รายงานการวิจัย

ความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพาในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

(Biodiversity of entomopathogenic nematodes and their bacterial symbiosis in Mae Wong National Park)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ [1]
ดร.อัญชลี ฐานวิสัย [1]
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รักษิณา พลสีลา [1]
ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว [1]
นายสุธน เวียงดาว [2]

1 ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา/สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์/สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2 หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2558

รายงานการวิจัย

ความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพาในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

(Biodiversity of entomopathogenic nematodes and their bacterial symbiosis in Mae Wong National Park)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ วิทย์ตะ [1]
ดร.อัญชลี ฐานวิสัย [1]
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รักษิณา พลสีลา [1]
ดร.นารีลักษณ์ นาแก้ว [1]
นายสุธน เวียงดาว [2]

1 ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา/สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์/สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2 หัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีจากความช่วยเหลือจากหลายๆ ท่าน ขอขอบคุณ นางสาวชไมพร ฟักรักษา นางสาวทัชชา ยิ้มถิน นายมนวรรธน์ สุวรรณโรจน์ นางสาวปรมาภรณ์ ม่วงปัทม์ นางสาวเต็มศิริ อยู่ยังเกต นางสาวพรสุวรรณ อ้ายวงศ์ นางสาวชุติมา สาหร่าย นางสาววิภาณี มีศิลป์ นายปัณณวัฒน์ ทิมภู นางสาวกมลพรรณ ศ.เรืองญาณ นางสาวพิชามญช์ จันธุ ที่ได้ช่วยเก็บตัวอย่างดิน และบุคลากรของภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้ให้สนับสนุนเครื่องมือบางอย่างสำหรับการทำงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สัญญาเลขที่ กบง./2556-33

อภิชาติ วิทย์ตะ
มิถุนายน 2559

บทคัดย่อ

ไส้เดือยฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีรายงานได้จากทั่วโลก และสามารถใช้ควบคุมแมลงชนิดอื่นๆ ได้หลายชนิด การศึกษาเกี่ยวกับความหลากชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทยมีค่อนข้างน้อย โดยเฉพาะในเขตอุทยานแห่งชาติที่มีความหลากหลายทางระบบนิเวศ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อจำแนกชนิดและศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* เก็บตัวอย่างดินจำนวน 550 ตัวอย่างในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดิน โดยใช้ตัวอ่อนหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) เป็นเหยื่อล่อ แล้วจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 28S rDNA สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ Internal transcribed spacer (ITS) สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ด้วยการทำ BLASTN เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 7 ไอโซเลต แบ่งเป็น *H. indica* จำนวน 3 ไอโซเลต *H. baujardi* จำนวน 3 ไอโซเลต และ *H. amazonensis* จำนวน 1 ไอโซเลต สำหรับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพาสามารถแยกได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต จำนวน 2 สกุล คือ *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต แบ่งเป็น *X. stockiae* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *X. japonica* จำนวน 1 ไอโซเลต สำหรับสกุล *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต แบ่งเป็น *P. luminescens* subsp. *akhurstii* จำนวน 20 ไอโซเลต ส่วนอีก 1 ไอโซเลต เป็น *P. temperata* subsp. *temperate* จำนวน 1 ไอโซเลต

การศึกษาครั้งนี้นอกจากพบความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียอาศัยอยู่แบบพึ่งพา *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์แล้วยังพบชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย คือ *H. amazonensis* และแบคทีเรีย *X. japonica* และ *P. temperata* subsp. *temperate* การศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านความหลากหลายทางชีวภาพ หรืออาจจะนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงหรือแบคทีเรียไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์หรือทางการเกษตรต่อไปได้

คำสำคัญ: ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, ความหลากหลาย, อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Abstract

Entomopathogenic nematodes (EPNs) of genus *Steinernema* and *Heterorhabditis* have been reported worldwide and were used for control of insect pests. Study of diversity of EPNs was limited in Thailand especially in National Park where ecological systems are diverse. The objectives of this study were to identify and study the phylogenetic tree of entomopathogenic nematodes and *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. Five hundred and fifty soil samples were collected from Mae Wong National Park. Entomopathogenic nematodes were isolated from soil samples using *Galleria mellonella* as bait. Molecular identification was performed by analysis of a partial nucleotide of 28S rDNA gene for *Steinernema* and Internal transcribed spacer (ITS) for *Heterorhabditis*. BLASTN search was performed to compare with known sequence in NCBI database. Seven isolates of genus *Heterorhabditis* were identified as *H. indica* (3 isolates), *H. baujardi* (3 isolates), and *H. amazonensis* (1 isolate). Twenty-four isolates of symbiotic bacteria of genus *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* were identified. It composed of 3 isolates of *Xenorhabdus* (*X. stockiae* = 2 isolates and *X. japonica* = 1 isolate). Genus *Photorhabdus* composed of 20 isolates of *P. luminescens* subsp. *akhurstii* and 1 isolate of *P. temperata* subsp. *temperat*a.

This study provides the diversity of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, in Mae Wong National Park. In addition, *H. amazonensis*, *X. japonica* and *P. temperata* subsp. *temperata* have never been reported in Thailand. This study provides basic knowledge on biodiversity. EPNs and symbiotic bacteria might be useful for medical and agricultural aspects in further study.

Keywords: Entomopathogenic nematodes/*Xenorhabdus*/*Photorhabdus*/Diversity/Mae Wong National Park

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	8-1
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	8-4
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	8-23
ผลการวิจัย	8-34
อภิปรายและวิจารณ์ผล	8-47
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	8-51
บรรณานุกรม	8-52
ภาคผนวก ก	8-73
ภาคผนวก ข	8-78
ภาคผนวก ค	8-116
คณะผู้วิจัย	8-125

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* 8-8

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* 8-12

ตารางที่ 3 แสดงชนิดของแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* 8-15

ตารางที่ 4 แสดงชนิดของแบคทีเรียสกุล *Photorhabdus* 8-17

ตารางที่ 5 แสดงคู่ไพรเมอร์สำหรับยีน 28S rDNA ยีน ITS และยีน *recA* 8-28

ตารางที่ 6 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* จำนวน 7 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ 8-36

ตารางที่ 7 ผลจากการทำ BLASTN ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rec*A ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ 8-39

ตารางที่ 8 ผลจากการทำ BLASTN ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน recA ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ 8-40

ตารางที่ 9 แสดงลักษณะดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จากตัวอย่างดินทั้งหมด 550 ตัวอย่าง 8-46

ตารางที่ 10 แสดงค่าอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความชื้น ที่พบและไม่พบ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 550 ตัวอย่าง 8-46

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะปากของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* (A), ลักษณะริมฝีปาก 6 ริมฝีปาก เชื่อมติดกัน (B) 8-5
ภาพที่ 2 ลักษณะรูปร่างของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะที่ 3 (infective juvenile) (A), ลักษณะริมฝีปาก 6 ริมฝีปากแยกออกจากันและมี labial tooth (B) 8-6
ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 8-7
ภาพที่ 4 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Photorhabdus* และ *Xenorhabdus* 8-19
ภาพที่ 5 แสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* โดยใช้ยีน *recA* 8-21
ภาพที่ 6 แสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* โดยใช้ยีน *recA* 8-22
ภาพที่ 7 การเตรียมอาหารเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง 8-23
ภาพที่ 8 แสดงแผนที่ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์และตำแหน่งที่เก็บตัวอย่าง 8-24
ภาพที่ 9 การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินโดยใช้หนอนกินรังผึ้งเป็นเหยื่อล่อ (Baiting technique) 8-25
ภาพที่ 10 แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากซากหนอนกินรังผึ้ง ด้วยวิธี White trap 8-25
ภาพที่ 11 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ 539_F และ 535_R จับบริเวณยีน 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* (accession number AY841762.1) 8-27
ภาพที่ 12 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ TW81_F และ AB28_R จับบริเวณยีน ITS ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. megidis* (accession number AY321408.1) 8-28
ภาพที่ 13 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน *recA* ของ *X. bovienii* SS-2004 (Accession number: NC_013892.1) สีเหลืองแสดงบริเวณยีน *recA* ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส 8-31
ภาพที่ 14 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน *recA* ของ *P. luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 (Accession number NC_005126.1) สีเหลืองแสดงตำแหน่งของยีน *recA* ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส 8-32
ภาพที่ 15 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NBTA (ซ้าย) แบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* และ (ขวา) แบคทีเรียสกุล *Photorhabdus* 8-34
ภาพที่ 16 ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน ITS จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* ตามลำดับ บน 1.2% agarose gel 8-35
ภาพที่ 17 ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน recA จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยใช้ primer *rec*A_R และ *rec*A_F บน 1.2% agarose gel 8-38
ภาพที่ 18 Maximum likelihood tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* โดยใช้โปรแกรม Mega version 6.0 วิเคราะห์ ด้วย Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง) 8-43

หน้า

ภาพที่ 19 Maximum likelihood tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rec*A (588 คู่เบส) จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* วิเคราะห์ด้วย Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง) 8-44
ภาพที่ 20 Maximum likelihood tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rec*A (588 คู่เบส) จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* วิเคราะห์ด้วย Kimura-2- parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง) 8-45

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ไส้เดือนฝอยเป็นหนอนตัวกลมที่สามารถฆ่าตัวอ่อนของแมลงที่เป็นศัตรูพืช (Entomopathogenic nematode) ซึ่งได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency: EPA ถึงความปลอดภัยต่อพืช สัตว์เลือดอุ่น และมนุษย์ รวมทั้งปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมด้วย (Kaya and Gaugler, 1990) ปัจจุบันมีรายงานไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 วงศ์ คือ Steinernematidae และ Heterorhabditidae (Kaya, 1985; Gaugler, 1988; Kaya and Gaugler, 1990) ซึ่งมีการดำรงชีวิตร่วมกับแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacterioceae โดยจะอยู่ร่วมกันในลักษณะพึ่งพาอาศัยหรือที่เรียกว่า symbiosis โดยที่แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* อาศัยอยู่ในลำไส้กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ตามลำดับ โดยตัวอ่อนระยะที่ 3 ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะเข้าทำลายแมลง ผ่านทางปาก ช่องขับถ่าย และรู้หายใจทางผิวหนัง จากนั้นเข้าสู่ช่องว่างภายในตัวแมลง (haemocoel) ซึ่งมีน้ำเลือด (haemolymph) แล้วไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงปลดปล่อยแบคทีเรียสู่กระแสเลือดของแมลง รวมทั้งสร้างสารพิษ (toxin) ทำให้แมลงเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 48 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณได้ในน้ำเลือดของแมลงและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้โดยการกินแบคทีเรียและซากแมลงเป็นอาหาร จากนั้นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเคลื่อนตัวออกจากซากแมลงแล้วหาเหยื่อใหม่ต่อไป

ปัจจุบันมีรายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* มีจำนวน 91 ชนิด (Thanwisai *et al*., 2012; Cimen *et al*., 2014; Nthenga *et al*., 2014; Phan *et al*., 2014; Shahina *et al*., 2014) และสกุล *Hererorhabditis* จำนวน 26 ชนิด (Li *et al*., 2012; Thanwisai *et al*., 2012; Malan *et al*., 2014) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถพบได้ทั่วโลก ยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกา (Hominick *et al*., 1996) ส่วนใหญ่พบได้ในตัวอย่างดินร่วนที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง ที่อุณหภูมิระหว่าง 25 - 28 องศาเซลเซียส (Kaya and Stock, 1997; Molyneux, 1986) ในประเทศไทยมีรายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทยครั้งแรกในปี พ.ศ. 2534 โดย วัชรี สมสุข ได้แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากอำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ และได้ระบุให้เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ใหม่ของโลก พร้อมทั้งตั้งชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Steinernema siamkayai* (วัชรี สมสุข 2534; Stock *et al*., 1998) และล่าสุดในปี ค.ศ. 2010 มีรายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดใหม่ของโลกเพิ่มเติม คือ *Steinernema minutum* ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากจังหวัดชุมพร (Maneesakorn *et al*., 2010) และมีรายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis indica* จากจังหวัดขอนแก่นและกระบี่ (Maneesakorn *et al*., 2011) และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* sp. จากจังหวัดกาญจนบุรี

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย ได้มีการศึกษาแล้วในหลายจังหวัด เมื่อปี ค.ศ. 2012 Thanwisai และคณะ ได้ศึกษาความหลากหลายของทั้งแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจาก 13 จังหวัดของประเทศไทย พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* อาศัยอยู่กับแบคทีเรีย *X. stockiae* ส่วนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. khoisanae* อาศัยอยู่กับ *X. miraniensis* ในขณะที่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* อาศัยอยู่กับแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *hainanensis* และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* และ *P. luminescens* subsp. *laumondii* และ *P. asymbiotica* subsp. *australis* ล่าสุดเมื่อปี พ.ศ. 2558 ชไมพร ฟักรักษา ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียและไส้เดือนฝอย

ศัตรูแมลงจาก 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงส่วนใหญ่เป็น *S. websteri* และ *H. indica* และพบ *S. scarabaei* เพียง 1 ไอโซเลต ซึ่งเป็นรายงานพบครั้งแรกในประเทศไทย ส่วนแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงส่วนใหญ่เป็น *X. stockiae* และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii*

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ มีพื้นที่ครอบคลุม 2 จังหวัด คือ กำแพงเพชร และนครสวรรค์ เป็นพื้นที่ป่าที่มีสภาพธรรมชาติที่สวยงาม และอุดมสมบูรณ์และเป็นป่าต้นน้ำลำธาร ส่วนใหญ่เป็นเทือกเขาสูง มีเอกลักษณ์ทางธรรมชาติที่สวยงาม และสภาพป่าที่อุดมสมบูรณ์ด้วยพันธุ์ไม้และสัตว์ป่านานาชนิด จึงน่าจะมีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ รวมถึงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และเหมาะสมที่จะเป็นพื้นที่อนุรักษ์ต่อไป

ในทางนิเวศวิทยาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญในแง่การเป็น predator คือ การเข้าทำลายตัวอ่อนของแมลงศัตรูพืช ซึ่งโดยปกติแล้วไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงพบได้ในดินที่ชื้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในดินบริเวณที่อยู่ภายใต้ต้นไม้ใหญ่ที่สามารถพบได้ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแบบพึ่งพา แบคทีเรียทั้ง 2 สกุล สามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติเป็น สารต้านจุลชีพ สารพิษต่อเซลล์ สารต้านแมลง และสารต้านปรสิต ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งผลิตสารในทางธรรมชาติที่มีประโยชน์อย่างยิ่ง ถ้ามีการค้นพบหรือหาสารใหม่อาจจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่ออุตสกรรมการผลิตยาต้านจุลชีพ หรือยาฆ่าแมลง อย่างไรก็ตามต้องมีความรู้ความเข้าใจกับสิ่งมีชีวิตทั้ง 2 กลุ่มนี้ก่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งความรู้พื้นฐานด้านชีววิทยา ถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศวิทยา ที่อาจจะส่งผลกระทบต่อปริมาณต้นไม้ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ที่ทำให้จำนวนต้นไม้ลดลง ผลที่ตามมาคืออาจจะทำให้จำนวนและชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงลดลง ซึ่งอาจจะส่งผลให้เสียสมดลทางธรรมชาติโดยจำนวนของแมลงศัตรูพืชเพิ่มมากขึ้น แล้วอาจจะส่งผลกระทบต่อเนื่องไปยังพืชเศรษฐกิจที่อยู่โดยรอบได้

ดังนั้นการศึกษานี้จึงจะทำการสำรวจหาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ แล้วจึงแยกแบคทีเรียออกมาจากไส้เดือนฝอย เพื่อหาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพา ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อจะได้ใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช หรือควบคุมแมลงที่เป็นพาหะนำโรค ตลอดจนอาจจะศึกษาแบคทีเรียในลำไส้ของไส้เดือนฝอยที่อาจจะผลิตสารบางอย่างที่ช่วยยับยั้งจุลชีพก่อโรคได้แล้นำมาผลิตเป็นยาปฏิชีวนะต่อไปได้

วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัย คือ จัดเก็บข้อมูลพื้นฐานในด้านความหลากหลายทางชีวภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพา

1. เพื่อสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบภาวะพึ่งพา จากตัวอย่างดินในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
2. เพื่อจำแนกจีนัส (Genus) และชนิด (Species) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบภาวะพึ่งพา ที่พบในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (Molecular techniques)
3. เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบภาวะพึ่งพา ที่เก็บในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบภาวะพึ่งพา

5. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาคของดินกับชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้จะเก็บไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ทั้งในเขตจังหวัดกำแพงเพชรและนครสวรรค์ โดยเริ่มจากเก็บตัวอย่างดินแล้วแยกไส้เดือนฝอยออกจากดิน ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยใช้ตัวอ่อนหนอนผีเสื้อกลางคืน (*Galleria mellonella*) เป็นเหยื่อล่อไส้เดือนฝอยออกจากดิน จากนั้นทำการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากซากตัวอ่อนหนอนผีเสื้อกลางคืน (*G. mellonella*) โดยใช้วิธี White trap และตรวจดูภายใต้กล้อง Stereo microscope แล้วทำการเก็บไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส และแยกแบคทีเรียออกจากหนอนกินหนอนกินรังผึ้ง โดยนำน้ำเลือด (Heamolymph) ของหนอนกินรังผึ้งที่ถูกเข้าทำลายด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพาะเลี้ยงบนอาหาร NBTA แล้วจึงทำการจำแนกตระกูล (Genus) และชนิด (Species) ของทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา พร้อมทั้งศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของไส้เดือนฝอยกับปัจจัยทางกายภาพของดิน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยเรื่องนี้มีประโยชน์ คือ ทำให้มีความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับชนิดและความหลากหลายของสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพาที่พบในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ทราบสายสัมพันธ์ของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย และอาจจะนำไปสู่การค้นพบสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยหรือแบคทีเรียที่เป็นชนิดใหม่ และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งทางเกษตรกรรมและทางการแพทย์ของทั้งไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย และงานวิจัยนี้จะได้รับการเผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์

เป็นอุทยานแห่งชาติลำดับที่ 55 ของประเทศไทย เมื่อวันที่ 14 กันยายน 2530 โดยมีพื้นที่ครอบคลุมท้องที่อำเภอปางศิลาทอง จังหวัดกำแพงเพชร และอำเภอแม่วงก์ และกิ่งอำเภอแม่เปิน จังหวัดนครสวรรค์ พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นแหล่งกำเนิดต้นน้ำลำธาร ตามเทือกเขาสูงชันก่อกำเนิดเป็นน้ำตกที่สวยงาม 4-5 แห่ง ทั้งเป็นต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ที่สำคัญของจังหวัดนครสวรรค์ นอกจากนี้ยังมีแก่งหินทำให้เกิดน้ำตกเล็กๆ ตามแก่งหินนี้ตลอดจนมีหน้าผาที่สวยงามตามธรรมชาติ มีเนื้อที่ประมาณ 558,750 ไร่ หรือ 894 ตารางกิโลเมตร มีสภาพป่าอุดมสมบูรณ์และเป็นป่าต้นน้ำลำธาร พื้นที่ดังกล่าว ส่วนใหญ่เป็นเทือกเขาสูงเป็นต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ มีเอกลักษณ์ทางธรรมชาติที่สวยงาม เช่น น้ำตกแม่กระสาหรือแม่กี ซึ่งสูงประมาณ 200 เมตร และหน้าผาต่างๆ สภาพป่าที่อุดมสมบูรณ์ด้วยพันธุ์ไม้และสัตว์ป่านานาชนิด

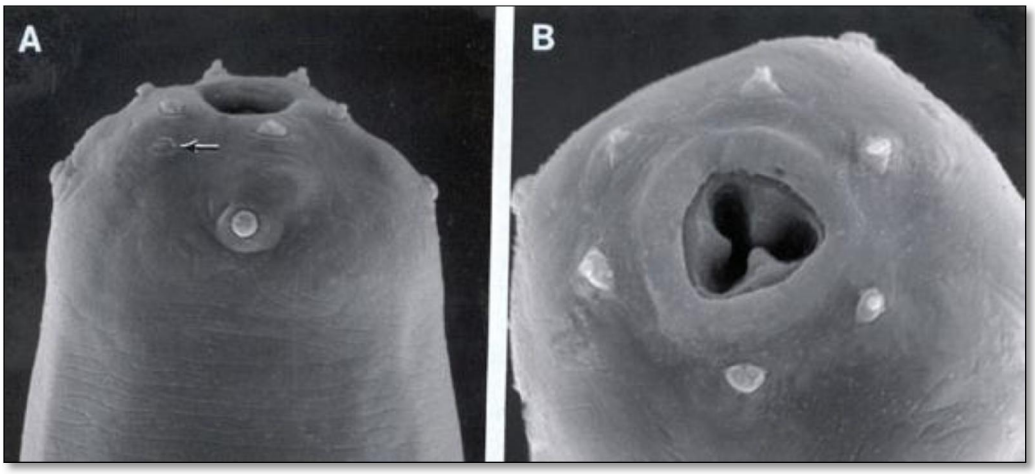
สภาพภูมิประเทศเป็นเทือกเขาสูงสลับซับซ้อนเรียงรายกันอยู่ตามเทือกเขาถนนธงชัยลดหลั่นลงมาจนถึงพื้นราบ ประมาณ 40-50 ลูก ยอดที่สูงที่สุดคือ “ยอดเขาโมโกจู” สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,964 เมตร เป็นแหล่งต้นน้ำลำธารต้นกำเนิดของลำน้ำแม่วงก์ ส่วนพื้นที่ราบมีไม่มาก ส่วนใหญ่อยู่บริเวณริมแม่น้ำ และเป็นแหล่งแร่ธาตุสำคัญ เช่น แร่ไมก้า สภาพภูมิอากาศของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ในช่วงฤดูหนาวเริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน - เดือนกุมภาพันธ์ เป็นช่วงที่เหมาะแก่การไปท่องเที่ยวมากที่สุด เพราะอากาศค่อนข้างหนาวเย็นอันเนื่องมาจากลิ่มความกดอากาศสูงมาจากประเทศจีนแผ่ลงมาทางตอนใต้เข้าสู่ประเทศไทยตอนบนและปกคลุมทั่วประเทศ ลมที่พัดสู่ประเทศไทยในฤดูนี้คือ ลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนืออุณหภูมิต่ำสุดในเดือนมกราคม ประมาณ 8.9 องศาเซลเซียส ส่วนช่วงฤดูร้อนเริ่มต้นจากเดือนมีนาคม - เดือนพฤษภาคม อุณหภูมิสูงสุดในเดือนเมษายนประมาณ 38.1 องศาเซลเซียส อากาศค่อนข้างร้อนจัดและมีฝนตกน้อย ทำให้สังคมพืชป่าเต็งรังและป่าเบญจพรรณผลัดใบ สำหรับฤดูฝนเริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายน ถึงเดือนตุลาคม มีปริมาณน้ำฝนโดยเฉลี่ย 1,100 มิลลิเมตรต่อปี ฤดูที่เหมาะสำหรับการท่องเที่ยวอุทยาน อยู่ระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงกุมภาพันธ์

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ มีพื้นที่ 558,750 ไร่ หรือ (894 ตร.กม.) สามารถจำแนกลักษณะพืชพรรณและสัตว์ป่าดังนี้ ลักษณะพืชพรรณอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ประกอบด้วย ป่าดิบเขา ประมาณ 0.88 % ป่าดิบแล้ง ประมาณ 21.85 % ป่าดิบแล้งผสมป่าเบญจพรรณชื้นประมาณ 9.24% ป่าเบญจพรรณ ประมาณ 59.05 % ป่าเต็งรัง ประมาณ 6.77 % และทุ่งหญ้าหรือไร่ร้าง ประมาณ 2.21 % ส่วนทรัพยากรสัตว์ป่า สามารถจำแนกได้ได้แก่ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จำนวน 57 ชนิด 26 วงศ์ สัตว์จำพวกนก จำนวน 305 ชนิด 53 วงศ์ สัตว์เลื้อยคลาน จำนวน 22 ชนิด 11 วงศ์ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก จำนวน 7 ชนิด 4 วงศ์ และปลา จำพวกปลาน้ำจืด จำนวน 68 ชนิด 14 วงศ์

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวงศ์ Steinernematidae และ Heterorhabditidae

