รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย :** อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน
2. **โครงการวิจัย** : การอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรเพื่อใช้ประโยชน์
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) :** การประเมินศักยภาพของไส้เดือนฝอยในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Potential of Entomopathogenic Nematodes for Controlling Insect Pest

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด
สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ
สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ**

การประเมินศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. จำนวน 18 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินในพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ CM, PL, KP, PB, NP, CN, KB, UT, AT, RB, KK, UB, SK, RE, BR, PR, PJ และ CB โดยวิธี Quadrant plate bio-assay พบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. รหัส KP isolate เคลื่อนที่ในทิศทางเข้าหาหนอนเหยื่อล่อกับทิศทางตรงข้าม ที่เวลา 30 นาที มีค่าระยะทางเฉลี่ย (χ) สูงที่สุดเท่ากับ 51.93 รองลงมาคือ KB และ RE isolate เท่ากับ 48.88 และ 48.87 ในขณะที่ *S. siamkayai* KP strain สายพันธุ์เปรียบเทียบ เท่ากับ 55.82 และไส้เดือนฝอยรหัสที่มีค่าเฉลี่ยระยะทางน้อยที่สุด 3 ลำดับคือ ไส้เดือนฝอยรหัส PJ, CN และ NP isolate เท่ากับ 9.68 10.59 และ 12.68 ตามลำดับ ในขณะที่ผลการทดสอบ Migration in sand column bioassay พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 18 ไอโซเลท เคลื่อนที่ในแนวดิ่งเข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อในดินลึก 5 นิ้ว และหนอนเหยื่อล่อตาย 100% ที่เวลา 24 ชม. เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* KP strain โดยไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KP, KB, RE และ UB isolate นำมาทดสอบการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ และกลุ่มหนอนด้วง พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 4 ไอโซเลท มีศักยภาพในการฆ่าแมลงทั้ง 2 กลุ่ม ตาย 38-100 % ในเวลา 48 ชม.

6. คำนำ :

ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง (Entomopathogenic nematode) ได้มีการศึกษาและพัฒนาไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้เป็นเวลามากกว่า 90 ปี ซึ่งพบว่าไส้เดือนฝอยมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacterioceae สกุล *Xenorhabdus* sp. อยู่ร่วมกันในลักษณะพึ่งพาอาศัยหรือเรียกว่า symbiosis โดยเซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่บริเวณลำไส้ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) โดยไส้เดือนฝอยเป็นตัวพาแบคทีเรียเข้าสู่ตัวแมลงโดยผ่านทางช่องเปิดตามธรรมชาติของแมลง ได้แก่ ทางปาก ช่องขับถ่าย และรูหายใจทางผิวหนัง (spiracle) จากนั้นเข้าสู่ช่องว่างภายในตัวแมลง (haemocoel) ซึ่งมีน้ำเลือด (haemolymph) ไส้เดือนฝอยจะปลดปล่อยแบคทีเรียสู่กระแสเลือดแมลง และร่วมกันสร้างสารพิษ ทำให้แมลงเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 48 ชม. เซลล์ของแบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณในน้ำเลือดของแมลง และไส้เดือนฝอยจะเจริญเติบโตโดยใช้เซลล์ของแบคทีเรียในการขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบบจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เรียกการผสมพันธุ์แบบนี้ว่า amphimictic ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตอยู่ภายในแมลงที่ตายแล้วประมาณ 2-3 ชั่วอายุ ขึ้นอยู่กับขนาดของแมลง เมื่อแมลงเริ่มแห้งเป็นซาก ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่สาม (third-stage juvenile) จะสะสมอาหารสำรองประเภทไขมันสะสมบริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างผิวหนังกับกล้ามเนื้อช่องท้อง (hypodermal chord) และดูดกลืนเซลล์แบคทีเรียเก็บไว้ในช่องว่าง (lumen) ของลำไส้ส่วนหน้าและเคลื่อนตัวออกจากซากของแมลง เพื่อรอแมลงเหยื่อตัวใหม่ต่อไป (Akhurst and Boemare, 1990)

ความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ที่จะพัฒนาศัตรูธรรมชาติของแมลงชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะใช้กำจัดแมลงระยะตัวหนอนที่เป็นศัตรูสำคัญในพืช จึงมีการศึกษาและพัฒนาไส้เดือนฝอยในกลุ่มนี้ตั้งแต่เริ่มค้นพบครั้งแรก จนถึงปัจจุบันมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมได้สำเร็จตั้งแต่ ค.ศ. 1931 โดย Glaser ซึ่งเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ axenic culture ที่ไม่มีเซลล์ของ symbiotic bacteria ร่วมด้วย ต่อมามีการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเป็นแบบ monoxenic culture ที่มี symbiotic bacteria ร่วมด้วย (Bedding, 1981) ซึ่งให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าแบบเดิม นอกจากนี้ ไส้เดือนฝอยยังได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ถึงความปลอดภัยต่อพืช สัตว์เลือดอุ่นและมนุษย์ รวมทั้งปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม (Gaugler and Kaya, 1990) ไส้เดือนฝอยจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางทั่วโลก ที่จะพัฒนาให้นำมาใช้ประโยชน์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) และไวรัส NPV (nuclear polyhedrosis virus) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูสำคัญต่างๆ โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชในพื้นที่

ทำการเกษตร เป็นการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี (biological control agent) เพื่อช่วยลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลง ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและสภาพแวดล้อม

นอกจากนั้น นักวิจัยยังให้ความสำคัญในการค้นหาชนิดและสายพันธุ์ใหม่ๆ ในเขตต่างๆ ทั่วโลก ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย เอเชีย และบางประเทศในแอฟริกา เพื่อได้สายพันธุ์พื้นเมืองหลากหลายชนิด และศึกษาการกระจายตัวของไส้เดือนฝอยในธรรมชาติของถิ่นที่อยู่ จากรายงานการกระจายตัวของไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในภูมิภาคต่างๆ 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 เวียตนาม และไทย ในทวีปแอฟริกาได้รายงานการสำรวจค้นพบในประเทศเคนยา (นุชนารถ และคณะ, 2544)

ในปัจจุบันไส้เดือนฝอยมีบทบาทสำคัญในการนำมาใช้กำจัดแมลงหลายชนิด โดยเฉพาะแมลงศัตรูสำคัญในพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ กลุ่มหนอนผีเสื้อในอันดับ (order) Lepidoptera เช่น หนอนกระทู้ผัก (common leafworm, *Spodoptera litura*) หนอนกระทู้หอม (beet armyworm, *S. exigua*) และหนอนเจาะสมอฝ้าย (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) ควบคุมด้วงงวงองุ่นสีดำ (black vine weevil) (นุชนารถ และคณะ, 2544)

การค้นหาไส้เดือนฝอยที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เพื่อนำขึ้นมาพัฒนาและนำกลับไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้เพิ่มความสำคัญและมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะงานวิจัยขั้นพื้นฐาน ซึ่งดำเนินงานโดยนักวิจัยในแต่ละสาขาเพื่อค้นหาจุดสำคัญของการนำมาใช้ให้มี

