วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ในประเทศไทยด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลและการก่อโรคต่อหนอนกินรังผึ้ง, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)

Molecular identification of entomopathogenic nematodes of the Genus *Heterorhabditis* in Thailand and pathogenicity to larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)

รัตนาวดี อ่อนวงษ์[1], นิยาภรณ์ ขวัญเกตุ[1], อัศเลข รัตนวรรณี[1], ประกาย ราชณุวงษ์[1] และ อธิราช หนูสีดำ[1]*

Rattanawadee Onwong[1], Niyaporn Khwanket[1], Atsalek Rattanawannee[1], Prakai Rajchanuwong[1] and Atirach Noosidum[1]*

[1] *ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900*
[1] *Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 10900*

บทคัดย่อ: ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในวงศ์ Heterorhabdtidae จัดเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชที่มีความสำคัญสำหรับใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชหลายชนิดทั่วโลก เนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถทำให้แมลงศัตรูพืชตายภายใน 48-72 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงยังมีความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมายและสิ่งแวดล้อมอีกด้วย การศึกษานี้ได้จัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท ที่พบในประเทศไทยด้วยการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 28S rRNA กับฐานข้อมูล GeneBank พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท สามารถจัดจัดจำแนกเป็น *Heterorhabditis indica* จำนวน 4 ไอโซเลท และ *Heterorhabditis baujardi* จำนวน 1 ไอโซเลท การศึกษาประสิทธิภาพการก่อให้เกิดโรคต่อหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) วัย 5 ที่อัตรา 12, 25, 50, 100 และ 200 Infective Juveniles (IJs)/หนอน 1 ตัว พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งหมดสามารถเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้งได้ 80-100% ที่เวลา 72 ชั่วโมง หลังการทดสอบ ซึ่ง *H. indica* EPNKU64, *H. indica* EPNKU67, *H. indica* EPNKU68, *H. indica* EPNKU82 และ *H. baujardi* EPNKU75 มีค่าความเข้มข้นที่ทำให้แมลงตาย 90 เปอร์เซ็นต์ (LC_{90}) เท่ากับ 4, 18, 22, 25 และ 165 IJs/หนอน 1 ตัว ตามลำดับ

คำสำคัญ: ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง; การควบคุมโดยชีววิธี; ลำดับนิวคลีโอไทด์; หนอนกินรังผึ้ง; 28S rRNA

ABSTRACT: Entomopathogenic nematodes (EPNs) in the family Heterorhabdtidae are important biological control agents for controlling various insect pests worldwide, because the EPNs kill insect pests within 48-72 hours. EPNs are safe to other non-target organisms and environments. This study was to identify five isolates of *Heterorhabditis* spp. collected from Thailand by analyzing and comparing 28S rRNA sequences with the GeneBank database. The results showed that five isolates of *Heterorhabditis* spp. were identified as 4 isolates of *Heterorhabditis indica* and 1 isolate of *Heterorhabditis baujardi.* The pathogenicity of five *Heterorhabditis* spp. against the 5th instar larva of the greater wax moth (*Galleria mellonella*) was tested at the rate of 12, 25, 50, 100 and 200 Infective Juveniles (IJs)/Insect larva. All five *Heterorhabditis* spp. were able to kill the insect larvae for 80-100% after 72 hours of exposure. The

* Corresponding author: fagrarn@ku.ac.th

Received: date; February 4, 2021 Accepted: date; June 9, 2021 Published: date; December 5, 2021

lethal concentration at 90% (LC_{90}) of *H. indica* EPNKU64, *H. indica* EPNKU67, *H. indica* EPNKU68, *H. indica* EPNKU82 and *H. baujardi* EPNKU75 were 4, 18, 22, 25 and 165 IJs/larva, respectively.
Keywords: entomopathogenic nematode; biological control; nucleotide; greater wax moth; 28S rRNA

บทนำ

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (entomopathogenic nematodes) เป็นหนอนตัวกลมขนาดเล็ก ลำตัวเรียวยาว ไม่เป็นข้อปล้อง ไม่มีรยางค์ (Adams and Nguyen, 2002; Hunt, 2007) ดำรงชีวิตเป็นอิสระ (free living) มีชีวิตอยู่ได้นานในธรรมชาติ และทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ สามารถเข้าทำลายระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม (Adams and Nguyen, 2002; Gaugler, 2002) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีความสำคัญในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้แก่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในวงศ์ Steinernematidae และวงศ์ Heterorhabditidae (Grewal et al., 2005) ซึ่งพบว่ามีแบคทีเรียร่วมอาศัย (symbiotic bacteria) ในสกุล *Xenorhabdus* และสกุล *Photorhabdus* ตามลำดับ อยู่ภายในทางเดินอาหาร (Kaya and Gaugler,1993; Lewis and Clarke, 2012) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะตัวอ่อนที่ 3 (ระยะ infective juvenile หรือ ระยะ IJ) เป็นเพียงระยะเดียวที่จะสามารถเข้าทำลายแมลงอาศัยที่อยู่ภายในดินหรือพื้นดิน โดยเข้าทำลายทางช่องเปิดทางธรรมชาติของแมลงเช่น ปาก รูหายใจ ทวาร หรือชอนไชเข้าผนังลำตัวแมลงโดยตรง (Kaya and Gaugler,1993; Lewis and Clarke, 2012) เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าสู่ภายในช่องว่างลำตัวของแมลงอาศัยแล้ว จะปล่อยแบคทีเรียร่วมอาศัยออกมาและแบคทีเรียร่วมอาศัยมีการแบ่งเซลล์เพิ่มปริมาณภายในตัวแมลง ทำให้แมลงอาศัยเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายอย่างรวดเร็วภายใน 24-48 ชั่วโมง (Gaugler, 2002; Lewis and Clarke, 2012)

ปัจจุบันไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้รับความนิยมและถูกนำมาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชทดแทนการใช้สารเคมีในกระบวนการเพาะปลูกพืชแบบเกษตรอินทรีย์ เนื่องจากเป็นสารชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดตัวอ่อนของแมลงศัตรูพืช หรือแมลงที่อาศัยอยู่ตามพื้นดินได้เป็นอย่างดี เช่น หนอนด้วง หนอนแมลงวัน และหนอนผีเสื้อ และได้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์การค้าพร้อมใช้ในหลายประเทศทั่วโลก ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงยังมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ผลผลิต ผู้ผลิต รวมทั้งผู้บริโภค (Gaugler, 2002; Grewal et al., 2005; Lewis and Clarke, 2012; Lewis et al., 2015) อย่างไรก็ตาม การใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชให้ประสบความสำเร็จนั้นมีปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่ ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ชนิดแมลงศัตรูพืช และปัจจัยแวดล้อม (Grewal et al., 2005; Shapiro-Ilan et al., 2006) ซึ่งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเข้าทำลายเหยื่อที่แตกต่างกัน เนื่องจาก ความแตกต่างทางชีววิทยาและนิเวศวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดนั้น นอกจากนั้น ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงบางชนิดยังมีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดแมลงอาศัย (Gaugler, 2002; Grewal et al., 2005) ความชื้น และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน (Kaya, 1990; Molyneux, 1985; Shapiro-Ilan et al., 2006) และการใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเฉพาะถิ่นจะช่วยส่งเสริมให้การใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงควบคุมแมลงศัตรูพืชมีความสำเร็จมากขึ้น เนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเฉพาะถิ่นในหลายพื้นที่แสดงศักยภาพและมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าสายพันธุ์ต่างประเทศ (Maneesakorn et al., 2010; Noosidum et al., 2010)