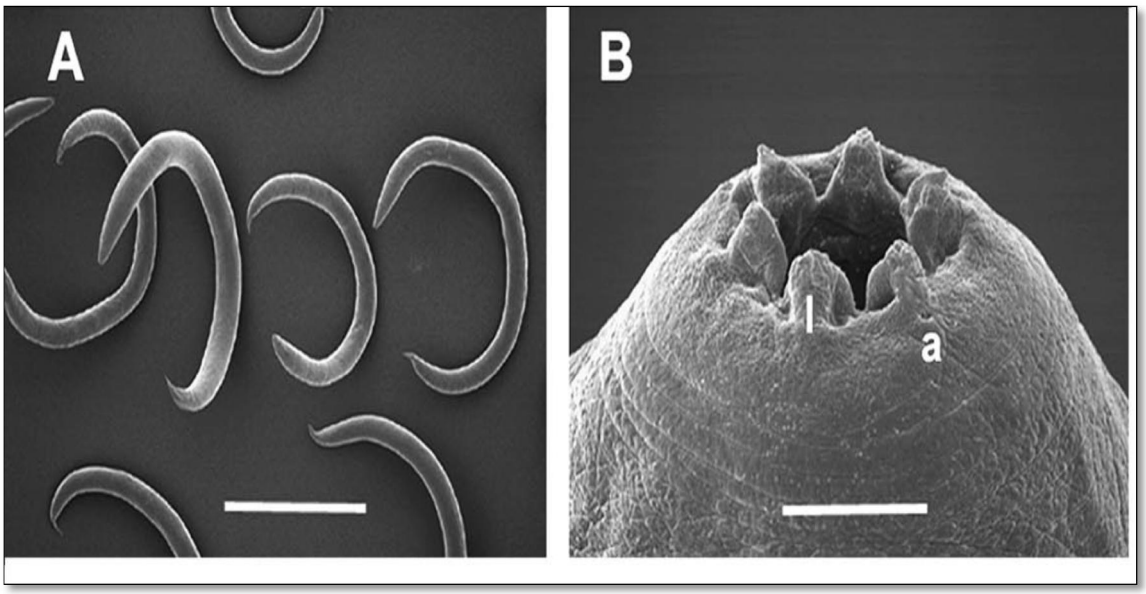
ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* สามารถทำให้แมลงตายภายใน 2 วัน โดยซากหนอนจะมีสีดำและไม่เน่า วงจรชีวิตใช้เวลาประมาณ 12 วัน (มณจันทร์ เมฆธน และคณะ, 2542) โดยเริ่มจากเมื่อตัวเมียวางไข่และออกมาจะเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 แล้วลอกคราบเป็นวัยที่ 2 ในช่วงท้ายวัยที่ 2 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะหยุดกิน

อาหาร และเก็บแบคทีเรียร่วมอาศัยไว้ในลำไส้ จากนั้นลอกคราบเป็นวัยที่ 3 ซึ่งเป็นระยะติดต่อ จากนั้นจะเข้าสู่ตัวแมลงเพื่อใช้เป็นอาหารและพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้ และเพศเมีย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* ไม่มี stylet ตัวผู้และตัวเมียแยกกัน (amphimictic) ปากมีริมฝีปาก 6 อัน เชื่อมติดกัน (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ลักษณะปากของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* (A), ลักษณะริมฝีปาก 6 ริมฝีปาก เชื่อมติดกัน (B) ที่มา: Nguyen and Smart, 1992

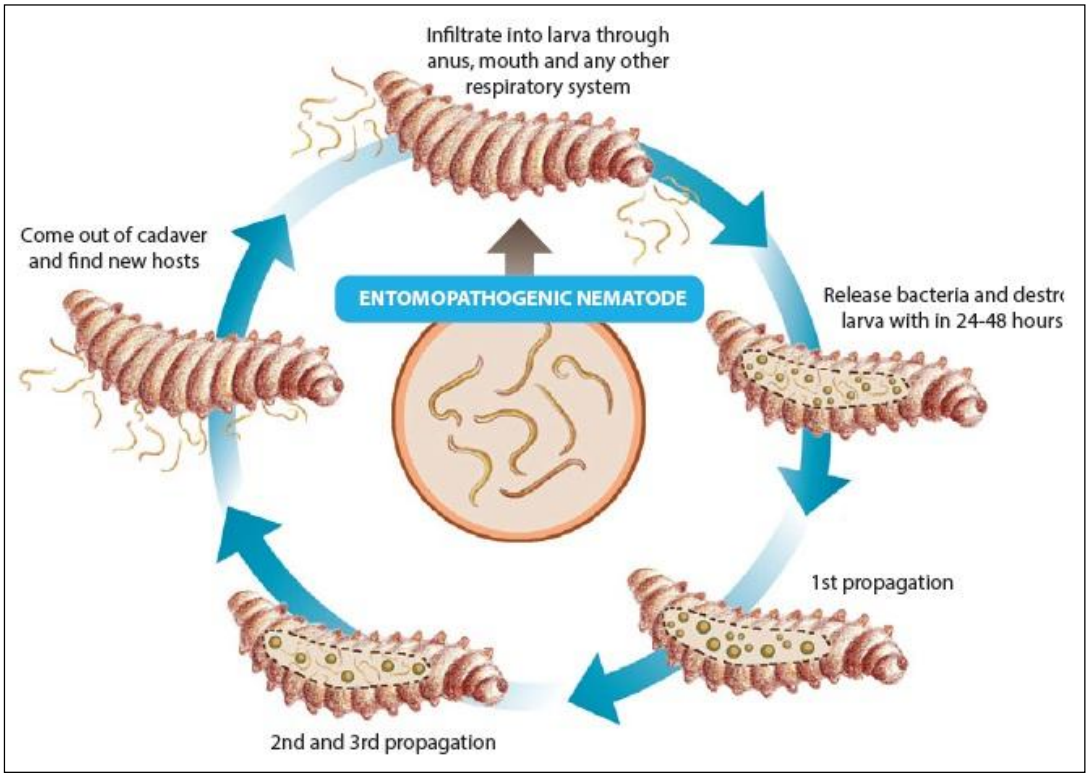
ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* มีการสืบพันธุ์ในรุ่นที่ 1 เป็นแบบ hermaphroditic และในรุ่นที่ 2 สืบพันธุ์แบบ amphimictic ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถทำให้แมลงอาศัยตายภายใน 2 วัน ซากหนอนเปลี่ยนเป็นสีแดงส้มและไม่เน่า วงจรชีวิตใช้เวลาประมาณ 10 วัน (มณจันทร์ เมฆธน และคณะ, 2542) ให้ลูกหลาน 2 ชั่วรุ่น ตัวอ่อนระยะติดต่อใช้เวลา 3 วัน โดยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศรวมในรุ่นที่ 1 (hermaphrodite) ส่วนรุ่นที่ 2 ตัวเต็มวัยมีทั้งเพศผู้และเพศเมีย (amphimictic) ฟักเป็นตัวภายในตัวแม่ (endotokia matricida) จากนั้นประมาณ 10 วัน หลังจากตัวอ่อนระยะติดต่อเข้าสู่แมลงอาศัย ตัวอ่อนระยะติดต่อออกจากซากแมลงอาศัยเก่าเพื่อเข้าสู่แมลงอาศัยตัวใหม่ ตัวเต็มวัยไม่มี stylet ปากมีริมฝีปาก 6 อันที่แยกจากกันชัดเจน (ภาพที่ 2) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* มี labial tooth อยู่บริเวณส่วนหัวของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะที่ 3 มีลักษณะเป็นฟันที่แข็งแรง ช่วยในการเจาะทะลุผนังลำตัวของแมลง ซึ่งเป็นโครงสร้างพิเศษที่พบในสกุลนี้เท่านั้น (Nguyen *et al*., 2004)



ภาพที่ 2 ลักษณะรูปร่างของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะที่ 3 (infective juvenile) (A), ลักษณะริมฝีปาก 6 ริม ฝีปากแยกออกจากันและมี labial tooth (B) ที่มา: Nguyen et al. 2004

ชีววิทยาและวงจรชีวิต

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจัดอยู่ในอาณาจักร Nematoda กลุ่ม Chromadorea อันดับ Rhabditida วงศ์ Steinernematidae สำหรับไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และวงศ์ Heterorhabditidae สำหรับไส้เดือนฝอยสกุล *Heterorhabditis* เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่กินแบคทีเรียเป็นอาหาร มีหลายชนิดที่อาศัยอยู่ร่วมกับแมลงเพื่อเป็นพาหะนำไปแพร่กระจายในที่ต่างๆ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 วงศ์ มีลักษณะเฉพาะคือ โดยธรรมชาติดำรงชีวิตอยู่ร่วมกับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ตามลำดับ โดยที่แบคทีเรียอาศัยอยู่ในส่วนของลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระยะตัวอ่อนที่ 3 (infective stage) ซึ่งสามารถติดต่อเข้าสู่ตัวอ่อนแมลง โดยไชเข้าสู่ตัวอ่อนแมลงผ่านทางรูเปิดธรรมชาติ เช่น ทางปาก ทวาร และรูหายใจของแมลงศัตรูพืช จากนั้นเข้าสู่ระบบเลือด (hemolymph) แบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เป็นสาเหตุทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง เนื่องจากภาวะเลือดเป็นพิษ (Bode, 2009) วงจรชีวิตของไส้เดือยฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* จะคล้ายกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* (ภาพที่ 3) โดยวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* ใช้ระยะเวลา 12 วัน ตั้งแต่ระยะเข้าทำลายจนกระทั่งออกจากซากตัวอ่อนแมลงเพื่อหาโฮสต์ตัวใหม่ ส่วนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ใช้เวลาประมาณ 10 วัน (มณจันทร์ เมฆธน และคณะ, 2542)



ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ที่มา: http://vegalab.com/larva-bio-control/

ประวัติการค้นพบครั้งแรกและในประเทศไทย

ในปี ค.ศ. 1923 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Gotthold Steiner ได้รายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นครั้งแรกที่ประเทศเยอรมันและให้ชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Aplectana kraussei* (Steiner, 1923) ต่อมาในปี ค.ศ. 1927 Travassos ได้เปลี่ยนชื่อสกุลใหม่ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดนี้ชื่อว่า *Steinernema*

ในปี ค.ศ. 1975 นักวิทยาศาสตร์ชื่อ Poinar มีการค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวงศ์ Heterorhabditidae เป็นครั้งแรกที่ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่จัดอยู่ในอันดับ Rhabditida เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวงศ์ Steinernematidae

สำหรับประเทศไทยมีการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง โดยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา และกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์มีการสำรวจครั้งแรก เมื่อเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2539 โดยกองกีฏและสัตววิทยา พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในตระกูล Steinernematidae ที่บริเวณดินใต้ต้นมะขามหวาน อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ และได้มีการจัดจำแนกชนิดเป็นชนิดใหม่ ให้ชื่อเป็น *S. siamkayai* (Stock *et al*., 1998) ต่อมาในปี ค.ศ. 2012 Thanwisai และคณะ ได้รายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri*, *S. khoisanae* และ *H. indica*

ความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* และ *Heterorhabditis*

ปัจจุบันไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีรายงานจากหลายประเทศทั่วโลก พบรายงานอย่างเป็นทางการแล้วจำนวน 91 และ 26 ชนิด ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema*

ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	แหล่งอ้างอิง
S. abbasi	Elawad, 1997
S. aciari	Qiu *et al*., 2005
S. affine	Wouts *et al*., 1982
S. akhursti	Qiu *et al*., 2005
S. anatoliense	Hazir *et al*., 2003
S. apuliae	Triggiani *et al*., 2004
S. arasbaranense	Nikdel *et al*., 2011
S. arenarium	Nguyen and Smart, 1993
S. ashiuense	Phan *et al*., 2006
S. asiaticum	Anis *et al*., 2002
S. austral	Edgington *et al*., 2009
S. backanense	Cutler and Stock, 2003
S. bedding	Qiu *et al*., 2005
S. bicornutum	Tallosi *et al*., 1995
S. boemarei	Lee *et al*., 2009
S. brazilense	Nguyen *et al*., 2010
S. cameroonense	Kanga *et al*., 2012
S. caudatum	Xu *et al*., 1991
S. carpocapsae	Belair, 1995
S. changbaiense	Ma *et al*., 2012
S. cholashanense	Nguyen *et al*., 2007
S. citrae	Knoetze *et al*., 2011
S. colombiense	Phan *et al*., 2006
S. costaricense	Nguyen *et al*., 2005
S. cubanum	Mracek *et al*., 1994

ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	แหล่งอ้างอิง
S. cumgarense	Phan *et al*., 2006
S. diaprepesi	Nguyen and Duncan, 2002
S. eapokense	Phan *et al*., 2006
S. ethiopiense	Tamiru *et al*., 2012
S. everestense	Khatri *et al*., 2011
S. feltiae	Wouts *et al*., 1982
S. glaseri	Steiner, 1929
S. guangdongense	Qiu *et al*., 2004
S. hebeiense	Chen, 2006
S. hermaphroditum	Stock *et al*., 2004
S. ichnusae	Nguyen *et al*., 2007
S. intermedium	Poinar, 1985
S. jollieti	Spiridonov *et al*., 2004
S. karii	Waturn *et al*., 1997
S. khoisanae	Nguyen *et al*., 2006
S. kraussei	Travassos, 1927
S. kushidai	Mamiya, 1988
S. lamjungense	Khatri-Chhetri *et al*., 2011
S. leizhouense	Nguyen *et al*., 2006
S. litorale	Yoshida, 2004
S. loci	Phan *et al*., 2001
S. longicaudum	Shen and Wang, 1991
S. minutum	Maneesakorn *et al*., 2010
S. meghalayensis	Ganguly *et al*., 2011
S. monticolum	Stock *et al*., 1927
S. neocurtillae	Nguyen and Smart, 1992
S. nepalense	Khatri-Chhetri *et al*., 2011

ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	แหล่งอ้างอิง
S. nyetense	Kanga *et al*., 20012
S. oregonense	Liu and Berry, 1996
S. pui	Qiu *et al*., 2011
S. pakistanense	Shahina *et al*., 2001
S. puertoricense	Roman and Figueroa, 1994
S. pauntauvense	Nguyen *et al*., 2007
S. rarum	Mamiya, 1988
S. riobrave	Cabanillas *et al*., 1994
S. ritteri	Doucet and Doucet, 1990
S. robustispiculum	Phan *et al*., 2005
S. sangi	Phan *et al*., 2001
S. sasonense	Phan *et al*., 2006
S. scapterisci	Nguyen and Smart, 1990
S. scarabaei	Koppenhofer and Fuzy, 2003
S. schliemanni	Spiridonov *et al*., 2010
S. serratum	Lengyel *et al*., 2005
S. siamkayai	Stock *et al*., 1998
S. sichuanense	Qiu *et al*., 2005
S. silvaticum	Sturhan *et al*., 2005
S. surkhetense	Khatri-Chhetri *et al*., 2011
S. tami	Pham *et al*., 2000
S. texanum	Nguyen *et al*., 2007
S. teilingense	Ma *et al*., 2012
S. thanhi	Phan *et al*., 2003
S. thermophilum	Ganguly and Singh, 2000
S. tophus	Cimen *et al*., 2014
S. unicornum	Edgington *et al*., 2009

ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	แหล่งอ้างอิง
S. vulcanicum	Clausi *et al*., 2011
S. websteri	Cutler and stock, 2003
S. weiseri	Mracek *et al*., 2003
S. xinbinense	Ma *et al*., 2012
S. xueshanense	Mrácek *et al*., 2009
S. yirgalomense	Nguyen *et al*., 2005
S. innovationi	Cimen *et al*., 2014
S. phyllophage	Nguyen and Buss, 2011
S. huense	Phan *et al*., 2014
S. sacchari	Nthenga *et al*., 2014
S. bifurcatum	Shahina *et al*., 2014

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis*

ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	**แหล่งอ้างอิง**
H. bacteriophora	Poinar, 1976
H. hambletoni	Poinar, 1976
H. heliothidis	Poinar *et al*., 1977
H. hoptha	Poinar, 1979
H. zealandica	Poinar, 1990
H. indica	Poinar *et al*., 1992
H. argentinensis	Stock, 1993
H. hawaiiensis	Gardner *et al*., 1994
H. hepialius	Stock and Gardner, 1996
H. marelatus	Liu and Berry, 1996
H. taysearae	Shamseldean *et al*., 1996
H. downesi	Stock *et al*., 2002
H. baujardi	Phan *et al*., 2003
H. mexicana	Nguyen *et al*., 2004
H. amazonensis	Andalo *et al*., 2006
H. floridensis	Nguyen *et al*., 2006
H. safricana	Malan *et al*., 2008
H. brevicaudis	Plichta *et al*., 2009
H. georgiana	Plichta *et al*., 2009
H. gerrardi	Plichta *et al*., 2009
H. megidis	Stock *et al*. 2009
H. poinarii	Stock *et al*., 2009
H. sonorensis	Stock *et al*., 2009
H. atacamensis	Edgington *et al*., 2011
H. beicherriana	Li *et al*., 2012
H. noenieputensis	Malan *et al*., 2014

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

การจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารจำแนกได้ยากมาก เนื่องจากทั้งสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีรูปร่างลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถทำได้ แต่มีความยุ่งยากเช่นเดียวกัน ในปัจจุบันนี้เทคนิคทางอณูวิทยา (Molecular technique) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีการศึกษาและพัฒนามาใช้เพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 สกุล มีรายงานการใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism หรือ RFLP) ในลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณของ Internal transcribed spacer (ITS) rDNA ของไรโบโซม ซึ่งเป็น noncoding gene วิธีนี้สามารถแยกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ได้ แต่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวนมาก (Nasmith *et al*., 1996) รวมถึงการศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rDNA (Stock and Gress, 2006) สามารถใช้จำแนกระดับสกุลของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* และ *Heterorhabditis* แต่ไม่สามารถแยกได้ในระดับชนิด (species) เนื่องจากเป็นยีนนี้มีความแปรผันต่ำ (Blaxter *et al*., 1998) อย่างไรก็ตามยังมีอีกหลายยีนที่ถูกนำมาศึกษาเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสัตรูแมลง เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแปรผันสูงของ Internal transcribed spacer (ITS) rDNA ของไรโบโซมซึ่งเป็น noncoding gene สามารถแยกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* ได้ (Hominick *et al*., 1997; Thanwisai *et al*., 2012) และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA เป็นยีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล NCBI มากกว่ายีนอื่นๆ รวมทั้งสามารถแยกชนิดของไส้เดือนฝอย *Steinernema* ได้ (Stock *et al*., 2001; Nguyen *et al*., 2010; Thanwisai *et al*., 2012)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถพบได้ทั่วโลก ยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกา (Hominick *et al*., 1996, 2002) ซึ่งการกระจายตัวของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น พฤติกรรมการปรับตัว อุณหภูมิ ความชื้นของดิน ลักษณะดิน ความชื้นสัมพัทธ์ แสงอาทิตย์ และรังสี เป็นต้น (Kaya, 1990; Smits, 1996)

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมักจะอยู่ระหว่าง 25 ถึง 28 องศาเซลเซียส (Kaya, 1997; Molyneux, 1986) จากการศึกษาของ Kaya (1977) พบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส มีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในตัวอ่อนแมลงอาศัย ดังนั้นอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการมีชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ความชื้นของดินเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Molyneux and Bedding, 1984; Kung *et al*., 1991; Koppenhofer *et al*., 1995; Grant and Villani, 2003) เนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต้องการน้ำรอบๆ ตัวเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ในช่วงที่อยู่ในดิน (Wallace, 1958; Norton, 1978)

แสงแดดและรังสีอัลตราไวโอเลตก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จากการศึกษาของ Gaugler และ Boush (1979) พบว่าไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในระยะติดต่อจะไวต่อรังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งที่ความยาวคลื่นนี้สามารถยับยั้งการสืบพันธุ์และการพัฒนาไปเป็นระยะต่างๆของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ แต่ไม่มีผลต่ออัตราการตายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระยะ

ติดต่อ นอกจากนี้ยังมีผลในการลดอัตราการก่อโรคในหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) อย่างรวดเร็ว เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้รับรังสีอัตราไวโอเลตเป็นเวลา 7 นาที

แบคทีเรีย *Xenorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* ถูกค้นพบครั้งแรกในลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (entomopathogenic nematode) ในวงศ์ Steinernematidae (Grorge and Thomas, 1965) ถูกจำแนกและจัดให้อยู่ในสกุล *Achromobacter* วงศ์ Enterobacteriaceae โดยให้ชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Achromobacter nematophilus* ต่อมาในปี ค.ศ. 1979 Grorge และ Thomas ได้ตั้งชื่อให้ใหม่เป็น *Xenorhabdus* เนื่องจากมีลักษณะที่แตกต่างไปจากแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ *Escherichia*, *Salmonella* และ *Klebsiella* คือ มีขนาดเซลล์ที่ใหญ่กว่า ไม่สามารถ reduce ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้ (Thomas and Grorge, 1979; Farmer *et al*. 1989) มีความใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและยังสามารถก่อโรคในแมลงได้อีกด้วย จึงทำให้มีการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* อย่างละเอียดมากขึ้น ในปัจจุบันได้มีรายงานพบชนิดของแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* แล้วอย่างน้อย 24 ชนิด

Xenorhabdus จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae อยู่ในกลุ่ม facultative anaerobic เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) รูปร่างท่อน (rod-shaped) เซลล์มีขนาด 0.3 x 2-10 ไมโครเมตร มีแฟกเจลล่ารอบเซลล์ (peritrichous flagella) เพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 25 องศาเซลเซียส ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase และ catalase ไม่สร้าง indole methyl red Voges-Proskauer และ simmon citrate ให้ผลลบ และไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ รวมทั้งไม่สามารถย่อยสลายยูเรียได้ (Thomas and Grorge, 1979) แบคทีเรีย *Xenorhabdus* มี 2 ระยะ คือระยะปฐมภูมิ (primary form) และระยะทุติยภูมิ (secondary form) ซึ่งทั้งสองระยะนี้มีคุณสมบัติทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน (Akhurst and Boemare, 1988) คือ แบคทีเรียระยะปฐมภูมิ สามารถสร้าง antibiotics เช่น hydroxystilbense polyketides ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่สามารถย่อยสลายซากตัวอ่อนแมลงได้ (Bormare *et al*. 1993) และมี intracellular inclusion ที่เป็น crystalline protein ซึ่งไม่พบในแบคทีเรียระยะทุติยภูมิ (Forst *et al*. 1997) แบคทีเรียในระยะปฐมภูมิสร้างสารที่ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และพัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสมบูรณ์ (Forst *et al*. 1997) เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Xenorhabdus* บนอาหาร nutrient bromothymol blue agar (NBTA) ที่มี triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ที่อุณหภูมิ 25 – 28 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียระยะปฐมภูมิสามารถดูดซึมสีน้ำเงินของ bromthymol blue (Akhurst and Bormore, 1990) ทำให้มีลักษณะโคโลนีสีน้ำเงินหรือน้ำตาลขอบไม่เรียบ มีลักษณะนูนโค้ง (covex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย (umbonate) และแผ่กว้าง (swarming) (Thanwisai, 2012)

ความหลากหลายของแบคทีเรีย *Xenorhabdus*

ปัจจุบันแบคทีเรีย *Xenorhabdus* มีรายงานจากทั่วโลก จากหลายภูมิศาสตร์ พบรายงานอย่างเป็นทางการแล้ว 24 ชนิด (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงชนิดของแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus*

สกุล	ชนิด	แหล่งอ้างอิง
Xenorhabdus	*nematophila*	Thomas and Poinar, 1979
	bovienii	Akhurst and Boemare, 1988
	poinarii	Akhurst and Boemare, 1988
	beddingii	Akhurst and Boemare, 1988
	japonica	Nishimura *et al*., 1994
	budapestensis	Lengyel *et al*., 2005
	ehlersii	Lengyel et al., 2005
	innexi	Lengyel *et al*., 2005
	szentirmaii	Lengyel *et al*., 2005
	cabanillasii	Tailliez *et al*., 2006
	doucetiae	Tailliez *et al*., 2006
	griffiniae	Tailliez *et al*., 2006
	hominickii	Tailliez *et al*., 2006
	koppenhoeferi	Tailliez *et al*., 2006
	mauleonii	Tailliez *et al*., 2006
	miraniensis	Tailliez *et al*., 2006
	romanii	Tailliez *et al*., 2006
	stockiae	Tailliez *et al*., 2006
	indica	Somvanshi *et al*., 2006
	vietnamensis	Tailliez *et al*., 2010
	magdalenensis	Tailliez *et al*., 2012
	ishibashii	Kuwata *et al*., 2013
	khoisanae	Ferreira *et al*., 2013

แบคทีเรีย *Photorhabdus*

ในปี ค.ศ. 1976 Poinar สามารถแยกแบคทีเรียได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis bacteriophora* และได้ให้ชื่อแบคทีเรียชนิดนี้ว่า *Xenorhabdus luminescens* (Thomas and Poinar, 1979) ต่อมาพบว่าแบคทีเรีย *X. luminescens* นี้มีคุณสมบัติเป็น bioluminescence และมีผล catalase เป็นบวก ซึ่งแตกต่างไปจาก *Xenorhabdus* ชนิดอื่นๆ และยังพบว่า *X. luminescens* สามารถเกิดยีน lateral transfer ได้ จึงทำให้ *X. luminescens* ถูกแยกออกมาและจัดให้อยู่ในสกุลใหม่ที่ชื่อว่า *Photorhabdus* และตั้งชื่อให้เป็น *Photorhabdus luminescens* (Boemare *et al*., 1993) จากนั้นแบคทีเรีย *Photorhabdus* ได้ถูกค้นพบเพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ (Fischer-Le Saux *et al*., 1999) โดยปัจจุบันมีรายงานอย่างเป็นทางการแล้วอย่างน้อย 5 ชนิด และอีกหลาย subspecies จากทั่วโลก โดยเฉพาะการค้นพบ *Photorhabdus asymbiotica* จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อทางผิวหนัง ซึ่ง *P. asymbiotica* เป็นเพียงชนิดเดียวที่สามารถก่อโรคในคนได้ (Wilkinson *et al*., 2009)

