อนุกรมวิธานไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis*

Taxonomy of *Steinernema* and *Heterorhabditis*

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
[1/]ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการวัดขนาดสัดส่วนและถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และพิจารณารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* (CMs) และ *Heterorhabditis* (PRh) ที่แยกได้จาก จ.เชียงใหม่ และ จ. เพชรบุรี ตามลำดับ พบว่าไส้เดือนฝอย CMs มีขนาดเฉลี่ยของตัวอ่อนระยะที่ 3 ความยาวลำตัว (L) = 442.49 ไมครอน ความกว้างลำตัว (W) = 23.05 ไมครอน ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP) = 38.22 ไมครอน ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES) = 106.55ไมครอน และความยาวหาง (Tail) = 39.99 ไมครอน มีค่าสัดส่วน (ratio) a = 19.21, b = 4.15, c = 11.08, D% = 35.83 และ E% = 95.44 สำหรับไส้เดือนฝอย PRh พบว่า ตัวอ่อนระยะที่ 3 มีความยาวลำตัว = 572.00 ไมครอน ความกว้างลำตัว = 22.31 ไมครอน ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore = 82.09ไมครอน ความยาววัดจากหัวถึง esophagus = 117.50 ไมครอน และความยาวหาง = 90.82 ไมครอน มีค่าสัดส่วน a = 25.65, b = 4.87, c = 6.30, D% = 69.88 และ E% = 90.43 ตัวเต็มวัยเพศเมียมีลักษณะหางแบบ conoid มีค่า D% = 122 ตัวเต็มวัยเพศผู้มีลักษณะหางแบบ conoid ความยาวของอวัยวะสืบพันธุ์ (spicule length) = 48 ไมครอน จากการศึกษา DNA sequencing โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวเต็มวัยเพศเมีย *Steinernema* (KPs, CMs, UBs, *S. riobrave*) และ *Heterorhabditis* (PRh) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 28S rDNA ในไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลทด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 502/536 พบว่าได้ดีเอ็นเอที่สะอาดโดยทุกไอโซเลทได้ PCR product ขนาด 946 base pair (bp)

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-01-17-54

คำนำ

ไส้เดือนฝอย (Nematode) เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) มีลำตัวซีกซ้ายและซีกขวาเหมือนกัน (bilateria) เป็นพวกที่มีช่องลำตัวเทียม (pseudocoelomate) ลำตัวไม่เป็นข้อปล้อง (nonsegmented) มีผนังชั้นนอก (cuticle) เป็นรอยย่นยืดหยุ่นได้ (elastic cuticle) มีระบบต่างๆ ภายในลำตัวประกอบด้วยระบบขับถ่ายทางผิวหนัง (excretory system) ระบบประสาท (nervous system) ระบบทางเดินอาหาร (digestive system) ระบบสืบพันธุ์ (reproductive system) และระบบกล้ามเนื้อ (muscular system) ไม่พบระบบไหลเวียนโลหิต (circulatory system) และระบบหายใจ (respiratory system) ไส้เดือนฝอยมีรูปร่างลำตัวกลมยาวคล้ายเส้นด้าย (thread) หรือมีรูปร่างเป็นทรงกระบอก (cylindrical) บางชนิดหัวแหลมท้ายแหลม (filiform) ไส้เดือนฝอยมีชื่อเรียกอื่นๆ อีก เช่น หนอนตัวกลม (roundworm) พยาธิตัวกลม (eelworm) หรือพยาธิเส้นด้าย (threadworm) แบ่งแยกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ตามลักษณะของการดำรงชีวิตและการกินอาหารออกเป็น 4 กลุ่ม คือ ไส้เดือนฝอยที่พบในน้ำเค็ม (marine nematode) ไส้เดือนฝอยหากินอิสระในดินและน้ำ (free-living nematode) ไส้เดือนฝอยที่เป็นศัตรูพืช (plant parasitic nematode) และไส้เดือนฝอยที่เป็นศัตรูในคนและสัตว์ (animal parasitic nematode) ซึ่งในกลุ่มที่เป็นศัตรูคนและสัตว์นี้ แบ่งแยกย่อยเป็นไส้เดือนฝอยที่มีความสัมพันธ์กับแมลง พบมากกว่า 40 วงศ์ (family) เป็นพาราสิตภายในตัวแมลง (insect parasitic nematode) และมีไส้เดือนฝอยเพียง 2 วงศ์เท่านั้น ที่ทำให้เกิดโรคในแมลง (entomopathogenic nematode) คือ family Steinernematidae และ Heterorhabditidae (นุชนารถ, 2544)