ในประเทศไทยมีการศึกษาและค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดพันธุ์ท้องถิ่นในวงศ์ Steinernematidae และวงศ์ Heterorhabditidae มากกว่า 100 ไอโซเลท ในช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา (Stock et al., 1998; Maneesakorn et al., 2010; Noosidum et al., 2010; Vitta et al., 2017; Yooyangket et al., 2018; Nitjarankul et al., 2020; Suwannaroj et al., 2020) และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทยเหล่านั้นบางชนิดยังมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงได้เป็นอย่างดี และสามารถเข้าทำลายแมลงได้หลากหลายชนิด เช่น ด้วงญี่ปุ่น (Maneesakorn et al., 2010) หนอนกินรังผึ้ง (Noosidum et al., 2010; Nitjarunkul et al., 2020) หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก (Maketon et al., 2011; Noosidum et al., 2016) และด้วงหมัดผัก (Noosidum et al., 2021) เป็นต้น ซึ่งจากข้อมูลจะเห็นได้ว่าประเทศไทยมีความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงค่อนข้างสูง การสำรวจหาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเฉพาะถิ่นเพื่อนำมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชจึงเป็นเรื่องที่กำลังได้รับความสนใจ แต่อย่างไรก็ตามไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ถูกค้นพบใหม่นั้นมีความจำเป็นต้องจัดจำแนกชนิดเพื่อทราบชนิดและกลุ่มของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ชัดเจน ซึ่งโดยทั่วไปการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงนั้นจะนิยมใช้วิธีการทางสัณฐานวิทยา (Nguyen and Hunt, 2007), วิธีทางชีวโมเลกุล (Stock,

2009) หรือใช้ทั้ง 2 วิธีร่วมกัน (Stock and Goodrich-Blair, 2012; Hunt and Nguyen, 2016; Nitjarankul et al., 2020) เพื่อการจัดจำแนกชนิดที่ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

เนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีขนาดเล็ก และมีความใกล้เคียงกันของลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกค่อนข้างสูง (Adams and Nguyen, 2002; Nguyen and Hunt, 2007) การจัดจำแนกโดยวิธีการทางสัณฐานวิทยาจึงทำได้ยากและใช้เวลานาน ผู้วิจัยยังต้องมีความรู้และความเชี่ยวชาญในการจัดจำแนกเป็นอย่างดี อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการจำแนกชนิดที่ไม่ถูกต้องได้ง่าย (Nitjarunkul et al., 2020) ดังนั้นการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลจึงเป็นวิธีการจัดจำแนกชนิดได้ถูกต้องและรวดเร็วกว่าการจัดจำแนกโดยวิธีการทางสัณฐานวิทยา ซึ่งในปัจจุบันการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลนั้นได้รับการยอมรับและมีความแม่นยำค่อนข้างสูง (Stock, 2009; Stock and Goodrich-Blair, 2012) และยังสามารถนำข้อมูลลำดับเบสที่ศึกษาได้มาใช้ในการศึกษาและวิจัยทางด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้ เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic variability) ความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic relationship) ได้อีกด้วย (Hunt and Nguyen, 2016)

การศึกษานี้ผู้วิจัยได้สำรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* spp. ในประเทศไทยจำนวน 5 ไอโซเลท จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยใช้วิธีจัดจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 28S rRNA แล้วทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GeneBank จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* spp. ข้างต้นที่มีต่อหนอนกินรังผึ้งในระดับห้องปฏิบัติการ ที่จะทำให้ทราบถึงชนิดและประสิทธิภาพการก่อโรคเบื้องต้นของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 5 ไอโซเลท เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์กำจัดแมลงต่อไป

วิธีการศึกษา

1. การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนกินรังผึ้ง

นำตัวเต็มวัยของผีเสื้อหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella* L.) เพศผู้และเพศเมียจำนวน 10 คู่ ใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 15×21×7 เซนติเมตร วางถ้วยที่บรรจุสำลีชุบน้ำผึ้ง 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อเป็นอาหารให้ตัวเต็มวัย จากนั้นปิดฝาที่บุด้านบนด้วยตะแกรงลวดเพื่อระบายอากาศ สอดกระดาษสีขาวใต้ฝากล่องทั้งสี่ด้าน เมื่อผีเสื้อหนอนกินรังผึ้งวางไข่บนกระดาษ นำกระดาษมาตัดเฉพาะที่มีกลุ่มไข่แล้วนำไปวางในกล่องพลาสติกเลี้ยงแมลงใบใหม่ ที่บรรจุอาหารเทียมหนอนกินรังผึ้งบดละเอียด 250 กรัม (อาหารเทียม 1 กิโลกรัม ประกอบด้วย แป้งข้าวโพด 233 กรัม, ข้าวสารบดละเอียด 140 กรัม, ถั่วเขียวบดละเอียด 140 กรัม, นมผง 55 กรัม, แผ่นผึ้ง 140 กรัม, น้ำผึ้ง 78 มิลลิลิตร, วิตามินรวม 19 มิลลิลิตร, กลีเซอรีน 78 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 177 มิลลิลิตร) ประมาณ 7 วัน ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนเพิ่มอาหารเทียมให้หนอนกินรังผึ้งทุก 7 วัน เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75±5 เปอร์เซ็นต์ จนกว่าหนอนกินรังผึ้งจะเจริญเป็นหนอนวัย 5 (ประมาณ 25-30 วัน) แบ่งหนอนวัย 5 ไปใช้ในการทดลองและนำส่วนที่เหลือไปเลี้ยงขยายพันธุ์ต่อไป (Noosidum et al., 2010)

