ผลของอาหารที่มีต่อศักยภาพในการสืบพันธุ์และความรุนแรงในการเข้าทำลายเหยื่อของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

The effect of culture media on reproductive potential and virulence of entomopathogenic nematode

ภานุพงศ์ แสนบุดดา[1], **ทิพย์สุคนธ์ อนุภาพ**[2], **นุชรีย์ ศิริ**[1,2] **และ ประกายจันทร์ นิ่มกิ่งรัตน์**[1,2*]
Panupong Sanbudda[1], Thipsukon Anupap[2], Nutcharee Siri[1,2] and Prakaijan Nimkingrat[1,2*]

บทคัดย่อ: หนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อศักยภาพในการสืบพันธุ์และประสิทธิภาพในการเข้าทำลายเหยื่อของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงคือความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอาหารเลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต่อจำนวนลูกและค่าความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (The median lethal dose; LD_{50}) จำนวน 7 ชั่วรุ่น วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) มี 3 กรรมวิธีดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 อาหารเทียมสูตรกรมวิชาการเกษตร กรรมวิธีที่ 2 อาหารเทียมวุ้น (Nutrient-agar media) และกรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงเพิ่มปริมาณบนตัวแมลง (*In vivo*) ผลการทดลองพบว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมวุ้นสามารถให้จำนวนลูกในรุ่นที่ 1 และ 2 สูงกว่ากรรมวิธีอื่น โดยมีจำนวนลูกเฉลี่ยอยู่ที่ 61.81 และ 62.20 ตัว/พ่อแม่ 1 คู่ ตามลำดับ เมื่อทำการเลี้ยงผ่านไป 3 - 7 รุ่น พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เลี้ยงบนตัวแมลงมีแนวโน้มจำนวนลูกสูงกว่ากรรมวิธีอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ค่าเฉลี่ยความเป็นพิษของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เลี้ยงบนตัวแมลง (LD_{50}) ในลูกทั้ง 7 รุ่น มีค่าต่ำที่สุดอยู่ที่ 45.97 ตัว/แมลงอาศัย รองลงมาคือ กรรมวิธีที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมวุ้น (53.18 ตัว/แมลงอาศัย) และสูตรอาหารกรมวิชาการเกษตร (53.47 ตัว/แมลงอาศัย) ผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า คุณภาพและประสิทธิภาพของอาหารที่เลี้ยงมีผลต่อศักยภาพในการสืบพันธุ์และความรุนแรงในการเข้าทำลายเหยื่อของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระยะไม่กี่ชั่วรุ่นเท่านั้น การพัฒนาเทคนิคเพื่อคงสภาพลักษณะเด่นที่ต้องการนั้นจำเป็นต้องได้รับการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต
คำสำคัญ: ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, อาหารเทียม, ศักยภาพในการสืบพันธุ์, ความรุนแรงในการเข้าทำลายเหยื่อ

ABSTRACT: One of the main factors that affects the reproductive potential and virulence of entomopathogenic nematode (EPN) is the quality of culture media. The objective of this study was to examine the effects of different culture media on the number of offspring and median lethal dose (LD50) up to seven cycles of entomopathogenic nematode. Completely Randomized Design was used and EPNs were reared on three different media as follows: 1) Department of Agriculture (DOA) culture media 2) Nutrient-agar media and 3) *In vivo* as control. Results showed that Nutrient-agar media gave the highest number of offspring in the first and second cycles compared to other treatments. The offspring number was 61.81 and 62.20 IJs/parent, respectively. From the third to seventh cycle, *In vivo* tended to give higher number of offspring than others. Nematodes which were reared *In vivo* gave the lowest average median lethal dose (LD_{50}) at 45.97 IJs/host toward seven cycles followed by nutrient-agar media (53.18 IJs/host) and culture media by DOA (53.47 IJs/host). From our results, we can conclude that different culture media affected on number of offspring and virulence only in a few generations. Further studies on developing methods of the beneficial trait stability are urgently needed.
Keywords: entomopathogenic nematode, culture media, reproductive potential, virulence

[1] สาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
Division of Entomology, Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[2] ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
National Biological Control Research Center, Upper Northeastern Regional Center, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: npraka@kku.ac.th