แบคทีเรีย *Photorhabdus* จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* มีความสัมพันธ์กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในวงศ์ Heterorhabditidae (Forst *et al*., 1997) มีลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) มีแฟกเจลล่ารอบเซลล์ (peritrichous flagella) เพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ มีขนาด 0.5-2 x 2-10 ไมโครเมตร แบคทีเรีย *Photorhabdus* ทุกชนิดให้ผลบวกกับ catalase ไม่รีดิวซ์ nitrate ในขณะที่แบคทีเรีย *Xenorhabdus* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ oxidase และ catalase แบคทีเรีย *Photorhabdus* มี 2 ระยะ คือ ระยะปฐมภูมิ (primary form) และระยะทุติยภูมิ (secondary form) แบคทีเรีย *P. luminescens* ต่างจากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* คือ *P. luminescens* ในระยะปฐมภูมิสามารถสร้างสารเรืองแสง (luminescent) (Leisman *et al*., 1995) และเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Photorhbdus* บนอาหาร Nutrient bromothymol blue agar (NBTA) ที่มี triphenyl tetrazolium chloride (TTC) ที่อุณหภูมิ 25 – 28 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Photorhabdus* มีสีเขียวขอบเรียบ โคโลนีโค้งนูน หรือนูนตรงกลางของโคโลนีเล็กน้อย (umbonate) (Thanwisai, 2012)

ความหลากหลายของแบคทีเรีย *Photorhabdus*

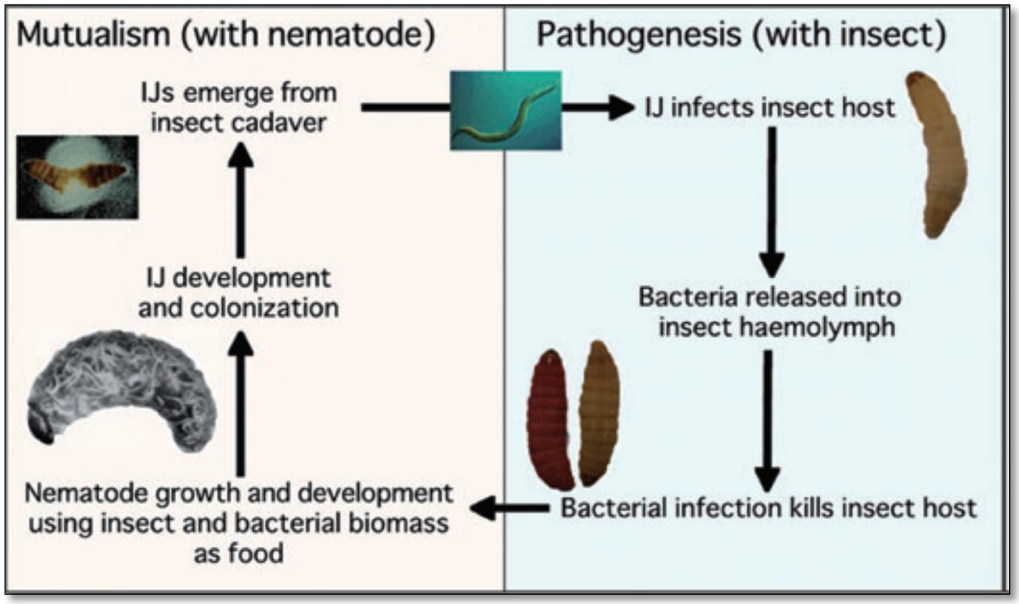
ปัจจุบันแบคทีเรีย *Photorhabdus* มีรายงานจากหลายประเทศทั่วโลก จากหลายภูมิศาสตร์ พบรายงานอย่างเป็นทางการแล้ว 5 ชนิด นอกจากนี้ยังแบ่งออกเป็นอีกหลาย subspecies (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 แสดงชนิดของแบคทีเรียสกุล *Photorhabdus*

สกุล	ชนิด	แหล่งอ้างอิง
Photorhabdus	*luminescens*	Thomas and Poinar, 1979
	luminescens subsp. *luminescens*	Thomas and Poinar, 1979
	luminescens subsp. *akhurstii*	Fischer-Le Saux *et al*., 1999
	luminescens subsp. *laumondii*	Fischer-Le Saux *et al*., 1999
	luminescens subsp. *kayaii*	Hazir *et al*., 2004
	luminescens subsp. *thracensis*	Hazir *et al*., 2004
	luminescens subsp. *caribbeanensis*	Tailliez *et al*., 2010
	luminescens subsp. *hainanensis*	Tailliez *et al*., 2010
	luminescens subsp. *kleinii*	An and Grewal, 2011
	luminescens subsp. *noenieputensis*	Ferreira *et al*., 2013
	asymbiotica	Fischer-Le Saux *et al*., 1999
	asymbiotica subsp. *asymbiotica*	Fischer-Le Saux *et al*., 1999
	asymbiotica subsp. *australis*	Akhurst *et al*., 2004
	temperata	Fischer-Le Saux *et al*., 1999
	temperata subsp. *temperata*	Fischer-Le Saux *et al*., 1999
	temperata subsp. *thracensis*	Hazir *et al*., 2004
	temperata subsp. *cinerea*	Tóth and Lakatos, 2008
	temperata subsp. *khanii*	Tailliez *et al*., 2010
	temperata subsp. *tasmaniensis*	Tailliez *et al*., 2010
	temperata subsp. *stackebrandtii*	An and Grewal, 2011
	heterorhabditis	Ferreira *et al*., 2014a
	zealandica	Ferreira *et al*., 2014b

วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Photorhabdus* และ *Xenorhabdus*

วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Photorhabdus* และ *Xenorhabdus* คล้ายกันมาก (ภาพที่ 4) แบ่งเป็น 2 ระยะ คือระยะที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (mutualism stage) และระยะที่อาศัยอยู่ในซากหนอนที่ตายแล้ว (pathogenic stage) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลอาศัยอยู่ในลำไส้ (foregut) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแบบพึ่งพาอาศัยกัน (symbiosis) โดยที่แบคทีเรีย *Xenorhabdus* อาศัยอยู่ในถุงเล็กๆ (vesicle) ของลำไส้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* (Adams *et al*., 2008) สำหรับแบคทีเรีย *Photorhabdus* อาศัยอยู่ทั่วทั้งลำไส้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* (Ciche and Ensign, 2003; Adams *et al*., 2008) แบคทีเรียเข้าสู่ระบบเลือด (heamolymph) ของแมลงโดยอาศัยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะที่ 3 (infective stage) เป็นตัวพาเข้าไปในตัวหนอนแมลงอาศัย โดยการไชเข้าทางรูเปิดธรรมชาติต่างๆ ของตัวหนอนแมลง เช่น ปาก ทวารหนัก และรูหายใจ (spiracles) หรือบางครั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* สามารถเข้าสู่ระบบเลือดของแมลงโดยการไชผ่านผิวหนังของแมลง (Wang and Gaugler, 1998; Adams *et al*., 2008) เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าสู่ระบบเลือดของแมลง ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพิ่มจำนวนและปล่อยแบคทีเรียเข้าสู่ระบบเลือดของแมลง โดยที่แบคทีเรีย *Xenorhabdus* ถูกปล่อยออกมาจากการถ่ายอุจจาระ (defecation) จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Martens *et al*., 2003) ในขณะที่แบคทีเรีย *Photorhabdus* ถูกปล่อยออกมาทางปาก (Ciche and Ensign, 2003) แบคทีเรียแบ่งตัวเพิ่มจำนวน มีการผลิตและปล่อยสารพิษ (toxin) และเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกเซลล์ (exoenzyme) มีผลทำให้แมลงเกิดอาการโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ส่งผลให้แมลงตายได้ภายใน 48 ชั่วโมง และเกิดการเปลี่ยนแปลงสสารทางกระบวนการชีวภาพ (bioconversion) ในซากแมลง (Forst and Clarke, 2002) เมื่อมีการติดเชื้อของแมลง แบคทีเรีย *Photorhabdus* เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในระบบเลือด ทำลายระบบภูมิคุ้มกันและลำไส้ ปล่อยสารพิษ (toxin) และ metalloprotease เพื่อทำลายเนื้อเยื่อบุผิวลำไส้ (midgut epithelium) และทำให้เกิด bioconversion ในเนื้อเยื่อได้ง่ายขึ้น (Silva *et al*., 2002) ส่วนแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ทำลายเซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) โดยการปล่อยสารจำพวก endotoxin เช่น lipopolysaccharide (LPS) ที่อยู่ส่วน outer membrane (Brillard *et al*., 2001; Dunphy and Thurston, 1990) และเมื่อแมลงอาศัยตายมีลักษณะเฉพาะคือ ไม่เน่าและผิวหนังของแมลงยังคงเหนียวไม่ฉีกขาด มีลักษณะแข็งมีสีดำคล้ำหรือแดง (Emelianoff *et al*., 2008) เนื่องจากแบคทีเรียทั้ง 2 สกุล สร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และราอื่นๆ (Akhurst, 1982) ในขณะเดียวกันไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้รับประโยชน์จากการอยู่ร่วมกันกับแบคทีเรียคือ การได้กินแบคทีเรีย และซากของแมลงเป็นอาหารทำให้ไส้เดือนฝอยมีการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนต่อไปได้



ภาพที่ 4 วงจรชีวิตของแบคทีเรีย *Photorhabdus* และ *Xenorhabdus* ที่มา: Goodrich and Clarke, 2007

การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีที่หลากหลายจึงไม่สามารถนำมาจำแนกแยกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองออกจากกันได้ โดยส่วนใหญ่ให้ผลลบกับการทดสอบทางชีวเคมีดังตาราง 3 (Thanwisai, 2012) แบคทีเรียทั้ง 2 สกุลเป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในกลุ่ม facultative anaerobic ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สามารถเคลื่อนที่โดยใช้แส้รอบตัว (peritrichous flagella) ไม่ผลิต nitrate เพราะไม่มีการรีดิวซ์ nitrate และไม่มีการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์เหมือนกัน แต่มีบางการทดสอบ เช่น การทดสอบ catalase ที่สามารถแยกได้ระหว่างแบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยแบคทีเรีย *Photorhabdus* ให้ผลบวก ส่วนแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ให้ผลลบ รวมทั้งแบคทีเรีย *Photorhabdus* มีการสร้าง bioluminescence แต่แบคทีเรีย *Xenorhabdus* ไม่สร้าง (Boemare and Akhurst, 1988)

DNA-DNA hybridization เป็นเทคนิคที่อาศัยคุณสมบัติของดีเอ็นเอที่มีเบสจับกันอย่างจำเพาะ (complementary) และตรวจสอบการเกิด hybridization ด้วยการติดตามจาก probe ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และชนิดของสิ่งมีชีวิต สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *X. nematophilus* กับ *X. luminescens* แล้วจำแนกแบคทีเรีย *X. luminescens* เป็น *P. luminescens* (Boemare *et al*., 1993) นอกจากนี้เมื่อใช้ nucleic acid probes โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA บริเวณตำแหน่งที่ 455-480 สามารถจำแนกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ออกเป็น 5 ชนิด

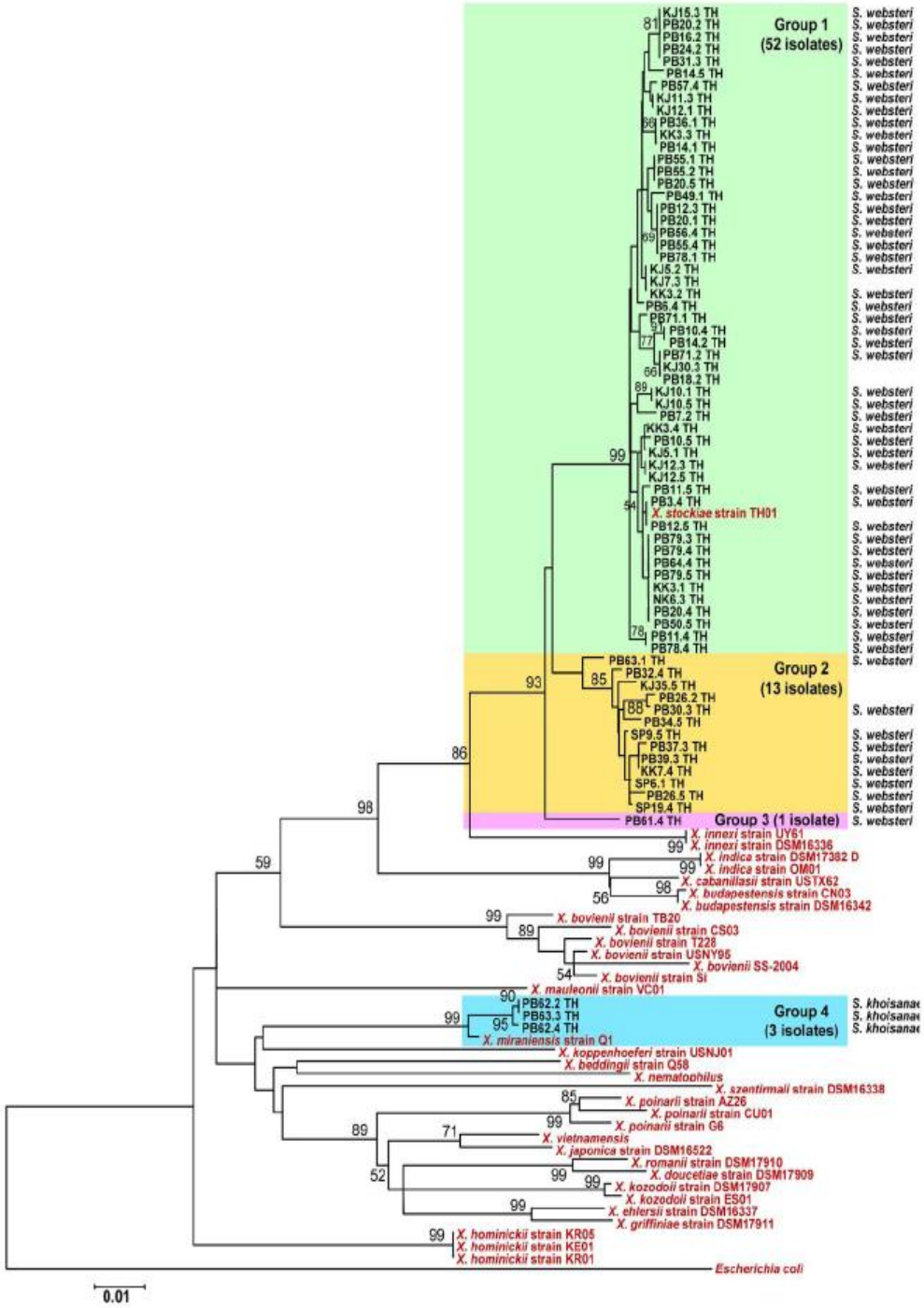
ได้แก่ *X. nematophila, X. bovienii, X. poinarii, X. beddingii* และ *X. luminescens* (Putz *et al*., 1990)

จากรายงานการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยใช้ เทคนิค ribotyping ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (endonucleases) บริเวณ 16S rDNA ด้วยวิธีrestriction fragment length polymorphism (RFLP) เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ต้องใช้เอนไซม์มากถึง 4 ชนิด ได้แก่ *Cfo*I, *Hinf*I, *Msp*I, และ *Alu*I หรือ *Hae*III หรือ *Dde*I ส่วนแบคทีเรีย *Photorhabdus* ต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ มากถึง 3 ชนิด ได้แก่ *Cfo*I, *Alu*I และ *Hae*III และเพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองสกุล (Brunel *et al*., 1997) ต้องใช้อีก 3 เอนไซม์ได้แก่ *Cfo*I, *Alu*I และ *Hinf*I หรือ *Dde*I หรือ *Hae*III หรือ *Msp*I เนื่องจากการนำเทคนิค RFLP มาใช้ในการจำแนกชนิดต้องใช้เอนไซม์จำนวนมาก จึงไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังไม่สามารถจำแนกได้ทุกชนิด (Lengyel *et al*., 2005; Brunel *et al*., 1997; Fischer-Le Saux *et al*., 1998)

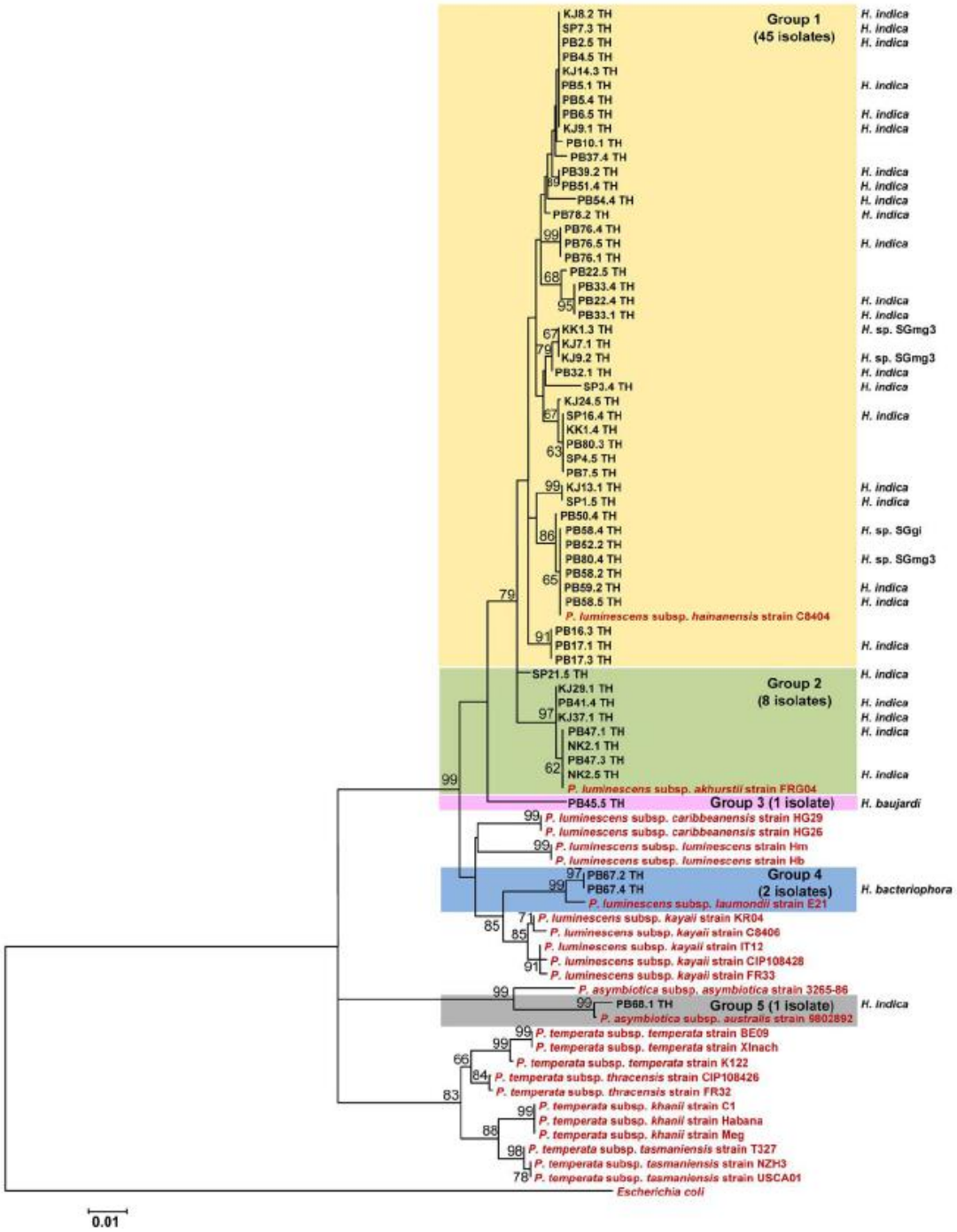
DNA sequencing เป็นวิธีการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ที่นิยมนำมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์คือยีนที่มีการแสดงออกในทุกเซลล์หรือทุกเนื้อเยื่อ และระดับการแสดงออกของยีนต้องคงที่หรือมีความผันแปรน้อย (housekeeping genes) ได้แก่ 16S rRNA, *asd, ompR, recA*, และ *sarC* (Sergeant *et al*., 2006) ในปี ค.ศ. 1999 Fischer-Le Saux และคณะ ได้วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เพื่อแยกความแตกต่างของ *P. luminescens, P. temperata* และ *P. asymbiotica* พบว่าไม่สามารถแยก *P. luminescens* subsp. *luminescens* และกลุ่มของ *P. aymbiotica* แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ไม่สามารถแยกความแตกต่างในระดับชนิด และระดับ subspecies ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* ได้ (Akhurst *et al*., 2004) ต่อมามีรายงานว่ายีน *recA* และ *dnaN* สามารถใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ได้ดีกว่าการใช้ยีน *gyrB, rplB* และ *gltX* และ concatenated ของทั้ง 4 ยีนคือ *recA, gyrB, dnaN* และ *gltX* อีกทั้งพบว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *recA* สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองสกุลได้ดีที่สุด เนื่องจาก 16S rRNA และ *rplB* ไม่เหมาะสมในการจำแนกถึงระดับชนิด เพราะเป็นยีนที่มีความแปรผันต่ำ (conserved gene) ส่วน *gyrB, rplB* และ *gltX* ไม่สามารถแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ได้ทุกชนิด ต่อมาในปี ค.ศ. 2012 Thanwisai และคณะ ได้ใช้ยีน *recA* ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่พบในประเทศไทยได้ทุกชนิด และได้ศึกษาสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลที่พบในประเทศไทยได้และจากประเทศอื่นทั่วโลก ดังภาพที่ 5-6 ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกยีน *recA* มาใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองสกุล

ความหลากชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในประเทศไทย

ปัจจุบันมีรายงานการพบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* 24 ชนิดและแบคทีเรีย *Photorhabdus* 5 ชนิด จากหลายประเทศทั่วโลก (ตารางที่ 3 และ 4) สำหรับประเทศไทยยังมีการศึกษาอยู่น้อย มีรายงานพบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* เพียง 2 ชนิด ได้แก่ *X. stockiae* และ *X. miraniensis* (Tailliez *et al*., 2006; Thanwisai *et al*., 2012) และ *Photorhabdus* เพียง 2 ชนิด (4 subspecies) ได้แก่ *P. luminescens* subsp. *akhurstii, P. luminescens* subsp. *hainanensis*, *P. luminescens* subsp. *laumondii* และ *P. asymbiotica* subsp. *australis* (Maneesakorn *et al*., 2011; Thanwisai *et al*., 2012)



ภาพที่ 5 แสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* โดยใช้ยีน *recA* ที่มา: Thanwisai *et al*. 2012



ภาพที่ 6 แสดง Phylogenetic tree ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* โดยใช้ยีน *recA* ที่มา: Thanwisai *et al*. 2012