2. **การเก็บและการแยกตัวอย่างไส้เดือนฝอยออกจากดิน**

นำตัวอย่างดินที่เก็บในพื้นที่เขตภาคตะวันตกของประเทศไทย ประกอบด้วย จังหวัดกาญจนบุรี (อำเภอไทรโยค 3 พื้นที่ อำเภอทองผาภูมิ 6 พื้นที่ และอำเภอสังขละบุรี 1 พื้นที่) จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (อำเภอหัวหิน 1 พื้นที่) และจังหวัดเพชรบุรี (อำเภอแก่งกระจาน 20 พื้นที่) และ โดยทุกพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างดินเป็นพื้นที่ป่าและใกล้แหล่งน้ำ เนื่องจากพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างดินจะต้องมีความชื้นสูง ไม่มีการใช้สารเคมีและชีวภัณฑ์ในการป้องกันและกำจัดแมลงมาก่อน โดยตักดินที่มีความชื้น จากหน้าดินจนถึงความลึก 20 เซนติเมตร ปริมาณ 1 กิโลกรัม (จำนวน 3 จุด ต่อ 1 พื้นที่ แต่ละจุดห่างกันไม่น้อยกว่า 20 เมตร และไม่นำมารวมกัน) ใส่ถุงพลาสติกและมัดปากถุงเพื่อรักษาความชื้นของดิน เก็บตัวอย่างดินไว้ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งเพื่อรักษาอุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส (Kaya and Stock, 1997)

แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินด้วยวิธี modified insect baiting technique (Kaya and Stock, 1997) โดยใช้หนอนกินรังผึ้งวัย 5 จำนวน 10 ตัว ใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 7×7×10 เซนติเมตร ที่บรรจุดินปริมาณ 250 กรัม (ตัวอย่างดินละ 4 ซ้ำ) ปิดฝาและเก็บไว้ในห้องมืดอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75±5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหนอนกินรังผึ้งถูกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

เข้าทำลาย สังเกตุจากซากหนอนกินรังผึ้งที่พบมีลักษณะแห้งคล้ายมัมมี่และซากหนอนมีสีแดงเข้มคล้ายกันทั้งหมด แยกซากหนอนกินรังผึ้งล้างด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที ล้างด้วยฟอร์มาลีน ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที และน้ำสะอาดนาน 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง (Kaya and Stock, 1997) จากนั้นนำซากหนอนกินรังผึ้งมาผ่านวิธีการ modified White trap (White, 1972) โดยใช้ผ้าขาวบางขนาด 7×7 เซนติเมตร วางพาดบนจานเพาะเชื้อขนาด 5.5 เซนติเมตร ที่วางอยู่ในกล่องพลาสติกขนาด 7×7×10 เซนติเมตร จากนั้นวางซากหนอนของแต่ละพื้นที่ลงบนผ้าขาวบาง เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝาทิ้งไว้ในที่มืด เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ ออกจากซากหนอนกินรังผึ้งและเคลื่อนที่ลงสู่น้ำกลั่น เก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณต่อไป

เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงตามวิธีการของ Kaya and Stock (1997) โดยหยดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ อัตรา 200 IJs/น้ำ 700 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่นที่วางอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาด 5.5 เซนติเมตร จากนั้นใส่หนอนกินรังผึ้งวัย 5 จำนวน 5 ตัวลงในจานเพาะเชื้อ ปิดฝาและเก็บไว้ในห้องมืด อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75±5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหนอนกินรังผึ้งตายให้นำซากหนอนกินรังผึ้งมาผ่านวิธีการ modified White trap (White, 1972) โดยการเปิดฝาจานเพาะเชื้อที่มีซากหนอนกินรังผึ้งแล้วนำไปวางลงในจานเพาะเชื้อขนาด 9.5 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อขนาดใหญ่ ปิดฝาทิ้งไว้ในที่มืด เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะ IJ ออกจากซากหนอนกินรังผึ้งและเคลื่อนที่ลงสู่น้ำกลั่น เก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ 200 IJs/น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และนำไปเก็บรักษาภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 16±2 องศาเซลเซียส เพื่อนำใช้ในการทดลองต่อไป ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ใช้ในการทดลองมีอายุไม่เกิน 3 สัปดาห์

3. การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยหนอนกินรังผึ้งวัย 5 ตามวิธีการทดลองข้อ 2 จากนั้นเมื่อหนอนตายให้ผ่าซากหนอนกินรังผึ้งที่ถูกเข้าทำลายด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแต่ละตัวอย่างในสารละลาย Ringer's solution (NaCl 22.5 กรัม, $CaCl_2$ 1 กรัม, NaH_2CO_3 0.5 กรัม, KCL 1 กรัม ต่อน้ำกลั่น 2.5 ลิตร) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย (hermaphroditic female) จำนวน 30 ตัว มาล้างด้วยน้ำกลั่น นาน 1 นาที ซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เตรียมไว้ไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GenUp™gDNA kit (Biotech Rabbit: Germany)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยดัดแปลงตามวิธีการของ Nitjarankul et al. (2020) ด้วยวิธีการ Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer ที่ตำแหน่งยีน 28S rRNA ประกอบด้วย forward primers: D2A_F (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT-3') และ reverse primers: D3B_R (5'-TGCGAAGGAACCAGCTACTA-3') (Nunn, 1992) อัตราส่วนที่ใช้มี 2x master mix (cat.no. BR0100201; Biotech Rabbit: Germany) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร, primer D2A_F และ primer D3B_R อย่างละ 2 ไมโครลิตร (0.1 นาโนโมล /ไมโครลิตร), น้ำกลั่นปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ genomic DNA ปริมาตร 12 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม) ใส่องค์ประกอบทั้งหมดลงใน PCR tube ขนาด 200 ไมโครลิตร จากนั้นเริ่มจากกระบวนการ initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ต่อด้วยกระบวนการ denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, annealing 50 องศาเซลเซียส 1 นาที และ elongation 72 องศาเซลเซียส 2 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 35 รอบ และเข้าสู่กระบวนการสุดท้ายคือ final elongation 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GenUP™ PCR Cleanup Kit (Biotech Rabbit: Germany) นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Prima Scientific Ltd., Thailand และ Bio Basic Ltd., Singapore) จากนั้นวิเคราะห์ความใกล้เคียงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ได้กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงของศูนย์ข้อมูล The national center for biotechnology information (NCBI) (NCBI, 2020)

4. การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีต่อหนอนกินรังผึ้ง

ทดสอบความสามารถของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในการก่อโรคกับหนอนกินรังผึ้งวัย 5 ด้วยวิธี filter paper bioassays ตามวิธีการ ของ Glazer and Lewis (2000) โดยหยดสารแขวนลอยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่อัตรา 12, 25, 50, 100 และ 200 IJs/หนอน 1 ตัว ที่อยู่ในน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใช้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม ลงบนกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.27 เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่นที่บรรจุอยู่ใน 24 well-plates จากนั้นนำหนอนกินรังผึ้งวัย 5 ใส่ลงไปในแต่ละหลุมจำนวน 1 ตัว/หลุม ปิดฝาและเก็บ 24 well-plates ที่ทดสอบไว้ในห้องมืดอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75±5 เปอร์เซ็นต์ โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว บันทึกอัตราการตายที่เวลา 72 ชั่วโมง หลังการทดสอบ