บทนำ

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Entomopathogenic nematode:EPN) เป็นหนึ่งในศัตรูธรรมชาติสำคัญที่มีการนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีในพืชหลากหลายชนิด อาทิเช่น พืชสวน ไม้ผล ไม้ดอกพืชไร่ ป่าไม้ เห็ด และหญ้าสนาม เป็นต้น (ประกายจันทร์ และคณะ, 2556; Grewal et al., 2005; Georgis et al., 2006) ข้อดีของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไม่เพียงแต่ปลอดภัยต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อมเท่านั้น แต่ยังมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชทั้งปากกัดและปากดูด วงจรชีวิตสั้น (7-10 วัน) เพิ่มปริมาณได้ทั้งในห้องปฏิบัติการและในสภาพแวดล้อม ซึ่งข้อดีเหล่านี้จะสามารถช่วยให้การป้องกันกำจัดเป็นไปอย่างต่อเนื่องและยั่งยืน (Gaugler and Kaya, 1990; Ehlers 2001; Somasekhar et al., 2002) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง Steinernematids จัดเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีความสัมพันธ์แบบภาวะพึ่งพาอาศัยกัน (Mutualistic symbiosis) กับแบคทีเรียร่วมอาศัยในสกุล *Xenorhabdus* spp. หน้าที่หลักของแบคทีเรียร่วมอาศัยที่มีต่อไส้เดือนฝอยคือ เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบและแพร่พันธุ์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ผลิตสารปฏิชีวนะ (Antibiotics) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และสามารถทำให้แมลงตายจากภาวะเลือดเป็นพิษ (Septicemia) (Shapiro-Ilan and Gaugler, 2002) กลไกการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยเริ่มจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะเข้าทำลายแมลงซึ่งเป็นตัวอ่อนวัยที่ 3 (Infective juvenile 3; IJ3) เคลื่อนที่เข้าสู่ภายในลำตัวแมลงทางรูเปิดทางธรรมชาติ ได้แก่ ปาก ทวาร รูหายใจ หรือชอนไชผ่านผนังลำตัวของแมลงโดยตรง เมื่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเคลื่อนที่ไปถึงช่องว่างกลางลำตัวแมลงจะปล่อยแบคทีเรียร่วมอาศัยออกมาและทำการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มปริมาณในเลือดอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้แมลงเกิดภาวะเลือดเป็นพิษและตายภายใน 24-48 ชั่วโมง (Akhurst, 1982; Shapiro-Ilan et al., 2008) ไส้เดือนฝอยจะเพิ่มปริมาณและเจริญเติบโตอยู่ภายในแมลงโดยอาศัยแบคทีเรียร่วมอาศัยและซากแมลงที่ถูกย่อยโดยแบคทีเรียเป็นแหล่งอาหารหลัก จนกระทั่งอาหารหมดจะอพยพออกจากซากแมลงและหาเหยื่อใหม่ต่อไป (Burman, 1982) ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในเชิงพาณิชย์มีอยู่ 3 วิธีด้วยกัน คือ การเลี้ยงบนตัวแมลง (*In vivo*) การเลี้ยงในอาหารเทียมแข็ง (*In vitro* solid culture) และการเลี้ยงในอาหารเทียมเหลว (*In vitro* liquid culture) ซึ่งแต่ละวิธีต่างมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ต้นทุนการผลิต แรงงาน ความเชี่ยวชาญของผู้ผลิต คุณภาพของผลิตภัณฑ์ อุปกรณ์และเครื่องมือการผลิต เป็นต้น คุณภาพของอาหารนับได้ว่าเป็นอีกหนึ่งปัจจัยหลักในการเพิ่มคุณภาพและปริมาณในการผลิตไส้เดือนฝอยเชิงพาณิชย์ องค์ประกอบของไขมัน โปรตีน ไนโตรเจน และคาร์โบไฮเดรท เป็นแหล่งพลังงานสำคัญที่ไส้เดือนฝอยใช้ในการผลิตลูกและเข้าทำลายเหยื่อ (Friedmann et al., 1989; Segal and Glazer, 2000; Yoo et al., 2000; Islas-Lopez et al., 2005) โดยจะเห็นได้ว่าในยุคแรกสูตรอาหารเทียมจะมีส่วนประกอบหลักมาจากอาหารสุนัข ไตหมู เลือดปศุสัตว์ หรือผลผลิตจากสัตว์เป็นต้น (Hara et al., 1981) ต่อมาเพื่อให้เกิดความคุ้มทุน Wouts (1981) ได้พัฒนาและปรับปรุงสูตรอาหารเทียมที่มีส่วนประกอบของ ยีสต์ น้ำมันพืช nutrient broth และแป้งถั่วเหลือง ถึงแม้ว่าปัจจุบันหน่วยงานราชการในประเทศไทย อาทิเช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร และศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ เป็นต้น ได้มีการส่งเสริมให้กลุ่มเกษตรกรสามารถเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อนำมาใช้ในแปลงเกษตรกรด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณบนตัวแมลงและในอาหารเทียมสูตรกรมวิชาการเกษตร (นุชนารถ, ม.ป.ป.) แต่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ผลิตได้ในแต่ละรุ่นมีประสิทธิภาพที่ไม่คงที่ ส่งผลให้เกษตรกรขาดความเชื่อมั่นในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ดังนั้นเพื่อศึกษาถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อคุณภาพไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบอาหารเลี้ยงต่างชนิดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย *Steinernema siamkayai* ต่อศักยภาพในการสืบพันธุ์และการเข้าทำลายเหยื่อใน 7 ชั่วรุ่น

