁處進入昆蟲體內，因 *Heterorhabditids* 侵染性幼蟲具有齒狀物可撕裂氣孔進入昆蟲體腔。一旦進入體腔則排出共生菌，菌迅速繁殖後，造成壞血症，24~48 小時內會殺死寄主昆蟲，並營造出不被其它微生物佔領的環境，此時線蟲開始其發育，取食共生菌及昆蟲組織。在較小型的昆蟲可能在幾分鐘內因機械傷害造成昆蟲死亡 (LeBeck *et al.*, 1993)。線蟲俟發育成熟就行二性交尾並在同一寄主身體繁殖出二~三代以上的線蟲再釋出體外。在理想狀況下，Steinernematids 在感染後 6-11 天，Heterorhabditids 在 12-14 天後開始逃離寄主昆蟲。共生菌無法在土壤殘存，而需由侵染性保護，細菌需依賴線蟲來協助侵入



表一 *Steinernematid* 和 *Heterorhabditid* 蟲生線蟲種類

蟲生線蟲屬名	種名
<i>Steinernema</i>	<i>affinis, anomali, carpocapsae, cubana, feltiae, glaseri, intermedia, kushidai, kraussei, longicaudatum, neocurtillis, oregonensis, puertoricensis, rara, riobravis, ritteri, scapterisc</i>
<i>Heterorhabditi</i>	<i>argentinensis, bacteriophora, hawaiiensis, indicus, marelatus, megidis, zealandica</i>

表二 商品化之蟲生線蟲種類及其共生菌

線蟲種類	共生細菌	產品名
<i>Steinernema carpocapsae</i>	<i>Xenorhabdus nematophilms</i>	Mioplant, Boden-Nutzlinge, BioSafe, BioVector, Helix, Vector TL
<i>S. feltiae</i>	<i>X. bovienii</i>	Exhibit, Stealth, Nemasys, Entonem, X-GNAT, Guardian, Magnet
<i>S. glaseri</i>	<i>X. poinarii</i>	上市
<i>S. riobrave</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>	Bio Vector, Vector MC
<i>S. scapterisci</i>	<i>Xenorhabdus sp.</i>	Proactant Ss
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>	Otinem
<i>H. megidis</i>	<i>P. uminescens</i>	Nemasys-H, LarvaNem

資料來源：Kaya and Koppenhofer, 1999；Grewal and Georgis, 1999

寄主昆蟲血腔，並接受線蟲的協助抑制寄主昆蟲所產生的抗細菌防禦系統。線蟲也可以接受細菌的協助如細菌快速殺死昆蟲寄主，產生一個合適的環境，產生抗生素來抑制競爭性微生物，細菌能將寄主組織轉變成線蟲的食物來源，細菌本身也作為新一代線蟲的食物。

在國內、外蟲生線蟲已逐漸被用在不同作物上各種害蟲的綜合管理上，儘管在室內測試都獲致相當佳的效果，但田間的施用效果仍不穩定，會受到許多因子的影響，如選定的線蟲種類或品系、溫溼度、施用方法、貯存及操作、製劑的品質、田間灌溉頻率及土壤型態等，使其效果打折扣。但其具有寄生及病原雙重特性因而被認為是具潛力的生物防治因子。因而我們在施用防治害

蟲前若能明瞭其特性收集更多的資訊以提高其效能。

一般言，侵染性線蟲在 5-15°C 時殘活較佳。在較高的溫度，侵染性線蟲代謝速率加速，會耗盡體內所貯存之能量而縮短生活期。在土壤內，侵染性幼蟲可自我調節從不合適的溫度（或濕度）遷移至較合適的環境。實際的施用是在早晨或黃昏或有雲的天氣施用蟲生線蟲可以減少乾燥，紫外線和極端溫度對蟲生線蟲造成的損害。在生產時都納入需考量。在台灣花蓮土壤分離的 *S. abbassi* 置於室溫的存活率也較高，更增加有利之處。