ประสิทธิภาพสูงสุด ไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดมีข้อจำกัดในการนำไปใช้แตกต่างกันไป เช่น ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในดินร่วนปนทราย ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส (Kaya, 1977) เป็นต้น ข้อจำกัดดังกล่าวจึงต้องมีการค้นคว้าวิจัยข้อมูลพื้นฐานทั้งด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และพฤติกรรมการดำรงชีวิต ซึ่งข้อมูลทางวิชาการเหล่านี้มีความสำคัญยิ่งต่อการพัฒนาไส้เดือนฝอยที่พบตามธรรมชาติให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ การพยายามค้นหาไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ใหม่ในเขตต่างๆ ซึ่งมีความแตกต่างของสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้น ความเข้มของแสงอัลทราไวโอเลต แมลงอาศัย ชนิดและคุณสมบัติของดิน เพื่อนำสายพันธุ์พื้นเมืองมาใช้ควบคุมศัตรูพืชในท้องถิ่นที่มีสภาพแวดล้อมเดิม จึงเป็นงานวิจัยที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* spp. จำแนกได้ 61 ชนิด และสกุล *Heterorhabditis* spp. จำแนกได้ 16 ชนิด (http://nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/steinsp1.htm) รวมทั้งประเทศไทยได้เริ่มมีการสำรวจเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงในปี 2539 สามารถแยกได้จำนวน 9 ไอโซเลท จัดอยู่ใน family Steinernematidae 8 ไอโซเลท โดยกำหนดรหัสตามจังหวัดที่พบคือ จังหวัดกาญจนบุรี (KBs) พิจิตร (PCs) อยุธยา (AYs) กาฬสินธุ์ (KSs) มหาสารคาม (MKs) ขอนแก่น (KKs) หนองคาย (NKs) และสระแก้ว (SKs) และ family Heterorhabditidae 1 ไอโซเลท คือ ร้อยเอ็ด (REh) (นุชนารถ และคณะ, 2544) ทั้ง 9 ไอโซเลท ได้นำมาศึกษาศักยภาพในการเป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมแมลง ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรี มีศักยภาพในกำจัดแมลงได้หลายชนิดและเพาะเลี้ยงได้ง่ายในอาหารเทียมราคาถูก สามารถนำไปพัฒนาและขยายผลสู่เกษตรกรได้ตั้งแต่ปี 2546-2549 (นุชนารถ, 2546: 2547) และในปี 2550 สายพันธุ์ KBs มีศักยภาพในการกำจัดแมลงลดลง และการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมให้ผลผลิตต่ำลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นในปี 2549-2553 จึงได้ทำการสำรวจรวบรวมและศึกษาไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งสามารถแยกได้สกุล *Steinernema* sp. ในพื้นที่จังหวัดกำแพงเพชร (KPs) ร้อยเอ็ด (REs) อุบลราชธานี (UBs) เพชรบูรณ์ (PBs) และสกุล *Heterorhabditis* sp. ในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี (PRh) เมื่อทำการเปรียบเทียบศักยภาพของไส้เดือนฝอยในการฆ่าแมลงพบว่า KPs มีศักยภาพในการกำจัดแมลงได้หลายชนิด REs กำจัดลูกน้ำยุงลาย และ PRh กำจัดเห็บวัว อีพีเอ็น KPs และ REs สามารถผลิตขยายและเพิ่มปริมาณได้ง่ายในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวสูตรไข่ไก่ผสมน้ำมันหมูและน้ำที่อัตราส่วน 5:2:3 สภาพการเลี้ยงแบบ axenic culture (นุชนารถ และ ณัฏฐิมา, 2552) จึงมีการใช้สายพันธุ์ KPs ทดแทน KBs ตั้งแต่ปี 2550 จนถึงปัจจุบัน รวม 7 ปี สายพันธุ์ KPs ยังคงศักยภาพในการกำจัดแมลงและยังให้ผลผลิตในอาหารเทียมคงที่และสม่ำเสมอ (นุชนารถ, 2552; นุชนารถ และคณะ, 2552; นุชนารถ, 2553) สำหรับไอโซเลทอื่นๆ นั้น เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมราคาถูกสูตรเดียวกัน สภาพการเลี้ยงแบบ axenic culture ยังให้ผลผลิตต่ำ ทำให้มีต้นทุนการผลิตสูง

7. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

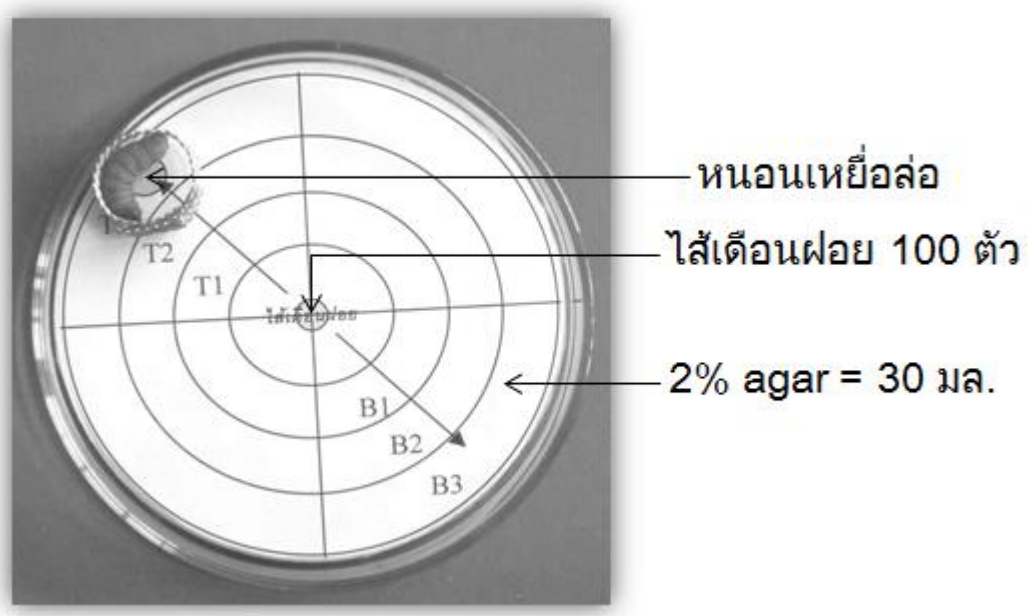
1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ที่แยกได้จากภาคเหนือ รหัส CM, PL, KP, PB ภาคกลาง รหัส NP, CN, KB, UT, AT, RB ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รหัส KK, UB, SK, RE, BR ภาคตะวันตก รหัส PR, PJ ภาคตะวันออก รหัส CB และไส้เดือนฝอย *Steinernema siamkayai* KP strain เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ

2. วัสดุ-อุปกรณ์ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องแก้ว ผงวุ้น กระดาษกรอง

3. แมลงทดสอบกลุ่มหนอนด้วงและหนอนผีเสื้อ

วิธีการ

1. Quadrant plate bioassay (ดัดแปลงจาก Campbell, 1994) ตัดกระดาษเป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. นำมาขีดเส้นแบ่งออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน และขีดวงกลมจำนวน 3 วง ระยะห่าง 1 ซม. นำไปวางใต้จานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเท 2 % agar ปริมาตร 30 มล. ในจาน เมื่อวุ้นแข็งตัว เจาะวุ้นที่ริมจานและวางกรงตาข่ายทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. ที่บรรจุหนอนกินไขผึ้ง 1 ตัว เป็นเหยื่อล่อ ปฏิบัติการทดลองโดยนำไส้เดือนฝอยระยะ IJ ของแต่ละรหัส และมีไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ KPs เป็นตัวเปรียบเทียบอย่างละ 100±10 ตัวต่อจาน ที่อยู่ในน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร หยดที่จุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 วิธีการทดสอบ Quadrant plate bioassay

<u>การบันทึกข้อมูล</u> จำนวนไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อล่อ (T1 T2 และ T3) และจำนวนไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ในทิศทางตรงข้าม (B1 B2 และ B3) ที่เวลา 10 20 และ 30 นาที ของไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด LM ทำซ้ำ 5 ครั้ง คำนวณค่าระยะทางเฉลี่ย (mean distance) ของการเคลื่อนที่โดยใช้สูตรของ Campbell (1994)

2. Migration in sand column bioassay (ดัดแปลงจาก Westerman and Godthelp, 1990) นำหนอนกินไขผึ้ง 1 ตัว วางในกระบอกพลาสติกทรงกลม (เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม. สูง 5 ซม.) บรรจุดินทรายอบฆ่าเชื้อที่มีความชื้น 10 % ให้เต็มกระบอก นำไส้เดือนฝอยระยะ IJ ของแต่ละรหัสและสายพันธุ์ KPs เป็นตัวเปรียบเทียบ อย่างละ 100±10 ตัว ที่อยู่ในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าดินทราย ทำการทดสอบไอโซเลท/ชนิดละ 10 ซ้ำ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25±2 ˚ซ เป็นเวลา 5 วัน