วิธีการศึกษา

1. การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ

1.1 ไส้เดือยฝอยศัตรูแมลง

นำหัวเชื้อไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย *Steinernema siamkayai* ที่มีจำหน่ายโดยกรมวิชาการเกษตรมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยอาหารตามกรรมวิธีที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 อาหารเทียมสูตรกรมวิชาการเกษตร (นุชนารถ, ม.ป.ป.) มีส่วนประกอบที่สำคัญได้แก่ ไข่ไก่:น้ำมันหมู:น้ำ ในอัตราส่วน 5:2:3 มาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำฟองน้ำที่ตัดเป็นรูปลูกเต๋าขนาด 1x1x1 ซม. (กว้างxยาวxสูง) มาขยำกับอาหารเทียมที่เตรียมไว้จนกระทั่งอาหารแทรกซึมเข้าไปในฟองน้ำจนหมดแล้วนำไปบรรจุใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ปิดขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเทียมด้วยจุกสำลีและนำไปผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ระดับความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิอาหารลดลงถึงระดับอุณหภูมิห้องทำการย้ายหัวเชื้อไส้เดือนฝอยในอัตราส่วน 100,000 ตัว/ขวด นำไปบ่มในห้องมืดที่มีอากาศถ่ายเทที่อุณหภูมิห้องปกติไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 7 วัน จะได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

กรรมวิธีที่ 2 อาหารเทียมวุ้น (Nutrient-agar media) สูตรอาหารนี้มีส่วนประกอบ 2 ส่วน ได้แก่ อาหารวุ้น (Wout's agar) และเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัย (Symbiotic bacteria) อาหารวุ้นประกอบด้วย Bacto Nutrient Broth 16 กรัม, Bacto agar 12 กรัม, น้ำมันดอกทานตะวัน 5 กรัม และน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยได้มาจากกระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ (Bacteria Isolation) จากซากแมลงอาศัย (Insect cadaver) โดยเริ่มจากพ่นไส้เดือนฝอยลงบนตัวหนอนกินรังผึ้งจำนวน 100 ตัว/หนอน ทิ้งไว้ประมาณ 24-48 ชั่วโมงในห้องมืดที่มีอากาศถ่ายเทที่อุณหภูมิห้องปกติไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเลือดหนอนที่มีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA (Trypcasesoja Bouillon 10 กรัม, Bacto agar 15 กรัม, Bromthymolblue 0.025 กรัม และน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร) ทิ้งไว้ในห้องมืดประมาณ 48 ชั่วโมงหรือเมื่อสังเกตเห็นโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยขึ้นบน NBTA คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว (Single colony) มาทำการเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชุดใหม่ (Sub culture) จนกระทั่งได้โคโลนีที่มีลักษณะเป็นจุดเดี่ยวและมีสีน้ำเงินเข้ม นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวที่มีส่วนผสมของยีสต์ (ยีส 5 กรัม, NaCl 5 กรัม, $NH_4H_2PO_4$ 0.5 กรัม, K_2HPO_4 0.5 กรัม, $MgSO_4*7H_2O$ และน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร) แบคทีเรียที่ได้จะสามารถนำมาหยดลงบนอาหารวุ้นที่เตรียมไว้เพื่อใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสำหรับการทดลองต่อไป

กรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงเพิ่มปริมาณบนตัวแมลง (*In vivo*)(กลุ่มควบคุม) ใช้ไส้เดือนฝอยหัวเชื้อมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี paper assay เริ่มจากนำกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม. วางลงในฝาจานทดลอง (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. นำหนอนนกจำนวน 10 ตัวย้ายไปใน Petri dish จากนั้นพ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยอัตรา 1,000 ตัว (ไส้เดือนฝอย 100 ตัว/หนอน 1 ตัว) ปิดด้วยพาราฟิล์ม ย้ายไปวางในห้องมืดที่มีอากาศถ่ายเทที่อุณหภูมิห้องปกติไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส หลังจากนั้น 5 วัน ย้ายซากหนอนนกไปวางบนกระดาษกรองชุ่มน้ำขนาด 55 มม. ที่ถูกวางบนฝา Petri dish ขนาด 50 มม. หล่อน้ำด้านล่างใน Petri dish ขนาด 10 ซม. เรียกวิธีการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากซากแมลงนี้ว่า White trap (White, 1927) นำ Petri dish ไปเก็บในห้องมืดเพื่อให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะเข้าทำลายวัย 3 เคลื่อนที่ออกจากซากหนอนลงสู่น้ำ น้ำที่มีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจะถูกนำไปล้างให้สะอาดแล้วกรองเพื่อไปเก็บในที่เย็นอุณหภูมิประมาณ 8 - 12 องศาเซลเซียส ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ได้นี้จะถูกนำมาใช้ในการทดลองภายใน 1 สัปดาห์เพื่อให้ได้ไส้เดือนฝอยที่แข็งแรงและมีประสิทธิภาพดี

1.2 มอดรำข้าวสาลี (*Tenebrio molitor*)