三、蟲生線蟲之大量生產、貯存與配方之研發

(一) 國外狀況

蟲生線蟲能以動物活體或非動物活體來生產，後者是用人工培養基，前者是利用昆蟲作為原料，只需少許的初步投資(如準備簡單的飼養盤及架子)。利用大蠟蛾幼蟲來培養蟲生線蟲是最典型的動物活體培養方式，產量雖然視被培養的蟲生線蟲物種而定，大蠟蛾曾被用於培養 *S. carpocapsae* 及 *H. bacteriophora*，產量是 $0.5\sim 4\times 10^5$ 線蟲 / 幼蟲。若要大規模生產時，則其成本呈線性增加，因而需考慮代替之道。

早在 1931 年 Glaser 就開始就 *S. glaseri* 進行人工培養，很可惜他並未注意到共生菌的問題，因而導致失敗。直到 Bedding (1981) 才真正成功，他當時採用 polyether polyurethane 海綿浸潤牛油、豬肝和共生菌，利用此法可產生 $6\sim 10\times 10^5$ 線蟲 / 克，此法後來在澳洲、中國及美國被廣泛採用。Friedman (1990) 認為也可利用液體培養，以 *S. carpocapsae* 而言，每克能生產 2.5×10^5 隻線蟲，則八萬升的發酵槽，每個月應能生產 50×10^{12} 線蟲。同法可用在 *S. Riobravis*，*S. feltiae*，*S. glaseri*，*H. bacteriophora* 和 *H. megidis*。培養基為全蛋、酵母、玉米油、大豆粉、動物蛋白、膽固醇及 KH_2PO_4 。*H. bacteriophora* 利用 bubble column fermenter (10^5 IJs 只需 US \$0.9)；*S. feltiae* 是利用氣舉式發酵器；*H. megidis* 用 stirred fermenter 生產。

在上述解決大量生產的方法後，緊接著如何長期保存就需考慮了，如何使得保存的線蟲依舊能維持與一開始幾乎相同的活力，則需考量線蟲的濃度、貯存溫度、通氣，此外不同物種及其行為適應(遊走型或坐等型)都需納入思考項目。如 *S. feltiae* 較適合 5°C 條件，*S. capterisci*、*S. riobravis*、*H. bacteriophora* 較適合 10°C 條件(Grewal and Georgis, 2003)。

劑型之開發目的有二，一為將活的線蟲送到顧客手中，另一為延長產品貯存期。最簡單的劑型就是將線蟲浸潤在基質，期能提供空氣流通之空間，此類物質包括 polyurethane 海綿、cedar shavings、peat (泥炭)、vermiculite (蛭石) 等等。此間有 Alginate gel、Flowable gel、Attapulgitic clay chips 和 Water-dispersible granules (WDG) 的產品，其室溫下或冷藏的貯存期如表三所示。WDG 是由含有矽、黏粒、纖維素、木質素和澱粉形成之直徑 $10\sim 20$ mm 之顆粒，製作方法是將線蟲懸浮液滴在上述粉末再滾動而成，此劑型能提供數項優點，例如在室溫下可延長貯存穩定性至數個月之久、增進線蟲對極端溫度的忍受性、運送較簡單價廉、施用容易、減少容積及不會製造太多廢棄物。

顧客對蟲生線蟲的接受度係由是否容易施用、功效及價格等考量，其中功效會受到許多因素之影響，如培養基類型、共生菌狀況、氧氣之輸送、生產及貯存之溫度和污染等。這些可由致病力的生物檢測來執行，如 1:1 生物測試、 LC_{50} 、侵染率及細菌數之多寡。但也可以利用線蟲侵染性幼蟲不取食須消耗體內脂肪之特性來進行檢測線蟲之活力。

(二) 國內狀況

國內生產的研究，侯豐男教授及其研究生進行一系列的研究，線蟲物種包含 *S. feltiae*、*S. carpocapsae* 和 *S. abbasi*。呂 (1993) 以豬腦，水煮蛋蛋黃及雞肝培養蟲生線蟲，IJs 於 33 天之總產量皆為 1×10^5 IJs/g 以上。以豬肝粉為基質，加奶粉產量為 1×10^6 IJs/g 與再添加奶粉及蔗糖總產量無顯著差異。於花豆粉中加入玉米油之培養基培養蟲生線蟲，接入之 IJs 可生長至成蟲並產生子代，但未能生長至 II 時期便死亡。再添加 peptone、vitamin B、膽固醇、methionine、蔗糖及 Wesson's salt mixture 於 30 天可產生 2.3×10^4 IJs/g。各配方中以