ไส้เดือนฝอยในวงศ์ Steinernematidae เรียกชื่อสามัญ (common name) ว่า steinernematid ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1923 โดย Steiner ในประเทศเยอรมัน ได้มีการศึกษาและพัฒนาไส้เดือนฝอยชนิดนี้เป็นเวลามากกว่า 80 ปี ซึ่งพบว่าไส้เดือนฝอยมีแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacterioceae สกุล *Xenorhabdus* sp. อยู่ร่วมกันในลักษณะพึ่งพาอาศัยหรือเรียกว่า symbiosis โดยเซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่บริเวณลำไส้ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) ไส้เดือนฝอยเป็นตัวพาแบคทีเรียเข้าสู่ตัวแมลง โดยผ่านทางช่องเปิดตามธรรมชาติของแมลง ได้แก่ ทางปาก ช่องขับถ่าย และรูหายใจทางผิวหนัง (spiracle) จากนั้นเข้าสู่ช่องว่างภายในตัวแมลง (haemocoel) ซึ่งมีน้ำเลือด (haemolymph) ไส้เดือนฝอยจะปลดปล่อยแบคทีเรียสู่กระแสเลือดแมลง และร่วมกันสร้างสารพิษ (toxin) ทำให้แมลงเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 48 ชม. เซลล์ของแบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณในน้ำเลือดของแมลง และไส้เดือนฝอยจะเจริญเติบโตโดยใช้เซลล์ของแบคทีเรียในการขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบบจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เรียกการผสมพันธุ์แบบนี้ว่า amphimictic ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตอยู่ภายในแมลงที่ตายแล้วประมาณ 2-3 ชั่วอายุ (generation) ขึ้นอยู่กับขนาดของแมลง เมื่อแมลงเริ่มแห้งเป็นซาก (cadaver) ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่สาม (third-stage juvenile) จะสะสมอาหารสำรอง (food reserve) ประเภทไขมันสะสม (lipid stroage) บริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างผิวหนังกับกล้ามเนื้อช่องท้อง (hypodermal chord) และดูดกลืนเซลล์แบคทีเรียเก็บไว้ในช่อง lumen ของลำไส้ส่วนหน้า และเคลื่อนตัวออกจากซากของแมลงเพื่อรอแมลงเหยื่อตัวใหม่ต่อไป (Akhurst and Boemare, 1990)

ความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย(nematode-bacterium complex) ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ ที่จะพัฒนาศัตรูธรรมชาติของแมลงชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะใช้กำจัดแมลงระยะตัวหนอนที่เป็นศัตรูสำคัญในพืช จึงมีการศึกษาและพัฒนาไส้เดือนฝอยในกลุ่มนี้ตั้งแต่เริ่มค้นพบครั้งแรกจนถึงปัจจุบัน มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมชนิดต่างๆ (artificial media) ได้สำเร็จตั้งแต่ปี ค.ศ. 1931 โดย Glaser ซึ่งเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ axenic culture ที่ไม่มีเซลล์ของ symbiotic bacteria ร่วมด้วย ต่อมามีการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเป็นแบบ monoxenic culture ที่มี symbiotic bacteria ร่วมด้วย (Bedding, 1981) ซึ่งให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าแบบเดิม นอกจากนี้ ไส้เดือนฝอยยังได้รับการรับรองจาก EPA ถึงความปลอดภัยต่อพืช สัตว์เลือดอุ่นและมนุษย์ รวมทั้งปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม (Gaugler and Kaya, 1990) ไส้เดือนฝอยจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางทั่วโลก ที่จะพัฒนาให้นำมาใช้ประโยชน์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย Bt (*Bacillus thuringiensis*) และไวรัส NPV (nuclear polyhedrosis virus) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูสำคัญต่างๆ โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชในพื้นที่ทำการเกษตร เป็นการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี (biological control agent) เพื่อช่วยลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลง ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและสภาพแวดล้อม