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเดียวกันและระหว่างชนิด (pairwise distance) วิเคราะห์หาโมเดลที่เหมาะสมในการสร้างแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) และหาค่า maximum likelihood (ML) ที่ 1000 รอบ ด้วยโปรแกรม MEGA-X version 10.1.1 (Kumar et al., 2018)

การทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต่อหนอนกินรังผึ้งวัย 5 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน โดยใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่กรรมวิธีด้วย Tukey's HSD test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม R version 4.1.2 (R Core Team, 2021) จากนั้นคำนวณหาอัตราการใช้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ทำให้หนอนกินรังผึ้งวัย 5 ตาย 90% (LC_{90}) ด้วยโปรแกรม Probit analysis (Finney, 1971)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล

ผลการคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดินด้วยวิธี Modified insect baiting technique พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Hetrerorhabditis* จำนวน 5 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินทั้งหมด 90 ตัวอย่าง เนื่องจากซากหนอนมีการเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและซากหนอนกินรังผึ้งที่พบมีลักษณะแห้งคล้ายมัมมี่และซากหนอนมีสีแดงเข้มคล้ายกันทั้งหมด (**Figure 1**) โดยแบ่งออกเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่พบในเขตพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และเพชรบุรี จำนวน 3, 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ (**Table 1**)

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 28S region ของสารพันธุกรรมภายในนิวเคลียส (nuclear DNA) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 5 ไอโซเลท ไปเปรียบเทียบการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในฐานข้อมูล NCBI พบว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 5 ไอโซเลท จัดแบ่งเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis indica* จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ *H. indica* EPNKU64 (MW513451), *H. indica* EPNKU67 (MW513452), *H. indica* EPNKU68 (MW513453) ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในจังหวัดกาญจนบุรี และ *H. indica* EPNKU82 (MW513454) ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* (MK063805.1) ในฐานข้อมูล NCBI ถึง 99-100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอีก 1 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างดินในจังหวัดเพชรบุรี จัดเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis baujardi* EPNKU75 (MW513455) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. baujardi* (MF621012.1) ในฐานข้อมูล NCBI ถึง 99.82 เปอร์เซ็นต์

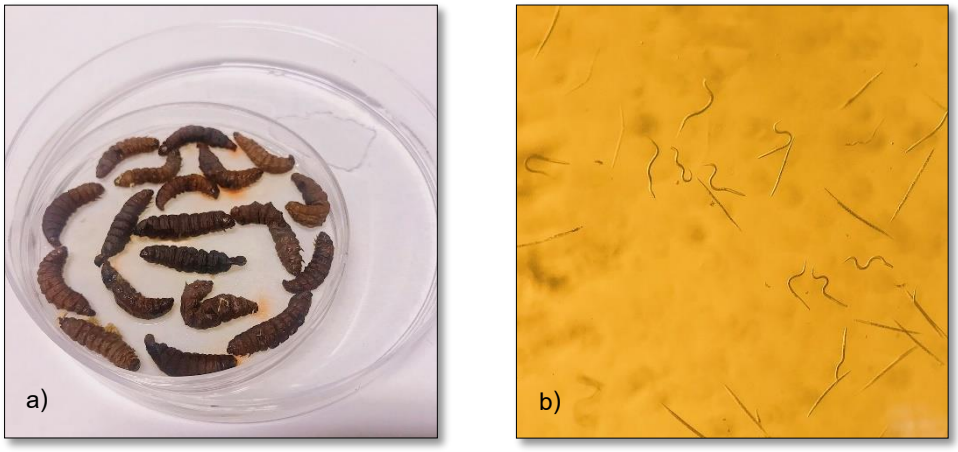

Figure 1 Infection of the *Heterorhabditis* spp.: a) the red colored-insect cadavers which were infected by *Heterorhabditis* spp.; b) the infective juveniles in a modified White trap.

Table 1 Locations and GPS coordinates of the five entomopathogenic nematode isolates

EPN isolates	Locations	GPS coordinates
Heterorhabditis indica EPNKU64	Sai Yok District, Kanchanaburi Province	14°14'23.5"N 99°03'36.3"E
Heterorhabditis indica EPNKU67	Sai Yok District, Kanchanaburi Province	14°14'23.8"N 99°03'35.7"E
Heterorhabditis indica EPNKU68	Sai Yok District, Kanchanaburi Province	14°14'23.8"N 99°03'35.4"E
Heterorhabditis indica EPNKU82	Hua Hin District, Prachuap Khiri Khan Province	12°32'17.6"N 99°27'46.4"E
Heterorhabditis baujardi EPNKU75	Kaeng Krachan District, Phetchaburi Province	12°47'51.0"N 99°27'13.7"E

นอกจากนั้น เมื่อพิจารณาข้อมูลความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเดียวกันและระหว่างชนิด (pairwise distances) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงซึ่งมีความยาว 529 คู่เบส (base pairs) ในกลุ่ม *H. indica* EPNKU64 (MW513451), *H. indica* EPNKU67 (MW513452), *H. indica* EPNKU68 (MW513453) และ *H. indica* EPNKU82 (MW513454) พบว่าไม่มีความแตกต่างกับ *H. indica* (KY311814.1) แต่จะพบความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์กับ *H. baujardi* EPNKU75 (MW513455) และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดอื่นๆ ในขณะที่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. baujardi* EPNKU75 (MW513455) มีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดอื่นๆ อย่างชัดเจน ดังแสดงใน **Table 2**

ผลการวิเคราะห์แบบจำลองแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการ ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 5 ไอโซเลท ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 28S rRNA ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในฐานข้อมูล GeneBank ซึ่งประกอบไปด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. zealandica* (EU099035.1), *H. safricana* (EU100416.1), *H. noenieputensis* (JX624110.1), *H. Mexicana* (EU100414.1), *H. megidis* (EU100413.1), *H. marelatus* (EU100412.1), *H. indica* (KY311814.1), *H. georgiana* (EU099033.1), *H. floridensis* (EU099034.1), *H. bacteriophora* (KT378445.1), *H. atacamensis* (HM230724.1), *H. amazonensi* (EU099036.1) และ *S. carpocapsae* (KY914572.1) พบว่าแบบจำลองแผนภูมิต้นไม้ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* เป็นแบบกลุ่มไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีความสัมพันธ์มาจากชาติพันธุ์เดียว (monophyletic) และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 5 ไอโซเลท จัดเข้าอยู่ในกลุ่มของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* (**Figure 2**)