นำตัวเต็มวัยของมอดรำข้าวสาลีหรือหนอนนกใส่ในกล่องพลาสติก ขนาด 24 X 34 X 9 เซนติเมตร จำนวน 300 ตัว/กล่อง แต่ละกล่องใส่อาหารไก่พื้นเมืองเอราวัณซี 5 (บริษัทซีพีเอฟ จำกัด; โปรตีน ≥ ร้อยละ 14 และไขมัน ≥ ร้อยละ 2) ปริมาตร 100 กรัม กระจายให้ทั่วกล่องเพื่อให้เต็มตัววางไข่ นำมะละกอดิบ ฟัก หรือแตงร้านฝานเป็นชิ้นบางๆเพื่อเป็นอาหารเสริมแก่ตัวเต็ม

วัย ปล่อยตัวเต็มวัยวางไข่นาน 5-7 วัน แล้วย้ายตัวเต็มวัยไปวางไข่ในกล่องใหม่ ไข่ที่ได้จะมีสีขาวขุ่น กลมรี ผิวเรียบมัน ขนาดประมาณ 0.75 X 2.0 มิลลิเมตร ติดอยู่ตามพื้นกล่องพลาสติกปนกับเศษอาหาร ระยะไข่มีอายุ 7 วัน ตัวหนอนมี 8 วัย เมื่อหนอนมีอายุ 1 เดือน ใช้ตะแกรงร่อนเอาเศษอาหารออก แล้วเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ ให้มะละกอดิบทุกๆ วัน จนตัวหนอนเริ่มเข้าดักแด้ ดักแด้ที่ได้แบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนหนึ่งนำไปใช้ในการทดลองและอีกส่วนหนึ่งนำไปใช้ในการเลี้ยงเพิ่มปริมาณต่อไป

2. เปรียบเทียบผลของอาหารต่อศักยภาพในการสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 7 รุ่น

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 3 กรรมวิธีๆ ละ 10 ซ้ำๆละ 24 คู่ ไส้เดือนฝอยที่นำมาทดสอบในการทดลองนี้จะถูกเลี้ยงภายใต้กรรมวิธีที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้ กรรมวิธีที่ 1 อาหารเทียมสูตรกรมวิชาการเกษตร กรรมวิธีที่ 2 อาหารเทียมวุ้น (Nutrient-agar media) และกรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงเพิ่มปริมาณบนตัวแมลง (กลุ่มควบคุม) นำไส้เดือนฝอยเพศผู้และเพศเมียจำนวน 24 คู่/ซ้ำ ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณในแต่ละกรรมวิธีมาผสมพันธุ์และเลี้ยงแยกในจานหลุม (24 microwell plate) ละ 1 คู่ บันทึกจำนวนลูกที่ได้ในแต่ละคู่และนำมาหาค่าเฉลี่ยของรุ่นนั้น ทำซ้ำอย่างนี้ต่อไปในลูกอีก 7 รุ่น เพื่อตรวจสอบแนวโน้มของจำนวนลูกในแต่ละรุ่นต่อเนื่องกัน นำค่าเฉลี่ยจำนวนลูกที่ได้มาเปรียบเทียบหาค่าความแตกต่างทางสถิติในแต่ละกรรมวิธีและในแต่ละรุ่นด้วยโปรแกรม XLSTAT 2006 (XLSTAT, New York, NY, USA) โดยวิธี Tukey's HSD test ($P \leq 0.05$)

3. เปรียบเทียบผลของอาหารต่อค่าความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 7 รุ่น

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มี 3 กรรมวิธีๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว นำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตรที่ผ่านการเพิ่มปริมาณภายใต้กรรมวิธีข้างต้นพ่นบนหนอนนกในอัตราที่แตกต่างกันดังนี้ 0, 10, 30, 50, 70 และ 90 ตัว/หนอนนกหนึ่งตัว ทดสอบค่าความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (The median lethal dose: LD_{50}) ด้วยวิธี sand assay (Glazer and Lewis, 2000) เริ่มจากนำทรายมาร่อนด้วยตะแกรงความถี่ขนาด 2 มม. แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชม. เพื่อไล่ความชื้นและฆ่าเชื้อโรค เติมน้ำให้ได้ความชื้นที่ 10% จากนั้นนำทราย 20 กรัม ใส่ลงใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 55 มม. นำหนอนนกวัยสุดท้ายจำนวน 10 ตัว/ซ้ำ ใส่ลงไปใน Petri dish แล้วพ่นไส้เดือนฝอยตามอัตราที่กำหนดข้างต้น ย้ายไปวางในห้องมืดที่มีอากาศถ่ายเทที่อุณหภูมิห้องปกติไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส บันทึกจำนวนตัวตายทุกตัวเป็นเวลา 5 วัน โดยใช้กล้องสเตอริโอตรวจสอบ นำข้อมูลการตายในแต่ละรุ่นจำนวน 7 รุ่น วิเคราะห์หาค่า LD_{50} และ LD_{90} โดยใช้โปรแกรม Probit analysis และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกรรมวิธีด้วยโปรแกรม XLSTAT 2006(XLSTAT, New York, NY, USA) โดยวิธี Tukey's HSD test ($P \leq 0.05$)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. เปรียบเทียบผลของอาหารต่อศักยภาพในการสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 7 รุ่น