บทที่ 3
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*

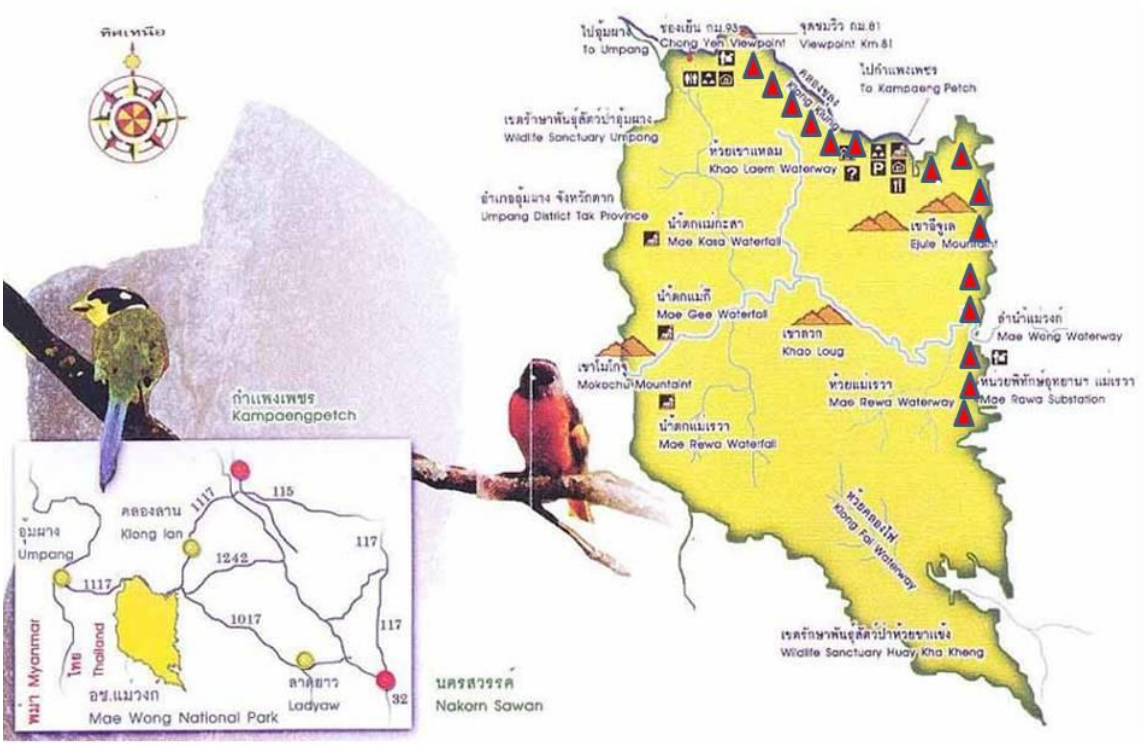
เตรียมอาหารเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) เพื่อใช้ในการล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยนำกล่องพลาสติกที่มีรูระบายอากาศ ใส่แป้งข้าวเจ้า 200 กรัม น้ำผึ้ง 100 มิลลิลิตร กลีเซอรอล 100 มิลลิลิตร และผงยีสต์ 50 กรัม ผสมให้เข้ากัน นำไข่ของหนอนกินรังผึ้งประมาณ 200-300 ฟอง วางลงบนอาหารที่เตรียมไว้ เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ จะได้ตัวอ่อนของหนอนกินรังผึ้งเพื่อใช้ในการทดลอง (ภาพที่ 7) ในขั้นตอนการล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินต่อไป

ภาพที่ 7 การเตรียมอาหารเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง

2. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ทั้งหมด 110 บริเวณ/จุด แต่ละบริเวณ/จุด เก็บดิน 5 ตัวอย่าง แต่ละบริเวณ/จุดที่เก็บตัวอย่างดินห่างกันประมาณ 10 เมตร ดังนั้นทำการเก็บดินรวมทั้งหมดเป็น 550 จุดย่อย เก็บโดยขุดดินลึกจากผิวดินประมาณ 10 เซนติเมตร แต่ละจุดเก็บดินประมาณ 500 กรัม เก็บในถุงพลาสติกเพื่อป้องกันไม่ให้ดินสูญเสียความชุ่มชื้น จดบันทึกตำแหน่งที่เก็บดิน เช่น Longtitude, Latitude และ Altitude และบันทึกปัจจัยกายภาพของดิน เช่น อุณหภูมิ (Temperature) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความชื้น (Moisture) รวมทั้งบันทึกภาพแต่ละตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดิน (ภาคผนวก ก และ ข) บริเวณที่เก็บตัวอย่างดินโดยสังเขป (ภาพที่ 8) รวมทั้งบันทึกภาพแต่ละตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดิน แล้วนำตัวอย่างดินที่เก็บ

ได้มาทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร



ภาพที่ 8 แสดงแผนที่ของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์และตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดิน ( )

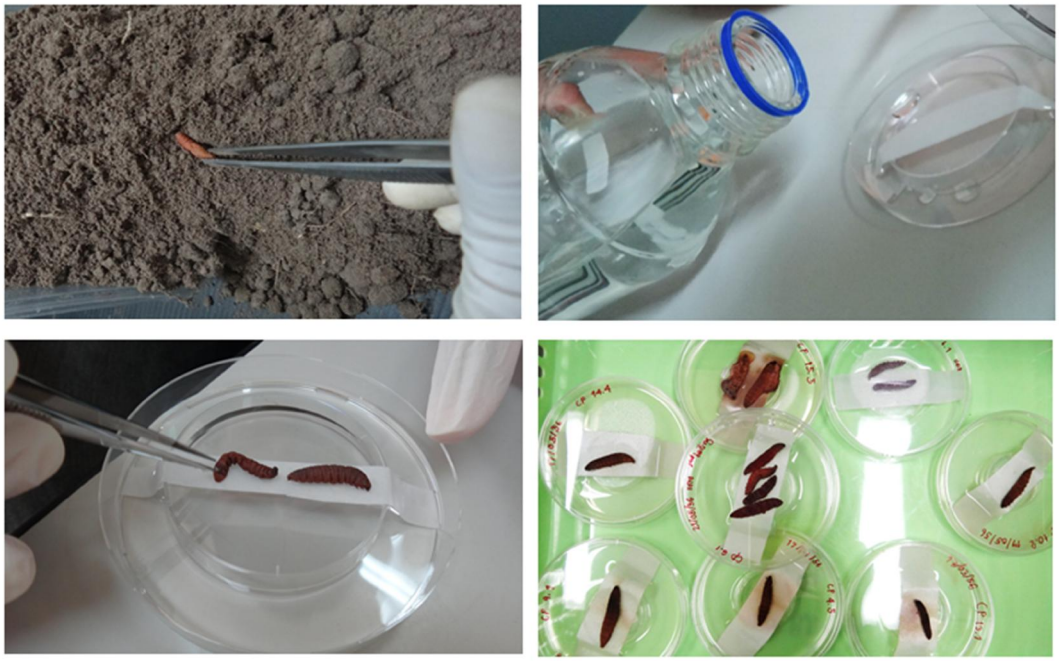
3. แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินด้วยวิธี Baiting technique

แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินโดยใช้หนอนกินรังผึ้งเป็นเหยื่อล่อ (Baiting) โดยเทดินใส่กล่อง จากนั้นวางหนอนกินรังผึ้ง 5 ตัวบนผิวดิน ปิดฝากล่อง แล้ววางกล่องแบบกลับหัว เพื่อให้หนอนกินรังผึ้งมุดเข้าไปในดิน เป็นการเพิ่มโอกาสให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ไชเข้าหนอนกินรังผึ้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน (ภาพที่ 9) หลังจากนั้นทำการเก็บซากหนอนกินรังผึ้ง (Beding and Akhurst, 1975)

ภาพที่ 9 การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินโดยใช้หนอนกินรังผึ้งเป็นเหยื่อล่อ (Baiting technique)

4. แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากหนอนกินรังผึ้งด้วยวิธี White trap

แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากซากหนอนกินรังผึ้ง โดยใช้วิธี White trap (White, 1927) นำซากหนอนกินรังผึ้งใส่ลงในกระดาษกรองเปียก จากการแช่ในน้ำกลั่นบน Petri dish บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 วัน ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระยะติดต่อ (Infective juvenile) จะออกมาจากซากหนอนกินรังผึ้งและลงไปในน้ำกลั่น (ภาพที่ 10) ทำการตรวจดูไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป จากนั้นทำการล้างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยน้ำกลั่น แล้วเก็บไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะติดต่อในตู้เย็นอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 10 แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากซากหนอนกินรังผึ้งด้วยวิธี White trap

5. การแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

นำซากหนอนกินรังผึ้งที่ตายด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 100% รอให้แห้ง จากนั้นใช้ปากคีบปลายแหลมฉีกตัวหนอนบริเวณปล้องที่สามแล้วใช้ sterile loop แตะบริเวณที่เป็นน้ำเลือด (Hemolymph) นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร Nutrient bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride agar (NBTA) ปิดฝาอาหารด้วยการพันพาราฟิล์มแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 3-4 วัน สังเกตลักษณะโคโลนีที่มีสีเขียวหรือสีน้ำเงิน

6. การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธีอณูชีววิทยา

6.1 การสกัดดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

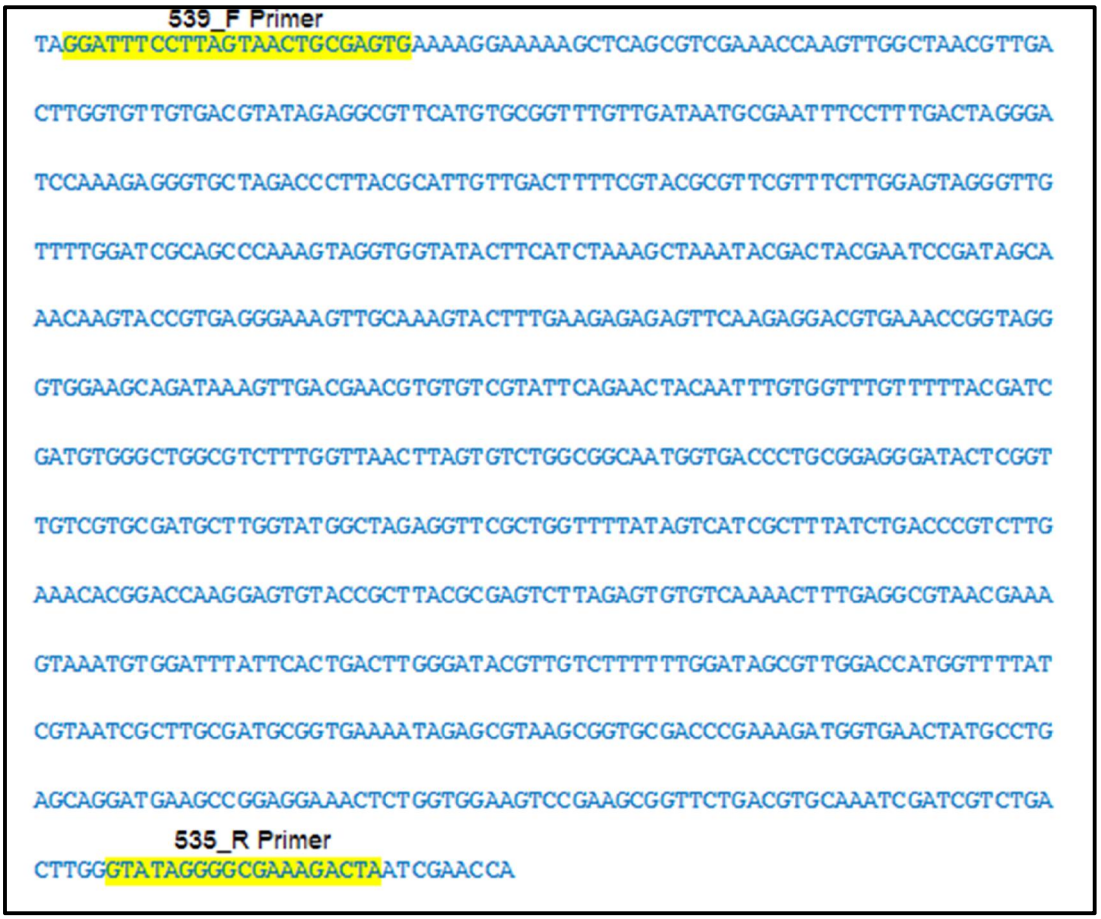
บดไส้เดือนศัตรูแมลงด้วย pipette tip ขนาด1000 ไมโครลิตรใน ATL buffer (Qiagen, Germany) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำให้เซลล์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแตกด้วยการแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ Proteinase K ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เอนไซม์ทำลายโปรตีน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ Proteinase K นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นเซลล์และโปรตีนทิ้งไป ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นปริมาตร 5 โมลาร์ ปริมาตร 6.5 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (Aljanabi and Martinez, 1997) ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอร์ 70 % ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา30 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง รอให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปละลายในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Sterile distilled water) ปริมาตร 12 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

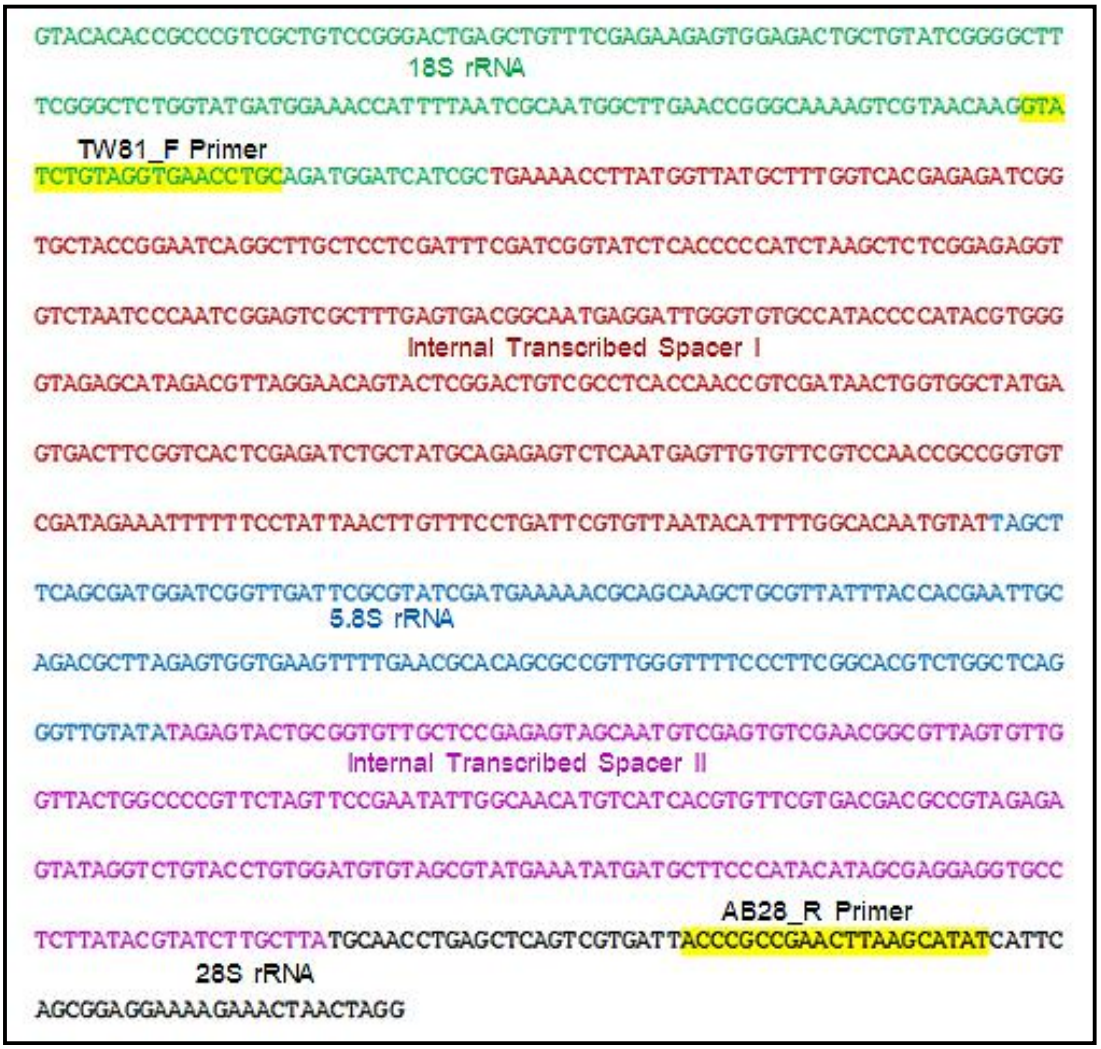
จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 28S ด้วยไพร์เมอร์ 539_F และ 535_R ผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาด 870 คู่เบส (Stock *et al*., 2001) (ตารางที่ 5 และภาพที่ 11) และจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ด้วยไพรเมอร์ TW81_F และ AB28_R ผลผลิต PCR ที่ได้มีขนาด 800-850 คู่เบส (Hominick *et al*., 1997) (ตาราง 5 และภาพที่ 12)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 10ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ (ความเข้มข้น 25 ไมโคโมลาร์) ปริมาตร 1.4 ไมโครลิตร dNTPs (ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร *Tag* DNA polymerase (Sigma, USA) (ความเข้มข้น 100 ยูนิต) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์แต่ละเส้น (BioDesign Co., Ltd., Thailand) (ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตรและเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 10 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems; Life Technologies,

Carlsbad, California) ปฏิกิริยาสำหรับยีน 28S rDNA มีดังนี้ Initial denaturing ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และ Final Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที และสำหรับยีน internal transcribed spacer (ITS) มีดังนี้ Initial denaturing ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ และ Final Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอกาโรสเจล (Agarose gel) 1.2% ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลท์ ในสารละลาย TBE buffer เป็นเวลา 37 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูภายใต้เครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat, France) โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (GeneDireX, Taoyuan, Taiwan) เป็นตัวเปรียบเทียบ พร้อมบันทึกภาพ



ภาพที่ 11 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ 539_F และ 535_R จับบริเวณยีน 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* (accession number AY841762.1)



ภาพที่ 12 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ TW81_F และ AB28_R จับบริเวณยีน ITS ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. megidis* (accession number AY321408.1)

ตารางที่ 5 แสดงคู่ไพรเมอร์สำหรับยีน 28S rDNA ยีน ITS และยีน *recA*

ยีนเป้าหมาย	ไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ความยาวผลผลิตพีซีอาร์	เอกสารอ้างอิง
28S rDNA	539_F 535_R	GGATTTCCTTAGTAACTGCGAGTG TAGTCTTTCGCCCCTATAC	870 คู่เบส	Stock *et al*., 2001
ITS	TW81_F AB28_R	GTTTCCGTAGGTGAACCTGC ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT	1000-1100 คู่เบส	Hominick *et al*., 1997
recA	recA_F recA_R	GCTATTGATGAAAATAAACA RATTTTRTCWCCRTTRTAGCT	890 คู่เบส	Tailliez *et al*., 2009

7. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

7.1 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

นำโคโลนีเดี่ยวของแต่ละไอโซเลตที่ได้จากการแยกแบคทีเรียบนอาหาร NBTA มาเลี้ยงในอาหารเหลว Luria-Bertani (LB broth) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,0000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured cell) (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) โดยเติม GT buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วใช้ไปเปต ดูดขึ้นและลงเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมด้วยเครื่อง Vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นเติม แอลกอฮอล์ 100% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วผสมด้วยเครื่อง Vortex ย้ายตัวอย่างใส่ใน GD column ที่อยู่ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง จากนั้นเติม W1 wash buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง จากนั้นเติม Wash buffer (ที่เติม 75% ethanol แล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใสด้านล่าง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นย้าย GD column ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube อันใหม่ แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อชะดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอกาโรสเจล 0.8 % ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลท์ ในสารละลาย TBE buffer เป็นเวลา 37 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูภายใต้เครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat, France) โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (GeneDireX, Taoyuan, Taiwan) เป็นตัวเปรียบเทียบ พร้อมทำการบันทึกภาพและเก็บที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

7.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

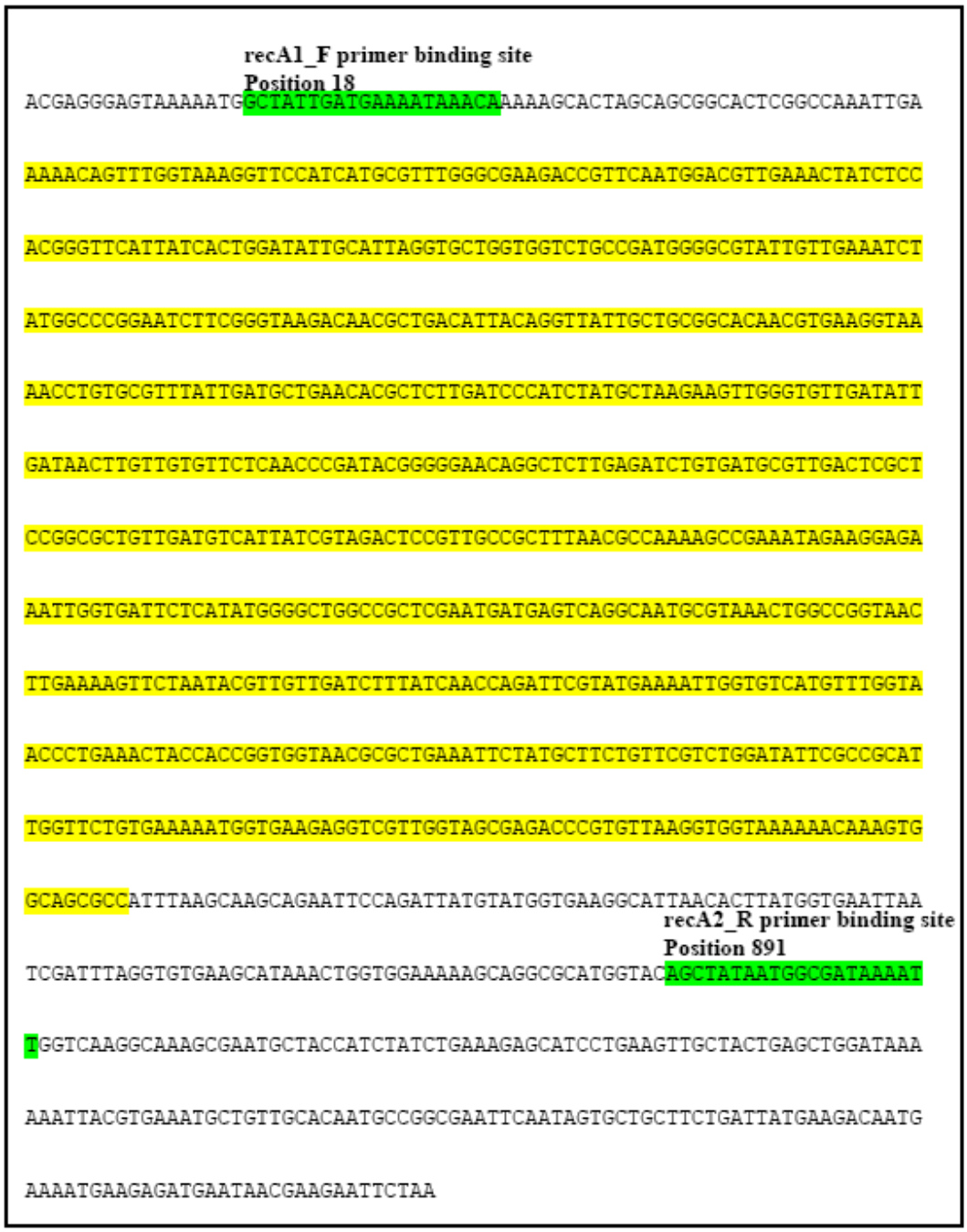
จำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *recA* โดยใช้ไพรเมอร์ recA_F และ recA_R (Tailliez *et al*. 2009) ผลผลิต PCR ที่ได้ของแบคทีเรียทั้ง 2 สกุลนี้จะมีขนาด 890 คู่เบส (ตารางที่ 5 ภาพที่ 13 และภาพที่ 14)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ (ความเข้มข้น 25 ไมโคโมลาร์) ปริมาตร 1.4 ไมโครลิตร dNTPs (ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (Sigma, USA) (ความเข้มข้น 100 ยูนิต) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์แต่ละเส้น (BioDesign Co., Ltd., Thailand) (ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตรและเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 10 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems; Life Technologies, Carlsbad, California)