การศึกษานี้สอดคล้องกับ Maketon et al. (2011) ที่ได้รายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* ในจังหวัดกาญจนบุรี ของประเทศไทยเช่นเดียวกัน นอกจากนั้นยังมีรายงานการค้นพบ *H. indica* ในจังหวัดอื่นๆ ของประเทศไทยเพิ่มเติม เช่น *H. indica* MP17 ในจังหวัดขอนแก่น, *H. indica* MP111 ในจังหวัดกระบี่ (Maneesakorn et al., 2010), *H. indica* K1, *H. indica* K2,

H. indica K3, *H. indica* K4 และ *H. indica* K5 ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี (Noosidum et al., 2010) และมีรายงานการค้นพบ *H. indica* เพิ่มเติมอีก ในจังหวัดพิษณุโลกจำนวน 14 ไอโซเลท (Suwannaroj et al., 2020) ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี เพชรบุรี ระยอง ฉะเชิงเทรา จันทบุรี นราธิวาส ชลบุรี และเชียงใหม่ จำนวน 9, 7, 3, 3, 2, 1, 1 และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ (Nitjarunkul et al., 2020)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้รายงานการพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. baujardi* ในเขตจังหวัดเพชรบุรีเป็นครั้งแรก ซึ่งเป็นการรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. baujardi* เพิ่มเติมจากการผลการศึกษาของ Noosidum et al. (2010) ที่ได้ค้นพบ *H. baujardi* K6 จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี และ Yooyangket et al. (2018) ได้ค้นพบ *H. baujardi* จำนวน 2 ไอโซเลท ที่อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์

ทั้งนี้สภาพแวดล้อมในประเทศไทยถือเป็นปัจจัยหลักในการดำรงชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และเป็นสาเหตุที่มีการค้นพบความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสูงมากในประเทศไทย เนื่องจากสภาพแวดล้อมของประเทศไทยที่จัดอยู่ในแถบภูมิประเทศแบบเขตร้อนชื้น มีฝนตกชุกเกือบทั้งปี และมีความชื้นในดินสูงจึงมีความเหมาะสมกับการพักอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Molyneux, 1985) นอกจากนี้อุณหภูมิของสภาพแวดล้อมถือเป็นอีกหนึ่งในปัจจัยหลักที่มีผลต่อวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ทั้งในด้านของการพักพิงอาศัยในธรรมชาติ การเจริญเติบโต และการเข้าทำลายแมลงอาศัย (Kaya, 1990; Glazer and Lewis, 2000; Gaugler, 2002; Shapiro-Ilan et al., 2006)

อย่างไรก็ตาม การค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงนั้นยังขึ้นอยู่กับปัจจัยสภาพแวดล้อมอื่นๆ อีกหลายประการ เช่น ความชื้น อุณหภูมิ แสง คุณสมบัติของดิน ลักษณะภูมิประเทศ ชนิดและความชุกชุมของแมลงอาศัย เป็นต้น (Gaugler, 2002; Hominick, 2002) ซึ่งปัจจัยดังกล่าวจะส่งผลต่อการค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เช่น การค้นพบ *H. indica* ในประเทศอินเดีย และในประเทศเคนยา (Stack et al., 2000) ที่มีลักษณะภูมิอากาศคล้ายคลึงกับประเทศไทย และยังมีโอกาสพบ *H. indica* มากในพื้นที่ที่มีเขตติดต่อกับทะเลหรือชายฝั่งทะเลอีกด้วย (Griffin et al., 2000; Hominick, 2002; Nitjarunkul et al., 2020) ในทำนองเดียวกัน *H. baujardi* ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในประเทศเวียดนาม (Phan et al., 2003) ซึ่งอยู่ในเขตพื้นที่ใกล้เคียงและมีส่วนชายฝั่งทะเลติดต่อกับประเทศไทย

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* ยังสามารถพบได้ในหลายประเทศทั่วโลก เช่น ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. amazonensis* ที่พบในประเทศบราซิล (Andaló et al., 2006) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. safricana*, *H. noenieputensis* ที่พบในประเทศแอฟริกาใต้ (Malan et al., 2008, 2014) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. gerradi* ที่พบในประเทศออสเตรเลีย (Plichta et al., 2009) และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. pakistanense* ที่พบในประเทศปากีสถาน (Shahina et al., 2017) เป็นต้น

Table 2 Pairwise distances of the 28S region between *Heterorhabditis indica* EPNKU64, *Heterorhabditis indica* EPNKU67, *Heterorhabditis indica* EPNKU68, *Heterorhabditis indica* EPNKU82 and *Heterorhabditis baujardi* EPNKU75 and other closely related species of *Heterorhabditis*

	28S region	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	***H. indica* EPNKU64 MW513451**		0	0	0	0	1	19	19	20	21	35	37	37	38	40	43	44
2	***H. indica* EPNKU67 MW513452**	0.00		0	0	0	1	19	19	20	21	35	37	37	38	40	43	44
3	***H. indica* EPNKU68 MW513453**	0.00	0.00		0	0	1	19	19	20	21	35	37	37	38	40	43	44
4	***H. indica* EPNKU82 MW513454**	0.00	0.00	0.00		0	1	19	19	20	21	35	37	37	38	40	43	44
5	*H. indica* KY311814.1	0.00	0.00	0.00	0.00		1	19	19	20	21	35	37	37	38	40	43	44
6	*H. noenieputensis* JX624110.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		18	18	19	20	37	37	37	38	40	43	44
7	***H. baujardi* EPNKU75 MW513455**	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03		5	2	5	35	33	35	36	38	39	44
8	*H. mexicana* EU100414.1	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01		4	4	35	33	33	36	36	37	42
9	*H. amazonensis* EU099036.1	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.00	0.01		4	35	33	33	36	36	37	40
10	*H. floridensis* EU099034.1	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.01	0.01	0.01		38	34	36	37	39	40	43
11	*H. safricana* EU100416.1	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08		26	3	27	6	11	12
12	*H. bacteriophora* KT378445.1	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.05		23	3	26	27	31
13	*H. atacamensis* HM230724.1	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.01	0.04		24	3	8	9
14	*H. georgiana* EU099033.1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.05	0.01	0.05		27	28	32
15	*H. marelatus* EU100412.1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08	0.01	0.05	0.01	0.05		11	12
16	*H. zealandica* EU099035.1	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.07	0.07	0.08	0.02	0.05	0.02	0.06	0.02		11
17	*H. megidis* EU100413.1	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09	0.02	0.06	0.02	0.06	0.02	0.02	