<u>การบันทึกข้อมูล</u> การตายของหนอนกินไขผึ้งที่ถูกไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดเข้าทำลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ KPs และผ่าซากหนอนตรวจหาไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM

3. การทดสอบศักยภาพของไส้เดือนฝอยในการฆ่าแมลงกลุ่มหนอนผีเสื้อและหนอนด้วง ทำการทดสอบใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 และ 9 ซม. ตามขนาดของแมลงทดสอบ (ระยะตัวหนอนหรือตัวเต็มวัย) วางด้วยกระดาษกรอง Whatman # 2 ใส่ไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลท/ชนิด จำนวน 1,000 และ 2,000 ตัวในน้ำ 0.5 และ 1.0 มล. ตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Petri dish 5 และ 9 ซม. ตามลำดับ นำแมลงแต่ละชนิดใส่ 3-10 ตัวต่อ Petri dish (ขึ้นกับขนาดของแมลง) มีวิธีการหยดน้ำกลั่นเป็น control เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

<u>การบันทึกข้อมูล</u> ตรวจนับการตายของแมลงแต่ละชนิดที่เวลา 24 และ 48 ชม. นำไปวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การตาย (% mortality) ของแมลงโดยใช้ Abbott’s formula (1925)

เวลาสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2560

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ :

ผลการทดสอบศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. ในการเข้าหาหนอนเหยื่อล่อ โดยใช้วิธี Quadrant plate bio-assay พบว่าการเคลื่อนที่ของไส้เดือนฝอยแต่ละรหัสตามแนวราบในทิศทางเข้าหาแมลงเหยื่อ (T1, T2, T3) และทิศทางตรงข้าม (B1, B2, B3) ที่เวลา 10 20 และ 30 นาที พบว่าไส้เดือนฝอยรหัส KP isolate มีค่าระยะทางเฉลี่ย (χ) ตามสูตรการคำนวณของ Campbell (1994) สูงที่สุดเท่ากับ 51.93 รองลงมาคือ KB และ RE isolate เท่ากับ 48.88 และ 48.87 ในขณะที่ *Steinernema siamkayai* KP strain สายพันธุ์เปรียบเทียบ เท่ากับ 55.82 และไส้เดือนฝอยรหัสที่มีค่าเฉลี่ยระยะทางน้อยที่สุด 3 ลำดับคือ ไส้เดือนฝอยรหัส PJ, CN และ NP isolate เท่ากับ 9.68 10.59 และ 12.68 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ในขณะที่ผลการทดสอบ Migration in sand column bioassay พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 18 ไอโซเลท เคลื่อนที่ในแนวดิ่งเข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อในดินลึก 5 นิ้ว และหนอนเหยื่อล่อตาย 100% ที่เวลา 24 ชม. เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* KP strain

จากผลของการศึกษาศักยภาพโดยวิธี Bio-assay ทั้ง 2 วิธีการ จึงได้ทำการคัดเลือกไส้เดือนฝอยไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงสุดในการพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ ได้แก่ ไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. KP, KB และ RE isolate นำมาทดสอบการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ (หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก หนอนกระทู้ดาวเรือง หนอนเจาะสมอฝ้าย) และกลุ่มหนอนด้วง (ด้วงกุหลาบ ด้วงเต่าแตง หนอนด้วงทำลายรากพืช) และเพิ่มไอโซเลท UB ทดสอบร่วมด้วย พบว่าไส้เดือนฝอย KP isolate มีศักยภาพในการฆ่าแมลงกลุ่มหนอนผีเสื้อและหนอนด้วงได้ 90-100 % ภายในเวลา 48 ชม. รองลงมาคือ KB, UB และ RE isolate ตายระหว่าง 38-100 % โดยคำนวณ % การตายของแมลงตามวิธีของ Abbott's formula (1925) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 การทดสอบศักยภาพของไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง (*Steinernema* sp.) ที่แยกได้ในจังหวัดต่างๆ ในการเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อล่อ โดยวิธี Quadrant plate bio-assay