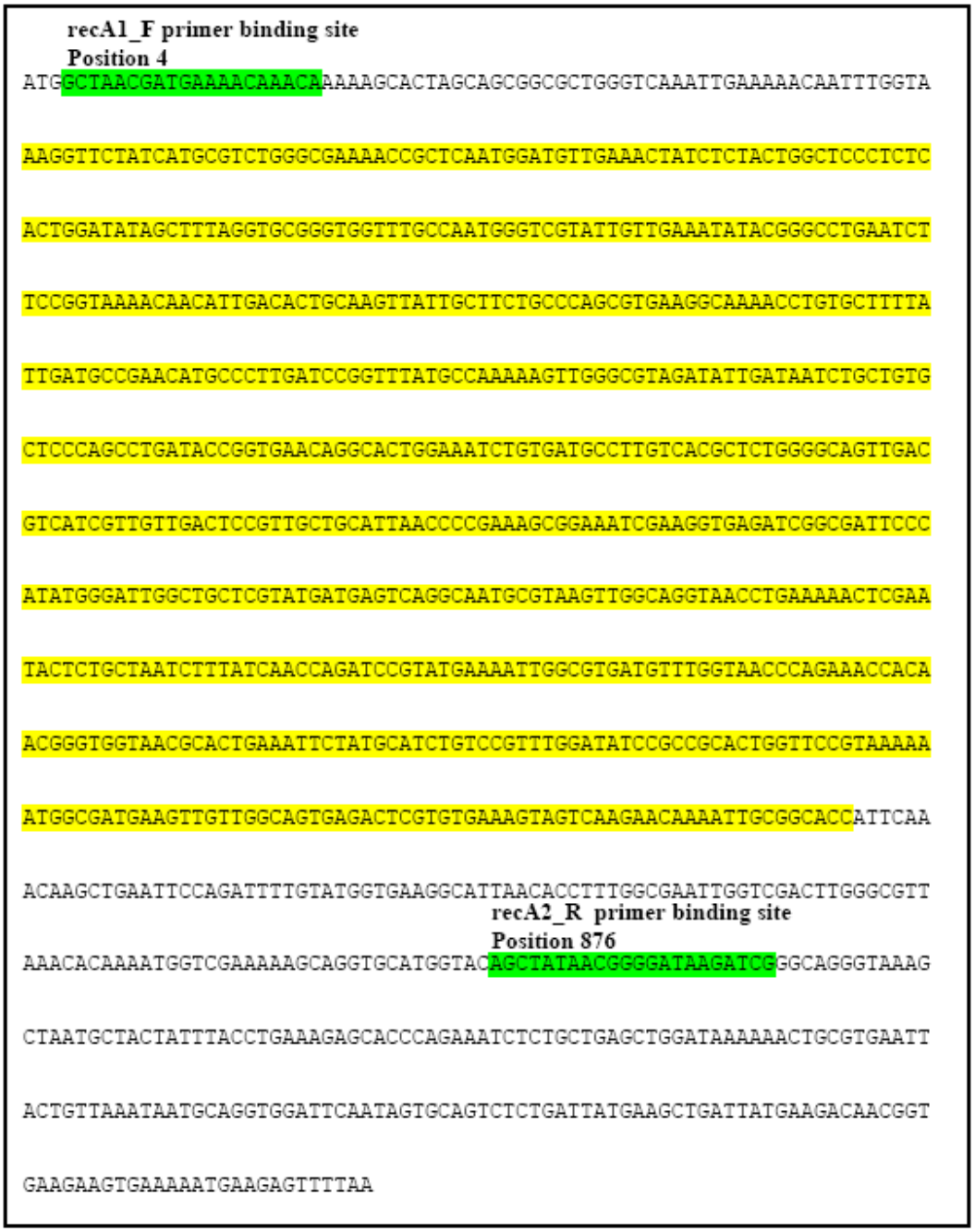
ปฏิกิริยาสำหรับยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* มีดังนี้ Initial denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ Final Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที และปฏิกิริยาสำหรับยีน *recA* ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* มีดังนี้ Initial denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที Denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ และ Final Extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอกาโรสเจล (Agarose gel) 1.2% ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลท์ ในสารละลาย TBE buffer เป็นเวลา 37 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูภายใต้เครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat, France) โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (GeneDireX, Taoyuan, Taiwan) เป็นตัวเปรียบเทียบ พร้อมบันทึกภาพ

8. การทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์

นำผลผลิตพีซีอาร์ทั้งของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) เติม Gel/PCR Buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใน PCR product ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมกันด้วยเครื่อง vortex จากนั้นย้ายสารละลายใส่ใน DFH column ที่อยู่ใน collection tube ขนาด 2 ไมโครลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง แล้วเติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 3 นาที จากนั้นย้าย DFH column มาใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube อันใหม่ เติม Elution buffer ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอกาโรสเจล 1.2 % ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลท์ ในสารละลาย TBE buffer แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูภายใต้เครื่อง UV transilluminator (Vilber Lourmat, France) โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (GeneDireX, Taoyuan, Taiwan) เป็นตัวเปรียบเทียบ พร้อมทำการบันทึกภาพ



ภาพที่ 13 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน *recA* ของ *X. bovienii* SS-2004 (Accession number: NC_013892.1) สีเหลืองแสดงบริเวณยีน *recA* ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส



ภาพที่ 14 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์จับบริเวณยีน *recA* ของ *P. luminescens* subsp. *laumondii* TTO1 (Accession number NC_005126.1) สีเหลืองแสดงตำแหน่งของยีน *recA* ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบส

9. การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยบริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี (http://macrogen.com) โดยใช้ไพร์เมอร์เช่นเดียวกับการทำ PCR

10. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบความถูกต้องของ Chromatograms และลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม SeqManII (DNASTAR inc., Wisconsin, USA) จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ด้วยการ BLAST ลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

11. ศึกษาสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ

ดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 28S rDNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง*Steinernema* และลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* ดาวน์โหลดลำดับเบสบริเวณยีน *recA* ของแบคทีเรียแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในฐานข้อมูล NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม Clustal W (Thompson *et al*., 1994) และศึกษาสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้ Maximum likelihood ด้วยวิธี Tamura-nei model กำหนดค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA version 6 (Tamura *et al*., 2013)

12. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดินกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดินกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม STATA version 11 (Stata Corp, College Stataion, Texas, USA)

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

จากการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 110 บริเวณ จำนวนดิน 550 ตัวอย่าง จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธี Baiting technique ได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต (4.36%) แบ่งเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 3 ไอโซเลต ซึ่งไม่สามารถจำแนกได้ในระดับชนิด ส่วนอีก 21 ไอโซเลต เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ที่จำแนกชนิดได้แล้วจำนวน 7 ไอโซเลต ส่วนอีก 14 ไอโซเลต ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อราระหว่างการเก็บตัวอย่างทำให้ไม่สามารถหรือสกัดได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย

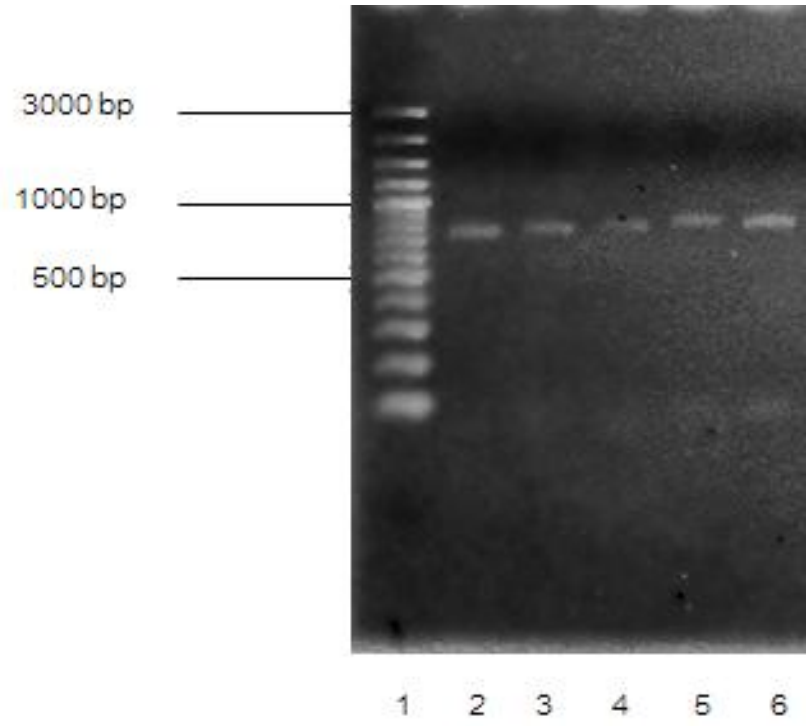
จากการสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร NBTA ทั้งหมด 24 ไอโซเลต พบโคโลนีสีน้ำเงิน ลักษณะโค้งนูน (covex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย (umbonated) จำนวน 3 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็นแบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* และโคโลนีสีเขียว ลักษณะโค้งนูน (covex) หรือนูนตรงกลางโคโลนีเล็กน้อย ขอบเรียบ จำนวน 21 ไอโซเลต จำแนกเป็นแบคทีเรียในสกุล *Photorhabdus* (ภาพที่ 15)

ภาพที่ 15 ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร NBTA (ซ้าย) แบคทีเรียสกุล *Xenorhabdus* และ (ขวา) แบคทีเรียสกุล *Photorhabdus*

2. การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งสองสกุลด้วยวิธี PCR โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน 28S rDNA ผลผลิต PCR ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 870 คู่เบส และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน internal transcribed spacer (ITS) ผลผลิต PCR ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 890 คู่เบส (ภาพที่ 16) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งสองสกุล (ภาคผนวก ค) ทำ BLASTN โดยเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่

มีรายงานแล้วในฐานข้อมูล NCBI สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 7 ไอโซเลต โดยจำนวน 3 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. indica* ซึ่งมีค่าความเหมือนอยู่ที่ 99% ส่วนอีก 2 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. baujardi* ซึ่งมีค่าความเหมือนอยู่ที่ 99% และอีก 2 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *H. amazonensis* หรือ *H. baujardi* ซึ่งมีค่าความเหมือนคล้ายอยู่ที่ 99% (ตารางที่ 6)



ภาพที่ 16 ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน ITS จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* ตามลำดับ บน 1.2% agarose gel (Lane1: Standard ladder, Lane2: eMW12.3 TH *Steinernema* spp., Lane3: eMW16.5 TH *Steinernema* spp., Lane4: eMW49.3TH *H. indica*, Lane5: eMW59.2 TH *H. indica*, Lane6: eMW59.5TH *H. indica*)

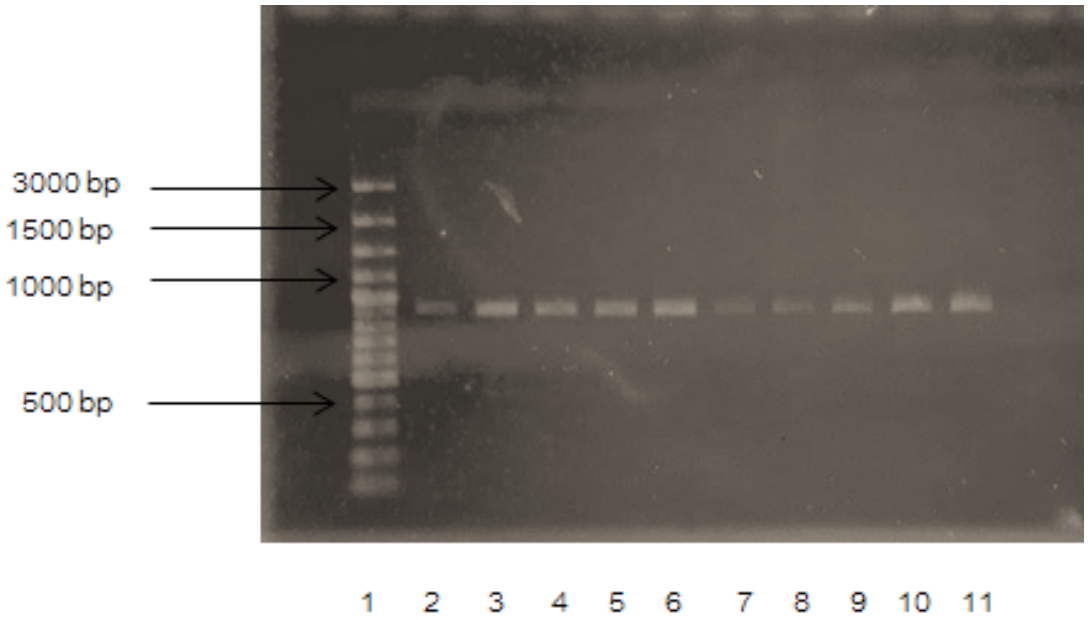
ตารางที่ 6 ผลจากการทำ BLASTN ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* จำนวน 7 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
eMW49.3_TH	*Heterorhabditis indica*	KJ938571.1	1165	100%	0	99%
eMW59.2_TH	*Heterorhabditis indica*	KJ938571.1	1163	100%	0	99%
eMW59.5_TH	*Heterorhabditis indica*	KF937813.1	1156	100%	0	99%
eMW74.2_TH	*Heterorhabditis baujardi*	AF548768.1	1181	98%	0	99%
eMW90.1_TH	*Heterorhabditis baujardi*	AF548768.1	1181	98%	0	99%
eMW103.2_TH	*Heterorhabditis baujardi*	AF548768.1	1181	98%	0	99%
eMW103.2_TH	*Heterorhabditis amazonensis*	DQ665222.1	1163	99%	0	99%
eMW107.5_TH	*Heterorhabditis baujardi*	AF548768.1	1181	98%	0	99%
eMW107.5_TH	*Heterorhabditis amazonensis*	DQ665222.1	1163	99%	0	99%

3. การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

แบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ที่แยกได้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีจำนวนทั้งหมด 24 ไอโซเลต แยกเป็นแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต และเป็นแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต

ทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองสกุลด้วยวิธี PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นบางส่วนของยีน *rec*A โดยผลผลิต PCR ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 900 คู่เบส (ภาพที่ 17) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียทั้งสองสกุล (ภาคผนวก ค) ทำ BLASTN โดยเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานแล้วในฐานข้อมูล NCBI สำหรับแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต พบว่า 1 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *X. japonica* strain DSM16522 ซึ่งมีค่าความเหมือน 98% และ 2 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *X. stockiae* strain 858516 ซึ่งมีค่าความเหมือน 97% (ตารางที่ 7) สำหรับแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต พบว่า 20 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* strain LB06 จำนวน 8 ไอโซเลต ซึ่งมีค่าความเหมือน 99% และ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04 จำนวน 12 ไอโซเลต ซึ่งมีค่าความเหมือน 99% จำนวน 3 ไอโซเลต 98% จำนวน 1 ไอโซเลต และ 97% จำนวน 8 ไอโซเลต และมี 1 ไอโซเลต มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. temperata* subsp. *temperata* strain K122 (ตารางที่ 8)



ภาพที่ 17 ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน recA จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยใช้ primer *rec*A_R และ *rec*A_F บน 1.2% agarose gel (Lane1: Standard ladder, Lane2: bMW1.2 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, Lane3: bMW4.4 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, Lane4: bMW4.5 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, Lane5: bMW8.1 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, Lane6: bMW12.3 TH *X. japonica,* Lane7: eMW16.3 TH *X. stockiae*, Lane8: bMW16.5 TH *X. stockiae,* Lane9: bMW27.4 *P. temperata* subsp. *temperate*, Lane10: bMW29.2 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*, Lane11: bMW29.4 TH *P. luminescens* subsp. *akhurstii*

ตารางที่ 7 ผลจากการทำ BLASTN ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rec*A ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
bMW12.3 TH	*Xenorhabdus japonica*	FJ823400.1	1079	100%	0	98%
bMW16.3 TH	*Xenorhabdus stockiae*	JX485977.1	1038	100%	0	97%
bMW 16.5 TH	*Xenorhabdus stockiae*	JX485977.1	1038	100%	0	97%

ตารางที่ 8 ผลจากการทำ BLASTN ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน recA ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
bMW1.2 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	LN835348.1	1110	99%	0	99%
bMW4.4 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	LN835348.1	1056	99%	0	99%
bMW4.5 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	LN835348.1	1110	99%	0	99%
bMW8.1 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	LN835348.1	1110	99%	0	99%
bMW27.4 TH	*Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*	FJ862014.1	1102	100%	0	99%
bMW29.2 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1033	100%	0	97%
bMW29.4 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1033	100%	0	97%
bMW38.3 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	LN835348.1	1100	99%	0	99%
bMW49.3 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	LN835348.1	1106	99%	0	99%
bMW49.4 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1127	100%	0	99%
bMW54.1 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	LN835348.1	1100	99%	0	99%
bMW56.5 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	LN835348.1	1112	99%	0	99%

ตารางที่ 8 ผลจากการทำ BLASTN ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน recA ของแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต ที่แยกได้จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ (ต่อ)

Code	Maximum identity to	BLASTN				
		Accession number	Total score	Query coverage	E value	Identity
bMW59.2 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1127	100%	0	99%
bMW59.5 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1127	100%	0	99%
bMW74.2 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1035	100%	0	97%
bMW86.4 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1035	100%	0	97%
bMW89.5 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1035	100%	0	97%
bMW90.1 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1058	100%	0	98%
bMW103.2 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1046	100%	0	97%
bMW107.2 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1046	100%	0	97%
bMW107.5 TH	*Photorhabdus luminescens* subsp. *akhurstii*	FJ862005.1	1046	100%	0	97%

4. สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 7 ไอโซเลต พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 3 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* ส่วนอีก 2 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. baujardi* และอีก 2 ไอโซเลต คือ eMW_103.2_TH และ eMW_107.5_TH มีความใกล้ชิดกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. baujardi* หรือ *H. amazonensis* (ภาพที่ 18) อย่างไรก็ตามเมื่อดูจากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแล้ว มีความเป็นไปได้ว่า eMW_103.2_TH น่าจะเป็น *H. amazonensis* เนื่องจากมีความใกล้ชิดกัน สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง eMW_107.5_TH น่าจะเป็น *H. baujardi* เพราะมีความใกล้ชิดกัน

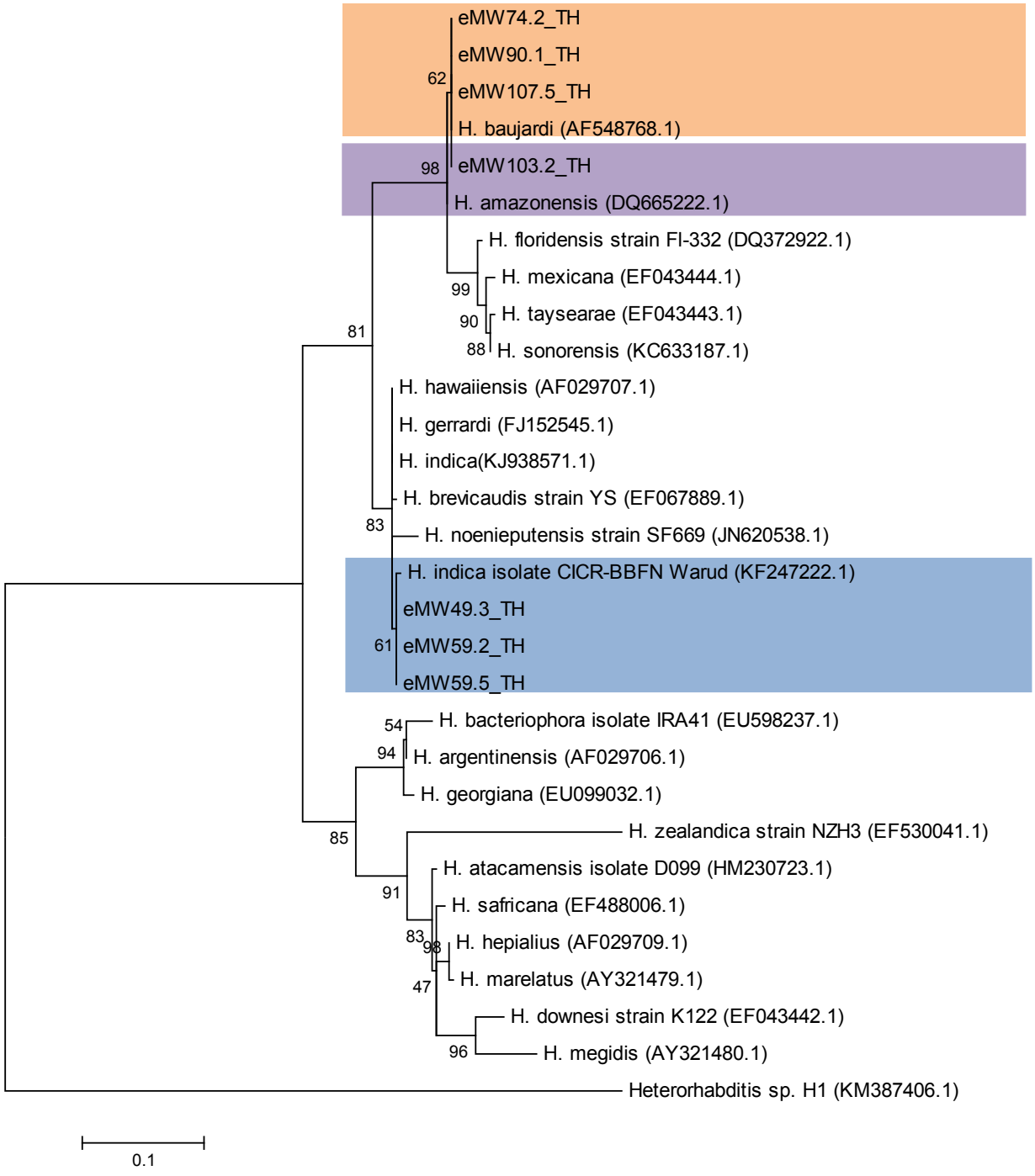
5. สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus*

การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต และแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 1 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *X. japonica* strain DSM16522 และอีก 2 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *X. stockiae* strain TH01 (ภาพที่ 19) สำหรับของแบคทีเรีย *Photorhabdus* พบว่าแบคทีเรีย *Photorhabdus* จำนวน 20 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* strain FRG04 และ *P. luminescens* subsp. *hainanensis* และอีก 1 ไอโซเลต มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* strain K122 (ภาพที่ 20)

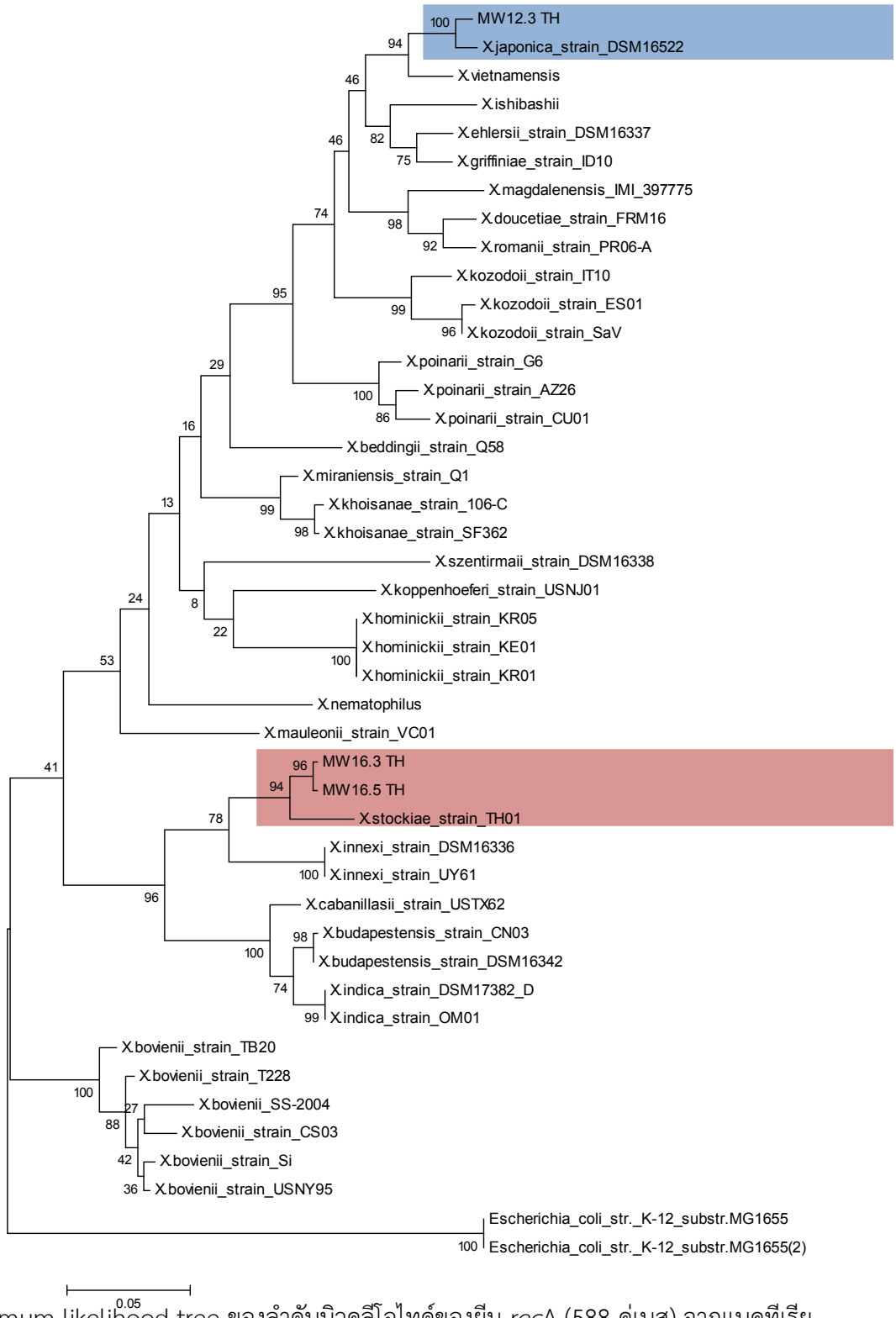
6. ความสัมพันธ์ระหว่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย

การศึกษาในครั้งนี้สามารถระบุชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลต พบว่า *H. indica* ทั้ง 3 ไอโซเลต อาศัยอยู่ร่วมกับแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. baujardi* อีก 3 ไอโซเลต ที่อาศัยอยู่ร่วมกับแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii* และมีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. amazonensis* เพียง 1 ไอโซเลต ที่อาศัยอยู่ร่วมกับแบคทีเรีย *P. luminescens* subsp. *akhurstii*