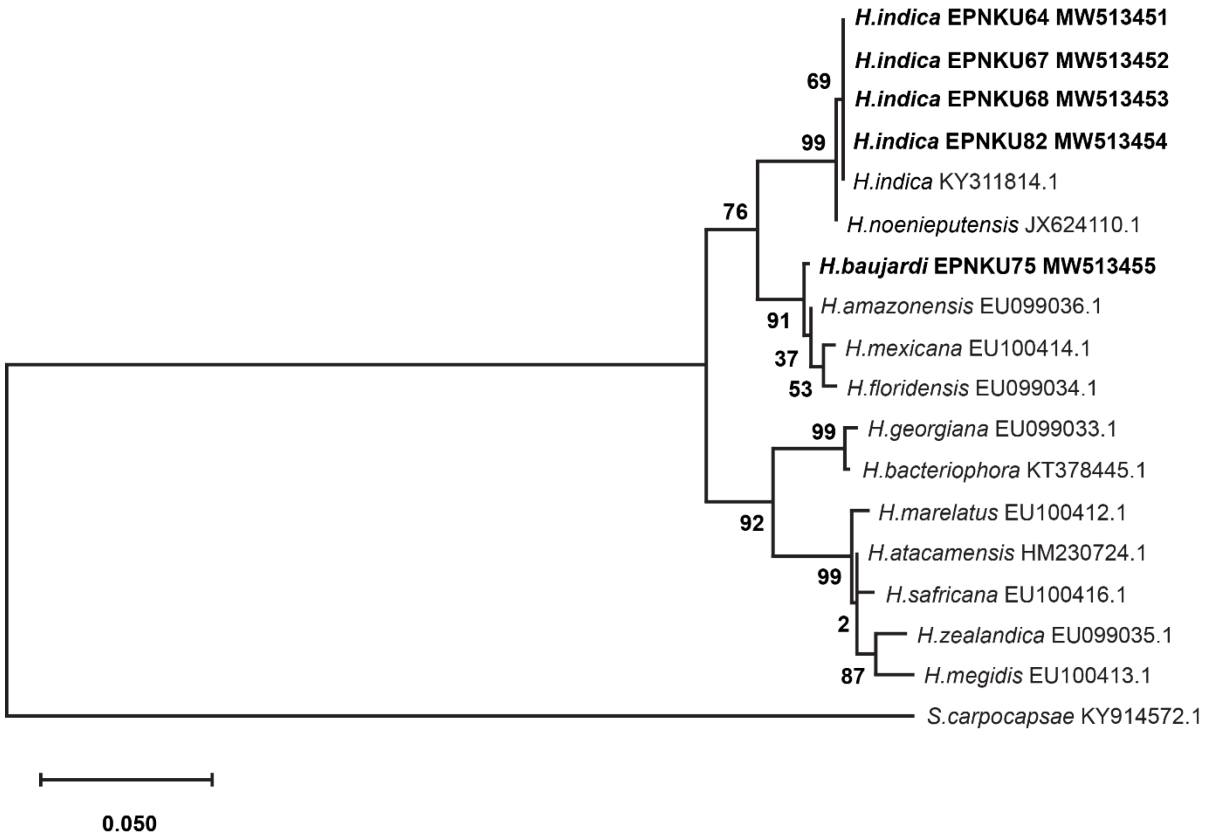

Figure 2 Phylogenetic relationships of *Heterorhabditis indica* EPNKU64, *Heterorhabditis indica* EPNKU67, *Heterorhabditis indica* EPNKU68, *Heterorhabditis indica* EPNKU82 and *Heterorhabditis baujardi* EPNKU75 and other closely related of *Heterorhabditis* spp. base on 28s rRNA sequences. *Steinernema carpocapsae* was used as the outgroup taxon.

2. การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีต่อหนอนกินรังผึ้ง

การทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* EPNKU64, *H. indica* EPNKU67, *H. indica* EPNKU68, *H. indica* EPNKU82 และ *H. baujardi* EPNKU75 ในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้งวัย 5 ที่อัตรา 12, 25, 50, 100 และ 200 IJs/หนอน 1 ตัว ด้วยวิธี filter paper bioassay โดยใช้ 24 well plates หลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งหมดทำให้หนอนกินรังผึ้งวัย 5 มีการตายแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) อย่างไรก็ตาม ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทุกตัวทำให้หนอนกินรังผึ้งวัย 5 ตายไม่แตกต่างกันในทุกอัตราการใช้ ($df = 5,12$; $P > 0.01$) ซึ่งมีค่าการตายอยู่ระหว่าง 70-100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่ที่อัตรา 12 IJs/หนอน 1 ตัว (**Figure 3**) และเมื่อบันทึกผลการทดลองหลังการทดสอบ 168 ชั่วโมง พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่นำมาทดสอบในทุกอัตราการใช้ มีประสิทธิภาพสูงในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้งวัย 5 ได้ 86.67-100.00 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างอัตราการใช้และตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ($df = 5,12$; $P > 0.01$) นอกจากนั้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่ออัตราการใช้เพิ่มขึ้นอัตราการตายของหนอนกินรังผึ้งก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกันในทุกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่นำมาทดสอบ

