



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การระบุชนิดของไส้เดือนฝอยที่สามารถกำจัดหอยทากศัตรูพืชในสวนกล้วยไม้
Identification of pathogenic nematodes of pest snails in orchid farms

ชื่อนิสิต นางสาวภาณิณ พันธุ์พานิช

เลขประจำตัว 6032035023

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การระบุชนิดของไส้เดือนฝอยที่สามารถกำจัดหอยทากศัตรูพืชในสวนกล้วยไม้

Identification of pathogenic nematodes of pest snails in orchid farms

นางสาวปภาณิณ พันธุ์พานิช

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวัตติ

โครงการวิทยาสตรระดับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการวิทยาสตรระดับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: การระบุชนิดของไส้เดือนฝอยที่สามารถกำจัดหอยทากศัตรูพืชในสวนกล้วยไม้
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวปภาณิณ พันธุ์พานิช
อาจารย์ที่ปรึกษา	: อาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวัตติ
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

กล้วยไม้เป็นหนึ่งในพืชสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากเป็นพันธุ์ไม้ที่มีสีสันสวยงามให้ดอกนาน และบางสายพันธุ์มีกลิ่นหอม ในช่วงสองถึงสามปีที่ผ่านมาการส่งออกกล้วยไม้ในประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น แต่ยังมีปัญหาที่ต้องแก้ไขคือ ผลผลิตไม่ได้มาตรฐานเนื่องจากการระบาดของหอยทากศัตรูพืช ไส้เดือนฝอยคือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมีรูปร่างคล้ายหนอน ลำตัวไม่มีปล้อง ดำรงชีวิตแบบอิสระได้ทั้งในดิน และแหล่งน้ำ ทั้งยังพบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น พืช และ สัตว์ ไส้เดือนฝอยมีประมาณ 23,000 สปีชีส์ บางสปีชีส์สามารถนำมาใช้เป็นตัวควบคุมการระบาดของหอยทากศัตรูพืชได้ เป็นหนึ่งทางเลือกแทนการพึ่งพาสารเคมีในห้องปฏิบัติการของ อาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวัตติ มีไส้เดือนฝอยที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อโรคต่อหอยทากศัตรูพืชที่พบในสวนกล้วยไม้เรียบร้อยแล้ว ซึ่งคือไส้เดือนฝอย monoculture ที่ผ่านการแยกโดยการนำตัวเมียที่มีไข่ 1 ตัว ออกจากไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากหอยทากที่ตาย (isolate) ทั้งหมด 17 สายพันธุ์ ได้แก่ 10B7, 10B2, 20B1, 12B8, 26A1, 17C1, 10C7, 10C8, 10C2, 10A12, 20A1, 16A1, 10A1, 16C5, 17B1, 10A3 และ 22A1 แต่ไส้เดือนฝอยดังกล่าวยังไม่ได้ผ่านการระบุชนิด ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการระบุชนิดของไส้เดือนฝอยดังกล่าวโดยใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุลมาเป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างของไส้เดือนฝอยจากลำดับเบสบนยีนไรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็ก (SSU หรือ 18S rRNA) ดังต่อไปนี้ 1) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคิวพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอย คือ SSU18A (5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3') และ SSU26R (5'-CATTCTTGCAAATGCTTTCG-3') 2) ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis 3) ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ MiniElute® PCR Purification Kit (QIAGEN) 4) ส่งวิเคราะห์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยวิธี Sanger sequencing method 5) ตรวจสอบและเปรียบเทียบกับข้อมูลใน Genbank nucleotide BLAST tool และ 6) สร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) โดยจัดกลุ่มด้วยวิธี neighbor-joining พบว่าไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10B7, 10C7, 12B8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 และ 22A1 คือ *Acroboloides* sp., สายพันธุ์ 10A3, 10A12, 10B2, 10C2 และ 10C8 คือ *Cephalobus cubaensis*, สายพันธุ์ 16A1 และ 16C5 คือ *Panagrolaimus* sp. และสายพันธุ์ 26A1 ซึ่งยังไม่สามารถระบุได้ว่าอยู่ในสกุล *Acroboloides* sp. หรือ *Cephalobus* sp. ซึ่งควรมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพิ่มเติมในภายหลัง โดยจากงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยชิ้นนี้ เนื่องจากพบว่า *Acroboloides* sp. *Cephalobus cubaensis* และ *Panagrolaimus* sp. มีความสามารถในการก่อโรคในหอยทากศัตรูพืช

คำสำคัญ: ชีววิทยาโมเลกุล, ไส้เดือนฝอย, หอยทากศัตรูพืช, 18S rRNA, SSU18A, SSU26R

Research title : Identification of pathogenic nematodes of pest snails in orchid farms

Student name : Miss Papanin Phanpanich

Research title : Krieng Kanchanawatee, Ph.D.

Student name : Biology

Abstract

Orchid is one of the major economic crops in Thailand because of its colourful flowers and fragrant in some species. Over the past several years, the export of orchids in Thailand is likely to increase, but there are still problems that need to be solved. The yield was not up to the standard due to an infestation of pest snails. Nematodes are non-segmented round worms living within terrestrial or aquatic environments and can be found in other organisms. About 23,000 species have already been described, some species can be used as a biocontrol for pest snail infestation. In the laboratory of Dr. Krieng Kanchanawatee, there are nematodes that have been tested for the ability to cause diseases against pest snails, found in the orchid farms, which are monoculture nematodes. Monoculture nematodes were established by culturing a single female nematodes with eggs that were found in dead pest snails. There are in total of 17 strains: 10B7, 10B2, 20B1, 12B8, 26A1, 17C1, 10C7, 10C8, 10C2, 10A12, 20A1, 16A1, 10A1, 16C5, 17B1, 10A3 and 22A1. However, these nematodes have not been yet identified. Therefore, the objective of this research is to identify the species of these nematodes using molecular biology methods. To differentiate nematode species, the small subunit ribosome (*SSU* or *18S rRNA*) gene was chosen to construct the phylogenetic trees which can be divided in six steps as follows 1) amplifying a segment of DNA using PCR with SSU18A primer (5'-AAAGATTAAGCCATGCATG-3') and SSU26R primer (5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTCG-3') 2) examining DNA by agarose gel electrophoresis 3) purifying PCR products using MiniElute® PCR Purification Kit (QIAGEN) 4) analyzing by Sanger sequencing method 5) comparing nucleotide sequences to sequence databases in Genbank nucleotide BLAST tool and 6) constructing phylogenetic trees by neighbor-joining method. This study suggests that the 10A1, 10B7, 10C7, 12B8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 and 22A1 strains are *Acrobeloides* sp., the 10A3, 10A12, 10B2, 10C2 and 10C8 strains are *Cephalobus cubaensis*, the 16A1 and 16C5 strains are *Panagrolaimus* sp. and the 26A1 strain could be both *Acrobeloides* sp. or *Cephalobus* sp. The 26A1 strain could not be identified solely by molecular biology techniques; therefore, the further morphology studies of these nematodes is suggested. Moreover, the previous studies of *Acrobeloides* sp. *Cephalobus cubaensis* and *Panagrolaimus* sp. indicated that these nematodes were pathogenic to pest snails. This supported the identification of the present study.

Keywords: molecular biology, nematode, pest snail, SSU18A, SSU26R, *18S rRNA*

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือทั้งด้านการปฏิบัติต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา อาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี และอาจารย์ ดร.มารุต เพ็ญอวรณ์ อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลายปีการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

ขอขอบคุณนางสาวรัตนสุดา เสนาดี ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา และถ่ายทอดประสบการณ์การทำงานด้านชีววิทยาโมเลกุล การเลี้ยงไส้เดือนฝอย และการปฏิบัติต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับผู้วิจัย

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการของศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี ชั้น 2 ตึกคัลมัวร์โรบล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ รวมถึงวัสดุและอุปกรณ์ ในการจัดทำงานวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนในการทำโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ครั้งนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ.....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	3
2.1. การระบาดของหอยทากในสวนกล้วยไม้	3
2.2. การกำจัดหอยทากศัตรูพืชด้วยสารเคมี.....	3
2.3. การใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมการระบาดของหอยทากศัตรูพืช.....	3
2.4. ชีววิทยาของไส้เดือนฝอย	4
2.5. การระบุชนิดของไส้เดือนฝอยจากลำดับเบสบนยีน <i>18S rRNA</i> หรือ <i>SSU</i>	5
2.6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้าง phylogenetic tree	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	8
3.1. การเลี้ยงไส้เดือนฝอย.....	8
3.2. การหาลำดับเบสของยีน <i>SSU</i> เพื่อใช้ในการระบุชนิดของไส้เดือนฝอย	9
3.2.1. การสกัดดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอย.....	9
3.2.2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR).....	9
3.2.3. การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis	10
3.2.4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing).....	10
3.3. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้าง phylogenetic tree.....	11
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	12
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา	19
5.1. ความสามารถในการก่อโรคของไส้เดือนฝอย	19
5.2. การระบุชนิดของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 26A1	19
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	21

6.1. สรุปผลการศึกษา	21
6.2. ข้อเสนอแนะ	21
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอย	21
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต	21
เอกสารอ้างอิง	22
ภาษาไทย	22
ภาษาอังกฤษ	23
ภาคผนวกที่ 1 ค่าพารามิเตอร์ (parameter) ที่ใช้ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยการจับกลุ่มแบบ neighbor-joining	26
ภาคผนวกที่ 2 แถบดีเอ็นเอของ control และไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A3 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ	27
ภาคผนวกที่ 3 แถบดีเอ็นเอของ control และไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 26A1 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ	27
ภาคผนวกที่ 4 แถบดีเอ็นเอของ control, ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 22A1, สายพันธุ์ 22A1 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 17C1, สายพันธุ์ 17C1 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 20B1, สายพันธุ์ 20B1 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 10A1 และสายพันธุ์ 10A1 เจือจาง 10 เท่า ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ	28
ภาคผนวกที่ 5 แถบดีเอ็นเอของ control, ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 12B8, สายพันธุ์ 17B1 และสายพันธุ์ 10B7 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ ..	28
ภาคผนวกที่ 6 แถบดีเอ็นเอของ control, ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 16A1, สายพันธุ์ 16A1 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 16C5, สายพันธุ์ 16C5 เจือจาง 10 เท่า, control, ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10C7, สายพันธุ์ 10C7 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 20A1, สายพันธุ์ 20A1 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 10C2 และสายพันธุ์ 10C8 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ	29
ภาคผนวกที่ 7 แถบดีเอ็นเอของ control, ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10B2, สายพันธุ์ 10A12, สายพันธุ์ 16A1, สายพันธุ์ 16A1, สายพันธุ์ 16C5 และสายพันธุ์ 16C5 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ	29
ภาคผนวกที่ 8 แถบดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A3, สายพันธุ์ 17C1, สายพันธุ์ 22A1 และสายพันธุ์ 26A1 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ตามลำดับ	30