รหัส ไส้เดือนฝอย	รวม การเคลื่อนที่เข้าหา หนอนเหยื่อล่อ (T1+T2+T3)	รวม การเคลื่อนที่ในทิศ ทางตรงข้าม (B1+B2+B3)	ผลรวม จำนวน ไส้เดือนฝอย (T+B)	ค่าเฉลี่ย ระยะทาง (χ)[1/]
CM	18	10	28	17.9
PL	22	9	31	21.91
KP	52	7	59	51.93
PB	15	28	43	14.72
NP	13	32	45	12.68
CN	11	41	52	10.59
KB	49	12	61	48.88
UT	15	32	47	14.68
AT	16	11	27	15.89
RB	22	34	56	21.66
KK	26	22	48	25.78
UB	38	15	53	37.85
SK	40	21	61	39.79
RE	49	13	62	48.87
BR	20	18	38	19.82
PR	13	26	39	12.74
PJ	10	32	42	9.68
CB	19	32	51	18.68
S. siamkayai	56	18	74	55.82

[1/] χ = [(10xT1)+(20xT2)+(30xT3)] - [(10xB1)+(20xB2)+(30xB3)] / 100

<u>ตารางที่ 2</u> เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงชนิดต่างๆ ที่ถูกไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KP, KB RE และ UB isolate เข้าทำลาย เป็นเวลา 48 ชม. ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ไส้เดือนฝอยและชนิดของแมลง	ใส่ไส้เดือนฝอย			ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย			% การตาย 1/
	แมลงทดสอบ (n)	แมลงตาย (n)	แมลงมีชีวิต (n)	แมลงทดสอบ (n)	แมลงตาย (n)	แมลงมีชีวิต (n)	
ไส้เดือนฝอย KP isolate							
1. หนอนกระทู้ผัก	16	16	0	10	0	10	100
2. หนอนใยผัก	15	15	0	10	0	10	100
3. หนอนเจาะสมอฝ้าย	10	10	0	10	0	10	100
4. หนอนกระทู้ดาวเรือง	10	10	0	10	0	10	100
5. ด้วงกุหลาบ	10	10	0	10	0	10	100
6. ด้วงเต่าแตง	10	9	1	10	0	10	90
7. หนอนด้วงทำลายราก	10	9	1	10	0	10	90
ไส้เดือนฝอย KB isolate							
1. หนอนกระทู้ผัก	10	10	0	10	0	10	100
2. หนอนใยผัก	15	15	0	10	0	10	100
3. หนอนเจาะสมอฝ้าย	8	8	0	8	0	8	100
4. หนอนกระทู้ดาวเรือง	8	7	1	8	0	8	88
5. ด้วงกุหลาบ	12	10	2	10	0	10	80
6. ด้วงเต่าแตง	10	7	3	10	0	10	70
7. หนอนด้วงทำลายราก	7	5	2	7	0	7	71
ไส้เดือนฝอย RE isolate							
1. หนอนกระทู้ผัก	14	14	0	10	0	10	100
2. หนอนใยผัก	14	14	0	10	0	10	100
3. หนอนเจาะสมอฝ้าย	10	10	0	10	0	10	100
4. หนอนกระทู้ดาวเรือง	8	5	3	8	0	8	63
5. ด้วงกุหลาบ	8	4	4	8	0	8	50
6. ด้วงเต่าแตง	8	3	5	8	0	8	38
7. หนอนด้วงทำลายราก	7	3	4	7	0	7	43
ไส้เดือนฝอย UB isolate							
1. หนอนกระทู้ผัก	12	12	0	10	0	10	100
2. หนอนใยผัก	10	10	0	10	0	10	100
3. หนอนเจาะสมอฝ้าย	7	7	0	7	0	7	100
4. หนอนกระทู้ดาวเรือง	7	7	0	7	0	7	100
5. ด้วงกุหลาบ	10	5	5	10	0	10	50
6. ด้วงเต่าแตง	10	6	4	10	0	10	60
7. หนอนด้วงทำลายราก	8	4	4	8	0	8	50

$$^{1/}\%\ \text{การตาย} = \frac{(\text{แมลงมีชีวิตในกรรมวิธีไม่ใส่ไส้เดือนฝอย} - \text{แมลงมีชีวิตในกรรมวิธีใส่ไส้เดือนฝอย}) \times 100}{\text{แมลงมีชีวิตในกรรมวิธีไม่ใส่ไส้เดือนฝอย}}$$