นอกจากนั้น นักวิจัยยังให้ความสำคัญในการค้นหาชนิดและสายพันธุ์ใหม่ๆ ในเขตต่างๆ ทั่วโลก ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย เอเชีย และบางประเทศในแอฟริกา เพื่อได้สายพันธุ์พื้นเมืองหลากหลายชนิด และศึกษาการกระจายตัวของไส้เดือนฝอยในธรรมชาติของถิ่นที่อยู่ จากรายงานการกระจายตัวของไส้เดือนฝอย steinernematid ในภูมิภาคต่างๆ พบว่าในยุโรปตอนเหนือเท่ากับ 37-49 % และพบในทุกประเทศที่มีการสำรวจในทวีปยุโรป ได้แก่ สาธารณรัฐเชคโกสโลวาเกีย 36.8 % สวีเดน 25 % ฟินแลนด์ 5.8 % สาธารณรัฐไอร์แลนด์ 10.4 % นอร์เวย์ 18.3 % และสวิสเซอร์แลนด์ 26.5 % ในทวีปอเมริกามีการศึกษาการกระจายตัวและรายงานใน 5 ประเทศของอเมริกาเหนือ-กลางคือ แคนาดา สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก คิวบา และเปอร์โตริโก และใน 3 ประเทศของอเมริกาใต้คือ บราซิล อุรุกวัย และอาร์เจนตินา นอกจากนั้นยังมีรายงานในประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ ส่วนในทวีปเอเชียมีการสำรวจและศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย รายงานใน 9 ประเทศ คือ ญี่ปุ่น จีน อินเดีย ศรีลังกา เกาหลี โอมาน มาเลเซีย เวียดนาม และไทย ในทวีปแอฟริกาได้รายงานการสำรวจค้นพบในประเทศเคนยาในปัจจุบันไส้เดือนฝอยมีบทบาทสำคัญในการนำมาใช้กำจัดแมลงหลายชนิด โดยเฉพาะแมลงศัตรูสำคัญในพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ กลุ่มหนอนผีเสื้อในอันดับ (order) Lepidoptera เช่น หนอนกระทู้ผัก (common leafworm, *Spodoptera litura*) หนอนกระทู้หอม (beet armyworm, *S. exigua*) และหนอน เจาะสมอฝ้าย (American bollworm, *Heliothis armigera*) กลุ่มหนอนด้วงในอันดับ Coleptera เช่น ด้วงหมัดกระโดด (flea betle, *Phyllotreta sinuata*) หนอนด้วง Japanese beetle และด้วงงวงองุ่น (vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*) เป็นต้น ได้มีการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย steinernematid นำมาผลิตเป็นการค้า 6 ชนิด คือ *S. carpocapsae, S. glaseri, S. feltiae, S. riobrave, S. scapterisci* และ *S. kushidai* ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายทั่วโลกมากกว่า 40 บริษัท ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย ได้แก่ บริษัท MicroBio ผลิตไส้เดือนฝอย *S. feltiae* ควบคุมหนอนแมลงวันทำลายเห็ด (mushroom sciarids) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys และไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมด้วงงวงองุ่น (vine weevil) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys บริษัท Biosys ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมหนอนด้วง Japanese beetle และบริษัท Ciba-Geigy

ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (S25) และ *S. feltiae* (S27) ควบคุมด้วงงวงอุ่นสีดำ (black vine weevil)

ปัจจุบันไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* spp.จำแนกได้ 26 ชนิดคือ *S. kraussei* Steiner, 1923 syn. *Aplectana kraussei* Steiner, 1923; *S. glaseri* Steiner, 1929; *S. feltiae* Filipjev, 1934; *S. affinie* Bovien, 1937; *S. carpocapsae* Weiser, 1955; *S. arenarium* (anomalae) Kozodoi, 1984; *S. intermedium* Poinar, 1985; *S. rarum* De Doucet, 1986; *S. kushidai* Mamiya, 1988; *S. ritteri* Doucet & Doucet, 1990; *S. scapterisci* Nguyen & Smart, 1990; *S. caudatum* Xu *et al.,* 1991; *S. neocurtillae* Nguyen & Smart, 1992 b; *S. longicaudum* Shen, 1992; *S. cubanum* Mracek *et al.,* 1994; *S. puertoricense* Roman & Figueroa, 1994; *S. riobrave* Cabanillas *et al.,* 1994; *S. bicornutum* Tallosi *et al.,* 1995; *S. oregonense* Liu & Berry, 1996; *S. monticolum* Stock *et al.,* 1997; *S. karii* Waturu *et al.,* 1997; *S. abbasi* Elawad *et al.,* 1997; *S. ceratophorum* Jian *et al.,* 1997; *S. siamkayai* Stock *et al.,* 1998 และ *S. tami* Luc *et al.,* 2000 (นุชนารถ, 2544)

ในสกุล Heterorhabditis spp. จำแนกได้ 8 ชนิด คือ *H. bacteriophora* Poinar, 1976, *H. zealandica* Wouts, 1979; *H. megidis* Poinar *et al.,* 1987; *H. indica* Poinar *et al.,* 1992; *H. argentinensis* Stock, 1993; *H. hawaiiensis* Gardner *et al.,* 1994; *H. brevicaudis* Liu, 1994; และ *H. marelata* Liu and Berry, 1996 (นุชนารถ, 2544)

ไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* จึงเป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงที่สามารถพัฒนานำไปใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด เช่น หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนใยผัก หนอนด้วงหมัดผัก และปลวก เป็นต้น ในปัจจุบันเกษตรกรให้ความสนใจการนำไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ไปใช้ควบคุมแมลง โดยเฉพาะแมลงดื้อสารเคมี และไส้เดือนฝอยดังกล่าวยังเป็นชีวภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งที่ประสบผลสำเร็จในการผลิตขยายทั้งในระดับเกษตรกรผลิตใช้เองและการผลิตจำหน่ายเป็นการค้า

การค้นหาไส้เดือนฝอยที่มีประโยชน์จากธรรมชาติ เพื่อนำขึ้นมาพัฒนาและนำกลับไปใช้ควบคุมศัตรูพืช ได้เพิ่มความสำคัญและมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะงานวิจัยขั้นพื้นฐาน ซึ่งดำเนินงานโดยนักวิจัยในแต่ละสาขาเพื่อค้นหาจุดสำคัญของการนำมาใช้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อนำสายพันธุ์พื้นเมืองมาใช้ควบคุมศัตรูพืชในท้องถิ่นที่มีสภาพแวดล้อมเดิม จึงเป็นงานวิจัยที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยได้เริ่มมีการสำรวจเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 สามารถแยกได้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 10 ไอโซเลท จัดอยู่ใน family Steinernematidae จำนวน 10 ไอโซเลท โดยกำหนดรหัสตามจังหวัดที่พบคือ จังหวัดกาญจนบุรี (KBs) พิจิตร (PCs) อยุธยา (AYs) กาฬสินธุ์ (KSs) มหาสารคาม (MKs) ขอนแก่น (KKs) หนองคาย (NKs) สระแก้ว (SKs) อุบลราชธานี (UBs) และกำแพงเพชร (KPs) และ family Heterorhabditidae จำนวน 2 ไอโซเลท คือ ร้อยเอ็ด (REh) และเพชรบุรี (PRh) นำมาเก็บรวบรวมเป็น culture collection ณ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กรมวิชาการเกษตร (นุชนารถ และคณะ, 2543) ไส้เดือนฝอยที่แยกได้เหล่านี้ จึงควรมีการจัดจำแนกชนิด (species) อย่างถูกต้องต่อไป

วัตถุประสงค์ของการทดลอง เพื่อจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ไอโซเลทที่แยกได้ในประเทศไทย โดยใช้รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางชีวโมเลกุลในการแบ่งแยกในระดับ species

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. หนอนกินไขผึ้งเพาะเลี้ยงจากอาหารเทียม
2. ไส้เดือนฝอย *Steinernema* CMs isolate และ *Heterorhabditis* PRh isolate
3. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (Stereo microscope) และกำลังขยายสูง (Compound microscope) พร้อมกล้องถ่ายภาพดิจิตอล
4. สารเคมีสำหรับฆ่าและดองไส้เดือนฝอย ได้แก่ glycerine, TAF, 40% formaldehyde, tri-ethanolamine และ 95% ethanol
5. วัสดุ-อุปกรณ์ และเครื่องแก้วสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย

วิธีการ

การเตรียมไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* ไอโซเลท CMs และ *Heterorhabditis* ไอโซเลท PRh เพื่อการวัดขนาดสัดส่วน ได้จากหนอนกินรังผึ้งที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (IJ) โดยตัวเต็มวัยเพศผู้ เพศเมียของไส้เดือนฝอยใน 1st และ 2nd generation ได้จากการผ่าหนอนกินรังผึ้งหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 วัน และ 6 วัน ตามลำดับ และไส้เดือนฝอยระยะ IJ ได้จากการเคลื่อนที่ออกมาจากซากของหนอนเป็นเวลาประมาณ 10 วันหลังปลูกเชื้อ

1. การจำแนกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ไส้เดือนฝอยทุกระยะการเจริญเติบโตนำมาฆ่าด้วยน้ำอุ่น (50 °ซ) เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำยา fixative (TAF, 7 ml of 40 % formaldehyde, 2 ml tri-ethanolamine, 91 ml distilled water) นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเขี่ยไส้เดือนฝอยลงใน solution I (20 parts 95 % ethanol, 1 part glycerine, 79 parts distilled water) นำไปวางใน desiccator ที่มี 95 % ethanol บรรจุอยู่ วางไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 12 ชม. เพื่อดึงน้ำออกจากตัวไส้เดือนฝอยช้าๆ และมีการแทนที่ด้วยกลีเซอรีน จากนั้นเติม solution II (5 parts of glycerine, 95 parts of 95 % ethanol) ลงไป นำไปไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 3 ชม. กลีเซอรีนจะเข้าแทนที่น้ำในตัวไส้เดือนฝอย สามารถเห็นอวัยวะสำคัญภายในตัวไส้เดือนฝอยได้ชัดเจน เขี่ยไส้เดือนฝอยจำนวน 10 ตัว ลงในหยดกลีเซอรีนบนสไลด์แก้ว หนุนด้วยใยแก้วก่อนปิดทับด้วย cover slip และซิล ด้วยน้ำยาซิลสไลด์ ถ่ายภาพรูปร่างลักษณะและวัดขนาดสัดส่วนภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยวัดส่วนต่างๆ ดังนี้