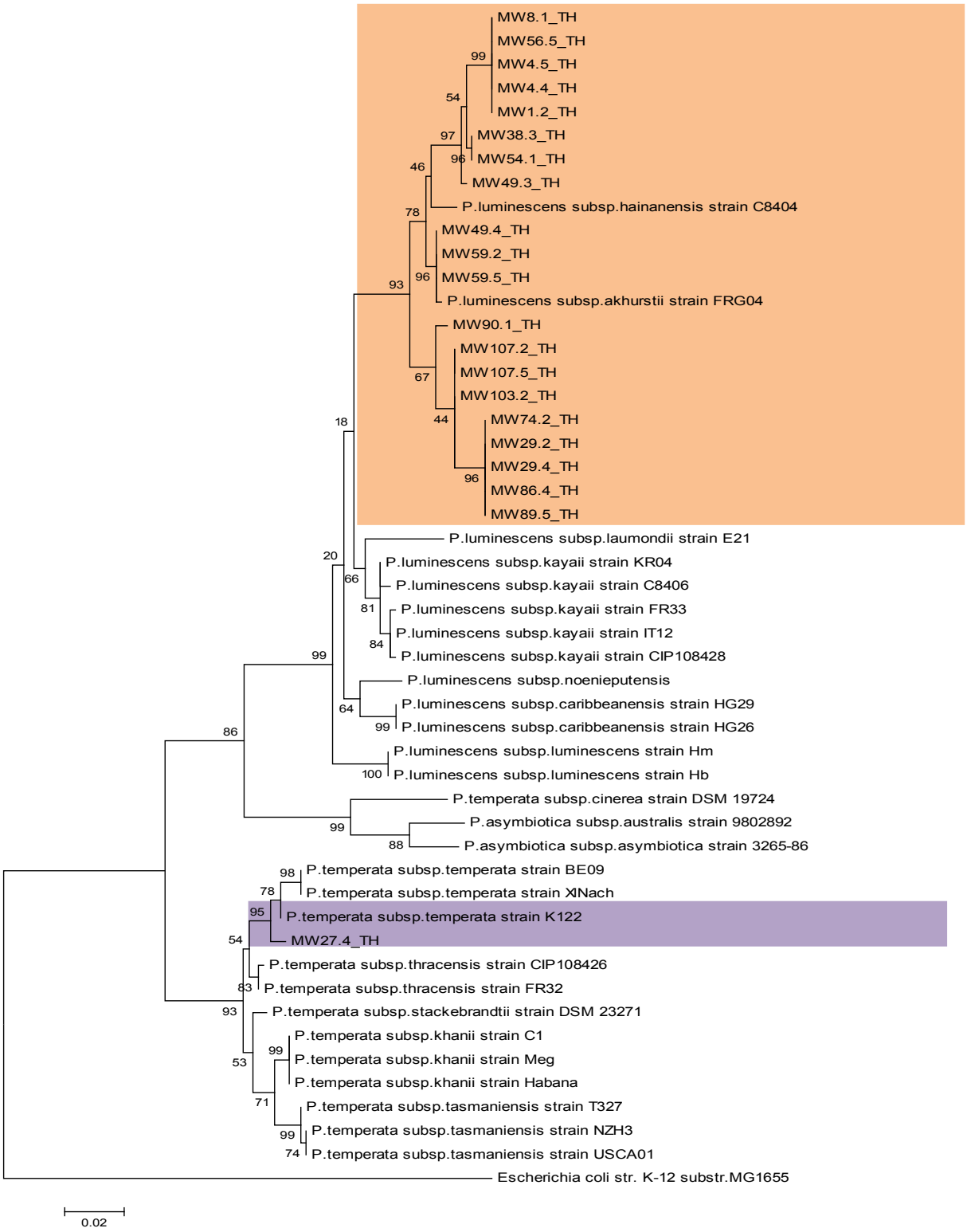
สำหรับแบคทีเรีย *X. japonica* พบว่าอาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ และแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperate* อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้



ภาพที่ 18 Maximum likelihood tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS จาก ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* โดยใช้โปรแกรม Mega version 6.0 วิเคราะห์ด้วย Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)



ภาพที่ 19 Maximum likelihood tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rec*A (588 คู่เบส) จากแบคทีเรีย *Xenorhabdus* วิเคราะห์ด้วย Kimura-2-parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)



ภาพที่ 20 Maximum likelihood tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rec*A (588 คู่เบส) จากแบคทีเรีย *Photorhabdus* วิเคราะห์ด้วย Kimura-2- parameter (Bootstrap 1,000 ครั้ง)

7. ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดินและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จำนวน 24 ตัวอย่าง พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากดินร่วนมากที่สุดจำนวน 19 ไอโซเลต (79.17%) รองลงมาเป็นดินร่วนปนทราย 4 ไอโซเลต (16.67%) และดินทราย 1 ไอโซเลต (4.17%) โดยไม่สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้จากดินเหนียว (ตารางที่ 9) สำหรับปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ ได้แก่ อุณหภูมิของดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (n=24) เฉลี่ย 22.8 $^{\circ}$C (14-31 $^{\circ}$C) ค่าความเป็นกรดด่างเฉลี่ย 6.7 (6.0-7.0) และความชื้นเฉลี่ย 2.0% (1.0-7.5%) พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับตัวอย่างดินที่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (n=526) (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 แสดงลักษณะดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จากตัวอย่างดินทั้งหมด 550 ตัวอย่าง

เนื้อดิน	**ดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง**	**ดินที่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง**
ดินร่วน	19 (79.17%)	361 (68.63%)
ดินร่วนปนทราย	4 (16.67%)	161 (30.61%)
ดินทราย	1 (4.17%)	1 (0.19%)
ดินร่วนปนทรายปนหิน	0 (0%)	1 (0.19%)
ดินร่วนปนหิน	0 (0%)	1 (0.19%)
ดินร่วนปนเหนียว	0 (0%)	1 (0.19%)
รวม	**24 (4.36%)**	**526 (95.63%)**

ตารางที่ 10 แสดงค่าอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความชื้น ที่พบและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 550 ตัวอย่าง

ปัจจัยทางกายภาพของดิน	**ดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (n=24)**	**ดินที่ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (n=526)**	***P*-value**
อุณหภูมิ ($^{\circ}$C) (ค่าเฉลี่ย)	14-31 (22.8)	14-31 (22.6)	0.59
ความเป็นกรด-ด่าง (ค่าเฉลี่ย)	6.0-7.0 (6.7)	5.6-7.1 (6.7)	0.38
ความชื้น (%) (ค่าเฉลี่ย)	1.0-7.5 (2.0)	1.0-8.0 (2.3)	0.71

บทที่ 5
อภิปรายและวิจารณ์ผล

จากการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 550 ตัวอย่าง จาก 110 บริเวณในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2557 – เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2558 สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากการใช้หนอนกินรังผึ้งเป็นเหยื่อล่อได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต โดยพบลักษณะการตายของหนอนกินรังผึ้งที่ถูกไชโดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* จะมีสีดำ ไม่เน่า และสีแดง ไม่เน่าจากการถูกไชโดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* ซึ่งเป็นไปตามการศึกษาของมณจันทร์ เมฆธน และคณะ (2544) โดยพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุลใดสกุลหนึ่งใน 2 สกุล จากซากหนอนกินรังผึ้งทั้งหมด 5 ตัว (Thanwisai *et al*., 2012)

การจำแนกสกุลและชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถทำได้โดยการดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ เพศเมีย และระยะติดต่อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Nguyen and Smart, 1996) แต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความคล้ายคลึงกันมากจึงทำให้ยากต่อการจำแนกระดับชนิด ดังนั้นจึงได้นำวิธีทางอณูชีววิทยาเข้ามาใช้ในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถใช้ในการจำแนกระดับชนิดได้ โดยยีนที่นิยมใช้คือ Internal transcribed spacer (ITS) rDNA ซึ่งเป็น non coding gene ใช้ในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* (Hominick *et al*., 1997; Maneesakorn *et al*., 2011; Thanwisai *et al*., 2012) และบริเวณ 28S rDNA ใช้ในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* (Stock *et al*., 2001; Nguyen *et al*., 2010; Thanwisai *et al*., 2012) เมื่อนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้ทั้งหมด 24 ไอโซเลต มาทำการจำแนกสกุลพบว่าเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 3 ไอโซเลต และยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้เนื่องจากมีการปนเปื้อนเชื้อราระหว่างการเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ส่วนอีก 21 ไอโซเลต เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้จำนวน 14 ไอโซเลต ส่วนอีก 7 ไอโซเลต จำแนกชนิดได้เป็น *H. indica* จำนวน 3 ไอโซเลต *H. baujardi* จำนวน 3 ไอโซเลต และอีก 1 ไอโซเลตเป็น *H. amazonensis* ซึ่งเป็นชนิดที่ยังไม่เคยมีรายงานพบในประเทศไทย การรายงานพบครั้งนี้ถือเป็นครั้งแรกที่พบ *H. amazonensis* ทั้งนี้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* เป็นชนิดที่พบได้บ่อยและพบได้ในหลายๆ จังหวัดของประเทศไทย (Thanwisai *et al*., 2012)

งานวิจัยครั้งนี้พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* เป็นจำนวนไอโซเลตที่มากกว่าสกุล *Steinernema* ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งพบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* ได้มากกว่า อย่างไรก็ตามมีรายงานพบการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 สกุล ได้เกือบทุกทวีป ยกเว้นแถบแอนตาร์กติก (Poinar, 1990) และรายงานการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* ในแถบอเมริกาเหนือและใต้, ออสเตรเลีย, ยุโรป, เอเชีย และ แอฟริกา (Tailliez *et al*., 2006; Tailliez *et al*., 2010) การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินได้จำนวน 24 ไอโซเลต (4.36%) พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* เพียง 3 ไอโซเลต ซึ่งน้อยกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* ที่พบมากถึง 21 ไอโซเลต ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Hominick *et al*. (1995) ที่รายงานการพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* มากที่สุดในแถบทวีปยุโรป คิดเป็น 37-48% เนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* มีความสามารถในการปรับตัวในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* (Nyasani *et al*., 2008) อย่างไรก็ตามในการศึกษาในครั้งนี้

ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างแน่นอนว่าการพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ได้มากกว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* ในเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์มีปัจจัยใดเข้ามาเกี่ยวข้อง ทั้งนี้อาจเนื่องจากอุณหภูมิที่ค่อนข้างเย็นตลอดปี

ในประเทศไทยเริ่มมีรายงานการสำรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในปี ค.ศ. 1998 โดย Nuchanart และ Sontirat ได้สำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย 8 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี พิจิตร พระนครศรีอยุธยา กาฬสินธุ์ มหาสารคาม ขอนแก่น หนองคาย และสระแก้ว พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* จำนวน 8 ไอโซเลต และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต ต่อมา (ธาริณี นาแสวง, ม.ป.ป., หน้า 661) ได้รายงานการสำรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ กาฬสินธุ์ มหาสารคาม ชัยภูมิ ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ และหนองบัวลำภู พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* และสกุล *Heterorhabditis* รวมกันเป็นจำนวน 7 ไอโซเลต และล่าสุดในปี ค.ศ. 2012 Thanwisai และคณะ ได้มีการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงครั้งใหญ่จาก 13 จังหวัดทั่วประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิ ขอนแก่น นครราชสีมา นครนายก นนทบุรี ปทุมธานี พระนครศรีอยุธยา นครปฐม สุพรรณบุรี ลพบุรี เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี และเพชรบุรี พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Steinernema* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *S. websteri* และ *S. khoisanae* โดยพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* มากที่สุดและพบในหลายๆ จังหวัด ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น เพชรบูรณ์ สุพรรณบุรี นครนายก และกาญจนบุรี และพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. khoisanae* จำนวนน้อยเพียง 3 ไอโซเลตและพบเพียงในจังหวัดเพชรบูรณ์เท่านั้น และมีรายงานการพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *H. indica, H. bacteriophora, H. baujardi, H*. sp. SGmg3 และ *H*. sp. SGgi โดยพบ *H. indica* มีการกระจายมากที่สุดในจังหวัดขอนแก่น นครนายก สุพรรณบุรี เพชรบูรณ์ และกาญจนบุรี รองลงมาพบ *H*. sp. SGmg3 ใน 3 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น เพชรบูรณ์ และกาญจนบุรี *H. bacteriophora*, *H. baujardi* และ *H*. sp. SGgi จากจังหวัดเพชรบูรณ์ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบ *H. indica* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่า *H. indica* เป็นชนิดที่พบได้บ่อยในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบว่า *H. amazonensis* ยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทยมาก่อน แต่อย่างไรก็ตามไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. amazonensis* รายงานพบครั้งแรกในเขตป่าอะเมซอน ประเทศบราซิล ซึ่งเป็นพื้นที่ป่าที่อุดมสมบูรณ์ ทั้งนี้อาจจะหมายความว่าในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์เป็นพื้นที่ที่อุดมสมบูรณ์

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* และ *Steinernema* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Internal Transcribed Spacer (ITS) และ 28S rDNA ตามลำดับ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีนมีความเหมาะสมในการจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทยทั้ง 2 สกุล (Hominick *et al*., 1997; Stock *et al*., 2001; Nguyen *et al*., 2010; Thanwisai *et al*., 2012) จากการแยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* และ *Heterorhabditis* ตามลำดับ และจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยยีน *recA* (Thanwisai *et al*., 2012) พบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* ทั้งหมดจำนวน 3 ไอโซเลต โดยแยกเป็น แบคทีเรีย *X. stockiae* จำนวน 2 ไอโซเลต และแบคทีเรีย *X. japonica* จำนวน 1 ไอโซเลต ในขณะเดียวกันพบแบคทีเรีย *Photorhabdus* ทั้งหมด 21 ไอโซเลต โดยเป็น *P. luminescens* subsp. *akhurstii* จำนวน 20 ไอโซเลต โดยมี *H. indica* และ *H. baujardi* เป็นโฮสต์ ส่วนอีกหนึ่งไอโซเลตเป็นแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* การศึกษาครั้งนี้เป็นการสำรวจพบเป็นครั้งแรกในประเทศไทยที่มีการรายงานพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิด *H. amazonensis* และแบคทีเรีย *X. japonica* และ *P. temperata* subsp. *temperate* แสดงให้เห็นว่าใน

อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ของประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของทั้งแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

จากการศึกษาสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ของประเทศไทยให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Thanwisai *et al*. (2012) ที่มีการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย นั่นคือไส้เดือนฝอยแมลงศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* พบว่าส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *H. indica* และ *H. baujardi* อย่างไรก็ตามยังมีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* จำนวน 1 ไอโซเลต ที่มีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *H. amazonensis* ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย แต่มีรายงานพบครั้งแรกที่ประเทศบราซิล (Andalo *et al*., 2006)

จากการศึกษาสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และแบคทีเรีย *Photorhabdus* ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Thanwisai *et al*. (2012) ที่มีการแยกแบคทีเรียเหล่านี้จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย นั่นคือพบว่าแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวน 2 ไอโซเลต ที่มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *X. stockiae* และพบแบคทีเรีย *Xenorhabdus* จำนวนเพียง 1 ไอโซเลตมีความใกล้ชิดกับ *X. japonica* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานพบในประเทศไทย สำหรับสายสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของแบคทีเรีย *Photorhabdus* พบว่าส่วนใหญ่แบคทีเรียมีความใกล้ชิดกับ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรีย *Photorhabdus* อีก 1 ไอโซเลตที่มีความใกล้ชิดกับแบคทีเรีย *P. temperata* subsp. *temperata* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานพบในประเทศไทย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางกายภาพของดินกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง พบว่าค่าอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าความชื้นที่บันทึกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างดินที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Thanwisai และคณะ (2012) จากการศึกษานี้ไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในดินเหนียว อาจเป็นเพราะลักษณะของดินเหนียวทำให้การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต่ำลง เนื่องจากดินเหนียวมีช่องว่างระหว่างเม็ดดินและออกซิเจนภายในดินที่น้อย (Molyneux, 1984; Kung *et al*., 1990) ในทางตรงกันข้ามดินร่วนปนทราย ดินทราย และดินร่วน มีช่องว่างขนาดใหญ่ระหว่างเม็ดดิน ปริมาณสัดส่วนของอากาศจึงมีมากกว่าน้ำ ซึ่งสำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแล้วลักษณะดังกล่าวเหมาะสมต่อการนำอาหารสะสมไว้ภายในตัวมาใช้อย่างมีประสิทธิภาพ (Georgis and Poinar, 1993) ดังนั้นจึงพบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถมีชีวิตรอดได้เป็นระยะเวลานาน จึงมีโอกาสที่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในดินร่วนปนทราย ดินทราย และดินร่วน ได้บ่อยกว่าลักษณะดินชนิดอื่นๆ

ความชื้นในดินมีความสำคัญต่อการอยู่รอดและความสามารถในการเข้าทำลายแมลงอาศัย โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ในสภาพความชื้นต่ำหรือสูงมากๆ (Grant and Villani, 2003; Mauleon *et al*., 2006; Nielsen *et al*., 2008) ซึ่งส่งผลทำให้ความอยู่รอดต่ำเพราะไม่สามารถเคลื่อนที่หาแมลงอาศัยตัวใหม่ได้ ความชื้นในดินที่แตกต่างกันอาจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ต่างกัน โดยความชื้นในดินที่เหมาะสมของ *H. indica* อยู่ระหว่าง 8-18% ส่วน *S. themophilum* อยู่ระหว่าง 6-20% และ *S. glaseri* อยู่ระหว่าง 8-25% (Yadav, 2012)

อุณหภูมิของตัวอย่างดินเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของระยะตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยทั่วไปพบว่าอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 0 และสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงตายได้ และอุณหภูมิระหว่าง 10-15 องศาเซลเซียส สามารถควบคุมหรือจำกัดการเคลื่อนที่ของไส้เดือนฝอยได้

ในขณะที่อุณหภูมิสูงระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส ทำให้ความสามารถในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยลดลงได้ (Rohde *et al*., 2010)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของดินเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการอยู่รอดและความสามารถในการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยมีรายงานว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* สามารถอยู่รอดและเข้าทำลายแมลงอาศัยลดลงเพียงเล็กน้อยในดินที่มีการปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง pH 8-pH 4 และอัตราการอยู่รอดและเข้าทำลายลดลงต่ำมากที่สุดเมื่อ pH 10 (Kung et al. 1990) ทั้งนี้ในดินประกอบด้วยส่วนต่างๆ หลายชนิดได้แก่อากาศในดิน เช่น ก๊าซไนโตรเจน (N_2) ออกซิเจน (O_2) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) น้ำในดิน สารอินทรีย์ อนินทรีย์วัตถุหรือแร่ธาตุ ปัจจัยเหล่านี้อาจมีผลต่อการอยู่รอดหรือการพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บดินทั้งหมด 550 ตัวอย่าง ในเขตพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ แล้วทำการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากตัวอย่างดินโดยใช้หนอนกินรังผึ้งเป็นเหยื่อล่อ แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 สกุล คือ *Heterorhabditis* และ *Steinernema* ส่วนใหญ่เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* ซึ่งสามารถจำแนกชนิดได้เป็น *H. indica H. baujardi* และ *H. amazonensis* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย สำหรับแบคทีเรียแยกได้ 24 ไอโซเลต จำแนกชนิดเป็น 2 สกุล คือ *Xenorhabdus* จำนวน 3 ไอโซเลต แบ่งเป็น *X. stockiae* และ *X. japonica* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย และ *Photorhabdus* จำนวน 21 ไอโซเลต จำแนกชนิดได้เป็น *P. luminescens* subsp. *akhurstii* 20 ไอโซเลต และอีก 1 ไอโซเลตเป็น *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในประเทศไทย

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เป็นโฮสต์ของ *P. luminescens* subsp. *akhurstii* ส่วนมากเป็น *H. indica* สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. websteri* จะเป็นโฮสต์หลักของ *X. stockiae* และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. kushidai*

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถพบได้ในดินที่มีช่วงความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และความชื้นที่กว้าง ซึ่งค่าปัจจัยทางกายภาพของตัวอย่างดินที่พบและไม่พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาความหลากชนิดของทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* ในพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ของประเทศไทย ซึ่งผลที่ได้เป็นแนวโน้มที่ดีในการพบชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียที่ยังไม่เคยมีรายงานพบในประเทศไทย ได้แก่ *H. amazonensis* และ *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata* แสดงให้เห็นว่าพื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ น่าจะมีแมลงที่เป็นโฮสต์หลักของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. amazonensis* นอกจากนี้ยังพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดนี้เพียงหนึ่งไอโซเลตเท่านั้น แสดงว่ามีความหลากหลายที่ค่อนข้างต่ำ พื้นที่อุทยานแห่งชาติแม่วงก์อาจจะเป็นถิ่นที่อาศัยหลักของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดนี้ ถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงสภาพพื้นที่หรือสภาพภูมิอากาศอาจจะทำให้แมลงที่เป็นโฮสต์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดนี้สูญพันธุ์ไป และอาจจะส่งผลกระทบต่อเนื่องโดยอาจจะไม่สามารถพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดนี้ได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณอื่นๆ ของเขตอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ หรืออาจจะขยายพื้นที่การเก็บตัวอย่างดินไปในอุทยานแห่งชาติอื่นๆ ที่มีความอุดมสมบูรณ์ที่อาจจะพบความหลากหลายของทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* นอกจากนี้อาจจะศึกษาเพิ่มเติมถึงการนำนำแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากการศึกษาในครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์ในการเป็น biological control agent ต่อไป หรือควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการหาสารประกอบทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่พบได้ในแบคทีเรีย *Xenorhabdus* และ *Photorhabdus* โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่มีคุณสมบัติในการกำจัดแมลงศัตรูพืชและจุลชีพที่ก่อโรคในมนุษย์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตต่อไป

บทที่ 7
บรรณานุกรม

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2544. ชีววิทยาของไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง *Heterorhabditis* sp. Thai isolate และการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียม. **วารสารข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา**. 11(3): 14-26.

บัญชา ชิณศรี, นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด, วัชรี สมสุข และพิมลพร นันทะ. 3-5 กุมภาพันธ์ 2542. อิทธิพลของเนื้อดินและความชื้นต่อการอยู่รอดและการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (All Strain). ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37: สาขาพืช สาขาส่งเสริมนิเทศศาสตร์เกษตร** (หน้า 326-332). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณีจันทร์ เมฆธน. 5-7 กุมภาพันธ์ 2544. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomopathogenic Nematode) สายพันธุ์ใหม่ในประเทศไทย. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39: สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม** (หน้า 189-196). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adams, B. J., Burnell, A. M. and Powers, T. O. 1998. A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. **Journal of Nematology**. 30: 22-39.

Aljanabi, S. M. and Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR based techniques. **Nucleic Acids Research**. 25: 4692-4693.

Akhurst, R. J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. **Journal of General Microbiology**. 121: 303-309.

Akhurst, R. J. 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp. bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. **Journal of General Microbiology**. 128: 3061-3065.

Akhurst, R. J. 1983. Taxonomy study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 33(1): 38-45.

Akhurst, R. J. and Boemare, N. E. 1988. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophillus* to species. **Journal of General Microbiology**. 134: 1835-1845.

Akhurst, R. J. and Boemare, N. E. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In R. Gaugler and H.K. Kaya (Eds.), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control** (pp. 75-90). USA: CRC Press.

Akhurst, R. J., Bedding, R. A., Bull, R. M. and Smith, D. R. J. 1992. An epizootic of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda) in sugar cane scarabaeids (Coleoptera). **Fundamental and Applied Nematology**. 15(1): 71-73.

Akhurst, R. and Dunphy, G. B. 1993. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria, nematodes, and their insect hosts. In N. Beckage, S. Thompson, and B. Federici (Eds.), **Parasites and Pathogens of Insects** (pp. 1-23). New York: Academic Press.

Akhurst, R. J., Boemare, N. E., Janssen, P. H., Peel, M. M., Alfredson, D. A. and Beard, C. E. 2004. Taxonomy of Australian clinical isolates of the genus *Photorhabdus* and proposal of *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica* subsp. nov. and *P. asymbiotica* subsp. *australis* subsp. nov**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 54: 1301-1310.

Amarasinghe, L. D., Hominick, W. M., Briscoe, B. R. and Reid, A. P. 1994. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in Sri Lanka. **Journal of Helminthology**. 68: 277-286.

An, R. and Grewal, P. S. 2010. *Photorhabdus temperata* subsp. *stackebrandtii* subsp. nov. (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). **Current Microbiology**. 61(4): 291-297.

An, R., and Grewal, P. S. 2011. *Photorhabdus luminescens* subsp. *kleinii* subsp. nov. (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). **Current Microbiology**. 62: 539-543.

Andaló, V., Nguyen, K. B. and Moino, A. 2006. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas. **Brazil Nematology**. 8: 853-867.

Anis, M., Shahina, F., Reid, A. P. and Rowe, J. 2002. *Steinernema asiaticum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Pakistan. **International Journal of Nematology**. 12: 220-231.

Balcerzak, M. 1991. Comparative studies on parasitism caused by entomogenous nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. The roles of the nematode-bacterial complex, and of the associated bacteria alone, in pathogenesis. **Acta Parasitologica Polonica**. 36: 175-181.