表三 *Steinernematids* and *Heterorhabditids* 蟲生線蟲上市之製劑型態及貨架壽命

Formulation	Nematode species	Shelf life (mo)	
		Room	Refrigerated
Alginate gels ^a	<i>S. carpocapsae</i>	3.0-4.0	6.0-9.0
	<i>S. feltiae</i>	0.5-1.0	4.0-5.0
Flowable gels ^a	<i>S. carpocapsae</i>	1.0-1.5	3.0-5.0
	<i>H. bacteriophora</i>	1.5-2.0	0
	<i>S. feltiae</i>	1.0-1.5	4.0-6.0
Attapulgitic clay chips ^b	<i>S. carpocapsae</i>	1.0-1.5	3.0-4.0
Water-dispersible granules ^b	<i>S. carpocapsae</i>	4.0-5.0	9.0-12.0
	<i>S. feltiae</i>	1.5-2.0	5.0-7.0
	<i>S. riobravis</i>	2.0-3.0	4.0-5.0

^aP. S. Grewal and R. Georgis (unpublished data).

^bBedding, 1984.

再添加 vitamin B，膽固醇，methionine 及 Wesson's salt mixture 於 30 天之產量最高，為 2.0×10^5 IJs/g。對斜紋夜盜之三齡幼蟲致病力最佳 ($LC_{50}=3.78$ IJs/ml)，一齡幼蟲最差 ($LC_{50}=13.09$ IJs/ml)； LT_{50} 以第三齡幼蟲於 50 IJs/ml 濃度下需時最短 (29.9 小時)。於土壤中接入 10 IJs/larvae，可造成六齡幼蟲 90% 死亡率。接入 25、50、75、100 和 150 IJs，對蛹期之致病力為 5-10%，各濃度之死亡率無顯著差異。對小菜蛾四齡幼蟲之致病力最好 ($LC_{50}=4.07$ IJs/ml)，一齡幼蟲最差 $LC_{50}=8.96$ IJs/ml；同一濃度下， LT_{50} 隨齡期增加而縮短。對蛹之 LC_{50} 分別為 20.15 及 20.41 IJs/ml， LC_{50} 為 149.25 及 74.69 IJs/ml。

鄭 (1991) 以新鮮皮蛋蛋黃及豬肝之繁殖 *S. carpocapsae* 率較佳。其中又以皮蛋蛋黃餵飼者最佳，於 2 週後收穫之線蟲量為原先接種量之 10 倍，而狗食培養基次之，豬肝粉培養基最差。

吳 (1996) 以狗飼料 (Pedigree crunchy bites) 添加 10% 牛肉抽出物及 10% 膽固醇作為人工繁殖 *S. carpocapsae* All strain 之基質，與添加 10% 蛋白脲

及 10% 膽固醇之培養基，並無顯著差異且對甜菜夜蛾幼蟲之致病性可達 100%。

羅 (2000) 嘗試以斜紋夜蛾及甜菜夜蛾來培養 *S. abbasi*。發現以甜菜夜蛾所飼育出之線蟲對甜菜夜蛾有較高的死亡率 (95.6-100%)，而接種斜紋夜蛾時死亡率較低 (40-62.2%)；但由斜紋夜蛾所產出之線蟲對以上兩種寄主均可造成 78.9-98.9% 之死亡率。其它昆蟲如大菜螟、白粉蝶等也可用於培養 *S. abbasi* (蕭 未發表)。