ภาคผนวกที่ 9 แถบดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, สายพันธุ์ 10B7, สายพันธุ์ 17B1 และสายพันธุ์ 20B1 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรมเมอร์ SSU18A และ ไพรมเมอร์ SSU26R และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ตามลำดับ	30
ภาคผนวกที่ 10 แถบดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10C2, สายพันธุ์ 10C7, สายพันธุ์ 10C8, สายพันธุ์ 12B8 และสายพันธุ์ 20A1 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรมเมอร์ SSU18A และ ไพรมเมอร์ SSU26R และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ตามลำดับ	31
ภาคผนวกที่ 11 แถบดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10B2, สายพันธุ์ 10A12, สายพันธุ์ 16A1 และสายพันธุ์ 16C5 ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรมเมอร์ SSU18A และ ไพรมเมอร์ SSU26R และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ตามลำดับ	31

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 3-1 แสดงสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย monoculture แหล่งที่พบและชนิดหอยทากที่นำมาแยก ไส้เดือนฝอยของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10A3, 10A12, 10B2, 10B7, 10C2, 10C7, 10C8, 12B8, 16A1, 16C5, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 และ 22A1	8
---	---

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย เริ่มจากระยะไข่ (egg) ตัวอ่อนระยะที่หนึ่ง (J1) ตัวอ่อนระยะที่สอง (J2) ตัวอ่อนระยะที่สาม (J3) ตัวอ่อนระยะที่สี่ (J4) ระยะตัวอ่อนเข้าทำลาย (I) และระยะตัวเต็มวัย (adult)..... 4

ภาพที่ 4-1 neighbor joining phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอย 17 สายพันธุ์ ได้แก่ 10A1, 10A3, 10A12, 10B2, 10B7, 10C2, 10C7, 10C8, 12B8, 16A1, 16C5, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1, 22A1 และ 26A1 ตัวเลขแสดงถึงความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการและความน่าเชื่อถือด้วย bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง..... 12

ภาพที่ 4-2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10B7, 10C7, 12B8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 และ 22A1 ด้วย BLAST 14

ภาพที่ 4-3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A3, 10A12, 10B2, 10C2 และ 10C8 ด้วย BLAST 14

ภาพที่ 4-4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 26A1 ด้วย BLAST 15

ภาพที่ 4-5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 16A1 และ 16C5 ด้วย BLAST 15

ภาพที่ 4-6 neighbor joining phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10A3, 10A12, 10B2, 10B7, 10C2, 10C7, 10C8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1, 22A1, 26A1 และสปีชีส์ใกล้เคียงอื่นๆ โดยมีไส้เดือนฝอย *Ceratoplectus armatus* เป็น outgroup 16

ภาพที่ 4-7 neighbor joining phylogenetic tree แบบ topology ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10A3, 10A12, 10B2, 10B7, 10C2, 10C7, 10C8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1, 22A1, 26A1 และสปีชีส์ใกล้เคียงอื่นๆ โดยมีไส้เดือนฝอย *Ceratoplectus armatus* เป็น outgroup 17

ภาพที่ 4-8 neighbor joining phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 16A1, 16C5 และสปีชีส์ใกล้เคียงอื่นๆ โดยมีไส้เดือนฝอย *Caenorhabditis elegans* เป็น outgroup 18

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

กล้วยไม้เป็นหนึ่งในพืชสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เนื่องจากเป็นพันธุ์ไม้ที่มีสีสันสวยงาม ให้ดอกนาน และบางสายพันธุ์มีกลิ่นหอม ทำให้ประเทศไทยสามารถส่งออกกล้วยไม้ทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท พันธุ์กล้วยไม้ที่ส่งออกหลัก ได้แก่ สกุลหวาย สกุลอะแรนด้า สกุลอะแควนิส สกุลออนซิเดียม และสกุลแวนด้า (กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, 2560) พื้นที่ปลูกกล้วยไม้ในประเทศไทยมีประมาณ 20,000 ไร่ โดยมีแนวโน้มเฉลี่ยเพิ่มขึ้นร้อยละ 1-2 ต่อปี ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในเขตกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี ปทุมธานี และพระนครศรีอยุธยา (พัชรินทร์ ว่องไชยกุล และคณะ, 2549) ในหลายปีที่ผ่านมาแม้ว่าการส่งออกกล้วยไม้จะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น แต่ก็ยังมีปัญหาการส่งออกที่ต้องแก้ไขคือ ผลผลิตไม่ได้มาตรฐานเนื่องจากการระบาดของศัตรูพืช

หอยทากถือเป็นศัตรูพืชที่เป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อกล้วยไม้เป็นอย่างมาก เช่นหอยทากยักษ์แอฟริกา หอยทากซัคซีเนีย หอยสาธิกา หอยเจดีย์ใหญ่ และหอยเจดีย์เล็ก เป็นต้น หอยทากเหล่านี้จะกัดกินตาหน่อ ตาดอก ช่อดอก รวมถึง ราก ลำต้น และใบ เป็นสาเหตุให้เชื้อโรคหรือเชื้อราเข้ามาทำลายต่อได้ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2545) ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (2551) กล่าวไว้ว่าการกำจัดหอยทากสามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีรูปผง ได้แก่ เมทลดีไฮด์ นิโคลซาไมด์ และเมทิโอบีคาร์บ มาละลายน้ำแล้วพ่นด้วยเครื่องพ่นชนิดใช้แรงดัน แต่การใช้สารเคมีนั้นส่งผลกระทบต่อปัญหาสุขภาพของเกษตรกร รวมถึงผู้บริโภค และยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการควบคุมทางชีวภาพ (biological control) ถือเป็นทางเลือกที่ดีในการควบคุมการระบาดของศัตรูพืช ซึ่งการควบคุมทางชีวภาพคือการใช้สิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์ยับยั้งหรือทำลายศัตรูพืชเพื่อไม่ให้สร้างความเสียหายต่อพืช (นิพนธ์ ทวีชัย, 2553) เช่น การใช้ไส้เดือนฝอย (nematodes) ที่สามารถก่อให้เกิดโรคในหอยทาก จึงนำมาใช้เป็นตัวควบคุมการระบาดของหอยทากซึ่งเป็นศัตรูพืชได้โดยไม่ต้องพึ่งพาสารเคมี ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม และลดผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค (Charwat and Davies, 1999)

ไส้เดือนฝอยคือสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมีรูปร่างคล้ายหนอน ลำตัวไม่มีปล้อง ดำรงชีวิตแบบอิสระได้ทั้งในดิน และแหล่งน้ำ ทั้งยังพบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น พืช และ สัตว์ ไส้เดือนฝอยเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายสูง มีการจดบันทึกไว้ถึง 23,000 สปีชีส์ (Seesao et al., 2016) บางสปีชีส์เป็นศัตรูพืช เช่น ก่อให้เกิดโรครากปม แต่บางสปีชีส์ก็เป็นประโยชน์สามารถนำมาใช้เป็นตัวควบคุมการระบาดของศัตรูพืชได้ เช่น หอยทาก และ แมลง วิธีการทำงานของไส้เดือนฝอยคือการทำงานร่วมกัน

ระหว่างตัวไส้เดือนฝอยและเชื้อแบคทีเรีย โดยไส้เดือนฝอยจะเจาะเข้าทางช่องเปิดของหอยทาก จากนั้นจะเริ่มขยายพันธุ์และแบคทีเรียที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้หอยทากตายลงไปภายใน 48 ชั่วโมง ในต่างประเทศมีการใช้ไส้เดือนฝอย *Phasmarhabditis hermaphrodita* กำจัดหอยทากในแปลงปลูกพืช (Glen et al., 1996) นอกจากนี้ d'Ovidio (2019) ค้นพบว่าไส้เดือนฝอย *Rhabditid terricola* สามารถก่อให้เกิดโรคในหอยทากยักษ์แอฟริกา (*Achatina fulica*) ได้ แต่การใช้ไส้เดือนฝอยในการควบคุมการแพร่ระบาดของหอยทากศัตรูพืชนั้นมีอุปสรรคหลายประการ เนื่องจากประเทศไทยยังขาดองค์ความรู้เกี่ยวกับชนิดไส้เดือนฝอยที่จำเพาะต่อหอยทาก

เนื่องจากในห้องปฏิบัติการของ อาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี มีไส้เดือนฝอยที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อโรคต่อหอยทากศัตรูพืชที่พบในสวนกล้วยไม้เรียบร้อยแล้ว แต่ไส้เดือนฝอยดังกล่าวยังไม่ผ่านการระบุชนิด ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการระบุชนิดของไส้เดือนฝอยดังกล่าวโดยใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุลมาเป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างของไส้เดือนฝอยจากลำดับเบสบนยีนไรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็ก ได้แก่ *SSU* หรือ *18S rRNA* (Lee et al., 2017) เพื่อให้ได้องค์ความรู้ที่ถูกต้องเพียงพอต่อการนำมาใช้งานควบคุมทางชีวภาพได้

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อระบุชนิดของไส้เดือนฝอยในห้องปฏิบัติการที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อโรคต่อหอยทากศัตรูพืชในสวนกล้วยไม้

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

2.1. การระบาดของหอยทากในสวนกล้วยไม้

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร (2558) ได้กล่าวว่าในสวนกล้วยไม้มักพบการระบาดของหอยทากบก (land snail) เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความชื้นสูง และจะพบการระบาดมากในช่วงหน้าฝน โดยหอยทากที่มักพบในสวนกล้วยไม้ในประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ หอยทากชนิดตัวใหญ่ ได้แก่ หอยสาริกา (*Sarika* spp.) หอยดักดาน (*Cryptozona simensis*) หรือหอยทากยักษ์อาฟริกา (*Achinita fulica*) และหอยทากชนิดตัวเล็ก ได้แก่ หอยทากซัคซีเนีย (*Succinea* spp.) หอยเจดีย์ใหญ่ (*Prosopaea walkeri*) หอยเจดีย์เล็ก (*Lamellaxis gracilis*) และหอยเลขหนึ่ง (*Ovachlamys fulgens*) หอยทากเหล่านี้จะเข้าทำลายตา หน่อ ดอก และใบ เป็นเหตุให้เชื้อโรคหรือเชื้อราสามารถเข้ามาทำลายต่อได้ ก่อให้เกิดความเสียหายต่อกล้วยไม้เป็นอย่างมาก