ตัวเต็มวัยเพศผู้ : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว (W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES); ความยาวหาง (Tail); ความกว้างบริเวณ anus; ความยาว spicule และความยาว gubernaculum

ตัวเต็มวัยเพศเมีย : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว (W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES); ความยาวหาง (Tail); ความกว้างบริเวณ anus และ % vulva

ตัวอ่อนระยะ Infective juvenile : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว(W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES) และความยาวหาง (Tail)

นำมาคำนวณค่าสัดส่วน (ratio) โดยใช้ De Man's formula (Poinar, 1986) ดังนี้

Ratio : a = L/W; b = L/ES; c = L/Tail; d = EP/ES; e = EP/Tail

และคำนวณค่าพารามิเตอร์ตามวิธีการของ Nguyen (1993) ดังนี้ D% = EP/ES x 100; E% = EP/Tail x 100

การบันทึกข้อมูล ถ่ายภาพรูปร่างลักษณะที่สำคัญของไส้เดือนฝอยระยะ Infective juvenile ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่างๆ ค่าการวัดขนาดสัดส่วนและรูปร่างลักษณะสำคัญของไส้เดือนฝอย นำไปเปรียบเทียบ กับ key to species of the genus *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Nguyen and Smart, 1996)

2. การจำแนกโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ทำการสกัดดีเอ็นเอไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. CMs isolate และ *Heterorhabditis* sp. PRh isolate ตามวิธีการของ Hominick *et al.* (1997) โดยนำไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียของแต่ละไอโซเลท จำนวน 10 ตัว ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมด้วย homogenizing buffer (100mM NaCl, 200mM sucrose, 10mM EDTA, 30mM Tris HCl, 1% β- merc pto- ethanol) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บดด้วย mini blue pestle ให้ละเอียด เติมด้วย lysis buffer (500 mM Tris- HCl, 50mM EDTA, 2.5% SDS, pH 8.0) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 65 °ซ นาน 10 นาที เติมด้วย precipitation solution (3M potassium acetate, pH 8.0) 192 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย chloroform / iso-amyl-alcohol (24/1) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบนใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เย็นในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 °ซ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอนเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอ เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 28 S rDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลทด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 502 (5'-CCTTAGTAACGGCGAGTGAAA -3')/536 (5'-CAGCTATCCTGAGGA AAC-3') ตามรายงานของ Stock *et al.* (2001) สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ส่วน D2/D3 regions ของยีน 28S rDNA ซึ่งออกแบบมาจากยีน 28S rDNA ของไส้เดือนฝอย *Caenorhabditis elegans* จาก Genbank accession number X03680 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ที่ใช้ในการออกแบบ primers ใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลท ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม ที่เตรียมไว้ข้างต้นผสมกับ 10X PCR buffer [67 mM Tris-HCl, pH8.8, 83 mM (NH4)2SO4, 2.0 mM MgCl2, 30 mM β -mercaptoethanol, 10% dimethylsulfoxide และ bovine

serum albumin] dNTPs ชนิดละ 125 μM เอนไซม์ Taq DNA polymerase 1.0 ยูนิต (Invitrogen Corporation Grand Island, NY, USA) และไพรเมอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ไว้แล้วข้างต้นชนิดละ 20 μM แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ได้ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามวิธีการของ Nguyen *et al*. (2001) ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°ซ)	เวลา (นาที)
1. แยกสายดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้น (initial denaturing)	94	5
2. แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing)	94	1
3. ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (primer annealing)	50	1
4. สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension)	72	1
5. สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	5

ทำปฏิกิริยาขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ทั้งหมด 35 รอบ หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาผสมกับ loading dye (0.025% bromophenol blue, 40% Ficoll 400, 0.5% SDS) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 1% อะกาโรสใน 0.5 xTAE (40mM Tris, 4mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH 7.9) ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 135 โวลต์ นาน 25 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา 3 ปี เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2556

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การจำแนกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากผลการศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. และ *Heterorhabditis* sp. ไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดเพชรบุรี กำหนดรหัสเป็น CMs และ PRh ตามลำดับ โดย CMs isolate อยู่ใน Family Steinernematidae และ PRh isolate อยู่ใน Family Heterorhabditidae ทำการวัดขนาดสัดส่วนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope เพื่อการจัดจำแนกในระดับชนิด (species)