羅 (2000) 以 *S. abbasi* 為材料，探討蛋白脲、酵母抽出物、沙拉油、黃豆粉、水及海綿為基質，分別添加鴨肝粉、斜紋夜蛾幼蟲粉、家蠶蛹粉、果實蠅蛹粉、雞蛋及奶粉等六種不同配方，進行培養，結果顯示，添加奶粉之處理，可得最高產量，其次為添加雞蛋，鴨肝粉最差。各處理產出之線蟲與活體培養 (in vivo) 所產之線蟲個體並無顯著差異；就致病力而言，果實蠅蛹粉處理之致病力優於活體培養所產者，其他處理組與活體培養組之致病力無顯著差異。

1. 劑型

劑型方面，高 (2004) 利用太空包固體培養方式量產 *S. abbasi* 及 *S. carpocapsae* 兩種線蟲，線蟲接種濃度並不會影響線蟲產量。各接種 34×10^3 IJs/g 於太空包中兩種線蟲平均產量 1.38×10^7 IJs/g 以上，證實的確可達到大量生產之目的。

鐘 (1990) 將 *Steinernema feltiae* 製備成膠囊 (Capsule)、膠劑 (Gel) 及膏劑 (Paste) 三種型式，施用於油菜葉片餵食小菜蛾幼蟲，三天內即見死亡，且可於解剖顯微鏡下觀察到寄主昆蟲屍體內線蟲寄生情形。其致死效果以膠囊最佳，膏劑次之，膠劑最差，但亦達 50% 以上致死率。

呂 (1993) 將線蟲配製成水懸劑、膏劑及澱粉劑，對線蟲之保護作用以膏劑最佳。夜間施膏劑於甘藍菜後 7 小時可維持 50% 以上之存活率及致病力。水懸劑最差，施用 3 小時後存活率為 25% 以下，致病力為 40% 以下。澱粉劑於施用 6 小時存活率及致病力均為 40% 以下。

2. 貯存方式及其限制

於黑色蛭石底片盒置入 10^4 IJs/ml 蟲生線蟲懸浮液，可造成甜菜夜蛾幼蟲 83.33% 死亡率；而 10^3 IJs/ml 及 10^2 IJs/ml 蟲生線蟲懸浮液，致死率分別為 61.67% 及 72.5%。此結果表示以內盛蛭石之黑色底片盒的蟲生線蟲懸浮液濃度只須 10^2 IJs/ml 以上，即可得良好的防治效果。張 (2001) 以無菌水懸浮液與海綿保存兩種方式進行 *S. abbasi* 保存條件之測試，並以大蠟蛾測試其感染能力。結果顯示 10^2 及 10^3 IJs/ml 濃度於 15 和 20°C 下保存 12 週仍不會影響其對大蠟蛾之致死率。但若懸浮液之濃度提高至 10^4 IJs/ml 時至第 8 週後，線蟲的存

活率開始下降。或濃度 10^5 IJs/ml 時，一週後，存活率就急遽下降，保存效果最差；且當懸浮保存之液面越高，則存活時間越短。

以 10^3 IJs/ml 的濃度吸附於海綿，結果以 15°C 可存放 16 週、20°C 可存放 14 週，且不影響對大蠟蛾之致死率。就濃度而言，以 10^2 - 10^5 IJs/ml 濃度於 15°C 下，保存 16 週後，並不會影響存活率及感染能力。張 (2001) 建議低濃度、短期的保存可採懸浮保存方式，若需大量保存時，宜將高濃度線蟲保存於海綿中。

吳 (1996) 分別將含有蟲生線蟲 *S. carpocapsae* 的包囊蛹冷藏 10、12、15、18 及 20 天，結果以冷藏 10 天的蛹體所釋出之侵染幼蟲，對甜菜夜蛾幼蟲之致死率最高，達 91.67%；線蟲之致死率隨隨著蛹體冷藏時間的增加而下降。

高 (2004) 指出利用太空包生產之線蟲在不同保存溼度測試中，在相對溼度 25、50、75、90、97 及 100% 下對 *S. abbasi* 及 *S. carpocapsae* 之影響效果，在 25 和 50% RH 環境下，線蟲在 24h 內即失去活力；而 75% RH 則是隨儲存時間增長而存活率漸減，且一天後則無存活率；另外 100 與 97% RH 則在一天後開始有存活率漸減之趨勢，觀察至第 32 天為止降至 20-50%。