2.2. การกำจัดหอยทากศัตรูพืชด้วยสารเคมี

ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (2551) ได้กล่าวว่ามีวิธีการกำจัดหอยทากชนิดตัวใหญ่ โดยใช้เหยื่อพิษสำเร็จรูปเมทลดีไฮด์ชนิดเม็ด วางไว้บริเวณโคนต้นกล้วยไม้ หลังจากการให้น้ำ หรือในวันที่ฝนตก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเหยื่อพิษ ส่วนวิธีการกำจัดหอยทากชนิดตัวเล็ก สามารถใช้สารฆ่าหอยรูปแบบผงมาละลายน้ำ แล้วพ่นด้วยเครื่องพ่นชนิดใช้แรงดัน โดยเลือกใช้สารดังต่อไปนี้ 1) เมทลดีไฮด์ เป็นสารผงสีขาว ผสมน้ำในอัตรา 40 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร 2) นิโคลซาไมด์ เป็นสารผงสีเหลือง ผสมน้ำในอัตรา 40 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร และ 3) เมทิโอคาร์บ เป็นสารผงสีขาว ผสมน้ำในอัตรา 60 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร การพ่นสารฆ่าหอยควรพ่นในช่วงเช้า เนื่องจากยังมีความชื้นในอากาศ และให้ถูกตัวหอยมากที่สุด โดยพ่นบริเวณตามพื้นทางเดินและโคนต้นกล้วยไม้ หลีกเลี่ยงส่วนดอก เพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนสารเคมีได้

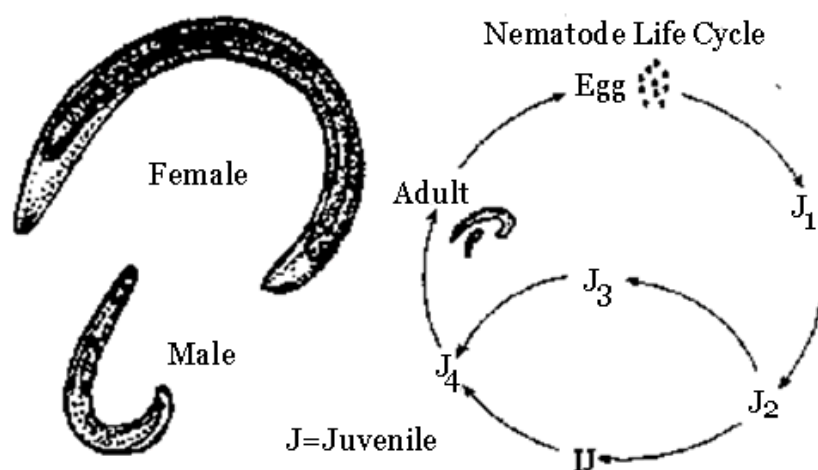
2.3. การใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมการระบาดของหอยทากศัตรูพืช

จากงานวิจัยของ Mengert (1953) ค้นพบว่าไส้เดือนฝอยซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมีรูปร่างคล้ายหนอน ลำตัวไม่มีปล้อง ดำรงชีวิตแบบอิสระได้ทั้งในดิน และแหล่งน้ำ บางชนิดสามารถก่อให้เกิดโรคในทากและหอยทากได้ ไส้เดือนฝอยจะทำงานร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย โดยจะเจาะเข้าทางช่องเปิดของทากหรือหอยทาก จากนั้นจะเริ่มขยายพันธุ์ และจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น ทำให้ทากหรือหอย

தாகตายภายใน 48 ชั่วโมง *Phasmarhabditis hermaphrodita* เป็นไส้เดือนฝอยที่นิยมนำมาใช้ทางด้านเกษตรกรรม (Wilson et al., 1993) เนื่องจากมีความสามารถในการกำจัดหากซึ่งเป็นศัตรูพืช และไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยมีการเริ่มวางจำหน่ายเป็นยาฆ่าแมลงทางชีวภาพในสหราชอาณาจักร (United Kingdom) ตั้งแต่ปีคริสต์ศักราช 1994 และในปัจจุบันมีการจำหน่ายอย่างแพร่หลายในทวีปยุโรป ทั้งนี้ Charwat and Davies (1999) ค้นพบว่าไส้เดือนฝอย *Cephalobus* spp. และ *Panagrolaimus* spp. สามารถช่วยควบคุมการระบาดของหอยหากศัตรูพืช *Cernuella virgata*, *Theba pisana*, *Cochlicella acuta* และ *Cochlicella barbara* ในทุ่งหญ้าทางตอนใต้ของประเทศออสเตรเลียได้

2.4. ชีววิทยาของไส้เดือนฝอย

ถึงแม้ว่าไส้เดือนฝอยจะเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลาย แต่มีวงจรชีวิตที่คล้ายคลึงกัน (สำนักงานเกษตรอำเภอเมืองนครปฐม, 2550) คือ ภายหลังจากระยะไข่ จะเป็นระยะตัวอ่อน 4 ระยะ โดยในระยะตัวอ่อนนี้จะอาศัยอยู่ภายนอกโฮสต์ เรียกว่า ระยะมีชีวิตอิสระ (free-living stage) หรือ จะเริ่มเสาะหาโฮสต์ เรียกว่า ระยะเข้าทำลาย (infective stage) จากนั้นไส้เดือนฝอยจะเจริญต่อเป็นตัวเต็มวัยและขยายพันธุ์ภายในตัวโฮสต์ บางชนิดจะออกจากโฮสต์และเป็นตัวเต็มวัยในดิน (ภาพที่ 2.1) วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยตั้งแต่ระยะไข่จนถึงระยะตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 4-7 วัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและชนิดของโฮสต์



ภาพที่ 2.1 วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย เริ่มจากรยะไข่ (egg) ตัวอ่อนระยะที่หนึ่ง (J1) ตัวอ่อนระยะที่สอง (J2) ตัวอ่อนระยะที่สาม (J3) ตัวอ่อนระยะที่สี่ (J4) ระยะตัวอ่อนเข้าทำลาย (IJ) และระยะตัวเต็มวัย (adult) (<http://www.ladybug.uconn.edu/FactSheets/beneficial-nematodes.php>)

ความสัมพันธ์ระหว่างไส้เดือนฝอยและโฮสต์มี 3 ประเภท ได้แก่

1) ความสัมพันธ์แบบปรสิต (parasitic) คือไส้เดือนฝอยจะใช้ประโยชน์จากโฮสต์ที่มีชีวิตและอาจฆ่าโฮสต์ในที่สุด เช่น ไส้เดือนฝอย *Heterorhadtis* sp. ช่วงตัวอ่อนระยะที่ 3 จะเข้าสู่โฮสต์ผ่านทางปาก ทวาร หรือช่องเปิดตามลำตัว (กรมวิชาการเกษตร, 2561) จากนั้นจะเพิ่มจำนวนและปล่อยแบคทีเรียภายในตัวของโฮสต์ ทำให้โฮสต์ตายลงภายใน 48 ชั่วโมง

2) ความสัมพันธ์แบบ necromenic คือไส้เดือนฝอยจะอาศัยภายในตัวโฮสต์ โดยไม่สามารถมีชีวิตที่ครบวงจรอย่างอิสระภายนอกตัวโฮสต์ แต่ไม่ได้เป็นสาเหตุการตายของโฮสต์ และเมื่อโฮสต์ตายจะกินซากของโฮสต์เพื่อขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนต่อไป เช่น ความสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์และไส้เดือนฝอย *Pristionchus pacificus* (Kroetz et al., 2012)

3) ความสัมพันธ์แบบ phoretic คือไส้เดือนฝอยจะอาศัยในโฮสต์เพียงเพื่อให้โฮสต์พาไปยังบริเวณที่เหมาะสมกับการเจริญต่อไป เช่น ความสัมพันธ์ระหว่างโฮสต์และไส้เดือนฝอย *Pelodera* sp. (Ramsay, 2012)

2.5. การระบุชนิดของไส้เดือนฝอยจากลำดับเบสบนยีน 18S rRNA หรือ SSU

ในการระบุชนิดของไส้เดือนฝอยโดยวิธีทางชีวโมเลกุล มักใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 4 ชนิด ซึ่งนิยมใช้จำแนกระหว่างไส้เดือนฝอยแต่ละชนิด ได้แก่ ยีน 18S rRNA, ITS-1 rRNA, ITS-2 rRNA และ 28S rRNA ซึ่งเป็นบริเวณที่เป็นประโยชน์ในการใช้ศึกษาอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและวิวัฒนาการที่ถูกต้อง โดยวิวัฒนาการของยีนเหล่านี้ค่อนข้างไม่ขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงทางด้านสัณฐานวิทยา และมีวิวัฒนาการช้ากว่าบริเวณอื่น จึงมีความเหมาะสมในการข้อมูลทางพันธุกรรมเหล่านี้ไปวิเคราะห์เพื่อให้ได้ซึ่งลำดับสายวิวัฒนาการที่ถูกต้อง (Pal and Singh, 2016) จากงานวิจัยของ Blaxter et al. (1998) พบว่ายีน 18S rRNA เป็นที่นิยมและสามารถจำแนกไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนไรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็ก (18S rRNA หรือ SSU) ในการจำแนกชนิดและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไส้เดือนฝอย

2.6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้าง phylogenetic tree

BLAST หรือ Basic Local Alignment Search Tool เป็นโปรแกรมภายใต้ฐานข้อมูล NCBI (TaeSK for Bioinformatics Course, 2010) ที่ทำหน้าที่ในการวิเคราะห์ความเหมือนหรือความแตกต่าง (identity and similarity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล ซึ่งในปัจจุบันได้มีการออกแบบโปรแกรมให้เลือกใช้งานตามวัตถุประสงค์ของงานที่ต้องการศึกษา โดยโปรแกรม BLAST ที่นิยมเลือกใช้งานได้แก่ blastn, blastp, blastx, tblastn และ tblastx ซึ่งแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันดังต่อไปนี้