ไส้เดือนฝอย *Steinernema siamkayai* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมวุ้นสามารถให้จำนวนลูกในรุ่นที่ 1 และ 2 สูงกว่ากรรมวิธีที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตรกรมวิชาการเกษตรและเลี้ยงบนตัวแมลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยพ่อแม่หนึ่งคู่สามารถผลิตลูกเฉลี่ยอยู่ที่ 61.81 และ 62.20 ตัว ตามลำดับ จำนวนลูกในรุ่นที่ 3-7 เมื่อเลี้ยงบนตัวแมลงกลับให้ค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับอีกสองกรรมวิธี เฉลี่ย/พ่อแม่ 1 คู่ คือ 32.52, 30.75, 29.91, 28.72 และ 27.89 ตัว ตามลำดับ ดังแสดงใน **Table 1** นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนลูกที่ได้ในแต่ละรุ่นมีแนวโน้มลดลงจากรุ่นสู่รุ่นในทุกกรรมวิธีอย่างมีนัยสำคัญ (**Figure 1**) Epsky and Capirera (1993) และ Abu-Hatab et al. (1998) กล่าวว่าปัจจัยที่มีส่วนสำคัญต่อการผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมให้ได้คุณภาพและปริมาณสูงนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร อุณหภูมิ วิธีการเลี้ยง และโดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งไขมันในอาหาร จากผลการทดลองของ Abu-Hatab and Gaugler (2001) ที่ทดสอบชนิดของอาหารเทียมที่มีส่วนผสมของไขมันที่ได้จากไขมันแมลง ไขมันวัว และ น้ำมันหมู พบว่าอาหารที่มีส่วนผสมของไขมันแมลงจะให้จำนวนลูกและอัตราการเจริญเติบโตสูง

กว่า 1.9 และ 1.7 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสูตรอาหารอื่น ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองนี้ที่พบศักยภาพในการสืบพันธุ์ต่ำสุดเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารของกรมวิชาการเกษตรที่มีส่วนผสมของน้ำมันหมูเป็นส่วนประกอบ นอกจากปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว Shapiro-Ilan and Gaugler (2002) รายงานว่า ขนาด อายุ ชนิดของแมลงอาศัย และ ชนิดของไส้เดือนฝอยยังเป็นปัจจัยสำคัญอีกด้วย โดยได้ทดสอบไส้เดือนฝอยต่างชนิดและต่างสายพันธุ์ของ *Heterorhabditis* spp. ต่ออัตราการให้ลูกบนหนอนนก และพบว่าจำนวนลูกที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งต่อชนิดและสายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย โดยมีจำนวนลูกระหว่าง 51,875 – 115,538 ตัว/พ่อแม่ 800 ตัว ซึ่งจำนวนลูกที่ได้นี้มีความแตกต่างจากผลการทดลองของผู้วิจัยเองที่มีปริมาณลูกอยู่ที่ 27.99 - 43.80 ตัว/พ่อแม่ 1 คู่ (รุ่นที่ 1) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความสัมพันธ์อันใกล้ชิดทางธรรมชาติ (Natural association) ของไส้เดือนฝอยต่อแมลงอาศัย (Shapiro-Ilan et al.,1999; Elaward et al., 2001)

Table 1 Effect of culture media on the reproductive potential of *Steinernema siamkayai* in seven cycles.

Treatment	Number of offspring (IJ/Parent) in different generations[1/]						
	1	2	3	4	5	6	7
Media by Department of agriculture	27.99 Ca	21.18 Cb	18.93 Cc	18.26 Cd	13.80 Ce	12.91 Cf	12.42 Cf
Nutrient agar media	61.81 Aa	62.20 Aa	28.06 Bb	26.60 Bb	19.49 Bc	18.26 Bc	14.68 Bd
In vivo	43.80 Bb	33.75 Bb	32.52 Abc	30.75 Acd	29.91 Acd	28.72 Ade	27.89 Ae
F-test	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	32.36	44.72	21.76	21.11	32.35	33.56	37.97

[1/] Means followed by the same capital letters in a column and lower case letters in a row are not significantly different by Tukey's HSD test at 99% (P<0.01).

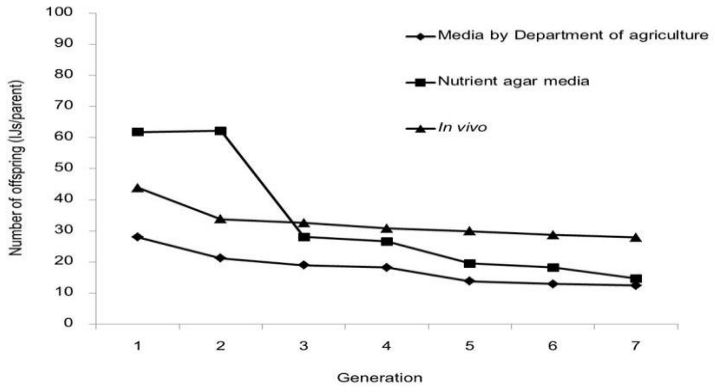


Figure 1 Number of offspring of *Steinernema siamkayai* in each generation after reared on different media.