Bedding, R. A. and Akhurst, R. J. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. **Nematologica**. 21(1): 109-110.

Bedding, R. A., Akhurst, R. J. and Kaya, H. K. 1993. Future prospects for entomogenous and entomopathogenic nematodes. In R. A. Bedding, R. J. Akhurst and H. K. Kaya (Eds.), **Nematodes and Biological Control of Insect Pests** (pp. 11-20). East Melbourne, Australia: CSIRO Publications.

Bedding, R. A. and Molyneux, A. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). **Nematologica**. 28: 354-359.

Blaxter, M. L., De Ley, P., Garey, J. R., Lui, L. X., Scheldeman, P., Vierstraete, J. R., et al. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**. 392: 71-75.

Boemare, N. E. 2002. Biology, taxonomy and systematics. In R. Gaugler (Ed.), **Entomopathogenic Nematology** (pp. 35-56). New York: CABI Publishing.

Boemare, N. and Akhurst, R. J. 1988. Biochemical and physiological characterization of colony from variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). **Journal of General Microbiology**. 134: 751-761.

Boemare, N. E., Boyer-Giglio, M. H., Thaler, J. O., Akhurst, R. J. and Brehelin, M. 1992. Lysogeny and bacteriocinogeny in *Xenorhabdus nematophilus* and other *Xenorhabdus* spp**. Applied and Environmental Microbiolog.** 58: 3032-3037.

Boemare, N., Thaler, J. O. and Lanois, A. 1997. Simple bacteriological tests for phenotypic characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* phase variants. **Symbiosis**. 22: 167-175.

Brachmann, A. O. 2009. **Isolation and identification of natural products and biosynthetic pathways from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*.** Doctoral dissertation, Ph. D., Saarland University, Saarbrücken.

Brachmann, A. O., Schwär, G. and Bode, H. B. 2008. *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*: Potent secondary metabolite producers. **International Organization for Biological Control of Noxious Animals and Plants/West Palearctic Regional Section Bulletin**. 31: 151-156.

Burman, M. 1982. *Neoaplectana carpocapsae*: Toxin production by axenic insect parasitic nematodes. **Nematologica**. 28: 62-70.

Cabanillas, H. E., Poinar, G. O. Jr. and Raulston, J. R. 1994. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas**. Fundamental and Applied Nematology**. 17: 123-131.

Capinera, J. L. and Epsky, N. D. 1992. Potential for biological control of soil insects in the Caribbean basin using entomopathogenic nematodes. **Florida Entomologist**. 75: 525-532.

Chen, S., Li, X., Yan, A., Spiridonov, S. E. and Moens, M. 2006. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema hebeiense* sp n Rhabditida Steinernematidae, from North China. **Nematology**. 8(4): 563-574.

Ciche, T. A., Blackburn, M., Carney, J. R and Ensign, J. C. 2003. Photobactin: A catechol siderophore produced by *Photorhabdus luminescens*, an entomopathogen mutually associated with *Heterorhabditis bacteriophora* NC1 nematodes**. Applied and Environmental Microbiology**. 69: 4706- 4713.

Cimen, H., Lee, M. M., Hatting, J., Hazir, S. and Stock, S. P. 2014a. *Steinernema innovationi* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode species from South Africa. **Journal of Helminthology**. 3: 1-4.

Cimen, H., Lee, M. M., Hatting, J., Hazir, S. and Stock, S. P. 2014b. *Steinernema tophus* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Zootaxa**. 3821(3): 337-353.

Clausi, M., Longo, A., Rappazzo, G., Tarasco, E., and Vinciguerra, M. T. 2011. *Steinernema vulcanicum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode species from Sicily (Italy). **Nematology**. 13(4): 409-423.

Constant, P., Marchay, L., Fischer-Le Saux, M., Briand-Panoma, S. and Mauleon, H. 1998. Natural occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Guadeloupe Islands. **Fundamental and Applied Nematology**. 21: 667-672.

Couche, G. A. and Gregson, R. P. 1987. Protein inclusions produced by the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus*. **Journal of Bacteriology**. 169: 5279-5288.

Couche, G. A., Lehbach, P. R., Forage, R .G., Cooney, B. C., Smith, D. R. and Gregson, R. P. 1987. Occurrence of intracellular inclusions and plasmids in *Xenorhabdus* spp. **Journal of General Microbiology**. 133: 967-973.

Cutler, C. G. and Stock, S. P. 2003. *Steinernema websteri* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from China. **Nematologia Mediterranea**. 31: 215-224.

Dolinski, C., Kamitami, F., Machado, I. R. and Winter, C. E. 2008. Molecular and morphological characterization of heterorhabditid entomopathogenic nematodes from the tropical rainforest in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. 103: 150-159.

Doucet, M. M. A., and Doucet, M. E. 1990. *Steinernema ritteri* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) with a key to the species of the genus. **Nematologica**. 36: 257-265.

Doucet, M. M. A. and Gabarra, R. 1994. On the occurrence of *Steinernema glaseri* Steiner, 1929 (Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar, 1976. (Heterorhabditidae) in Cotalogue, Spain. **Fundamental and Applied Nematology**. 17: 441-443.

Doucet, M. M. A., Bertolotti, M. A. and Doucet, M. E. 2003. Morphometric and molecular studies of isolates of *Steinernema rarum* (Doucet, 1986) Mamaya, 1988 (Nematoda: Steinernematidae) from the province of Córdoba, Argentina. **Journal of Nematode Morphology and Systematics**. 6: 27-36.

Doucet, M. M. A. 1986. A new species of *Neoaplectana* Steiner, 1929 (Nematoda: Steinernematidae) from Cordoba, Argentina. **Revue de Nematologie**. 9: 317-323.

Edgington, S., Buddie, A. G., Moore, D., France, A., Merino, L. and Hunt, D. J. 2011. *Heterorhabditis atacamensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from the Atacama Desert, Chile. **Journal of Helminthology**. 85(4): 381-394.

Edgington, S., Buddie, A. G., Tymo, L. M.; France, A., Merino, L. and Hunt, D. J. 2009a. *Steinernema unicornum* sp. n. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Tierra del Fuego, Chile. **Journal of Nematode Morphology and Systematics**. 12(2): 113-131.

Edgington, S., Buddie, A. G., Tymo, L., Hunt, D. J., Nguyen, K. B., France, A. I., et al. 2009b. *Steinernema australe* n. sp. (Panagrolaimomorpha: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Isla Magdalena, Chile. **Nematology**. 11(5): 699-717.

Ehlers, R-U., Deseo, K. V. and Stackebrandt, E. 1991. Identification of *Steinernema* spp. (Nematoda) and their symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. from Italian and German soils. **Nematologica**. 37: 360-366.

Elawad, S., Ahmad, W. and Reid, A. P. 1997. *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from the Sultanate of Oman. **Fundamental and Applied Nematology**. 20(5): 435-442.

Emelianoff, V., Le Brun, N., Pages, S., Stock, P., Tailliez, P., Moulia, C., et al. 2008. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France). **Journal of Invertebrate Pathology**. 98: 211-217.

Farmer, J. J. 3rd., Jorgensen, J. H., Grimont, P. A., Akhurst, R. J., Poinar, G. O. Jr., Ageron, E., et al. 1989. *Xenorhabdus luminescens* (DNA hybridization group 5) from human clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. 27: 1594-1600.

Fayyaz, S., Khanum, T. A., Ali, S., Solangi, G. S., Gulsher, M. and Javed, S. 2015. *Steinernema balochiense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Pakistan. **Zootaxa**. 3904(3): 387-402.

Ferreira, T., Van Reenen, C. A., Endo, A., Spröer, C., Malan, A. P. and Dicks, L. M. T. 2013a. Description of *Xenorhabdus khoisanae* sp. nov., the symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema khoisanae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 63: 3220-3224.

Ferreira, T., Van Reenen, C., Pages, S., Tailliez, P., Malan, A. P. and Dicks, L. M. T. 2013b. *Photorhabdus luminescens* subsp. *noenieputensis* subsp. nov., a symbiotic bacterium associated with a novel *Heterorhabditis* species related to *Heterorhabditis indica*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 63: 1853-1858.

Ferreira, T., Van Reenen, C. A., Endo, A., Tailliez, P., Pagès, S., Spröer, C., et al. 2014. *Photorhabdus heterorhabditis* sp. nov., a symbiont of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis zealandica.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 64(5): 1540-1545.

Fischer, P. and Führer, E. 1989. Effect of acidicty on the entomophilic nematode *Steinernema kraussei* Steiner. **Biology and Fertility of Soils**. 9: 174-177.

Fischer-Le Saux, M., Viallard, V., Brunel, B., Normand, P. and Boemare, N. E. 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 49: 1645-1656.

Forst, S., Dowds, B., Boemare, N. and Stackebrandt, E. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. Bugsthat Kill Bugs. **Annual Review of Microbiology**. 51: 47-72.

Gardner, S. L., Stock, S. P. and Kaya, H. K. 1994. A new species of *Heterorhabditis* from the Hawaiian islands. **Journal of Parasitology**. 80: 100-106.

Gaugler, R. (Ed.). 2002. **Entomopathogenic Nematology**. (p. 388), New York: CABI publishing.

Gaugler, R. and Boush, G. M. 1978. Effects of ultraviolet radiation and sunlight on the nematode *Neoaplectana carpocapsae*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 32: 291-296.

Ganguly, S. and Kumar, S. (Feb 13, 2009). **Description of a new species of *Heterorhabditis* (Heterorhabditidae: Rhabditida) from Meghalaya**. Retrieved December 20, 2014, from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/224612058.

Ganguly, S. and Singh, L. K. 2000. *Steinernema thermophilum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from India. **International Journal of Nematology.** 10: 183-191.

Gaugler, R., Lewis, E. and Stuart, R. J. 1997. Ecology in the service of biological control: The case of entomopathogenic nematodes. **Oecologia**. 109: 483 - 489.

Ganguly, S., Rathour, K. S., Kumar, S. and Singh, M. 2011. *Steinernema meghalayensis* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Northeastern Hilly Region of India. **Indian Journal of Nematology**. 41(1): 83-97.

Ganguly, S. and Singh, L. K. 2000. *Steinernema thermophilum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from India. **International Journal of Nematology**. 10(2): 183-191.

Gerrard, J. G., Joyce, S. A., Clarke, D. J., Ffrench-Constant, R. H., Nimmo, G. R., Looke, D. F. M., et al. 2006. Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. **Emerging Infectious Diseases**. 12: 1562-1564.

Gerrard, J. G., Waterfield, N, R., Vohra, R., and Ffrench-Constant, R. H. 2004. Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: An emerging bacterial pathogen. **Microbes and Infection**. 6: 229-237

Gibson, T., Farrugia, D., Barrett, J., Chitwood, D. J., Rowe, J., Subbotin, S., et al. 2011. The mitochondrial genome of the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Genome**. 54: 565–574.

Gokce, C., Erbas, Z., Yilmaz, H., Demirbag, Z. and Demir, L. 2015. A new entomopathogenic nematode species from Turkey, *Steinernema websteri* (Rhabditida: Steinernematidae), and its virulence. **Turkish Journal of Biology**. 39: 167-174.

Grant, J. A. and Villani, M. G. 2003. Soil moisture effects on entomopathogenic nematodes. **Environmental Entomology**. 32: 80-87.

Grewal, P., Ehlers, R-U. and Shapiro-Ilan, D. I. 2005. **Nematodes as Biocontrol Agents**. UK: CABI Publishing.

Grewal, P. S., Selvan, S. and Gaugler, R. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. **Journal of Thermal Biology**. 19: 245-253.

Griffin, C. T., Boemare, N. E. and Lewis, E. E. 2005. Biology and behaviour. In P. S. Grewal, R. U. Ehlers, D. Shapiro-Ilan (Eds.), **Nematodes as Biocontrol Agents** (pp. 47-59). Wallingford, UK: CABI.

Griffin, C. T., Chaerani, R., Fallon, D., Reid, A. P. and Downes, M. J. (2000). Occurrence and distribution of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis indica* in Indonesia. **Journal of Helminthology**. 74(2): 143-150.

Grimont, P. A. D., Steigerwalt, A. G., Boemare, N., Hickman-Brenner, F. W., Deval, C., Grimom, F. and Brenner, D. J. 1984. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic study of the genus *Xenorhabdus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 34: 378-388.

Grundmann, F., Kaiser, M., Schiell, M., Batzer, A., Kurz, M., Thanwisai, A., et al. 2014. Antiparasitic Chaiyaphumines from entomopathogenic *Xenorhabdus* sp. PB61.4. **Journal of Natural Products**. 77(4): 779-783.

Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P. and Keskin, S. 2003. Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests. **Turkish Journal of Biology**. 27: 181-202.

Hazir, S., Stackebrandt, E., Lang, E., Schumann, P., Ehlers, R.-U. and Keskin, N. 2004. Two new subspecies of *Photorhabdus luminescens*, isolated from *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae): *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* subsp. nov. and *Photorhabdus luminescens* subsp. *thracensis* subsp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**. 27: 36-42.

Hazir, S., Stock, S. P. and Keskin, N. 2003. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema anatoliense* n. sp (Rhabditida: Steinernematidae), from Turkey. **Systematic Parasitology**. 55: 211-220.

Hazir, S., Stock, S. P., Kaya, H. K., Koppenhöfer, A. M. and Keskin, N. 2001. Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. 77: 243-250.

Herbert, E. E. and Goodrich-Blair, H. 2007. Friend and foe: The two faces of *Xenorhabdus nematophila*. **Nature Reviews Microbiology**. 5: 634–646.

Hominick, W. M. (2002). Biogeography. In R. Gaugler (Ed.), **Entomopathogenic Nematology** (pp. 115 -143). UK: CABI Publishing.

Hominick, W. M., Briscoe, B. R., del Pino, F. G., Heng, J., Hunt, D. J., Kozodoy, E., et al. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes: Current status, protocols and definitions. **Journal of Helminthology**. 71: 271-298.

Hominick, W. M., Reid, A. P., Bohan, D. A. and Briscoe, B. R. 1996. Entomopathogenic nematodes: Biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. **Biocontrol Science and Technology**. 6: 317- 331.

Hu, K. J., Li, J. X., Li, B., Webster, J. M. and Chen, G. H. 2006. A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. 14: 4677- 4681.

Iraki, K., Salah, N., Sansour, M. A., Segal, D., Glazer, I., Johnigk, S. A., et al. 2000. Isolation and characterization of two entomopathogenic nematode strains, *Heterorhabditis indica* (Nematoda, Rhabditida), from the West Bank, Palestinian Territories. **Journal of Applied Entomology**. 124(9-10): 375–380.

Ji, D., Yi. Y, Kang, G. H., Choi, Y. H., Kim, P., Baek, N. I. and Kim, Y. 2004. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. 239: 241-248.

Jian, H., Reid, A. P. and Hunt, D. J. 1997. *Steinernema ceratophorum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic from north east China. **Systematic Parasitology**. 37: 115-125.

Kanga, F. N., Trinh, P. Q., Waeyenberge, L., Spiridonov, S. E., Hauser, S. and Moens, M. 2012. Two new species of *Steinernema* Travassos, 1927 from the humid forest of southern Cameroon. **Russian Journal of Nematology**. 20(1): 15-36.

Karimi, J., Kharazi-Pakdel, A., Yoshiga, T., Koohi Habibi, M. and Hassani-Kakhki, M. 2011. Characterization of *Xenorhabdus* (γ-Proteobacteria) strains associated bacteria with the Steinernema (Nematoda: Steinernematidae) isolates from Iran. **Journal of Entomological Society of Iran**. 31(1): 57-69.

Kary , N. E., Niknam ,Gh., Griffin, C. T., Mohammadi, S. A. and Mohammadi, M. 2009. A survey of entomopathogenic nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in the North-West of Iran. **Nematology**. 11(1): 107-116.

Kaya, H. K. 1990. Soil ecology. In R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control** (pp. 93-115). Florida: CRC Press.

Kaya, H. K. 1977. Development of the DD-136 strain of Neoapleclana carpocapsae at constant temperatures. **Journal of nematology**. 9: 346-349.

Kaya, H. K. and Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. **Annual Review of Entomology**. 38: 181-206.

Kaya, H. K. and Stock, S. P. 1997. **Techniques in insect nematology**. In L. Lacey (Ed.) (pp. 281-324). San Diego California: Academic Press.

Khatri-Chhetri, H. B., Waeyenberge, L., Spiridonov, S., Manandhar, H. K. and Moens, M. 2011a. Two new species of *Steinernema* Travassos, 1927 with short intective juveniles from Nepal. **Russian Journal of Nematology**. 19(1): 53-74.

Khatri-Chhetri, H. B., Waeyenberge, L., Spiridonov, S., Manandhar, H. K. and Moens, M. 2011b. *Steinernema everestense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from Pakhribas, Dhankuta, Nepal. **Nematology**. 13(4): 443-462.

Khatri-Chhetri, H. B., Waeyenberge, L., Spiridonov, S., Manandhar, H. K. and Moens, M. 2011c. *Steinernema lamjungense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from Lamjung district, Nepal. **Nematology**. 13(5): 589-605.

Koppenhofer, A. M., Kaya, H. K. and Taormino, S. 1995. Infectivity of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae) at different soil depths and moistures. **Journal of Invertebrate Pathology**. 65: 193-199.

Kumar, K. S. V., Vendan, K. T. and Nagaraj, S. B. 2014. Isolation and Characterization of Entomopathogenic Symbiotic Bacterium, *Photorhabdus luminescens* of *Heterorhabditis indica* from Soils of Five Agro Climatic Zones of Karnataka. **Biosciences Biotechnology Research Asia**. 11(1): 129-139.

Kung, S. P., Gaugler, R. and Kaya, H. K. 1990. Influence of Soil pH and Oxygen on Persistence of *Steinernema* spp. **Journal of Nematology**. 22(4): 440-445.

Kung, S. P., Gaugler, R. and Kaya, H. K. 1991. Effects of soil temperature, moisture, and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. **Journal of Invertebrate Pathology.** 57: 242-249.

Kuwata, R., Qiu, L. H., Wang, W., Harada, Y., Yoshida, M., Kondo, E., et al. 2013. *Xenorhabdus ishibashii* sp. nov., isolated from the entomopathogenic nematode *Steinernema aciari*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 63(5): 1690-1695.

Kuwata, R., Shigematsu, M., Yoshiga, T., Yoshida, M. and Kondo, E. 2006. Phylogenetic analyses of Japanese Steinernematid nematodes and their associating *Xenorhabdus* bacteria. **Japanese Journal of Nematology**. 36(2): 75-85.

Kwon, B. and Kim, Y. 2008. Benzylideneacetone, an immunosuppressant, enhances virulence of *Bacillus thuringiensis* against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**. 101(1): 36-41.

Lang, G., Kalvelage, T., Peters, A., Wiese, J. and Imhoff, J. F. 2008. Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic Bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. **Journal of Natural Products**. 71: 1074-1077.

Lee, M. M., Sicard, M., Skeie, M. and Stock, S. P. 2009. *Steinernema boemarei* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern France. **Systematic Parasitology**. 72(2): 127-141.

Lee, M. M. and Stock, S. P. 2010a. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (γ-Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**. 77: 1-12.

Lee, M. M. and Stock, S. P. 2010b. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (Gamma-Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**. 104: 67-74.

Lengyel, K., Lang, E., Fodor, A., Szallas, E., Schumann, P. and Stackebrandt, E. 2005. Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus budapestensis* sp. nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov. *Xenorhabdus innexi* sp. nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**. 28: 115-122.

Liu, J. and Berry, R. E. 1996a. *Steinernema oregonensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Oregon, USA. **Fundamental and Applied Nematology**. 19: 375-380.

Liu, J. and Berry, R. E. 1996b. *Heterorhabditis marelatus* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Oregon. **Journal of Invertebrate Pathology**. 67: 48-54.

Liu, J., Berry, R., Poinar, G. and Moldenke, A. 1997. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* Species and Strains as Determined by Comparison of Partial 16s rRNA Gene Sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 47(4): 948-951.

Li, J., Chen, G. and Webster, J. M. 1996. N-(Indol-3-ylethyl)-2'-hydroxy-3'-methylpentanamide, a Novel Indole Derivative from *Xenorhabdus nematophilus*. **Journal of Natural Products**. 59: 1157-1158.

Li, J. X., Chen, G. H., Wu, H. M. and Webster, J. M. 1995. Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. **Journal of Natural Products**. 58: 1081-1086.

López-Núñez, J. C., Cano, L., Gongora-B, C. E. and Stock, S. P. 2007. Diversity and evolutionary relationships of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Central Andean region of Colombia. **Nematology**. 9(3): 333-341.

López-Núñez, J. C., Plichta, K., Gongora Botero, C. E. and Stock, P. S. 2008. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp. Nematoda: Steinernematidae, from Colombia. **Nematology**. 10(4): 561-574.

Lloyd, A. T. and Sharp, P. M. 1993. Evolution of the *recA* gene and the molecular phylogeny of bacteria. **Journal of Molecular Evolution**. 37: 399-407.

Luc, P. V., Nguyen, K. B., Reid, A. P. and Spiridonov, S. E. 2000. *Steinernema tami* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Cat Tien Forest, Vietnam. **Russian Journal of Nematology**. 8: 33-43.

Ma, J., Chen, S., Clercq, P. D., Han, R. and Moens, M. 2012a. *Steinernema changbaiense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematodes from Northeast China. **Russian Journal of Nematology.** 20(2): 97-112.

Ma, J., Chen, S., Clercq, P. D., Waeyenberge, L., Han, R. and Moens, M. 2012b. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema xinbinense* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), from north China, **Nematology**. 14(6): 723-736.

Ma, J., Chen, S., Li, X., Han, R., Khatri-Chhetri, H. B., Clercq, P. D. and Moens, M. 2012c. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema tielingense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), from north China **Nematology** 14(3): 321-338.

Malan, A. P., Knoetze, R. and Tiedt, L. 2014. *Heterorhabditis noenieputensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Journal of Helminthology**. 88(2): 139-151.

Malan, A. P., Knoetze, R. and Tiedt, L. 2015. *Steinernema jeffreyense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Journal of Helminthology**. 11: 1-17.

Malan, A. P., Nguyen, K. B., Waal, J. Y. de. and Tiedt, L. 2008. *Heterorhabditis safricana* n.sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Nematology**. 10: 381-396.

Mamiya, Y. 1988. *Steinernema kushidai* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) associated with scarabaeid beetle larvae from Shizuoca, Japan. **Applied Entomology and Zoolog**. 23: 313-320.

Maneesakorn, P., An, R., Daneshvar, H., Taylor, K., Bai, X., Adam, B. J., et al. 2011. Phylogenetic and cophylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis*: Rhabditida) and their symbiotic bacteria (*Photorhabdus*: Enterobacteriaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 59: 271-280.

Maneesakorn, P., Grewal, P. S. and Chandrapatya, A. 2010. *Steinernema minutum* sp. nov. (Rhabditida: Steinernamatidae): A new entomopathogenic nematode from Thailand. **International Journal of Nematology**. 20: 27-42.

Mason, J. M. and Hominick, W. M. 1995. The effect of temperature on infection, development and reproduction of *Heterorhabditids*. **Journal of Helminthology**. 69: 337-345.

McInerney, B. V., Taylor, W. C., Lacey, M. J., Akhurst, R. J. and Gregson, R. P. 1991. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. **Journal of Natural Products**. 54: 785-795.

Molyneux, A. S. 1986. *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. temperature and aspects of behaviour and infectivity. **Experimental Parasitology**. 62: 169-180.

Molyneux, A. S. and Bedding, R. A. 1984. Influence of soil texture and moisture on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. D1 and *Steinernema glaseri* for larvae of the sheep blow fly *Lucilia cuprina*. **Nematologica**. 3: 358-356.

Mrácek, Z., Hernandez, E. A. and Boemare, N. E. 1994. *Steinernema cubana* sp. (Nematoda Rhabditida: Steinernematidae) and the preliminary characterization of its associated bacterium. **Journal of Invertebrate Pathology**. 64: 123-129.

Mrácek, Z., Nguyen, K. B., Tailliez, P., Boemare, N. and Chen, S. 2006. *Steinernema sichuanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, East Tibetan Mts., China. **Journal of Invertebrate Pathology**. 93: 157-169.

Mrácek, Z., Qi-Zhi, L. and Nguyen, K. B. 2009. *Steinernema xueshanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Yunnan, southeast Tibetan Mts., China**. Journal of Invertebrate Patholog**y. 102(1): 69-78.

Mrácek, Z., Sturhan, D. and Reid, A. 2003. *Steinernema weiseri* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. **Systematic Parasitology**. 56: 37-47.

Nasmith, C. G., Speranzini, D., Jeng, R. and Hubbes, M. 1996. RFLP analysis of PCR-amplified ITS and 26S ribosomal RNA genes of selected entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). **Journal of Nematology**. 28: 15-25.