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. CMs isolate

Steinernematidae Chitwood and Chitwood 1937, 1950; Rhabditoidea (Oerley), Rhabditida (Oerley) (syn. Neoaplectanidae Sobolev), type genus : *Steinernema* Travassos, 1927; synonym : *Neoaplectana* Steiner, 1929

รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญของตัวเต็มวัยเพศเมีย (female) เพศผู้ (male) และตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) ใช้ในการแบ่งแยกดังรายละเอียดต่อไปนี้

ตัวเต็มวัยเพศเมีย (female) : มีขนาดใหญ่ ส่วนของผนังชั้นนอกลำตัวเรียบ (smooth) หรือมีรอยย่น (annulated) ไม่พบเส้นข้างลำตัว (lateral field) ส่วนของรูขับถ่าย (excretory pore) ชัดเจน ส่วนหัวมีลักษณะกลมมน (rounded) หรือตัด (truncate) ประกอบด้วย 6 ริมฝีปาก (lip) แต่ละริมฝีปาก มีตุ่มเล็กๆ ที่เรียกว่า labial papillae จำนวน 1ตุ่ม บางครั้งพบโครงสร้างคล้ายตุ่มอยู่ใกล้ labial papillae นอกจากนั้น บริเวณริมฝีปากยังพบตุ่มที่เรียกว่า cephalic papillae จำนวน 4 ตุ่ม และพบอวัยวะที่เรียกว่า amphid มีขนาดเล็ก ซึ่งเป็นช่องรับความรู้สึกเกี่ยวกับสารเคมี (chemoreceptor organ) จำนวน 2 ช่อง ช่องปาก (stoma) ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ยุบลงเป็นช่อง สังเกตเห็นผนังของ cheilostom บริเวณริมฝีปากชัดเจน หลอดอาหาร (esophagus) เป็นแบบ rhabditoid ส่วนของ metacorpus โป่งพอง และแคบลง (isthmus) มีเส้นประสาท (nerve ring) ล้อมรอบรองรับด้วยฐานใหญ่เป็นกระเปราะ (basal bulb) หลอดอาหารต่อเชื่อมกับลำไส้มีลิ้นปิด-เปิด (cardic) ระบบสืบพันธุ์เป็นแบบท่อรังไข่ 2 ข้าง (didelphic) และโค้งงอที่ปลายรังไข่ทั้งสองข้าง อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียอยู่บริเวณกลางลำตัวสังเกตเห็นชัดเจน พบโครงสร้างที่เรียกว่า epiptygma ตัวเมียที่ได้รับการผสมจากตัวผู้ วางไข่และฟักเป็นตัวอ่อนภายในมดลูกของตัวแม่เรียกว่า ovoviviparous ตัวอ่อนสามารถเจริญ เติบโตภายในตัวแม่ได้หรือไข่ถูกขับออกมาฟักภายนอกตัวแม่ (oviparous) ความยาวหางของตัวเมียสั้นกว่าความกว้างของลำตัว

ตัวเต็มวัยเพศผู้ (male) : มีขนาดเล็กกว่าตัวเมีย 2 ถึง 3 เท่า ส่วนหัวประกอบด้วย 6 labial papillae และ 4 cephalic papillae มีช่องทางเดินอาหารคล้ายกับตัวเต็มวัยเพศเมีย ท่อสร้างและเก็บน้ำเชื้อ (testis) เป็นแบบข้างเดียวและโค้งงอที่ปลาย อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (spicule) มีลักษณะเป็นคู่ มีอวัยวะบังคับ spicule ที่เรียกว่า gubernaculum ไม่ปรากฏแพนหาง (bursa) ปลายหางกลมปลายแหลม อาจมีติ่ง (mucronate) ที่ปลายหาง ปลายหางมีอวัยวะรับความรู้สึกเรียกว่า genital papillae 1ตุ่มเดี่ยว และ 10-14 ตุ่มคู่

ตัวอ่อนระยะทำลาย (infective juvenile = third-stage infective juvenile) : ช่องปากยุบลงเป็นช่อง รูปร่างเรียวขนาดเล็ก ส่วนของผนังชั้นนอก (cuticle) มีลักษณะเป็นรอยย่น (annulated) มีเส้นข้างลำตัว (lateral line) 6 เส้น ช่องทางเดินอาหารติดต่อกับลำไส้ สังเกตเห็นช่องขับถ่ายทางผิวหนัง (excretory pore) ชัดเจน อยู่ในตำแหน่งเหนือ nerve ring ลักษณะปลายหางแหลม พบ phasmid ที่ตำแหน่งกลางหางระหว่างช่องขับถ่าย (anus) และปลายหาง มีค่าการวัดขนาดสัดส่วนตามตารางที่ 1

จากรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดสัดส่วน เปรียบเทียบกับ key มาตรฐาน มีความใกล้เคียงกับ *S. siamkayai* แยกได้จาก จ.เพชรบูรณ์ และ *S. tami* แยกได้จากประเทศเวียตนาม ซึ่งจะได้นำไปจำแนกดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลต่อไป

ตารางที่ 1 ค่าการวัดขนาดสัดส่วนของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. CMs isolate ตัวอ่อนระยะที่ 3

ตัวอ่อนที่	ไมครอน					ค่าสัดส่วน (Ratio)				
	L	width	EP	ES	T	a	b	c	D %	E %
1	444.08	23.64	35.46	102.42	37.43	18.79	4.34	11.86	34.62	94.74
2	436.15	23.64	33.49	102.42	37.43	18.45	4.26	11.65	32.70	89.47
3	412.36	21.67	33.49	102.42	37.43	19.03	4.03	11.02	32.70	89.47
4	428.22	21.67	37.43	106.34	39.40	19.76	4.03	10.87	35.20	95.00
5	436.15	21.67	37.43	106.34	39.40	20.13	4.10	11.07	35.20	95.00
6	459.94	23.64	43.34	110.32	41.37	19.46	4.17	11.12	39.29	104.76
7	444.08	23.64	41.37	108.35	41.37	18.79	4.10	10.73	38.18	100.00
8	444.08	23.64	39.40	102.44	41.37	18.79	4.34	10.73	38.46	95.24
9	452.01	23.64	39.40	110.26	41.37	19.12	4.10	10.93	35.73	95.24
10	467.87	23.64	41.37	114.18	43.34	19.79	4.10	10.80	36.23	95.45
ผลรวม	4424.94	230.49	382.18	1065.49	399.91	192.09	41.55	110.78	358.31	954.38
ค่าเฉลี่ย	442.49	23.05	38.22	106.55	39.99	19.21	4.15	11.08	35.83	95.44
ค่าสูงสุด	467.87	23.64	43.34	114.18	43.34	20.13	4.34	11.86	39.29	104.76
ค่าต่ำสุด	412.36	21.67	33.49	102.42	37.43	18.45	4.03	10.73	32.70	89.47

หมายเหตุ : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว(W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES) และความยาวหาง (Tail); ค่าสัดส่วน a = L/W; b = L/ES; c = L/T; D% = EP/ES x 100; E% = EP/T x 100

2. ไส้เดือนฝอย *Heterorhabtidis* sp. PRh isolate

พบว่าตัวอ่อนระยะที่ 3 มีค่าความยาวลำตัว (L) = 572.00 ไมครอน ความกว้างลำตัว (W) = 22.31 ไมครอน ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP) = 82.09ไมครอน ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES) = 117.50 ไมครอน และความยาวหาง (Tail) = 90.82 ไมครอน มีค่าสัดส่วน (ratio) a = 25.65, b = 4.87, c = 6.30, D% = 69.88 และ E% = 90.43 (ตารางที่ 2)

ตัวเต็มวัยเพศเมียมีลักษณะหางแบบ conoid มีค่า D% = 122 ตัวเต็มวัยเพศผู้ มีลักษณะหางแบบ conoid ความยาวของอวัยวะสืบพันธุ์ (spicule length) = 48 ไมครอน สามารถจำแนกโดยเปรียบเทียบกับ Key มาตรฐาน พบว่ารูปร่างลักษณะและสัดส่วนต่างๆ มีความใกล้เคียงกับ *H. bacteriophora*

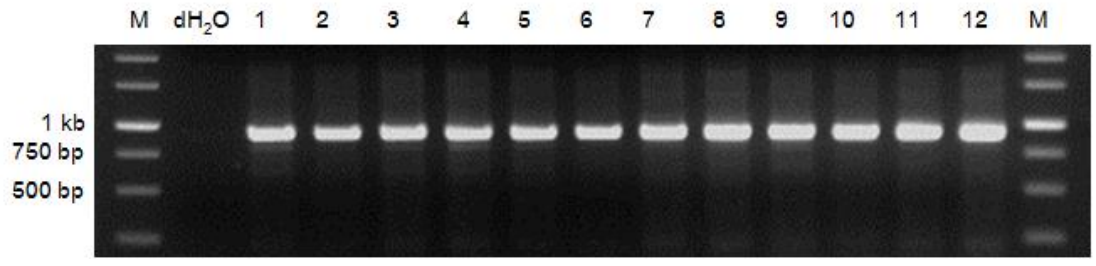
ตารางที่ 2 ค่าการวัดขนาดสัดส่วนของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. PRh isolate ตัวอ่อนระยะที่ 3