1) nucleotide blast หรือ blastn เป็นการวิเคราะห์และค้นหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ที่ต้องการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database sequence)

2) protein blast หรือ blastp เป็นการวิเคราะห์และค้นหาความเหมือนของลำดับโปรตีน (protein sequence) ที่ต้องการศึกษากับลำดับโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (database sequence)

3) blastx เป็นการวิเคราะห์และค้นหาความเหมือนของ translated nucleotide sequence ที่ต้องการศึกษากับลำดับโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

4) tblastn เป็นการวิเคราะห์และค้นหาความเหมือนของลำดับโปรตีน (protein sequence) กับ translated nucleotide sequence ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

5) tblastx เป็นการวิเคราะห์และค้นหาความเหมือนของ translated nucleotide sequence กับ translated nucleotide sequence ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

โดยโปรแกรม blastn เป็นที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากใช้เวลาประมวลผลต่ำและให้ค่า E-value ซึ่งคือค่าคาดหวัง (expect value) ซึ่งคือค่าที่บ่งบอกความสอดคล้องกันของลำดับเบสที่ต้องการ (query) เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏในฐานข้อมูล เท่ากับหรือใกล้เคียงกับศูนย์ ส่วนโปรแกรม tblastx จะใช้เวลาในการประมวลผลนานที่สุดและให้ค่า E-value ไม่เท่ากับศูนย์

ภายหลังการวิเคราะห์โดยโปรแกรม BLAST จะได้ค่า E-value ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการคำนวณหรือคะแนนเชิงสถิติ โดยขึ้นอยู่กับคุณภาพการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาใช้เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ปรากฏในฐานข้อมูล และเปอร์เซ็นต์ max identity คือเปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่างคู่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการเปรียบเทียบและลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล ที่มีความเหมือนหรือคะแนนความเหมือนสูงที่สุด (max score) ที่อยู่ภายในช่วงการเปรียบเทียบ (พุงศักดิ์ รวยอารี และคณะ, 2554)

การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogentic tree) ของสิ่งมีชีวิตเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ neighbor-joining เป็นวิธีการจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่ค่อนข้างได้รับความนิยม (บุญเรือง คำศร, 2556) ที่เกี่ยวข้องกับการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (distance-based approach) โดยมีหลักการคือ คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และสร้างตารางแสดงระยะห่างทางพันธุกรรม (distance matrix) แล้วจึงแสดงผลเป็นแผนภูมิต้นไม้ ซึ่งเป็นการเชื่อมโยงสายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของคู่สิ่งมีชีวิตที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ตามด้วยสิ่งมีชีวิตที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมมากขึ้นตามลำดับ

การทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้โดยอาศัยกระบวนการทางสถิติ หลักการสำคัญของการตรวจสอบความน่าเชื่อถือและความถูกต้อง ได้แก่ การวิเคราะห์บูทสตรอป (bootstrap analysis) (จินตนา, 2550) โดยค่าความน่าเชื่อถือของกลุ่มที่จัดนั้น มีการคำนวณและแสดงเป็น

เปอร์เซ็นต์ของโอกาสความน่าจะเป็นที่จะมีการจัดกลุ่มเหมือนเดิม เมื่อมีการสุ่มตัวแปรตัวใดตัวหนึ่งที่ใช้ในการคำนวณการจัดกลุ่มออกตามจำนวนครั้งที่ต้องการ กลุ่มตัวอย่างที่มีค่า bootstrap มากแสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่จัดได้มีความน่าเชื่อถือมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีค่า bootstrap น้อย

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน

3.1. การเลี้ยงไส้เดือนฝอย

ไส้เดือนฝอยที่นำมาเลี้ยงคือ ไส้เดือนเดือนฝอยที่ผ่านการคัดเลือกความสามารถในการก่อโรคในหอยทากศัตรูพืช โดยการนำหอยทากมาเลี้ยงบนดินที่เก็บจากบริเวณสวนกล้วยไม้ที่พบการระบาดของหอยทากเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในกล่องพลาสติก เพื่อล่อให้ไส้เดือนฝอยออกจากดิน โดยไส้เดือนฝอยที่ก่อให้เกิดโรคในหอยทากจะเคลื่อนที่เข้าสู่หอยทากและทำให้หอยทากตาย หอยทากที่ตายจะถูกนำมาแช่ในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นสังเกตไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile ที่ออกมาอยู่นอกตัวหอยทาก แล้วนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป

อาหารที่นำมาใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอยคือ Nigon's medium (Nigon, 1943) โดยมีวิธีการเตรียมดังนี้ ผสม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 กรัม K_2HPO_4 4.0 กรัม NaCl 1.4 กรัม KNO_3 1.5 กรัม Peptone 1.2 กรัม และผงวุ้น 15 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่ออาหารเย็นลง เติม lecithin 1 กรัม ที่ละลายใน 100% เอทานอล 25 มิลลิลิตร (Chen et al., 2003) จากนั้นเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ ไส้เดือนฝอยที่ใช้ในการทดลองคือ ไส้เดือนฝอย monoculture ซึ่งคือไส้เดือนฝอยที่ผ่านการแยกโดยการนำตัวเมียที่มีไข่ 1 ตัว ออกจากไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากหอยทากที่ตาย (isolate) (ตารางที่ 3.1) แล้วนำมาเลี้ยงในจานเพาะเชื้อ ได้แก่ สายพันธุ์ 10A1, 10A3, 10A12, 10B2, 10B7, 10C2, 10C7, 10C8, 12B8, 16A1, 16C5, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1, 22A1 และ 26A1 นำลงในอาหาร ปิดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 แสดงสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย monoculture แหล่งที่พบ และ ชนิดหอยทากที่นำมาแยกไส้เดือนฝอย ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10A3, 10A12, 10B2, 10B7, 10C2, 10C7, 10C8, 12B8, 16A1, 16C5, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 และ 22A1

สายพันธุ์ไส้เดือนฝอย	แหล่งของดินที่ใช้เลี้ยงหอยทากเพื่อการคัดเลือกไส้เดือนฝอย	ชนิดหอยทากที่พบไส้เดือนฝอย
10A1	ดินแปลง Eco จ.สระบุรี	<i>Vallonia</i> sp.
10A3	ดินแปลง Eco จ.สระบุรี	<i>Vallonia</i> sp.
10A12	ดินแปลง Eco จ.สระบุรี	<i>Kaliella</i> sp.
10B2	ดินแปลง Eco จ.สระบุรี	<i>Vallonia</i> sp.
10B7	ดินแปลง Eco จ.สระบุรี	<i>Kaliella</i> sp.
10C2	ดินแปลง Eco จ.สระบุรี	<i>Vallonia</i> sp.

10C7	ดินแปลง Eco จ.สระบุรี	<i>Vallonia</i> sp.
10C8	ดินแปลง Eco จ.สระบุรี	<i>Vallonia</i> sp.
12B8	สวนกล้วยไม้ จ.ปทุมธานี	<i>Vertigo</i> sp.
16A1	สวนกล้วยไม้ จ.ปทุมธานี	<i>Kaliella</i> sp.
16C5	สวนกล้วยไม้ จ.ปทุมธานี	<i>Vallonia</i> sp.
17B1	อุทยานแห่งชาติ จ.กาญจนบุรี	<i>Kaliella</i> sp.
17C1	อุทยานแห่งชาติ จ.กาญจนบุรี	<i>Vallonia</i> sp.
20A1	สวนกล้วยไม้ จ.นนทบุรี	<i>Succinea horticola</i>
20B1	สวนกล้วยไม้ จ.นนทบุรี	<i>Succinea horticola</i>
22A1	สวนหย่อมบ้านมีหิ่งห้อย จ.น่าน	<i>Succinea horticola</i>
26A1	NA	NA

3.2. การหาลำดับเบสของยีน *SSU* เพื่อใช้ในการระบุชนิดของไส้เดือนฝอย

3.2.1. การสกัดดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอย

ใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อประมาณ 2-3 มิลลิลิตร ลงไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงไว้ในอาหาร Nigon's medium จากนั้นนำน้ำดังกล่าวหยดบนสไลด์ให้ได้ไส้เดือนฝอยประมาณ 100 ตัว จากนั้นปิดด้วยกระจกสไลด์ แล้วบดไส้เดือนฝอยโดยใช้ micropipette tips ขนาด 200 μ l กดลงบนกระจกสไลด์เบาๆ ภายใต้กล้อง stereomicroscope จนกว่าเนื้อเยื่อแตกละเอียด ดูดน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร ชะล้างดีเอ็นเอบนกระจกสไลด์ แล้วดูดน้ำหลังจากการชะล้างนี้ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อชะลอการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอแล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่บริเวณยีน *SSU* หรือ *18S rRNA* โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอย (Blaxter et al., 1998) ได้แก่ *SSU18A* (5'-AAAGATTAAAGCCATGCATG-3') และ *SSU26R* (5'-CATTCTTGGCAAATGCTTTCG-3') การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย DNA template, น้ำกลั่นปลอดเชื้อ, ไพรเมอร์ *SSU18A* ที่ความเข้มข้น 0.2 μ M, ไพรเมอร์ *SSU26R* ที่ความเข้มข้น 0.2 μ M และ EmeraldAmp GT PCR Master Mix (Takara) (ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A12, 16A1 และ 16C5 ใช้ EmeraldAmp MAX PCR Master Mix) ที่ความเข้มข้น 1x โดยใช้สภาวะ ดังนี้

- | | | | |
|-------------------------|------|----|--------|
| 1) Initial denaturation | 95°C | 3 | นาที |
| 2) Denaturation | 95°C | 30 | วินาที |

3) Annealing	48°C	30	วินาที
4) Extension	72°C	1.15	นาที
(ขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ)			
5) Final extension	72°C	10	นาที

3.2.3. การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1% ใน TBE buffer (Tris-borate-EDTA buffer) และ ย้อมสีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย EcoDye™ Nucleic Acid Staining Solution เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (KAPA™ Universal Ladder) นำเข้าเครื่องปล่อยกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานและบันทึกภาพผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ภายใต้แสงยูวี (ultra violet) โดยใช้เครื่อง gel document system เมื่อพบแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการ จะทำซ้ำโดยเพิ่มปริมาตรพีซีอาร์เป็น 50 µl