Nguyen, K. B. (Jan 29, 2010). **Morphology and Taxonomy of Entomopathogenic nematodes: Species of *Steinernema***. Retrieved December 18, 2014, from http://entnemdept.ufl.edu/nguyen/morph/steinsp1.htm.

Nguyen, K. B. and Buss, E. A. 2011. *Steinernema phyllophagae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Florida, USA. **Nematology**. 13(4): 425-442.

Nguyen, K. B. and Duncan, L. W. 2002. *Steinernema diaprepese* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a parasite of the citrus root weevil *Diaprepes abbreviatus* (L). **Journal of Nematology**. 34: 159-170.

Nguyen, K. B. and Smart, G. C. Jr. 1990. *Steinernema scapterisci* n. sp. (Steinernematidae: Nematoda). **Journal of Nematology**. 22: 187-199.

Nguyen, K. B. and Smart, G. C. Jr. 1992. *Steinernema neocurtillis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) and a key to species of the genus *Steinernema*. **Journal of nematology**. 24: 463-477.

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

Nguyen, K. B., Ginarte, C. M, Leite, L. G, Santos, J. M. and Harakava, R. 2010. *Steinernema brazilense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Mato Grosso, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**. 103: 8-20.

Nguyen, K. B., Gozel, U., Koppenhöfer, H. S., and Adams, B. J. 2006. *Heterorhabditis floridensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Florida. **Zootaxa**. 1177: 1-19.

Nguyen, K. B., Malan, A. P. and Gozel, U. 2006a. *Steinernema khoisanae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Nematology**. 8: 157-175.

Nguyen, K. B., Maruniak, J. and Adams, B. J. 2001. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema***. Journal of Nematology**. 33: 73-82.

Nguyen, K. B., Puza, V. and Mrácek, Z. 2008. *Steinernema cholashanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae) a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, Chola Shan Mts., China. **Journal of Invertebrate Pathology**. 97(3): 251-264.

Nguyen, K. B., Qiu, L., Zhou, Y. and Pang, Y. 2006b. *Steinernema leizhouense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China. **Russian Journal of Nematology**. 14: 101-118.

Nguyen, K. B., Shapiro-Ilan, D. I., Stuart, R.J., McCoy, C. W., James, R. R. and Adams, B. J. 2004. *Heterorhabditis mexicana* sp. (Heterorhabditidae: Rhabditida) from Tamaulipas, Mexico, and morphological studies of the bursa of *Heterorhabditis* spp. **Nematology**. 6: 231-244.

Nguyen, K. B., Stuart, R, Andallo, V., Gozel, U. and Roger, M. E. 2007. *Steinernema texanum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode fron Texas, USA. **Nematology**. 9: 379-396.

Nguyen, K. B., Tesfamariam, M., Gozel, U., Gaugler, R. and Adams, B. J. 2005. *Steinernema yirgalemense* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Ethiopia. **Nematology**. 6: 839-856.

Nikdel, M., Niknam, G. and Ye, W. 2011. *Steinernema arasbaranense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from arasbaran forests, Iran. **Nematologia Mediterranea**. 39: 17-28.

Nishimura, Y., Hagiwara, A., Suzuki, T. and Yamanaka, S. 1994. *Xenorhabdus japonicus* sp. nov. associated with the nematode *Steinernema kushidai*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 10: 207-210.

Nthenga, I., Knoetze, R., Berry, S., Tiedt, l. R. and Malan, A. P. 2014. *Steinernema sacchari* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Nematology**. 16(4): 475-494.

Orozco, R. A., Hill, T. and Stock, S. P. 2013. Characterization and Phylogenetic Relationships of *Photorhabdus* subsp. *sonorensis* (γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae), the Bacterial symbiont of Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis sonorensis* (Nematode: Heterorhabditidae). **Current Microbiology**. 61: 291-297.

Phan, K. L., Mrácek, Z., Puza, V., Nermut, J. and Jarosova, A. 2014. *Steinernema huense* sp. n., a new entomopathogenic nematode (Nematoda: Steinernematidae) from Vietnam. **Nematology**. 16: 761-775.

Phan, K.L., Nguyen, N.C. and Moens, M. 2001a. *Steinernema loci* sp. n. and *Steinernema thanhi* sp n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vietnam. **Nematology**. 3: 503-514.

Phan, K.L., Nguyen, N.C. and Moens, M. 2001b. *Steinernema sangi* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vietnam. **Russian Journal of Nematology**. 9: 1-7.

Phan, K. L., Spiridonov, S. E., Subbotin, S. A. and Moens, M. 2006a. Four new species of *Steinernema* Travassos, 1928 with short infective juveniles from Vietnam. **Russian Journal of Nematology**. 14: 11-29.

Phan K. L., Subbotin S. A., Nguyen N. C. and Moens, M. 2003. *Heterorhabditis baujardi* n. sp. (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. **Nematology**. 5: 367-382.

Phan, L. K., Subbotin, S. A., Waeyenberge, L. and Moens, M. 2005. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema robustispiculum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), from Chumomray National Park in Vietnam. **Systematic Parasitology**. 60: 23-32.

Phan, L. K., Takemoto, S. and Futai, K. 2006b. *Steinernema ashiuense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Japan. **Nematology**. 8: 681-690.

Pizano, G. A., Agullera, M. M., Monterio, A. R. and Ferroy, L. C. C. B. 1985. Incidente de *Neoaplectana glaeri* Steiner, 1929 Nematoda: Steinernematidae) Parasitan ob ovo de Migdolus frynus (West wood, 1963) Coleoptera: Cerambycidae). **Society of Brisilian Nematology**. 1: 13-15.

Plichta, K. L., Joyce, S. A., Clarke, D., Waterfield, N. and Stock, S. P. 2009. *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): The hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: Gamma-Proteobacteria). **Journal of Helminthology**. 83: 309-320.

Poinar, G. O. Jr. (Ed.). 1979. **Nematodes for biological control of insects**. (unpaged), Boca Raton, Florida, U.S.A: CRC Press.

Poinar, G. O. Jr. 1985. *Neoaplectana intermedia* n. sp. (Steinernematidae: Nematoda) from South Carolina. **Revue de Nematology**. 8: 321-327.

Poinar, G.O. Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.). **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**. Boca Raton, USA: FL CRC Press.

Poinar, G. O. Jr. 1990. Biology and Taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae, In R. Gaughler and H. K. Kaya (Eds), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control** (pp. 23-61), Boca Raton, Florida, U.S.A: CRC Press.

Poinar, G. O. Jr. 1986. *Neoaplectanana intermedia* n.sp. (Steinernematidae: Nematoda) from South Carolina. **Revue de Nematologie**. 8: 321-327.

Poinar, G. O. Jr., Karunakar, G. K. and David, H. 1992. *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida: Nematoda) from India: Separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. **Fundamental and Applied Nematology**. 15(5): 467-472.

Poinar, G. O. Jr. and Himswok, H. P. T. 1967. Neoaplectazza parasitism of larvae of the greated wax moth (*Galleria mellonella*). **Journal of Invertebrate Pathology**. 9: 241-246.

Poinar, G.O. Jr. and Thomas, G. M. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of thenematode, DD-136. **Parasitology**. 56: 385-390.

Poinar, G.O. Jr. and Thomas, G.M. 1990. Taxonomy and biology of steinernematidae and Heterorhabditidae. In R. Gaugler and H. K. Kaya (Eds.), **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control** (pp. 23-61). Boston: CRC Press.

Poinar, G. O. Jr., Thomas, G. M. and Hess, R. 1976. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. Fam.). **Nematologica**. 21: 463-470.

Putz, J., Meinert, F., Wyss, U., Ehlers, R. U. and Stackebrandt, E. 1990. Development and application of oligonucleotide probes for molecular identification of *Xenorhabdus* species**. Applied and Environmental Microbiology**. 56(1): 181-186.

Qiu, L., Fang, Y., Zhou, Y., Pang, Y. and Nguyen, K. B. 2004. *Steinernema guangdongense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China with a note on *S. serratum* (nomen nudum). **Zootaxa**. 704: 1-20.

Qiu, L., Hu, X., Zhou, Y., Mei, S., Nguyen, K.B. and Pang, Y. 2005. *Steinernema akhursti* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from Yunnan, China. **Journal of Invertebrate Pathology**. 90: 151-160.

Qiu L., Hu, X., Zhou, Y., Pang, Y. and Nguyen, K. B. 2005a. *Steinernema beddingi* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Yunan, China. **Nematology**. 7: 737-749.

Qiu, L., Yan, X., Zhou, Y., Nguyen, K.B. and Pang, Y. 2005b. *Steinernema aciari* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Guangdong, China. **Journal of Invertebrate Pathology**. 88: 58-69.

Qiu, L., Zhao, J., Wu, Z., LV, Z. and Pang, Y. 2011. *Steinernema pui* sp. n. (Rhabditida, Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Yunnan, China. **Zootaxa**. 2767: 1-13.

Rainey, F. A., Ehlers, R. U. and Stackebrandt, E. 1995. Inability of the polyphasic approach to systematics to determine the relatedness of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 45: 379-381.

Reid, A. P. and Hominick, W. M. 1992. Restriction fragment length polymorphisms within the ribosomal DNA repeat unit of British entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **Parasitology**. 105(2): 317-323.

Román, J. and Figueroa, W. 1994. *Steinernema puertoricensis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Puerto Rico. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**. 78: 167-175.

Shahina, F., Anis, M., Reid, A. P., Rowe, J. and Maqbool, M. A. 2001. *Steinernema pakistanense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Pakistan. **International Journal of Nematology**. 11: 124-133.

Shahina, F., Anis, M., Zainab, S. and Maqbool, M. A. 1998. Entomopathogenic nematodes in soil samples collected from Sindh, Pakistan. **Pakistan Journal of Nematology**. 16(1): 41-50.

Shamseldean, M. M., Abou El-Sooud, A. B., Abd-Elgawad, M. M., and Saleh, M. M. 1996. Identification of a new heterorhabditid species from Egypt, *Heterorhabditis taysearae*, n. sp. (Rhabditroa: Heterorhabditidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. 6: 129-138.

Shen, C.P. and Wang, G.H. 1991. Description and study of an entomopathogenic nematode: *Steinernema longicaudum* sp. nov. In **Proceedings of the First National Academy Symposium. Young and Middle Aged Science and Technology Works, Plant Protection** (pp. 220-231). Beijing: Chinese Science and Technology Press.

Smits, P. H. 1996. Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**. 6: 379-387.

Somvanshi, V. S., Lang, E., Ganguly, S., Swiderski, J., Saxena, A. K. and Stackebrandt, E. 2006. A novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus indica* sp. nov., symbiotically associated with entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum* Ganguly and Singh, 2000. **Systematic and Applied Microbiology**. 29: 519-525.

Spiridonov, S. E., Krasomil-Osterfeld, K. and Moens, M. 2004. *Steinernema jollieti* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from the American Midwest. **Russian Journal of Nematology**. 12: 85-95.

Spiridonov, S. E., Moens, M. 1999. Two previously unreported species of steinernematids from woodlands in Belgium. **Russian Journal of Nematology**. 7: 39-42.

Spiridonov, S. E., Waeyenberge, L. and Moens, M. 2010. *Steinernema schliemanni* sp n. (Steinernematidae; Rhabditida), a new species of Steinernematids of the `monticolum' group from Europe. **Russian Journal of Nematology**. 18(2): 175-190.

Stock, S. P. 1993. A new species of the genus *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (Nematoda: Heterorhabditidae) parasitizing *Graphognathus* sp. larvae (Coleoptera: Curculionidae) from Argentina. **Research and Reviews in Parasitology**. 53(3-4): 103-107.

Stock, S. P. and Koppenhofer, A. M. 2003. *Steinernema scarabaei* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a natural pathogen of scarab beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) from New Jersey, USA. **Nematology**. 5: 191-204.

Stock, S. P., Strong, D. R. and Gardner, S. L. 1996. Identification of *Heterorhabditis* (Nematoda: Heterorhabditidae) from California with a new species isolated from the larvae of the ghost moth *Hepialis californicus* (Lepidoptera: Hepialidae) from the Bodega Bay Natural Reserve. **Fundamental and Applied Nematology**. 19: 585-592.

Stock, S. P., Campbell, J. F. and Nadler, S. A. 2001. Phylogeny of *Steinernema* Travassos 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology**. 87: 877-889.

Stock, S. P., Choo, H. Y. and Kaya, H. K. 1997. An entomopathogenic nematode *Steinernema monticolum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Korea with a key to other species. **Nematologica**. 43: 15-29.

Stock, S. P., Griffin, C.T, and Burnell, A. M. 2002. Morphological characterisation of three isolates of *Heterorhabditis* Poinar, 1976 from the Irish group (Nematoda: Rhabditida: Heterorhabditidae) and additional evidence supporting their recognition as a distinct species, *H. downesi* n. sp. **Systematic Parasitology**. 51: 95-106.

Stock, S. P., Griffin, C. T. and Chaerani, R. 2004. Morphological and molecular characterisation of *Steinernema hermaphroditum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Indonesia, and its phylogenetic relationships with other members of the genus. **Nematology**. 6: 401-412.

Stock, P. S., Pryor, B. M. and Kaya, H. K. 1999. Distribution of entomopathogenic nematodes (Steirnematidae and Heterorhabditidae in natural habitats in California, USA). **Biodiversity and Conservation**. 8: 535-549.

Stock, S. P., Rivera-Orduno, B. and Flores-Lara, Y. 2009. *Heterorhabditis sonorensis* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae) in natural habitats in California. **Journal of Invertebrate Pathology**. 100: 175-184.

Stock, S. P., Somsook, V. and Reid, A. P. 1998. *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), anentomopathogenic nematode from Thailand. **Systematic Parasitology**. 41: 105-113.

Stokwe, N. F., Malan, A. P., Nguyen, K. B., Knoetze, R. and Tiedt, L. 2011. *Steinernema citrae* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. **Nematology**. 13(5): 569-587.

Stuart, R. J. and Gaugler, R. 1994. Patchiness in populations of entomopathogenic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**. 64: 39-45.

Sturhan, D., Spiridonov, S. E. and Mrácek Z. 2005. *Steinernema silvaticum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Europe. **Nematology**. 7: 227-241.

Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, S. and Boemare, N. 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperate* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 60: 1921-1937.

Tailliez, P., Laroui, C., Ginibre, N., Paule, A., Pages, S. and Boemare, N. 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 60: 1921-1937.

Tailliez, P., Pages, S., Edgington, S., Tymo, L. M. and Buddie, A. G. 2012. Description of *Xenorhabdus magdalenensis* sp. nov., the symbiotic bacterium associated with *Steinernema austral*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 62: 1761-1765.

Tailliez, P., Pages, S., Ginibre, N. and Boemare, N. 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 56: 2805-2818.

Tallosi, B. and Ehlers, R. 1995. *Steinernema bicornutum* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) from Vojvodina, Yugoslavia. **Russian Journal of Nematology**. 3: 71-80.

Tamiru, T., Waeyenberge, L., Hailu, T., Ehlers, R. U., Puza, V. and Mrácek, Z. 2012. *Steinernema ethiopiense* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Ethiopia. **Nematology**. 14(6): 741-757.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. 30: 2725-2729.

Tangchitsomkid, N. and Sontirat, S. 1998. Occurrence of Entomopathogenic Nematodes in Thailand. **Kasetsart Journal, Natural Sciences**. 32(3): 347-354.

Tarasco, E., Mrácek, Z., Nguyen, K. B., Triggiani, O. 2008. *Steinernema ichnusae* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Sardinia Island (Italy). **Journal of Invertebrate Pathology**. 99: 173-185.

Thanwisai, A. 2012. **Isolation of entomopathogenic nematodes and associated *Xenorhabdus/Photorhabdus* spp. In Thailand.** Doctural dissertation, Ph. D., Mahidol University, Bangkok.

Thanwisai, A., Tandhavanant, S., Saiprom, N., Waterfield, N. R., Ke Long, P., Bode, H. B., et al. 2012. Diversity of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. and their symbiotic entomopathogenic nematodes from Thailand. **Plos One**. 7(9): e43835.

Thomas, G. M. and Poinar, G. O. Jr. 1979. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 29: 352-360.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. 22(22): 4673-4680.

Tóth, T. and Lakatos, T. 2008. *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis* nematodes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 58: 2579-2581.

Travassos, L. 1927. Sobre ogenera Oxysomatium. **Boletim. Biologico**. 5: 20-21.

Triggiani, O., Mrácek, Z., Reid, A., 2004. *Steinernema apuliae* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae): a new entomopathogenic nematode from southern Italy. **Zootaxa**. 460: 1-12.

Uribe-Lorío, L., Mora, M. and Stock, S. P. 2007. *Steinernema costaricense* n. sp. and *Steinernema puntauvense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), two new entomopathogenic nematodes from Costa Rica. **Systematic Parasitology**. 68: 167-172.

Wallace, H. R. 1958. Movement of eelworms. **Annals of Applied Biology**. 46: 74-85.

Waturu, C. N., Hunt, D.J. and Reid, A. P. 1997. *Steinernema karii* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic nematode from Kenya. **International Journal of Nematology**. 7: 68-75.

Webster, J. M., Chen, G., Hu, K. and Li, J. 2002. Bacterial metabolites. In R. Gaugler (Ed), **Entomopathogenic Nematology**. (pp. 99-114). UK: CAB International.

Weiser, J. 1955. *Neoplectana carpocapsae* n. sp. (Anguillulata: Steinernematidae) Novycizopasnik housenik Oválese jableeneho, *Carpapsa pomonella* L. Vest. Ceskoslov. **Spolecnosti Zoology**. 19: 44-52.

Weissfeld, A. S., Halliday, R. J., Simmons, D. E., Trevino, E. A., Vance, P. H., Caroline, M., et al. 2005. *Photorhabdus asymbiotica*, a pathogen emerging on two continents that proves that there is no substitute for a well-trained clinical microbiologist. **Journal of Clinical Microbiology**. 43: 4152-4155.

White, G.F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. **Science**. 66: 302-303.

Wouts, W. M., Mrácek, Z., Gerdin, S. and Bedding, R. A. 1982. *Neoaplectana* Steiner, 1929, a junior synonym of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Rhabditida). **Systematic Parasitology**. 4: 147-154.

Xu, Z., Wang, G. and Li, X. 1991. A new species of the genus *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae). **Zoological Research**. 12: 17-20.

ภาคผนวก ก

การติดต่อประสานงานกับหัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

การเก็บตัวอย่างดิน วัดและจดบันทึกปัจจัยทางกายภาพของตัวอย่างดิน

ภาพที่ 1 ติดต่อประสานงานกับหัวหน้าอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ภาพที่ 2 พื้นที่ช่องเย็น ในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ภาพที่ 3 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ภาพที่ 4 เก็บตัวอย่างดินบริเวณเส้นทางศึกษาธรรมชาติบริเวณช่องเย็นในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ภาพที่ 5 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ภาพที่ 6 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินในอุทยานแห่งชาติแม่วงก์

ภาพที่ 7 การวัดปัจจัยทางกายของตัวอย่างดิน

ภาพที่ 8 จดบันทึกปัจจัยทางกายของตัวอย่างดิน

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 550 ตัวอย่าง จากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์
ตั้งแต่วันที่ 2 สิงหาคม 2557 ถึงวันที่ 24 กรกฎาคม 2558

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ (°C)	ความชื้น (%)	เนื้อดิน
2/8/2557	13.35	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW1	1	N 15° 10' 40.1"	7.0	30	1.0	ร่วน
				2	E 101° 44' 42.1"	7.0	30	1.0	ร่วน
				3		7.0	31	1.0	ร่วน
				4	Elev= 244 m	6.8	30	1.0	ร่วน
				5		6.8	29	1.0	ร่วน
2/8/2557	13.42	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW2	1	N 16° 62' 27.0"	7.0	29	1.0	ร่วน
				2	E 099° 13' 59.2"	6.8	29	1.0	ร่วน
				3		6.8	29	1.0	ร่วน
				4	Elev= 270 m	6.8	28	1.0	ร่วน
				5		7.0	28	1.0	ร่วน
2/8/2557	13.52	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW3	1	N 16° 02' 27.7"	6.8	29	2.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 01.5"	6.8	28	2.0	ร่วน
				3		6.8	28	1.0	ร่วน
				4	Elev= 316 m	6.8	28	1.5	ร่วน
				5		6.8	28	2.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ (°C)	ความชื้น (%)	เนื้อดิน
2/8/2557	14.00	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW4	1	N 16° 02' 27.0"	7.0	29	1.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 07.0"	6.8	29	1.5	ร่วน
				3		7.0	28	1.0	ร่วน
				4	Elev= 304 m	6.8	28	1.5	ร่วน
				5		6.8	28	2.0	ร่วน
2/8/2557	14.11	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW5	1	N 16° 02' 31.7"	7.0	29	1.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 11.5"	6.8	29	1.0	ร่วน
				3		6.8	28	1.5	ร่วน
				4	Elev= 293 m	6.8	28	2.0	ร่วน
				5		6.8	28	2.0	ร่วน
2/8/2557	14.19	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW6	1	N 16° 02' 36.2"	7.0	27	1.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 11.0"	7.0	27	1.5	ร่วน
				3		6.8	27	1.5	ร่วน
				4	Elev= 318 m	6.8	28	1.5	ร่วน
				5		6.8	28	1.5	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ (°C)	ความชื้น (%)	เนื้อดิน
2/8/2557	14.29	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW7	1	N 16° 02' 41.5"	6.8	28	1.0	ร่วน
				2	E 099° 14' 11.8"	6.8	28	2.5	ร่วน
				3		6.4	27	1.0	ร่วน
				4		7.0	29	1.0	ร่วน
				5		6.8	29	1.5	ร่วน
2/8/2557	14.47	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW8	1	N 16° 02' 46.8"	6.8	31	1.0	ร่วน
				2	E 16° 14' 06.0"	7.0	29	1.0	ร่วน
				3		6.8	28	1.0	ร่วน
				4	Elev= 309 m	6.8	28	1.0	ร่วน
				5		7.0	28	1.0	ร่วน
17/1/2558	9.39	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW9	1	-	7.0	20	1.0	ร่วน
				2		7.0	20	1.0	ร่วน
				3		7.0	20	1.0	ร่วน
				4		7.0	19	1.0	ร่วน
				5		7.0	19	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความชื้น (%)	เนื้อดิน
17/1/2558	9.45	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW10	1	-	7.0	20	1.0	ร่วน
				2		7.0	20	1.0	ร่วน
				3		7.0	24	1.0	ร่วน
				4		7.0	21	1.0	ร่วน
				5		7.0	23	1.0	ร่วน
17/1/2558	10.00	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW11	1	-	7.0	23	1.0	ร่วน
				2		7.0	19	1.0	ร่วน
				3		7.0	21	1.0	ร่วน
				4		7.0	20	1.0	ร่วน
				5		7.0	20	1.0	ร่วน
17/1/2558	10.05	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW12	1	-	6.8	18	1.5	ร่วน
				2		6.8	18	1.5	ร่วน
				3		7.0	21	1.0	ร่วน
				4		7.0	19	1.0	ร่วน
				5		6.8	18	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ (°C)	ความชื้น (%)	เนื้อดิน
17/1/2558	10.10	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW13	1	-	7.0	17	1.0	ร่วน
				2		6.9	18	1.0	ร่วน
				3		6.8	20	1.5	ร่วน
				4		7.0	18	1.0	ร่วน
				5		7.0	20	1.0	ร่วน
17/1/2558	10.16	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW14	1	-	6.6	21	2.0	ร่วน
				2		6.8	21	2.0	ร่วน
				3		7.0	22	1.0	ร่วน
				4		6.8	21	1.5	ร่วน
				5		6.9	21	1.5	ร่วน
17/1/2558	10.30	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW15	1	-	6.9	20	1.5	ร่วน
				2		7.0	20	1.0	ร่วน
				3		6.8	21	1.5	ร่วน
				4		7.0	20	1.0	ร่วน
				5		6.9	21	1.0	ร่วน

ตาราง ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดินจากอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จังหวัดกำแพงเพชร (ต่อ)

ว/ด/ป	เวลา	สถานที่	รหัส	จุดย่อยที่	พิกัดที่ตั้ง	pH	อุณหภูมิ (^{o}C)	ความชื้น (%)	เนื้อดิน
17/1/2558	10.35	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW16	1	-	6.8	20	1.0	ร่วน
				2		6.8	20	1.5	ร่วน
				3		6.9	21	1.0	ร่วน
				4		6.8	19	1.5	ร่วน
				5		6.8	21	1.5	ร่วน
17/1/2558	10.43	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW17	1	-	6.5	17	2.5	ร่วน
				2		6.8	17	2.0	ร่วน
				3		6.8	20	1.5	ร่วน
				4		6.6	17	2.0	ร่วน
				5		6.7	18	2.0	ร่วน
17/1/2558	10.50	อุทยานแห่งชาติแม่วงก์ จ.กำแพงเพชร	MW18	1	-	7.0	19	1.0	ร่วน
				2		6.8	18	1.5	ร่วน
				3		6.8	22	1.5	ร่วน
				4		7.0	18	1.0	ร่วน
				5		6.8	18	1.5	ร่วน