อนุกรมวิธานไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis*

Taxonomy of *Steinernema* and *Heterorhabditis*

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการวัดขนาดสัดส่วน และพิจารณารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* (REs) แยกได้จาก จ.ร้อยเอ็ด พบว่าตัวอ่อนระยะที่ 3 มีค่า L = 472 (444-508) ไมครอน, W = 24 (24-27) ไมครอน, EP = 42 (37-45) ไมครอน, ES =114 (102-126) ไมครอน, T = 43 (39-45) ไมครอน มีค่าสัดส่วน a = 19.3 (18.8-20.1), b = 4.1 (3.8-4.6), c = 11.1 (10.6-12.3), D% = 37 (33-40), E% = 99 (91-105) เป็นไส้เดือนฝอยที่มีขนาดเล็ก โดยตัวอ่อนระยะเข้าทำลายมีความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 472 ไมครอน ส่วนหางสั้น (43 ไมครอน) ในตัวเต็มวัยเพศผู้-เพศเมียทั้ง 2 ชั่วอายุ ปลายหางมี mucron และ spicule ยาวเท่ากับ 94.2 ไมครอน gubernaculum มีขนาดใหญ่และรูปร่างผอม พบโครงสร้าง epiptygma ในเพศเมียทั้ง 2 ชั่วอายุ มีความใกล้เคียงกับ *S. siamkayai* และ *S. tami* สำหรับไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* (REh) แยกได้จาก จ.ร้อยเอ็ด โดยพบว่าตัวอ่อนระยะที่ 3 มีค่า L = 541 (523-562) ไมครอน, W = 21 (20-22) ไมครอน, EP = 80 (79-85) ไมครอน, ES =112 (108-116) ไมครอน, T = 87 (82-92) ไมครอน, มีค่าสัดส่วน a = 26 (25-26), b = 4.8 (4.7-4.9), c = 6.2 (5.9-6.4), D% = 72 (70-73), E% = 92 (88-96) ตัวเต็มวัยเพศเมียมีลักษณะหางแบบ conoid มีค่า D% = 120 ตัวเต็มวัยเพศผู้ มีลักษณะหางแบบ conoid ความยาวของอวัยวะสืบพันธุ์ (spicule length) = 44 (38-48) ไมครอน สามารถจำแนกโดยเปรียบเทียบกับ Key มาตรฐาน พบว่ารูปร่างลักษณะและสัดส่วนต่างๆ มีความใกล้เคียงกับ *H. indica*

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) ไส้เดือนฝอยตัวอ่อน

ระยะที่สาม (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) ควบคุมด้วงงวงองุ่นสีดำ (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* REs isolate และ *Heterorhabditis* REh 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

เตรียมไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* ไอโซเลท REs และ *Heterorhabditis* ไอโซเลท REh เพื่อการวัดขนาดสัดส่วน ได้จากหนอนกินรังผึ้งที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (IJ) โดยตัวเต็มวัยเพศผู้ เพศเมียของไส้เดือนฝอยใน 1st และ 2nd generation ได้จากการผ่าหนอนกินรังผึ้งหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 วัน และ 6 วัน ตามลำดับ และไส้เดือนฝอยระยะ IJ ได้จากการเคลื่อนที่

ออกมาจากซากของหนอนเป็นเวลาประมาณ 10 วันหลังปลูกเชื้อ 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)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา 1 ปี เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2554

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. และ *Heterorhabditis* sp. ไอโซเลทที่แยกได้จากจังหวัดร้อยเอ็ด กำหนดรหัสเป็น REs และ REh ตามลำดับ โดย REs isolate อยู่ใน Family Steinernematidae และ REh isolate อยู่ใน Family Heterorhabditidae ทำการวัดขนาดสัดส่วนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light microscope เพื่อการจัดจำแนกในระดับชนิด (species)

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. REs 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 ยุบลงเป็นช่องสังเกตเห็นผนังของ 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 วางไข่และฟักเป็นตัวอ่อนภายในมดลูกของตัวแม่ เรียกว่า ovoviviparous ตัวอ่อนสามารถเจริญ เติบโตภายในตัวแม่ได้หรือไข่ถูกขับออกมาฟักภายนอกตัวแม่ (oviparous) ความยาวหางของตัวเมียสั้นกว่าความกว้างของลำตัว มีค่าการวัดขนาดสัดส่วนตามตารางที่ 1

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 ปลายหางมีอวัยวะรับความรู้สึก เรียกว่า genital papillae 1ตุ่มเดี่ยว และ 10-14 ตุ่มคู่ มีค่าการวัดขนาดสัดส่วนตามตารางที่ 2

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 3

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

ตารางที่ 1 ค่าการวัดขนาดสัดส่วนของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. REs isolate ตัวเต็มวัยเพศเมีย