2. เปรียบเทียบผลของอาหารต่อค่าความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 7 รุ่น

จำนวนตัวตายของหนอนนกหลังพ่นด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในแต่ละอัตราที่แตกต่างกันหลังเลี้ยงภายใต้กรรมวิธีต่างๆถูกนำมาหาค่าความเป็นพิษของไส้เดือนฝอย (The median and 90% lethal dose หรือค่า LD_{50-90}) ในลูกจำนวน 7 รุ่น จากผลที่ได้พบว่าไส้เดือนฝอยรุ่นที่ 1 และ 2 ที่เลี้ยงบนตัวแมลงให้ค่า LD_{50} ต่ำที่สุด คือ 41.03 และ 43.19 ตัว/หนอน 1 ตัว รองลงมาคือ กรรมวิธีที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมวุ้นมีค่าอยู่ที่ 42.08 และ 45.60 ตัว/หนอน ตามลำดับ และเมื่อมาถึงลูกรุ่นที่ 3 ไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตรกรมวิชาการเกษตรให้ค่า LD_{50} ต่ำที่สุด คือ 38.63 ตัว/หนอน เมื่อผ่านไปถึงรุ่นที่ 4-7 พบว่าไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงบนตัวแมลงกลับให้ค่า LD_{50} ต่ำที่สุด คือ 46.37,

47.18,49.98 และ 50.12 ตัว/หนอน ตามลำดับ (**Table 2**) ในขณะที่ค่า LD_{90} ของไส้เดือนฝอยในแต่ละกรรมวิธีพบว่าลูกรุ่นที่ 1- 7 ที่เลี้ยงบนตัวแมลงมีค่าต่ำที่สุดคือ 68.46, 69.11, 70.80, 74.20, 75.80, 81.80 และ 81.62 ตัว/หนอน ตามลำดับ (**Table 3**) จากการทดลองพบว่าทั้งจำนวนลูกและความรุนแรงของไส้เดือนฝอยมีแนวโน้มที่ลดลงจากรุ่นสู่รุ่น Wang and Grewal (2002) รายงานว่าอุปสรรคสำคัญที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในห้องปฏิบัติการมีสาเหตุหลักมาจากผลของพันธุกรรม โดยผลจากการทดสอบสมรรถนะทางสรีระ (Physiological fitness) ได้แก่ ความเสถียรของอายุการเก็บรักษา (Storage stability) อัตราการให้ลูก (Reproductive potential) และความรุนแรง (Virulence) ในไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีรูปแบบการเก็บที่แตกต่างกัน ดังนี้ ไส้เดือนฝอยที่เก็บในไนโตรเจนเหลว เก็บในห้องเย็นที่มีการเพิ่มปริมาณเท่าที่จำเป็น และเก็บในอุณหภูมิห้องที่มีการเพิ่มปริมาณบ่อยครั้ง พบว่าไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงในห้องเย็นและอุณหภูมิห้องตั้งแต่รุ่นที่สามเป็นต้นไปจะสูญเสียสมรรถนะทางสรีระ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนี้ในไส้เดือนฝอยที่เก็บในไนโตรเจนเหลวเลย ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Bilgrami et al. (2006) ที่ทดสอบความเสื่อมของลักษณะเด่นทางพันธุกรรม (Trait deterioration) ในไส้เดือนฝอย *H. bacteriophora* และ *S. carpocapsae* จำนวน 20 รุ่น ในหนอนกินรังผึ้ง ผลที่ได้พบว่าไส้เดือนฝอยทั้งสองสกุลมีความเสื่อมของลักษณะเด่น (ความรุนแรงในการก่อโรค, ความทนทานต่อความร้อน, ความสามารถในการให้ลูก, ความสามารถในการค้นหาเหยื่อ, ความสามารถในการจับเหยื่อ และศักยภาพในการสืบพันธุ์) เมื่อมีการเพิ่มปริมาณต่อเนื่องไปเรื่อยๆ ในการทดลองนี้ใช้หัวเชื้อที่มีจำหน่ายโดยกรมวิชาการเกษตร ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าไส้เดือนฝอยอาจได้รับผลกระทบทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณหลายรอบในห้องปฏิบัติการ (Inadvertent selection) ซึ่งการเก็บพ่อแม่พันธุ์ในไนโตรเจนเหลว ลดจำนวนรอบของการเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการ และการปรับปรุงพันธุกรรมโดยกระบวนการ Genetic variation (Grewal et al., 2006), Hybridisation และ Genetic selection (Grewal et al., 2006; Nimkingrat et al., 2013a,b) อาจเป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาความเสื่อมของลักษณะเด่นทางพันธุกรรมได้ เนื่องจากเป็นเครื่องมือที่ได้รับการยอมรับเพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงลักษณะเด่นทางพันธุกรรมของไส้เดือนฝอยในหลายๆประเทศ (Kaya and Gaugler, 1993; Burnell, 2002) ยกตัวอย่างเช่น งานทดลองของ Bai et al. (2005) ที่สร้างสายพันธุ์บริสุทธิ์ (Inbred lines) ของ *H. bacteriophora* และผ่านการทดสอบแล้วว่าสามารถช่วยคงความเสถียรของลักษณะเด่นทางพันธุกรรมที่ต้องการได้ (Beneficial traits stabilization)

Table 2 Effect of culture media on the median lethal dose of *Steinernema siamkayai* in seven cycles.