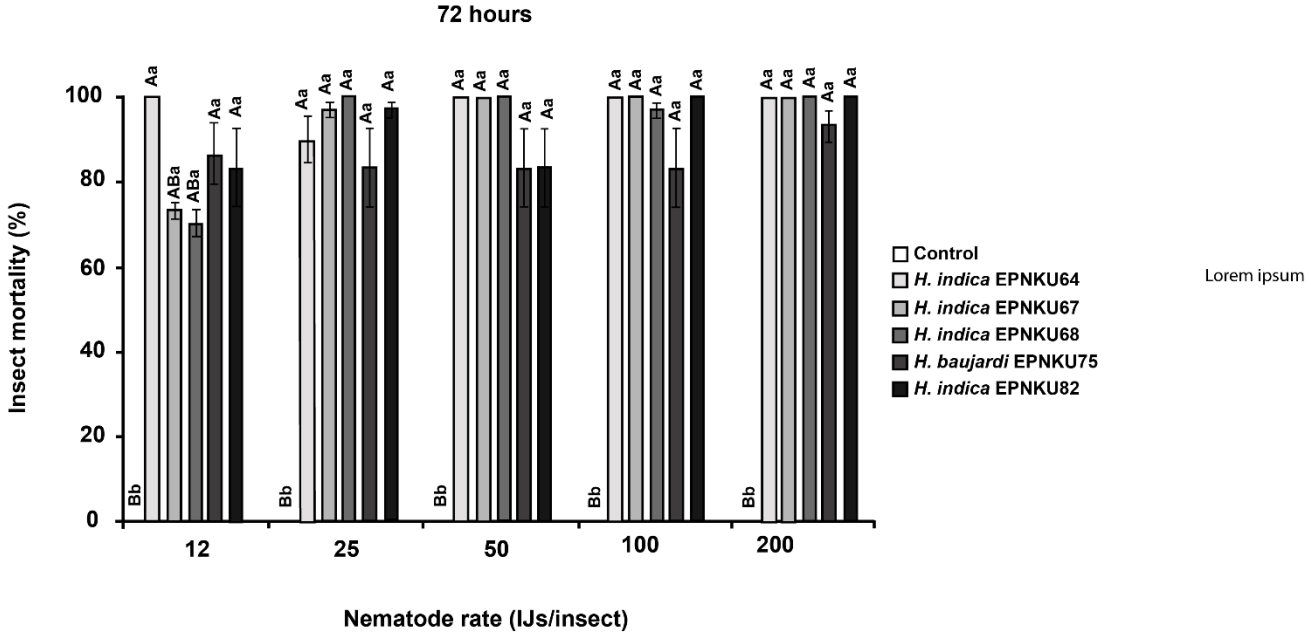

Figure 3 Mean (±SE) mortality of last-instar larval of *Galleria mellonella* infected by the infective juvenile stage of entomopathogenic nematodes (*Heterorhabditis indica* EPNKU64, *Heterorhabditis indica* EPNKU67, *Heterorhabditis indica* EPNKU68, *Heterorhabditis baujardi* EPNKU75 and *Heterorhabditis indica* EPNKU82) exposed to different rates [Control (0), 12, 25, 50, 100 and 200 IJs/insect] after 72 hours of exposure. Bars with the same letter (uppercase letters for comparison results between nematode treatments and lowercase letters for comparison results between rates) do not differ significantly at P = 0.05

เมื่อนำการตายของหนอนกินรังผึ้งวัย 5 ไปหาอัตราการใช้ที่ทำให้แมลงตาย 90 เปอร์เซ็นต์ (LC_{90}) พบว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* EPNKU64, *H. indica* EPNKU67, *H. indica* EPNKU68, *H. indica* EPNKU82 และ *H. baujardi* EPNKU75 มีค่า LC_{90} ที่เวลา 72 ชั่วโมง หลังการทดสอบ เท่ากับ 4, 18, 22, 25 และ 165 IJs/หนอน 1 ตัว ตามลำดับ (**Table 3**)

Table 3 Lethal concentration at 90% (LC_{90}) of five entomopathogenic nematodes against the 5th instar larvae of *Galleria mellonella* after 72 hours of exposure

EPN Species	LC_{90} (IJ/insect)	X^2	Regression equations
Heterorhabditis indica EPNKU64	4	28.23	Y = 0.75 + 0.84X
Heterorhabditis indica EPNKU67	18	0.14	Y = -3.64 + 3.94X
Heterorhabditis indica EPNKU68	22	38.95	Y = -1.56 + 2.13X
Heterorhabditis indica EPNKU82	25	32.63	Y = -0.15 + 1.02X
Heterorhabditis baujardi EPNKU75	165	3.16	Y = 0.92 + 0.01X

Y = mortality rate of *G. mellonella*; X = EPN rate (IJ/insect); 95% confidence limits (%) was not presented.

ผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้งวัย 5 โดยการทดสอบด้วยวิธี filter paper bioassays ที่อัตรา 12 IJs/หนอน 1 ตัว ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถทำให้หนอนกินรังผึ้งตายสูงถึง 70-100 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ Noosidum et al. (2010) ที่รายงานว่า *H. indica* K1, *H. indica* K4 และ *H. baujardi* K6 สามารถเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้ง โดยการทดสอบด้วยวิธี filter paper bioassays สามารถทำให้หนอนกินรังผึ้งวัย 5 ตายสูงถึง 80-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 3.75, 1.99 และ 4.99 IJs/หนอน ตามลำดับ

ผลการศึกษาครั้งนี้ ยังสอดคล้องกับรายงานผลการทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis* spp. ในการเข้าทำลายหนอนผีเสื้อชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี filter paper bioassays เช่น *H. indica* สามารถเข้าทำลายหนอนผีเสื้อกินใบสัก [*Eutectona machaeralis* (Walker)] ซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 4.57 IJs/หนอน (Kulkarni et al., 2011), *H. bacteriophora* สามารถเข้าทำลายหนอนแมลงวันแตง (*Dacus ciliates* Loew) วัย 3 ซึ่งมีค่า LC_{50} เท่ากับ 326 IJs/ตารางเซนติเมตร (Kamali et al., 2013) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายตัวอ่อนของแมลงได้ดี โดยเฉพาะในตัวอ่อนของแมลงกลุ่มหนอนผีเสื้อ เนื่องจากระยะตัวอ่อนของผีเสื้อมีผนังลำตัวที่อ่อนนุ่ม มีรูหายใจกว้าง ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าทำลายได้ง่าย โดยเฉพาะไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในกลุ่ม *Heterorhabditis* spp. ที่มีอวัยวะคล้ายฟันบริเวณหัวทำให้เจาะเข้าผ่านลำตัวของแมลงที่อ่อนนุ่มได้ดี (Bedding and Molyneux, 1982; Dowds and Peters, 2002)

อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงบางชนิดในอัตราการใช้ที่ต่ำกว่าสามารถแสดงความสามารถในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้งได้ดีกว่าในอัตราการใช้ที่สูงกว่า อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นระหว่างการทดลองนอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้น (ชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ชนิดแมลงศัตรูพืช และปัจจัยแวดล้อม) เช่น ความแข็งแรงของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและเหยื่อที่ใช้ทดสอบ พฤติกรรมของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและเหยื่อระหว่างทดสอบ (Grewal et al., 2005; Noosidum et al., 2010; Lewis et al., 2015) นอกจากนั้น ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในการเข้าทำลายแมลงอาศัยในห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกันนั้น อาจขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความชื้น ลักษณะดิน (Glazer and Lewis, 2000) และวิธีการใช้ที่เหมาะสม (Shapiro-Ilan et al., 2006) อีกด้วย

สรุป

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่พบใหม่ทั้ง 5 ไอโซเลท เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 28S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลธนาคารยีน (GeneBank) พบว่าสามารถจัดจำแนกได้เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *H. indica* จำนวน 4 ไอโซเลท และ *H. baujardi* จำนวน 1 ไอโซเลท และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 5 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้งวัย 5 สูงมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ แม้ใช้ในอัตรา 12 IJs/หนอน 1 ตัว เท่านั้น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีงบประมาณ 2559 (รหัสโครงการ ก-ษ (ด) 61.59) และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (รหัสโครงการ MRG6080195)

เอกสารอ้างอิง

Adams, B. J., and K. B. Nguyen. 2002. Taxonomy and systematics. P.1–33. In: R. Gaugler. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Andaló, V., K. B. Nguyen, and Jr. A. Moino. 2006. *Heterorhabditis amazonensis* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Amazonas, Brazil. Nematology. 8(6): 853–867.

Bedding, R. A., and A. S. Molyneux. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). Nematologica. 28(3): 354–359.

Dowds, B. C. A., and A. Peters. 2002. Virulence mechanisms. P.79–98. In: R. Gaugler. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Finney, D. J. 1971. Probit analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London. UK.