3.2.4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ MiniElute® PCR Purification Kit (QIAGEN) ทำตามขั้นตอนดังนี้

- 1) ใส่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml ปริมาณ 45 µl จากนั้นเติม QG buffer ปริมาณ 135 µl และ Isopropanol ปริมาณ 90 µl
- 2) ดูดสารละลายข้างต้นใส่ลงในหลอด QIAquick column ที่ประกอบเข้ากับ collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอของตัวอย่างติดกับแผ่น membrane ใน column และเทส่วนที่เป็นน้ำใน collection tube ทิ้ง จากนั้นเซ็ดให้แห้ง แล้วนำมาประกอบกันอีกครั้ง
- 3) เติม QG buffer ปริมาณ 500 µl ลงใน column ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำใน collection tube ทิ้ง จากนั้นเซ็ดให้แห้ง แล้วนำมาประกอบกันอีกครั้ง
- 4) เติม PE buffer ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์สำหรับล้างดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น (wash buffer) ปริมาณ 750 µl ลงใน column ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำใน collection tube ทิ้ง และทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกรอบ
- 5) ย้าย column ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml ที่จะใช้เก็บรักษาดีเอ็นเอ
- 6) เติมน้ำกลั่น ปริมาณ 50 µl ลงบริเวณด้านบนตรงกลางของแผ่น membrane ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจากแผ่น membrane

ของ column ตกกลงไปยังหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ทำซ้ำอีกครั้งเพื่อลดการตกค้างของดีเอ็นเอ โดยอาจลดปริมาณน้ำกลั่นเหลือ 30 μ l แล้วนำหลอด column ที่

7) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ในกรณีของไส้เดือนฝอย 16A1 และ 16C5 จะทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์โดยการสกัดดีเอ็นเอจากเจล โดยทำการตัดเจล 600 mg ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 kb ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml เติม QG buffer ปริมาณ 3 เท่าของน้ำหนักเจล แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 10 นาที ทำการพลิกหลอดไปมาทุกๆ 2-3 นาที สังเกตสีของ QG buffer (pH \leq 7.5) ต้องเป็นสีเหลือง หากเป็นสีส้มหรือม่วง ให้เติม 3M sodium acetate pH 5.0 ปริมาณ 10 μ l เพื่อปรับค่า pH และให้ได้สารละลายเป็นสีเหลือง จากนั้นเติม Isopropanol ปริมาณ 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน แล้วทำตามขั้นตอน 2-7 ดังขั้นตอนข้างต้น

จากนั้นนำส่งบริษัท U2Bio Co., Ltd เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยวิธี Sanger sequencing method

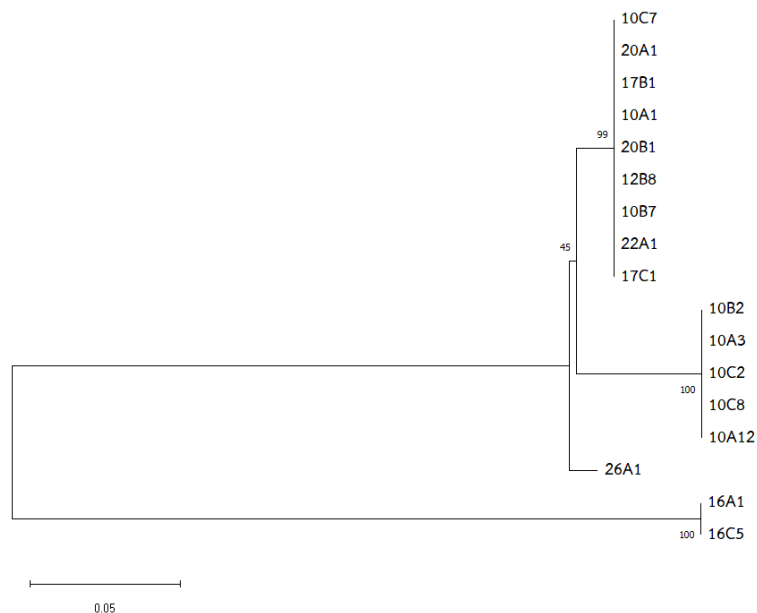
3.3. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการสร้าง phylogenetic tree

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BioEdit เพื่ออ่านกราฟ electropherograms แลทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank nucleotide BLAST tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) โดยโปรแกรม blastn และสืบค้นสปีชีส์ที่เกี่ยวข้องกับสกุลที่ได้จากเอกสารงานวิจัยเพิ่มเติม สร้าง phylogenetic tree ระหว่างไส้เดือนฝอยแต่ละสายพันธุ์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ และเทียบกับสปีชีส์ใกล้เคียงอื่นๆ โดยใช้โปรแกรม Mega7 โดยเริ่มจากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ตรงกันโดยใช้ ClustalW แล้วสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยการจับกลุ่มแบบ neighbor-joining และใช้โมเดล Kimura 2-parameter ตรวจสอบความน่าเชื่อถือของ phylogenetic tree ด้วย bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง กรอค่าพารามิเตอร์ (parameter) Substitution Type เป็น Nucleotide, Substitutions to Include เป็น d: Transitions + Transversions, Rates among Sites เป็น Uniform Rates, Gaps/Missing Data Treatment เป็น Pairwise deletion, Number of Threads เป็น 3 และทำการสร้าง phylogenetic tree แบบตรึงรากโดยใช้ตัวนอกกลุ่ม (outgroup)

บทที่ 4 ผลการศึกษา

ในการระบุชนิดของไส้เดือนฝอยที่สามารถก่อโรคต่อหอยทากศัตรูพืชในสวนกล้วยไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ สายพันธุ์ 10A1, 10A3, 10A12, 10B2, 10B7, 10C2, 10C7, 10C8, 12B8, 16A1, 16C5, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1, 22A1 และ 26A1 เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลถูกนำมาใช้โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างไส้เดือนฝอยแต่ละสายพันธุ์ และด้วย BLAST เพื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล

พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10B7, 10C7, 12B8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 และ 22A1 มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการและมีความน่าเชื่อถือถึง 99% ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A3, 10A12, 10B2, 10C2 และ 10C8 มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการและมีความน่าเชื่อถือถึง 100% และไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 16A1 และ 16C5 มีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการและมีความน่าเชื่อถือถึง 100% ส่วนไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 26A1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* แตกต่างจากไส้เดือนฝอยสายพันธุ์อื่น (ภาพที่ 4.1) โดยไส้เดือนฝอยที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* เหมือนหรือใกล้เคียงกัน มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้เคียงกัน โดยอาจอยู่ในสกุลหรือเป็นสปีชีส์เดียวกัน



ภาพที่ 4.1 neighbor joining phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอย 17 สายพันธุ์ ได้แก่ 10A1, 10A3, 10A12, 10B2, 10B7, 10C2, 10C7, 10C8, 12B8, 16A1, 16C5, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1, 22A1 และ 26A1 ตัวเลขแสดงถึงความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการและความน่าเชื่อถือด้วย bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10B7, 10C7, 12B8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 และ 22A1 มาตรวจสอบและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน BLAST พบว่ามีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอย *Acrobelloides* sp. สายพันธุ์ 14 GVDU-2019 (MN082203) ถึง 99.88% (ภาพที่ 4.2) เมื่อสร้าง phylogenetic tree เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลและเอกสารงานวิจัยเพิ่มเติม (Holterman, 2007) ด้วยวิธี neighbor joining พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10B7, 10C7, 12B8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 และ 22A1 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอย *Acrobelloides* sp. สายพันธุ์ 14 GVDU-2019 มากที่สุด และมีความน่าเชื่อถือถึง 100% (ภาพที่ 4.6a)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A3, 10A12, 10B2, 10C2 และ 10C8 มาตรวจสอบและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน BLAST พบว่ามีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอย *Cephalobus cubaensis* (AF202161) ถึง 99.77% (ภาพที่ 4.3) เมื่อสร้าง phylogenetic tree เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลและเอกสารงานวิจัยเพิ่มเติม (Holterman, 2007) ด้วยวิธี neighbor joining พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A3, 10A12, 10B2, 10C2 และ 10C8 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอย *Cephalobus cubaensis* มากที่สุด และมีความน่าเชื่อถือถึง 100% (ภาพที่ 4.6)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 26A1 มาตรวจสอบและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน BLAST พบว่ามีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอย *Acrobelloides varius* (MK636581), *Acrobelloides buchneri* (MF325099), *Acrobelloides nanus* (KX669638), *Acrobelloides apiculatus* (KY119451), *Acrobelloides cf. buetschlii* (JQ957905) และ *Cephalobus oryzae* (AF034390) ถึง 100% (ภาพที่ 4.4) เมื่อสร้าง phylogenetic tree เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลและเอกสารงานวิจัยเพิ่มเติม (Holterman, 2007) ด้วยวิธี neighbor joining พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 26A1 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอย *Acrobelloides varius* (MK636581) และ *Cephalobus* sp. (AF202158) มากที่สุด และมีความน่าเชื่อถือ 9% และ 18% ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7)

และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 16A1 และ 16C5 มาตรวจสอบและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน BLAST พบว่ามีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอย *Panagrolaimus* sp. สายพันธุ์ JU765 (FJ590956) ถึง 100% และไส้เดือนฝอย *Panagrolaimus* sp. สายพันธุ์ 4 TWN1482 (MN082331) ถึง 99.19% (ภาพที่