Treatment	The median lethal dose 50 (LD_{50}) in different generations[1/]						
	1	2	3	4	5	6	7
Media by Department of agriculture	51.85 Bc	48.20 Bb	38.63 Aa	60.94 Cd	53.59 Bc	59.50 Bd	61.57Bd
Nutrient agar media	42.08 Aa	45.60 Ab	53.11 Cc	54.81 Bc	55.39 Bc	61.66 Bd	59.63 Bd
In vivo	41.03 Aa	43.19 Aab	43.93 Bbc	46.37 Acd	47.18 Ad	49.98 Ae	50.12 Ae
F-test	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	11.64	5.10	14.15	11.82	7.35	9.55	9.40

[1/] Means followed by the same capital letters in a column and lower case letters in a row are not significantly different by Tukey's HSD test at 99% ($P<0.01$).

Table 3 Effect of culture media on the lethal dose 90% of *Steinernema siamkayai* in seven cycles.

Treatment	The lethal dose 90% (LD_{90}) in different generations[1/]						
	1	2	3	4	5	6	7
Media by Department of agriculture	84.50 Bb	88.37 Bc	76.66 Ba	88.71 Bc	88.46 Bc	98.67 Cd	99.23 cd
Nutrient agar media	82.90 Ba	91.32 Cb	84.13 Ca	88.59 Bb	94.64 Cc	95.06 Bc	94.22 Bc
In vivo	68.46 Aa	69.11 Aa	70.80 Aa	74.20 Ab	75.80 Ab	81.80 Ac	81.62 Ac
F-test	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	9.79	12.63	7.57	8.67	9.68	8.42	8.61

[1/] Means followed by the same capital letters in a column and lower case letters in a row are not significantly different by Tukey's HSD test at 99% (P<0.01).

สรุป

ผลของการเปรียบเทียบสูตรอาหารต่อศักยภาพในการสืบพันธุ์และความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของไส้เดือนฝอยจำนวน 7 รุ่น พบว่าการเลี้ยงด้วยอาหารที่มีวัตถุดิบแตกต่างกันสามารถส่งผลต่อจำนวนลูกและความรุนแรงในการเข้าทำลายเหยื่อของไส้เดือนฝอยในชั่วรุ่นแรกๆได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบว่าอาหารเทียมวุ้นที่มีส่วนประกอบของแบคทีเรียร่วมอาศัยและการเลี้ยงบนตัวแมลงสามารถทำให้จำนวนลูกในรุ่นถัดไปมีปริมาณและความรุนแรงต่อการเข้าทำลายเหยื่อสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารเทียมจากกรมวิชาการเกษตร ถึงแม้ว่าทั้งสามสูตรอาหารจะมีความแตกต่างกันในลูกรุ่นแรกๆ แต่เมื่อมีการผสมพันธุ์ในพี่น้องไปเรื่อยๆ พบว่าแนวโน้มอัตราการถดถอยของพันธุกรรมมีสูงขึ้นในทุกๆ รุ่น ซึ่งสามารถส่งผลให้จำนวนลูกในรุ่นถัดไปและความรุนแรงในการเข้าทำลายเหยื่อลดต่ำลง ดังนั้นการทดลองนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าอาหารที่เลี้ยงจะมีผลต่อศักยภาพในการสืบพันธุ์และความรุนแรงในการเข้าทำลายเหยื่อของไส้เดือนฝอยในระยะไม่กี่ชั่วรุ่นเท่านั้น แต่การถดถอยทางพันธุกรรมนั้นเป็นอุปสรรคสำคัญที่สมควรได้รับการแก้ไข เพื่อให้การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในเชิงพาณิชย์เกิดประสิทธิภาพสูงสุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย อุปกรณ์ และสถานที่สำหรับทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. ม.ม.ป. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเรื่องการผลิตและใช้ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูพืช. แหล่งข้อมูล: http://goo.gl/jVxHJk. ค้นเมื่อ 28 พฤษภาคม 2559.

ประกายจันทร์ นิ่มกิ่งรัตน์, นุชรีย์ ศิริ และจันทร์เพ็ญ ชาดาเม็ก. 2556. ประสิทธิภาพไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในการป้องกันกำจัดแมลงหวี่ขาวในพริก. แก่นเกษตร. 42(2): 255-264.

Abu Hatab, M., R. Gaugler, and R.-U. Ehlers. 1998. Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids. J. Parasitol. 84: 215-221.