現今國內已經有本土的線蟲 *S. abbasi* 及 *H. brevicaudis* 可供利用，且對 *S. abbasi* 有一系列的大量生產、劑型及儲存條件。但 *H. brevicaudis* 仍有待研究，期能日後提供農民應用。

AgBIO

蕭文鳳 國立嘉義大學 生物資源系 教授

參考文獻

1. 呂佳宜。1993。蟲生線蟲之人工繁殖及其對斜紋夜盜與小菜蛾之致病力。國立中興大學昆蟲研究所碩士論文。八十二學年度。54頁。
2. 吳山正。1996。人工飼料育蟲生線蟲及其共生細菌對甜菜夜蛾之致病力。國立中興大學昆蟲研究所碩士論文。八十五學年度。53頁。
3. 吳永泉。1995。蟲生線蟲感染斜紋夜蛾之研究。國立中興大學昆蟲研究所碩士論文。八十四學年度。71頁。
4. 高慧齡。2004。兩種蟲生線蟲 *Steinernema abbasi* 及 *Steinernema carpocapsae* 量產與保存之改進。國立中興大學昆蟲研究所碩士論文。九十三學年度。56頁。
5. 張紋菁。2001。本土產蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) 在實驗室內之保存。國立中興大學昆蟲研究所碩士論文。九十學年度。53頁。
6. 曾美容。1994。蟲生線蟲對甜菜夜蛾之致病力及田間持久性。國立中興大學昆蟲研究所碩士論文。八十三學年度。59頁。
7. 鄭旗志。1991。蟲生線蟲防治亞洲玉米螟之潛用性。國立中興大學昆蟲研究所碩士論文。八十學年度。83頁。
8. 羅如娟。2000。本土產蟲生線蟲 (*Steinernema abbasi*) 之人工培養。國立中興大學昆蟲研究所碩士論文。八十九學年度。59頁。
9. Bedding, R. A. 1981. Low cost in vitro mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27: 109-114.
10. Bedding, R. A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insectparasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Ann. Appl. Biol.*, 104: 117-120.
11. Dunphy, G. B. and J. M. Webster. 1989. The monoxenic culture of *Neoaplectana carpocapsae* DD136 and *Heterorhabditis heliothidis*. *Revue Nematol.* 12: 113-123.
13. Dutky, S. R., J. V. Thompson, and G. E. Cantwell. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *J. Invert. Pathol.* 6: 417-422.
14. Friedman, M. J. 1990. Commercial production and development, in *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control* (Gaugler, R. and H. K. Kaya, eds.), CRC, Boca Raton, FL, pp. 153-172.
15. Georgis, R., H. K. Kaya, and R. Gaugler. 1991. Effect of steinernematid and heterorhabditid nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on nontarget arthropods. *Environ. Entomol.* 20: 815-822.
16. Georgis, R. 1992. Present and future prospects for entomopathogenic nematode products. *Biocontrol Sci. Technol.* 2: 83-99.
17. Grewal, P. S. and R. Georgis. 2003. Entomopathogenic nematodes. 271-299. In: *Biopesticides, use and delivery*. Humana Press. 626pp.
18. Grewal, P. S., S. Selvan, and R. Gaugler. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *J. Thermal Biology* 19: 245-253.
19. Grewal, P. S., V. Converse, and R. Georgis. 1998. Influence of production and bioassay methods on infectivity of two ambush foragers. (Nematoda:Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.*, in press.
20. Glazer, I. 1992. Invasion rate as a measure of infectivity of steinernematid and heterorhabditid nematodes to insects. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 90-94.
21. Kaya, H. K., and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Ann. Review Entomol.* 38: 181-206.
22. Miller, R. W. 1989. Novel pathogenicity assessment technique for *Steinernema* and *Heterorhabditis* entomopathogenic nematodes. *J. Nematol.* 21:574(abstract).
23. Silver, S. C., D. B. Dunlop, and I. D. Grove. 1995. Granular formulation of biological entities with improved storage stability. *Int. Patent WO 95/05077*.