Gaugler, R. 2002. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Glazer, I., and E. E. Lewis. 2000. Bioassays for entomopathogenic nematodes. P.229–247. In: A. Navon and K. R. S. Ascher. Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. CABI Publishing, Wallingford, UK.

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

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

Hominick, W. M. 2002. Biogeography. P.115–144. In: R. Gaugler, ed. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Hunt, D. J. 2007. Overview of taxonomy and systematic. P.27–57. In: K. B. Nguyen and D. J. Hunt. Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts. Brill Academic, Leiden, The Netherlands.

Hunt, D. J., and B. K. Nguyen, 2016. Advances in Entomopathogenic nematode taxonomy and phylogeny. Nematology Monographs and Perspectives. Brill Academic. Leiden, The Netherlands.

Kamali, S., J. Karimi, M. Hosseini, R. Campos-Herrera, and L. W. Duncan. 2013. Biocontrol potential of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* on cucurbit fly, *Dacus ciliatus* (Diptera: Tephritidae). Biocontrol Science and Technology. 23: 1307–1323.

Kaya, H. K. 1990. Soil ecology. P.93–115. In: R. Gaugler and H. K. Kaya, eds. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, Florida.

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

Kaya, H. K., and S. P. Stock. 1997. Techniques in insect nematology. P.281–324. In: L. A. Lacey. Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press, California.

Kulkarni, N., S. Paunikar, and S. S. Hussaini. 2011. Susceptibility of teak skeletonizer, *Eutectona machaeralis* (Walker) to EPN, *Heterorhabditis indica* Poinar. World Journal of Zoology. 6(1): 33–39.

Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution. 35: 1547–1549.

Lewis, E. E., and D. J. Clarke. 2012. Nematode parasites and entomopathogens. P.395–424. In: F. Vega and H. K. Kaya. Insect Pathology, 2nd ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

Lewis, E. E., S. Hazir, A. Hodson, and B. Gulcu. 2015. Trophic relationships of entomopathogenic nematodes in agricultural habitats. P.139–163. In: R. Campos-Herrera. Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests. Springer International Publishing, Switzerland.

Maketon, M., V. Somsook, P. Ratanakorn, and D. Hotaka. 2011. Pathogenicity and culture of a *Heterorhabditis indica* isolate from Thailand. Nematropica. 41: 52–61.

Malan, A. P., K. B. Nguyen, J. Y. de Waal, and L. Tiedt. 2008. *Heterorhabditis safricana* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae), a new entomopathogenic nematode from South Africa. Nematology. 10(3): 381–396.

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

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

Molyneux, A. S. 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. (Nematoda: Rhabditida) at various temperatures and their subsequent infectivity of insects. Revue de Nematologie. 8: 165–170.

National center for biotechnology information (NCBI). 2021. Basic Local Alignment Search Tool. Available: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. Accessed January 15, 2021.

Nguyen, B. K., and D. J. Hunt. 2007. Entomopathogenic Nematode: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts Nematology Monographs and Perspectives. Brill Academic, Leidon, The Netherlands.

Nitjarunkul, A., A. Rattanawannee, and A. Noosidum. 2020. Genetic variation of *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David (Nematoda, Rhabditida) population in Thailand. Agriculture and Natural Resources. 54(4): 453–462.

Noosidum, A., A. K. Hodson, E. E. Lewis, and A. Chandrapatya. 2010. Characterization of new entomopathogenic nematodes from Thailand: foraging behavior and virulence to the Greater wax moth, *Galleria mellonell*a L. (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Nematology. 42(4): 281–291.

Noosidum, A., P. Satwong, A. Chandrapatya, and E. E. Lewis. 2016. Efficacy of *Steinernema* spp. plus anti-desiccants to control two serious foliage pests of vegetable crops, *Spodoptera litula* F. and *Plutella xylostella* L. Biological Control. 97: 48–56.

Noosidum, A., S. Mangtab, and E. E. Lewis. 2021. Biological control potential of entomopathogenic nematodes against the striped flea beetle*, Phyllotreta sinuata* Stephens (Coleoptera: Chrysomelidae). Crop Protection. 141: 105448.

Nunn, G. B. 1992. Nematode Molecular Evolution. Ph.D. Thesis. UIC, University of Nottingham.

Phan, K. L., S. A. Subbotin, N. C. Nguyen, and M. Moens. 2003. *Heterorhabditis baujardi* sp. n. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Vietnam and morphometric data for *H. indica* populations. Nematology. 5(3): 367–382.

Plichta, K. L., S. A. Joyce, D. Clarke, N. Waterfield, and S. P. Stock. 2009. *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: γ-Proteobacteria). Journal of Helminthology. 83: 309–20.

R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available: https://www.R-project.org/. Accessed Jan. 15, 2021.

Shahina, F., K. Tabassum, J. Salma, G. Mehreen, and R. Knoetze. 2017. *Heterorhabditis pakistanense* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae) a new entomopathogenic nematode from Pakistan. Journal of Helminthology. 91(2): 222–235.

Shapiro-Ilan, D. I., R. J. Stuart, and C. W. McCoy. 2006. A comparison of entomopathogenic nematode longevity in soil under laboratory conditions. Journal of Nematology. 38(1): 119–129.

Stack, C., S. Easwaramoorthy, U. Metha, M. Downes, C. Griffin, and A. Burnell. 2000. Molecular characterisation of *Heterorhabditis indica* isolates from India, Kenya, Indonesia and Cuba. Nematology. 2(5): 477–487.

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

Stock, S. P. 2009. Molecular approaches and the taxonomy of insect-parasitic and pathogenic nematodes. P.71–100. In: S. P. Stock, J. Vandenberg, I. Glazer and N. Boemare. Insect Pathogenic: Molecular Approches and Techniques. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Stock, S. P., and H. Goodrich-Blair. 2012. Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance. P.373–426. In L.A. Lacey. Manual of Techniques in Invertebrate Pathology 2nd ed. Academic Press, London, UK.

Suwannaroj, M., T. Yimthin, C. Fukruksa, P. Muangpat, T. Yooyangket, S. Tandhavanant, A. Thanwisai, and A. Vitta. 2020. Survey of entomopathogenic nematodes and associate bacteria in Thailand and their potenrial to control *Aedes aegypti*. Journal of Applied Entomology. 144(3): 212–223.

Vitta, A., C. Fukruksa, T. Yimthin, K. Deelue, C. Sarai, R. Polseela, and A. Thanwisai. 2017. Preliminary survey of entomopathogenic nematodes in upper northern Thailand. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 48(1): 18–26.

White, G. F. 1972. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. Science. 66(1709): 302–303.

Yooyangket, T., P. Muangpat, R. Polseela, S. Tandhavanant, A. Thanwisai, and A. Vitta. 2018. Identification of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria from Nam Nao National Park in Thailand and larvicidal activity of symbiotic bacteria against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. PLoS ONE. 13(4): e0195681.