4.5) เมื่อสร้าง phylogenetic tree เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลและเอกสารงานวิจัยเพิ่มเติม (Lewis et al., 2009) ด้วยวิธี neighbor joining พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน SSU ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 16A1 และ 16C5 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน SSU ของไส้เดือนฝอย *Panagrolaimus* sp. สายพันธุ์ 4 TWN1482 (MN082331) มากที่สุด และมีความน่าเชื่อถือถึง 100% (ภาพที่ 4.7)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Acroboloides sp. 14 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides sp....	1528	1528	94%	0.0	99.88%	847	MN082203.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides sp. 17 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides sp....	1528	1528	95%	0.0	99.52%	871	MN082206.1
<input type="checkbox"/> Pseudacrobeles macrocystis small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudacrobeles...	1476	1476	97%	0.0	97.67%	940	MW298529.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides sp. 11 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides sp....	1452	1452	96%	0.0	97.64%	857	MN082200.1
<input type="checkbox"/> Dicells ussuriensis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Dicells ussuriensis	1476	1476	97%	0.0	97.56%	1625	EU573706.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides sp. 5 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides sp....	1454	1454	96%	0.0	97.53%	866	MN082225.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides sp. 10 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides sp....	1448	1448	96%	0.0	97.52%	863	MN082199.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides sp. 9 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides sp....	1447	1447	96%	0.0	97.52%	860	MN082229.1
<input type="checkbox"/> Nematoda environmental sample clone NMSU00036 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nematoda enviro...	1445	1445	95%	0.0	97.52%	1200	KC758196.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides sp. 19 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides sp....	1445	1445	95%	0.0	97.51%	868	MN082208.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides sp. 15 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides sp....	1443	1443	95%	0.0	97.51%	852	MN082204.1
<input type="checkbox"/> Cervidellus sp. 4 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cervidellus sp. 4...	1441	1441	95%	0.0	97.51%	856	MN082273.1
<input type="checkbox"/> Cervidellus vexilliger 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cervidellus vexill...	1469	1469	97%	0.0	97.45%	906	KC508905.1
<input type="checkbox"/> Cervidellus sp. 3 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cervidellus sp. 3...	1465	1465	97%	0.0	97.44%	859	MN082272.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides sp. Acro-A gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	Acroboloides sp....	1448	1448	96%	0.0	97.41%	886	AB681629.1
<input type="checkbox"/> Zeldia sp. 1 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Zeldia sp. 1 GVD...	1441	1441	96%	0.0	97.40%	856	MN082367.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides thornei strain DWF1109 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides tho...	1502	1502	100%	0.0	97.39%	1771	EU543175.1
<input type="checkbox"/> Acrobeles marianne 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acrobeles marian...	1469	1469	98%	0.0	97.34%	908	KC508907.1

ภาพที่ 4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน SSU ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10B7, 10C7, 12B8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 และ 22A1 ด้วย BLAST

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Cephalobus cubaensis 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cephalobus cub...	1615	1615	98%	0.0	99.77%	1660	AF202161.1
<input type="checkbox"/> Cephalobus sp. 3 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cephalobus sp....	1563	1563	95%	0.0	99.77%	854	MN082266.1
<input type="checkbox"/> Cephalobus sp. 2 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cephalobus sp....	1563	1563	95%	0.0	99.88%	855	MN082265.1
<input type="checkbox"/> Cephalobus sp. 1 GVDU-2019 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cephalobus sp....	1559	1559	95%	0.0	99.88%	856	MN082264.1
<input type="checkbox"/> Nematoda environmental sample gene for 18S rRNA, partial sequence, isolate: SnTUT_h01_02_operational taxo...	Nematoda enviro...	1391	1391	85%	0.0	99.47%	761	AB728234.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides maximus isolate wb4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides ma...	1373	1373	100%	0.0	94.72%	1800	EU306344.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides maximus strain DF5048 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides ma...	1373	1373	100%	0.0	94.72%	1700	EU196016.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides thornei isolate I17_SMIRACONTROL33 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides tho...	1367	1367	100%	0.0	94.60%	921	KY119885.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides apiculatus isolate C13_SMIRACONTROL14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides apl...	1367	1367	100%	0.0	94.59%	921	KY119887.1
<input type="checkbox"/> Chilopliacus propinquus isolate E22_SP152015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chilopliacus propi...	1363	1363	100%	0.0	94.48%	922	KY119885.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides thornei strain DWF1109 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides tho...	1363	1363	100%	0.0	94.48%	1771	EU543175.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides varius strain LKC27 small subunit ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, partial seq...	Acroboloides varius	1362	1362	100%	0.0	94.48%	1701	MK636581.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides varius strain PS1959 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides varius	1362	1362	100%	0.0	94.48%	1762	MK636580.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides varius strain LKC52 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides varius	1362	1362	100%	0.0	94.48%	1716	MK636579.1
<input type="checkbox"/> Uncultured soil eukaryote clone v391 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured soil e...	1362	1362	100%	0.0	94.48%	1023	MK945940.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides buchmeri voucher Gt960 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides buc...	1362	1362	100%	0.0	94.48%	882	MF325099.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides nanus 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides nan...	1362	1362	100%	0.0	94.48%	1701	KX669638.1
<input type="checkbox"/> Acroboloides varius small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides varius	1362	1362	100%	0.0	94.48%	1802	KX889085.1

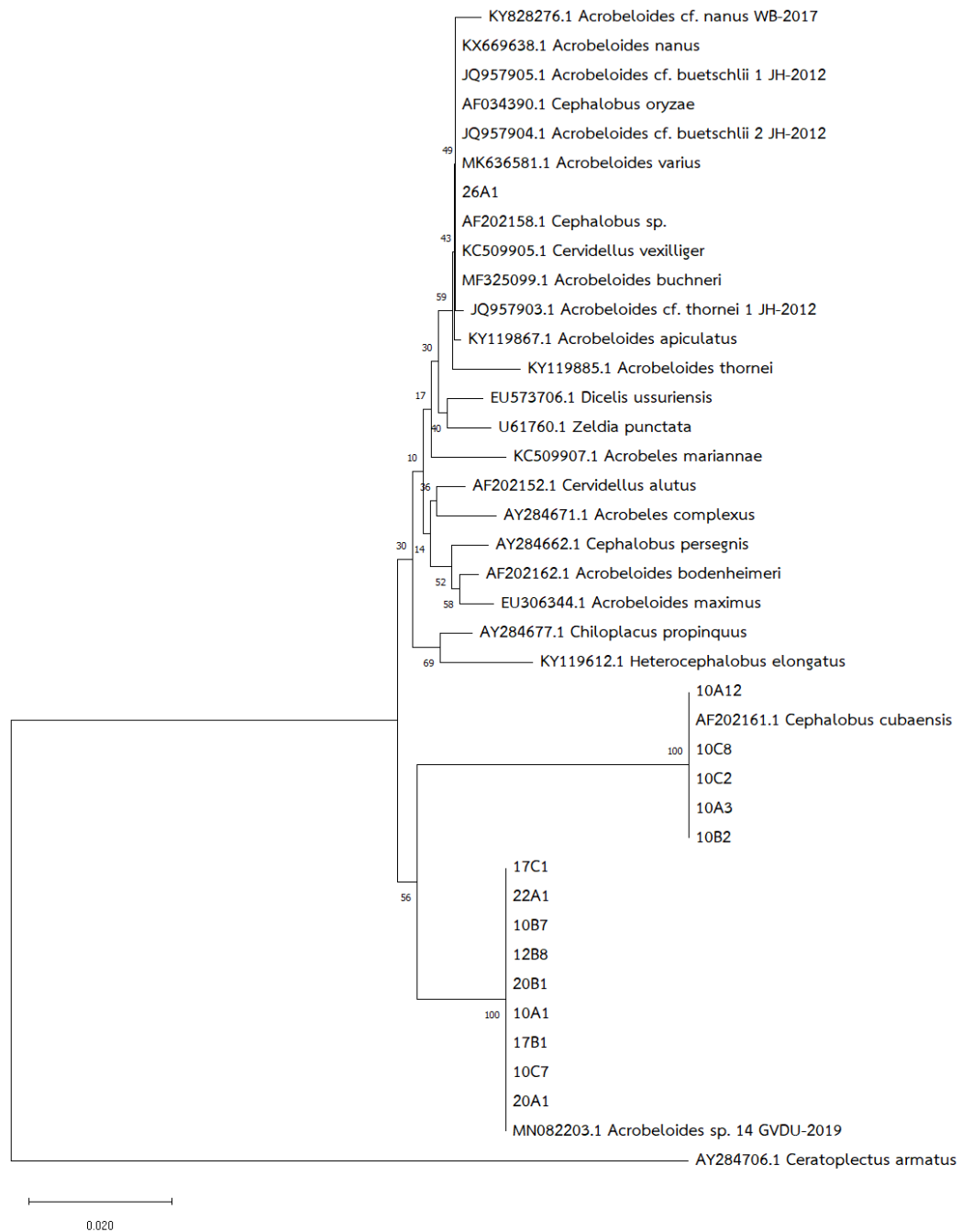
ภาพที่ 4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน SSU ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A3, 10A12, 10B2, 10C2 และ 10C8 ด้วย BLAST

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	Acroboloides varius strain LKC27 small subunit ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, partial se...	Acroboloides var...	1628	1628	100%	0.0	100.00%	1771	MK636581.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides varius strain PS1959 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides var...	1628	1628	100%	0.0	100.00%	1762	MK636580.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides varius strain LKC52 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides var...	1628	1628	100%	0.0	100.00%	1716	MK636579.1
<input type="checkbox"/>	Uncultured soil eukaryote clone v391 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured soil e...	1628	1628	100%	0.0	100.00%	1023	MK945940.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides buchneri voucher Gr960 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides bu...	1628	1628	100%	0.0	100.00%	882	MF325099.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides nanus 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides na...	1628	1628	100%	0.0	100.00%	1701	KX669638.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides varius small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides var...	1628	1628	100%	0.0	100.00%	1802	KX889085.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides apiculatus isolate J03_DETRE62015_B01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides api...	1628	1628	100%	0.0	100.00%	921	KY119451.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides cf. buetschlii 1 JH-2012 isolate AcLoBue1Z small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides cf....	1628	1628	100%	0.0	100.00%	1698	JQ957905.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides apiculatus isolate AcLoApi 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides api...	1628	1628	100%	0.0	100.00%	1717	AY284673.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides nanus small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides na...	1628	1628	100%	0.0	100.00%	1748	DQ102707.1
<input type="checkbox"/>	Cephalobus oryzae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cephalobus oryzae	1628	1628	100%	0.0	100.00%	1699	AF934390.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides cf. buetschlii 2 JH-2012 isolate AcLoBue2Z small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides cf....	1624	1624	100%	0.0	99.89%	1698	JQ957904.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides apiculatus isolate I16_SP312015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides api...	1622	1622	100%	0.0	99.89%	921	KY119884.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides apiculatus isolate C13_SMIRACONTROL14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides api...	1622	1622	100%	0.0	99.89%	921	KY119867.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides cf. thornei 1 JH-2012 isolate AcLoTho1Z small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides cf....	1622	1622	100%	0.0	99.89%	1698	JQ957904.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides buetschlii strain DWF1107 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides bu...	1622	1622	100%	0.0	99.89%	1766	EU543174.1
<input type="checkbox"/>	Acroboloides nanus isolate AcLoNan 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Acroboloides na...	1620	1620	100%	0.0	99.77%	1717	AY284672.1