ตัวเมียที่	ไมครอน							ค่าสัดส่วน (Ratio)				
	L	W	EP	ES	T	anus	% vulva	a	b	c	D %	E %
1	7,078.0	214.1	117.6	278.3	27.4	82.3	52.0	33.1	25.4	257.9	42.3	428.6
2	8,331.8	253.8	117.6	282.2	19.6	82.3	52.2	32.8	29.5	425.1	41.7	600.0
3	6,284.5	214.1	94.1	270.5	25.4	98.0	54.8	29.4	23.2	247.4	34.8	370.4
4	6,776.4	206.2	133.3	270.5	25.4	74.5	54.5	32.9	25.1	266.8	49.3	524.7
5	6,998.7	230.0	133.3	290.1	35.3	101.9	53.1	30.4	24.1	198.4	45.9	377.8
6	7,268.5	230.0	145.0	270.5	25.4	98.0	52.4	31.6	26.9	286.2	53.6	571.0
7	5,967.1	230.0	141.1	294.0	35.3	101.9	52.4	25.9	20.3	169.1	48.0	400.0
8	5,332.3	230.0	117.6	254.8	27.4	105.8	53.3	23.2	20.9	194.3	46.2	428.6
9	8,173.1	258.7	152.9	266.6	27.4	74.5	54.0	31.6	30.7	297.9	57.4	557.1
10	7,046.3	231.3	133.3	270.5	35.3	94.1	52.7	30.5	26.1	199.7	49.3	377.8
ผลรวม	69,256.6	2,298.0	1,285.8	2,747.9	284.0	913.4	531.3	301.3	252.2	2,542.8	468.3	4,636.0
ค่าเฉลี่ย	6,925.7	229.8	128.6	274.8	28.4	91.3	53.1	30.1	25.2	254.3	46.8	463.6
ค่าสูงสุด	8,331.8	258.7	152.9	294.0	35.3	105.8	54.8	33.1	30.7	425.1	57.4	600.0
ค่าต่ำสุด	5,332.3	206.2	94.1	254.8	19.6	74.5	52.0	23.2	20.3	169.1	34.8	370.4

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

ตารางที่ 2 ค่าการวัดขนาดสัดส่วนของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. REs isolate ตัวเต็มวัยเพศผู้

ตัวผู้ที่	ไมครอน								ค่าสัดส่วน		
	L	W	EP	ES	T	spicule	gub.	anus	D%	SW	GS
1	1,784.3	147.8	88.7	191.1	27.6	98.5	70.9	55.2	46.4	1.8	0.7
2	1,942.9	157.6	86.7	179.3	23.6	90.6	67.0	43.3	48.4	2.1	0.7
3	1,998.4	145.8	98.5	175.3	34.5	90.6	67.0	59.1	56.2	1.5	0.7
4	2,141.1	157.6	103.4	197.0	41.4	82.7	63.0	63.0	52.5	1.3	0.8
5	1,982.5	147.8	86.7	195.0	31.5	98.5	69.0	57.1	44.4	1.7	0.7
6	1,974.6	161.5	84.7	191.1	37.4	98.5	69.0	49.3	44.3	2.0	0.7
7	1,934.9	157.6	94.6	189.1	31.5	88.7	63.0	51.2	50.0	1.7	0.7
8	2,260.1	172.4	90.6	189.1	34.5	96.5	61.1	45.3	47.9	2.1	0.6
9	2,061.8	147.8	98.5	178.3	33.5	98.5	78.8	39.4	55.2	2.5	0.8
10	1,998.4	149.7	99.5	194.1	33.5	98.5	65.0	46.3	51.3	2.1	0.7
ผลรวม	20,078.8	1,545.5	931.8	1,879.4	329.0	941.7	673.7	509.3	496.6	18.9	7.2
ค่าเฉลี่ย	2,007.9	154.5	93.2	187.9	32.9	94.2	67.4	50.9	49.7	1.9	0.7
ค่าสูงสุด	2,260.1	172.4	103.4	197.0	41.4	98.5	78.8	63.0	56.2	2.5	0.8
ค่าต่ำสุด	1,784.3	145.8	84.7	175.3	23.6	82.7	61.1	39.4	44.3	1.3	0.6

หมายเหตุ : ความยาวลำตัว (L); ความกว้างลำตัว (W); ความยาววัดจากหัวถึง excretory pore (EP); ความยาววัดจากหัวถึง esophagus (ES); ความยาวหาง (Tail); ความกว้างบริเวณ anus; ความยาว spicule และความยาว gubernaculum; ค่าสัดส่วน D% = EP/ES x 100; SW = ค่าสัดส่วนที่คำนวณจาก spicule/ความกว้างของลำตัวบริเวณช่องขับถ่ายปลายหาง; GS = ค่าสัดส่วนที่คำนวณจาก gubernaculum/spicule

ตารางที่ 3 ค่าการวัดขนาดสัดส่วนของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. REs isolate ตัวอ่อนระยะที่ 3