Abu Hatab, M., and R. Gaugler. 2001. Diet composition and lipids of in vitro - produced *Heterorhabditis bacteriophora*. Biological Control. 20: 1-7.

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

Bai, C., D. Shapiro-Ilan, R. Gaugler, and K.R. Hopper. 2005. Stability of beneficial traits in *Heterorhabditis bacteriophora* through creation of inbred lines. Biological Control. 32(2): 220-227.

Bilgrami, A., R. Gaugler, D. Shapiro-Ilan, and B. Adams. 2006. Source of trait deterioration in entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* during in vivo culture. J. Nematol. 8: 397-409.

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

Burnell, A. 2002. Genetics and genetic improvement. In: Gaugler R. (ed.). Entomopathogenic Nematology. CABI International, Wallingford, UK, pp. 241-263.

Ehlers, R.-U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Applied Microbiology and Biotechnology. 56: 623-633.

Elawad, S.A., S.R. Gowen, and N.G.M. Hague. 2001. Progeny production of *Steinernema abbasi* in lepidopterous larvae. Int. J. Pest. Manage. 47: 17 – 21.

Epsky, N.D., and J.L. Capinera. 1993. Quantification of invasion of two strains of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) into three lepidopteran larvae. Journal of Nematology. 25: 173-180.

Friedman, M.J., S.E. Langston, and S. Pollitt. 1989. Mass production in liquid culture of insect-killing nematodes. International Patent Application, WO 89/04602.

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

Georgis, R., A.M. Koppenhofer, L.A. Lacey, G. Belair, L.W. Duncan, P.S. Grewal, M. Samish, L. Tan, P. Torr, and R.W.H.M. van Tol. 2006. Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. Biological Control. 38: 103-123.

Glazer, I., and E.E. Lewis. 2000. Bioassays of entomopathogenic nematodes. In: Navon A. and Ascher K.R.S. (eds.). Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CAB International, Wallingford, UK, pp. 229-248.

Grewal, P.S., R.-U. Ehlers, and D. Shapiro-Ilan. 2005. Nematodes as biological control agents. CAB International, Wallingford, UK, pp. 505.

Grewal, P.S., S. Bornstein-Forst, A.M. Burnell, and I. Glazer. 2006. Physiological, genetic, and molecular mechanisms of chemoreception, thermobiosis, and anhydrobiosis in entomopathogencic nematodes. Biological Control. 38: 54-65.

Hara, A.H., J.E. Lindegren, and H.K. Kaya. 1981. Monoxenic mass production of the entomogenous nematode *Neoaplectana carpocapsae* Weiser on dog food/agar medium. USDA Advances in Agriculture W-16: 8 pp.

Islas-Lopez, M.A., R. Sanjuan-Galindo, A.I. Rodriguez-Hernandez, and N. Chavarria-Hernandez. 2005. Monoxenic production of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* using culture media containing agave juice (aguamiel) from Mexican maguey-pulquero (*Agave* spp.). Effect of the contents of nitrogen, carbohydrates and fat on infective juvenile production. App. Micro. Biotech. 68: 91-97.

Kaya, H.K., and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. Ann Rev Entomol. 38: 181-206.

Nimkingrat, P., S. Khanam, O. Strauch, and R.-U. Ehlers. 2013a. Hybridisation and selective breeding for improvement of low temperature activity of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. BioControl. 58(3): 417-426.

Nimkingrat, P., O. Strauch, and R.-U. Ehlers. 2013b. Hybridisation and genetic selection for improving desiccation tolerance of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. Biocontrol Sci Techn. pp. 348-361.

Segal, D. and I. Glazer. 2000. Genetics for improving biological control agents: the case of entomopathogenic nematodes. Crop Protection. 19: 685-689.

Shapiro-Ilan, D., J.R. Cate, J. Pena, A. Hunsberger, and C.W. McCoy. 1999. Effects of temperature and host range on suppression of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) by entomopathogenic nematodes. J. Eco. Ent. 92: 1086-1092.

Shapiro-Ilan, D., and R. Gaugler. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. JIMB. 28: 137-146.

Shapiro-Ilan, D., M. Guadalupe Rojas., J.A. Morales-Ramos, E.E. Lewis, and W.L. Tedders. 2008. Effects of host nutrition on virulence and fitness of entomopathogenic nematodes: Lipid- and protein-based supplements in *Tenebrio molitor* diets. J. Nematol. 40(1): 13-19.

Somasekhar, N., P.S. Grewal, and M.G. Klein. 2002. Genetic variability in stress tolerance and fitness among natural populations of *Steinernema carpocapsae*. Biological Control. 23: 303-310.

Wang, X., and P.S. Grewal. 2002. Rapid genetic deterioration of environmental tolerance and reproductive potential of an entomopathogenic nematode during laboratory maintenance. Biological Control. 23: 71-78.

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

Wouts, W.M. 1981. Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on artificial media. J. Nematol. 13: 467-469.

Yoo, S.K., I. Brown, and R. Gaugler. 2000. Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: lipid source and concentration. App. Micro. Biotech. 54: 759-763.