ตัวอ่อนที่	ไมครอน					ค่าสัดส่วน (Ratio)				
	L	width	EP	ES	T	a	b	c	D %	E %
1	555.8	23.5	85.61	119.32	92.63	23.65	4.66	6.00	71.75	92.42
2	578.9	22.3	84.56	118.98	90.21	25.96	4.87	6.42	71.07	93.74
3	564.23	21.56	79.8	120.2	93.65	26.17	4.69	6.02	66.39	85.21
4	559.47	22.36	82.31	116.65	94.78	25.02	4.80	5.90	70.56	86.84
5	601.23	22.55	78.54	116.58	89.66	26.66	5.16	6.71	67.37	87.60
6	579.3	23.01	80.82	114.56	87.52	25.18	5.06	6.62	70.55	92.34
7	594.12	22.54	81.23	115.23	88.97	26.36	5.16	6.68	70.49	91.30
8	538.65	21.34	84.84	115.78	90.21	25.24	4.65	5.97	73.28	94.05
9	578.45	22.13	83.19	118.2	91.89	26.14	4.89	6.30	70.38	90.53
10	569.89	21.78	79.96	119.45	88.63	26.17	4.77	6.43	66.94	90.22
ผลรวม	5720.04	223.07	820.86	1174.95	908.15	256.54	48.70	63.04	698.78	904.25
ค่าเฉลี่ย	572.00	22.31	82.09	117.50	90.82	25.65	4.87	6.30	69.88	90.43
ค่าสูงสุด	601.23	23.50	85.61	120.20	94.78	26.66	5.16	6.71	73.28	94.05
ค่าต่ำสุด	538.65	21.34	78.54	114.56	87.52	23.65	4.65	5.90	66.39	85.21

หมายเหตุ : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว(W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES) และความยาวหาง (Tail); ค่าสัดส่วน a = L/W; b = L/ES; c = L/T; D% = EP/ES x 100; E% = EP/T x 100

2. การจำแนกโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 28S rDNA ในไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลทด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 502/536 ผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในแต่ละไอโซเลท โดยทุกไอโซเลทได้ PCR product ขนาด 946 base pair (bp) (ภาพที่ 1)



(M: 1 kb Marker; lane 1-2: KP isolate; lane 3-4: RE isolate; lane 5-6: UB isolate; lane 7-9: SR isolate และ lane 10-12: HB isolate

ภาพที่ 1 PCR product ขนาด 946 base pair (bp) ของไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในแต่ละไอโซเลท

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* sp. CMs isolate ที่แยกได้จากดินใน จ. เชียงใหม่ และ *Heterorhabditis* sp. PRh isolate แยกได้จาก จ.เพชรบุรี จำแนกโดยพิจารณาจากรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวัดขนาดสัดส่วนเปรียบเทียบกับ key มาตรฐาน พบว่า CMs มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับ *S. siamkayai* แยกได้จาก จ.เพชรบูรณ์ สำหรับไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* มีความใกล้เคียงกับ *H. bacteriophora* จากการศึกษา DNA sequencing โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวเต็มวัยเพศเมีย *Steinernema* (KPs, CMs, UBs, *S. riobrave*) และ *Heterorhabditis* (PRh) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 28S rDNA ในไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลทด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 502/536 พบว่าได้ดีเอ็นเอที่สะอาด โดยทุกไอโซเลทได้ PCR product ขนาด 946 base pair (bp)

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2544. อนุกรมวิธานไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง STEINERNEMATID. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 63 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด พรพิมล อธิปัญญาคม และ สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช. 2543. งานวิจัยและพัฒนาไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. Thai isolate เพื่อควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี. หน้า 31-32. ใน : รายงานประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา 8-10 มีนาคม 2543 ณ โรงแรมลองบีช เพชรบุรี.

Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. Pages 75-90. In : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

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.

Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 365 pp.

Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. Science 614.

Hominick, W. M., B. R. Briscoe, F. G. del Pino, Jian Heng, D. J. Hunt, E. Kozodoy, Z. Mracek, K. B. Nguyen, A. P. Reid, S. Spiridonov, D. Sturhan, C. Waturu, and M. Yoshida. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: Current status, protocols, and definitions. J. Helminthology 71:271–298.

Nguyen, K.B. and G.C. Smart. 1996. Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata : Rhabditida). J. Nematol. 28 : 286-300.

Nguyen, K.B., J. Maruniak, and B. J. Adams. 2001. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. J. Nematology 33(2–3):73–82.

Stock, S.P., J.F. Campbell and S.A. Nadler. 2001. Phylogeny of Steinernema Travassos, 1972 (Cephalobina : Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. J. Parasitology 87 : 877-889.