ตัวอ่อนที่	ไมครอน					ค่าสัดส่วน (Ratio)				
	L	W	EP	ES	T	a	b	c	D %	E %
1	507.5	25.6	41.4	125.9	41.4	19.8	4.0	12.3	32.8	100.0
2	483.7	25.6	41.4	125.9	41.4	18.9	3.8	11.7	32.8	100.0
3	459.9	23.6	43.3	110.3	43.3	19.5	4.2	10.6	39.3	100.0
4	444.1	23.6	37.4	102.4	41.4	18.8	4.3	10.7	36.5	90.5
5	452.0	23.6	41.4	110.3	39.4	19.1	4.1	11.5	37.5	105.0
6	467.9	23.6	41.4	118.1	43.3	19.8	4.0	10.8	35.0	95.5
7	483.7	25.6	45.3	122.0	45.3	18.9	4.0	10.7	37.1	100.0
8	491.7	25.6	45.3	122.0	45.3	19.2	4.0	10.9	37.1	100.0
9	452.0	23.6	41.4	102.4	41.4	19.1	4.4	10.9	40.4	100.0
10	475.8	23.6	41.4	102.4	43.3	20.1	4.6	11.0	40.4	95.5
ผลรวม	4,718.4	244.3	419.6	1,141.9	425.5	193.2	41.5	111.0	369.1	986.4
ค่าเฉลี่ย	471.8	24.4	42.0	114.2	42.6	19.3	4.1	11.1	36.9	98.6
ค่าสูงสุด	507.5	25.6	45.3	125.9	45.3	20.1	4.6	12.3	40.4	105.0
ค่าต่ำสุด	444.1	23.6	37.4	102.4	39.4	18.8	3.8	10.6	32.8	90.5

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. REh isolate

พบว่าตัวอ่อนระยะที่ 3 มีค่า L = 541 (523-562) ไมครอน, W = 21 (20-22) ไมครอน, EP = 80 (79-85) ไมครอน, ES =112 (108-116) ไมครอน, T = 87 (82-92) ไมครอน, มีค่าสัดส่วน a = 26 (25-26), b = 4.8 (4.7-4.9), c = 6.2 (5.9-6.4), D% = 72 (70-73), E% = 92 (88-96) (ตารางที่ 4)

ตัวเต็มวัยเพศเมียมีลักษณะหางแบบ conoid มีค่า D% = 120 ตัวเต็มวัยเพศผู้ มีลักษณะหางแบบ conoid ความยาวของอวัยวะสืบพันธุ์ (spicule length) = 44 (38-48) ไมครอน สามารถจำแนกโดยเปรียบเทียบกับ Key มาตรฐาน พบว่ารูปร่างลักษณะและสัดส่วนต่างๆ มีความใกล้เคียงกับ *H. indica*

ตารางที่ 4 ค่าการวัดขนาดสัดส่วนของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. REh isolate ตัวอ่อนระยะที่ 3

ตัวอ่อนที่	ไมครอน					ค่าสัดส่วน (Ratio)				
	L	W	EP	ES	T	a	b	c	D %	E %
1	561.6	22.3	84.7	116.3	91.6	25.2	4.8	6.1	72.8	92.5
2	553.8	21.6	81.6	115.5	88.6	25.6	4.8	6.3	70.6	92.1
3	538.2	20.8	78.5	111.7	84.7	25.9	4.8	6.4	70.3	92.7
4	546.0	21.6	78.5	112.4	86.2	25.3	4.9	6.3	69.8	91.1
5	530.4	20.8	78.5	107.8	89.3	25.5	4.9	5.9	72.8	87.9
6	538.2	20.8	80.1	109.3	88.6	25.9	4.9	6.1	73.3	90.4
7	546.0	21.6	80.9	110.9	87.8	25.3	4.9	6.2	72.9	92.1
8	522.6	20.8	78.5	110.9	81.6	25.1	4.7	6.4	70.8	96.2
9	553.8	21.6	83.2	116.3	91.6	25.6	4.8	6.0	71.5	90.8
10	522.6	20.0	78.5	109.3	81.6	26.1	4.8	6.4	71.8	96.2
ผลรวม	5,413.2	211.9	803.0	1,120.4	871.6	255.5	48.3	62.2	716.8	922.0
ค่าเฉลี่ย	541.3	21.2	80.3	112.0	87.2	25.6	4.8	6.2	71.7	92.2
ค่าสูงสุด	561.6	22.3	84.7	116.3	91.6	26.1	4.9	6.4	73.3	96.2
ค่าต่ำสุด	522.6	20.0	78.5	107.8	81.6	25.1	4.7	5.9	69.8	87.9

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

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ที่แยกได้จากดินใน จ.ร้อยเอ็ด รหัส REs และ REh isolate จำแนกโดยพิจารณาจากรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการวัดขนาดสัดส่วนเปรียบเทียบกับ key มาตรฐาน พบว่า *Steinernema* มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับ *S. siamkayai* แยกได้จาก จ.เพชรบูรณ์ และ *S. tami* แยกได้จากประเทศเวียตนาม สำหรับไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* มีความใกล้เคียงกับ *H. indica* ซึ่งจะได้นำไปจำแนกดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลต่อไป

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.

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

Steiner, G. 1923. Aplectana kraussei n.sp. der Blattwespe Lyda sp. parasitierende Nematoden-form, nebst Bemerkungen uber das Steitenorgan der parasitischen Nematoden. Page 24. In : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.