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการทดลอง Quadrant plate bio-assay พบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. รหัส KP isolate เคลื่อนที่ในทิศทางเข้าหาหนอนเหยื่อล่อกับทิศทางตรงข้าม ที่เวลา 30 นาที มีค่าระยะทางเฉลี่ย (χ) สูงที่สุดเท่ากับ 51.93 รองลงมาคือ KB และ RE isolate เท่ากับ 48.88 และ 48.87 ในขณะที่ *S. siamkayai* KP strain สายพันธุ์เปรียบเทียบ เท่ากับ 55.82 และไส้เดือนฝอยรหัสที่มีค่าเฉลี่ยระยะทางน้อยที่สุด 3 ลำดับคือ ไส้เดือนฝอยรหัส PJ, CN และ NP isolate เท่ากับ 9.68 10.59 และ 12.68 ตามลำดับ และผลการทดสอบ Migration in sand column bioassay พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 18 ไอโซเลท เคลื่อนที่ในแนวดิ่งเข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อในดินลึก 5 นิ้ว และหนอนเหยื่อล่อตาย 100% ที่เวลา 24 ชม. เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* KP strain

ไส้เดือนฝอยไอโซเลทที่มีศักยภาพสูงสุดในการเป็นสารชีวภัณฑ์ ได้แก่ ไส้เดือนฝอย รหัส KP, KB, RE และ UB isolate นำมาทดสอบการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ (หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก หนอนกระทู้ดาวเรือง หนอนเจาะสมอฝ้าย) และกลุ่มหนอนด้วง (ด้วงกุหลาบ ด้วงเต่าแตง หนอนด้วงทำลายรากพืช) พบว่าไส้เดือนฝอย 4 ไอโซเลท มีศักยภาพในการฆ่าแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ และกลุ่มหนอนด้วง ในแต่ละไอโซเลท ตาย 38-100 % ในเวลา 48 ชม.

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เพื่อนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืช

11. เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2546. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่าย. เอกสารประกอบการฝึกอบรม. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 20 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2547. การพัฒนากระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่ายเพื่อถ่ายทอดสู่เกษตรกร. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. 182 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2553. การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในกลุ่มเกษตรอินทรีย์. ในสรุปผลการดำเนินงานโครงการเกษตรอินทรีย์ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 6 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช พรพิมล อธิปัญญาคม และหิรัญ หิรัญประดิษฐ์. 2544. งานวิจัยและพัฒนาไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย *Steinernema thailandensis* n. sp. : การจำแนกชนิด คัดเลือกสายพันธุ์ และการผลิตขยายปริมาณ. หน้า 1-71. ใน : รายงานผลงานวิจัยกองโรคพืชและจุลชีววิทยา 2544. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช และ หิรัญ หิรัญประดิษฐ์. 2543. การตรวจวิเคราะห์โดยชีววิธีเพื่อการคัดเลือกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 10 (3) : 1-12.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. สำรวจรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. ใน ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด อัจฉรา ตันติโชดก ดำรง เวชกิจ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การพัฒนาโรงงานต้นแบบและเทคโนโลยีการผลิตชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในเชิงพาณิชย์. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 53 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ขวัญชัย เจริญกุล สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. การพัฒนาชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดปลวกในเชิงพาณิชย์. ผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน), กรุงเทพฯ. 131 หน้า.

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.

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

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

https//: nematology.ifas.ufl.edu/nguyen/morph/steinsp1.htm. All described species of the genera *Steinernema, Neosteinernema* and *Heterorhabditis*

Kaya, H.K. 1977. Development of DD-136 strain of *Neoaplectana carpocapsae* at constant temperature. *J. Nematol.* 9 : 346-349.