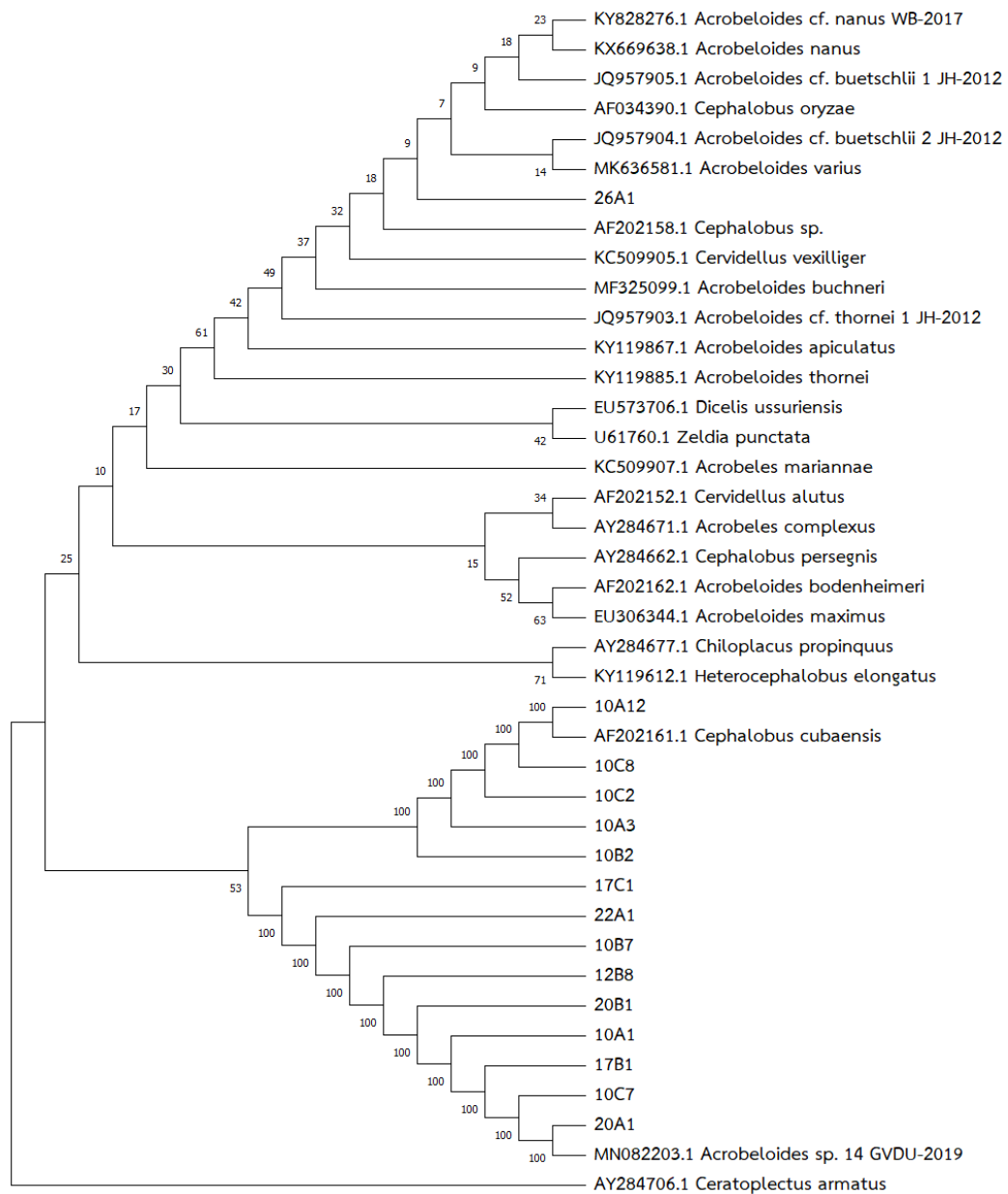
ภาพที่ 4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน SSU ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 26A1 ด้วย BLAST

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	Panagrolaimus sp. 4 TWN1482 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Panagrolaimus sp. 4 T...	1563	1563	92%	0.0	99.19%	867	MN082331.1
<input type="checkbox"/>	Panagrolaimus sp. JU765 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Panagrolaimus sp. JU765	789	789	45%	0.0	100.00%	427	FJ509956.1
<input type="checkbox"/>	Propanagrolaimus sp. WTM1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Propanagrolaimus sp....	483	702	83%	1e-131	82.38%	1668	KJ434176.1
<input type="checkbox"/>	Propanagrolaimus sp. LC91 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Propanagrolaimus sp. L...	483	702	83%	1e-131	82.38%	1669	KJ434175.1
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus sp. AA5 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus sp. AA5	342	342	36%	3e-89	84.86%	1605	MF470237.1
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus sp. JB043 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus sp. JB043	337	337	36%	1e-87	84.57%	1720	MK087059.1
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus sp. AA4 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus sp. AA4	337	337	36%	1e-87	84.57%	1621	MF470238.1
<input type="checkbox"/>	Propanagrolaimus filiformis strain PGLaFil1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Propanagrolaimus filifor...	337	337	65%	1e-87	77.96%	1652	KJ836392.1
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus gingivallis 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus gingivallis	335	335	38%	4e-87	83.52%	1643	AF202156.2
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus sp. hall_val small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus sp. hall...	331	331	36%	6e-86	84.29%	1712	MK087058.1
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus sp. 72A small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus sp. 72A	331	331	36%	6e-86	84.29%	1712	MK087054.1
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus sp. 10B small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus sp. 10B	331	331	36%	6e-86	84.29%	1733	MK087051.1
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus sp. AB7 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus sp. AB7	331	331	36%	6e-86	84.29%	1678	MF470236.1
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus gingivallis isolate 46B946C9 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus gingivallis	331	331	36%	6e-86	84.29%	1543	JX674039.1
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus cf. gingivallis PF-2011 strain WB0801 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus cf. gingi...	331	331	36%	6e-86	84.29%	1712	HQ697250.1
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus sp. Hall3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus sp. Hall3	327	327	36%	7e-85	84.00%	1728	MK087057.1
<input type="checkbox"/>	Hallicephalobus gingivallis isolate 2014-10-972 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Hallicephalobus gingivallis	327	327	37%	7e-85	83.75%	713	KP875567.1
<input type="checkbox"/>	Tarantobelus sp. n. AD-2021 isolate AD small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Tarantobelus sp. n. AD...	327	327	35%	7e-85	84.73%	1736	MW560268.1

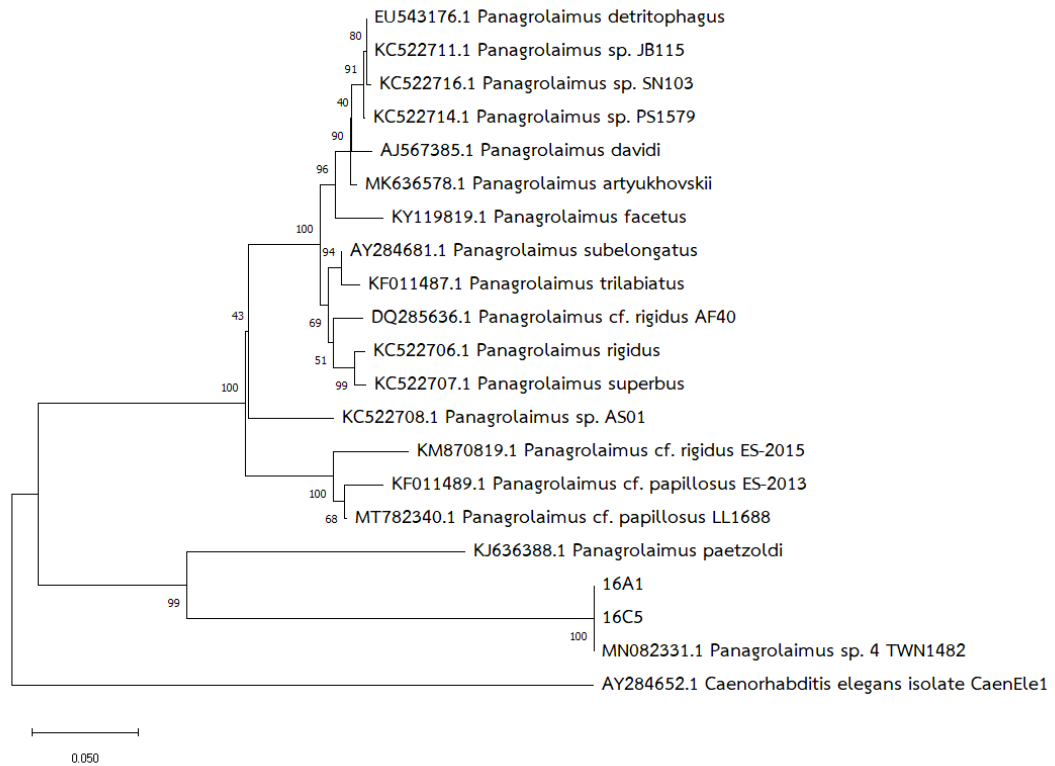
ภาพที่ 4.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน SSU ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 16A1 และ 16C5 ด้วย BLAST



ภาพที่ 4.6 neighbor joining phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน SSU ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10A3, 10A12, 10B2, 10B7, 10C2, 10C7, 10C8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1, 22A1, 26A1 และสปีชีส์ใกล้เคียงอื่นๆ โดยมีไส้เดือนฝอย *Ceratoplectus armatus* เป็น outgroup



ภาพที่ 4.7 neighbor joining phylogenetic tree แบบ topology ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน SSU ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10A3, 10A12, 10B2, 10B7, 10C2, 10C7, 10C8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1, 22A1, 26A1 และสปีชีส์ใกล้เคียงอื่นๆ โดยมีไส้เดือนฝอย *Ceratoptectus armatus* เป็น outgroup



ภาพที่ 4.8 neighbor joining phylogenetic tree ที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 16A1, 16C5 และสปีชีส์ใกล้เคียงอื่นๆ โดยมีไส้เดือนฝอย *Caenorhabditis elegans* เป็น outgroup

บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา

5.1. ความสามารถในการก่อโรคของไส้เดือนฝอย

จากผลการศึกษา พบว่าไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10B7, 10C7, 12B8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 และ 22A1 อยู่ในสกุล *Acrobelloides* สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al. (2015) ที่พบไส้เดือนฝอยสกุล *Acrobelloides* ในซากของหอยทาก *Cernuella virgata* ที่ตายแล้ว ซึ่งเป็นหอยทากศัตรูพืชของประเทศออสเตรเลีย อย่างไรก็ตามยังไม่มีหลักฐานแน่ชัดที่ยืนยันได้ว่า ไส้เดือนฝอยสกุล *Acrobelloides* เป็นปรสิตกับหอยทากศัตรูพืช แต่มีสมมติฐานสนับสนุนแนวคิด (Abebe et al., 2011) ดังต่อไปนี้ 1) ไส้เดือนฝอยสกุล *Acrobelloides* อาศัยอยู่ร่วมกับแบคทีเรีย เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *Phasmarhabditis hermaphrodita* ที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวควบคุมหอยทากศัตรูพืช ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวมีส่วนช่วยในการก่อโรคของไส้เดือนฝอยและ 2) ไส้เดือนฝอยสกุล *Acrobelloides* ที่แยกได้จากซากหอยทาก *C. virgata* ที่ตายแล้ว อาจได้รับยีนปรสิต (parasitism genes) จากแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้น ส่งผลให้ในบางระยะของวงจรชีวิต ไส้เดือนฝอยเหล่านี้อาจกลายเป็นปรสิตกับหอยทากศัตรูพืช

สำหรับไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A3, 10A12, 10B2, 10C2 และ 10C8 คือ *Cephalobus cubaensis* และสายพันธุ์ 16A1 และ 16C5 อยู่ในสกุล *Panagrolaimus* สอดคล้องกับงานวิจัยของ Charwat and Davies (1999) ที่พบว่าไส้เดือนฝอยในสกุล *Cephalobus* และ *Panagrolaimus* สามารถก่อให้เกิดโรค และกำจัดหอยทากศัตรูพืชในประเทศออสเตรเลีย

จากการระบุชนิดของไส้เดือนฝอยโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนไรโบโซมหน่วยย่อยขนาดเล็กเป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่าง พบว่าไส้เดือนฝอยอยู่ในสกุล *Acrobelloides*, *Cephalobus* และ *Panagrolaimus* และจากการค้นคว้างานวิจัย แสดงให้เห็นถึงความถูกต้องของสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยที่ได้ว่าสามารถใช้ในการกำจัดหอยทากศัตรูพืชได้จริง

5.2. การระบุชนิดของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 26A1

จากการระบุชนิดของไส้เดือนฝอยโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 26A1 ไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัดว่าอยู่ในสกุล *Acrobelloides* หรือ *Cephalobus* และไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10B7, 10C7, 12B8, 16A1, 16C5, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 และ 22A1 ที่ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ที่ชัดเจนได้ จะมีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นตัวช่วยใน

การระบุชนิดเพิ่มเติมภายหลัง (Van den Berg et al., 2017) เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำ โดยอาจ
จำแนกจากลักษณะของ cuticle, alimentary canal และ sensory cuticular organs เป็นต้น อีก
ประเด็นคือเป็นไปได้ว่าไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10B7, 10C7, 12B8, 16A1, 16C5, 17B1,
17C1, 20A1, 20B1, 22A1 และ 26A1 อาจเป็นสปีชีส์ใหม่ เนื่องจากยังไม่มีใครเคยบันทึกและจัด
จำแนกลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *SSU* แบบนี้มาก่อน

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ไล้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, 10A3, 10A12, 10B2, 10B7, 10C2, 10C7, 10C8, 12B8, 16A1, 16C5, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1, 22A1 และ 26A1 สามารถระบุชนิดได้ดังนี้ สายพันธุ์ 10A1, 10B7, 10C7, 12B8, 17B1, 17C1, 20A1, 20B1 และ 22A1 คือ *Acrobelloides* sp., สายพันธุ์ 10A3, 10A12, 10B2, 10C2 และ 10C8 คือ *Cephalobus cubaensis*, สายพันธุ์ 16A1 และ 16C5 คือ *Panagrolaimus* sp. และสายพันธุ์ 26A1 ซึ่งยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น *Acrobelloides* sp. หรือ *Cephalobus* sp. โดยไล้เดือนฝอยทั้ง 3 สกุล ได้แก่ *Acrobelloides* sp., *Cephalobus* sp. และ *Panagrolaimus* sp. สามารถก่อให้เกิดโรคต่อหอยทากศัตรูพืชในสวนกล้วยไม้ได้

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของไล้เดือนฝอย

ในการสกัดดีเอ็นเอของไล้เดือนฝอยจะทำการบดบนกระจกสไลด์ เนื่องจากไล้เดือนฝอยมีขนาดเล็กมาก จึงต้องทำการบดภายใต้กล้อง stereomicroscope และใช้จำนวนไล้เดือนฝอยประมาณ 100 ตัว ดังนั้นจึงควรทำการบดอย่างละเอียด เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอตามที่ต้องการ โดยการบดไล้เดือนฝอยแต่ละครั้งจะมีเศษ cuticle ติดมาด้วย จึงควรชะล้างดีเอ็นเอบนกระจกสไลด์ประมาณ 2-3 ครั้ง หรือทำการเจือจาง (dilute) 10 เท่า และ 100 เท่า และภายหลังจากการสกัดดีเอ็นเอเสร็จ ควรเริ่มการทดลองขั้นต่อไปทันที เพื่อไม่ให้ดีเอ็นเอที่เกิดการเสื่อมสภาพ

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

ในงานวิจัยฉบับนี้ได้ใช้วิธีการทางชีววิทยาโมเลกุลในการระบุชนิดของไล้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว จึงจะมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไล้เดือนฝอยเพิ่มเติม เพื่อประกอบการระบุชนิดของไล้เดือนฝอยให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2545. เกษตรกรดีที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้ตัดดอก. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://ebook.lib.ku.ac.th/ebook27/ebook/20130033/#p=1> กระทรวงเกษตรฯ [5 มิถุนายน 2564]
- กรมวิชาการเกษตร. 2561. วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.thaipn.com/home/nematode-th-06/> [15 มิถุนายน 2564]
- กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ. 2560. สิ้นค้ากล้วยไม้. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://www.ditp.go.th/contents_attach/165775/165775.pdf [5 มิถุนายน 2564]
- จินตนา อิงคินันท์. 2550. เอกสารประกอบคำสอนวิชาการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- นิพนธ์ ทวีชัย. 2553. โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน 35: 129-159.
- บุญเรือง คำศร. 2556. การประยุกต์ใช้วิวัฒนาการระดับโมเลกุลในชั้นศาลยุติธรรม: การตรวจหาแหล่งที่มาของไวรัสตับอักเสบบีที่มีการระบาดอย่างรวดเร็ว. วารสารนิติศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 6: 97-111.
- พญศักดิ์ รวยอารี, สุภาวดี จ้อเหรียญ, ภรณ์ สว่างศรี, หทัยรัตน์ อุไรรงค์ และ พากเพียร อัญญารณ. 2540. การระบุยีนข้าวที่ตอบสนองในระยะแรกต่อการปลูกเชื้อด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้. วารสารวิชาการเกษตร 29: 216-232.
- พัชรศนมี ว่องไชยกุล, ศิริลักษณ์ หาพันธ์นา และ ชานนท์ คล่องแคล่ว. 2549. กล้วยไม้ตัดดอก. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://positioningmag.com/30043> [5 มิถุนายน 2564]
- ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2551. แนววิธีกำจัดหอยทากศัตรูสำคัญของกล้วยไม้. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.phtnet.org/news51/view_news.asp?nID=529ฆ่าหอยทาก [5 มิถุนายน 2564]
- สำนักงานเกษตรอำเภอเมืองนครปฐม. 2550. ไส้เดือนฝอย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://mueang.nakhonpathom.doae.go.th/2007/pathogens6.html> [15 มิถุนายน 2564]
- สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 2558. หอยทากในสวนกล้วยไม้. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.ezathai.org/?p=230> [15 มิถุนายน 2564]

ภาษาอังกฤษ

- Abebe, E. Abebe-Akele, F., Morrison, J., Cooper, V. and Thomas, W.K. 2011. An insect pathogenic symbiosis between a *Caenorhabditis* and *Serratia*. *Virulence*. 2: 158–161.
- Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackey, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T. and Thomas, W.K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature*. 392: 71–75.
- Charwat, S. and Davies, K. 1999. Laboratory screening of nematode isolated from south Australia for potential as biocontrol agent of helixid snails. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74: 55–61.
- Chen, Z.X., Chen, S.Y. and Dickson, D.W. 2003. Nematode morphology physiology and ecology. *Nematode Advances and Perspectives*. 1: 555.
- d’Ovidio, D., Nermut, J. and Santoro, M. 2019. Occurrence of rhabditid nematodes in the pet giant African land snails (*Achatina fulica*). *Frontiers in Veterinary Science*. 6: 88.
- Glen, D.M., Wilson, M.J., Hughes, L., Cargeey, P. and Hajjjar, A. 1996. Exploring and exploiting the potential of the rhabditis nematode *Phasmarhabditis hermathrodita* as a biocontrol snail pests in agriculture. *British Crop Protection*. 66: 271–280.
- Holterman, M. 2007. Phylogenetic relationships within the phylum Nematoda as revealed by ribosomal DNA and their biological implications. *Production Ecology and Resource Conservation*. 1: 23–148.
- Kroetz, S.M., Srinivasan, J., Yaghoobian, J., Sternberg, P. and Hong, R. 2012. The cGMP signaling pathway affects feeding behavior in the necromenic nematode *Pristionchus pacificus*. *PLoS ONE*. 7(4): e34464.
- Lee, M.R., Canales–Aguirre, C.B., Nuñez, D., Pérez, K., Hernández, C.E. and Brante, A. 2017. The identification of sympatric cryptic free–living nematode species in the Antarctic intertidal. *PLoS ONE*. 12(10): e0186140.
- Lewis, S., Dyal, L.A., Hilburn, C.F., Weits, S., Liao, W., Lamunyon, C.F. and Denver, D. 2009. Molecular evolution in *Panagrolaimus* nematodes: Origins of

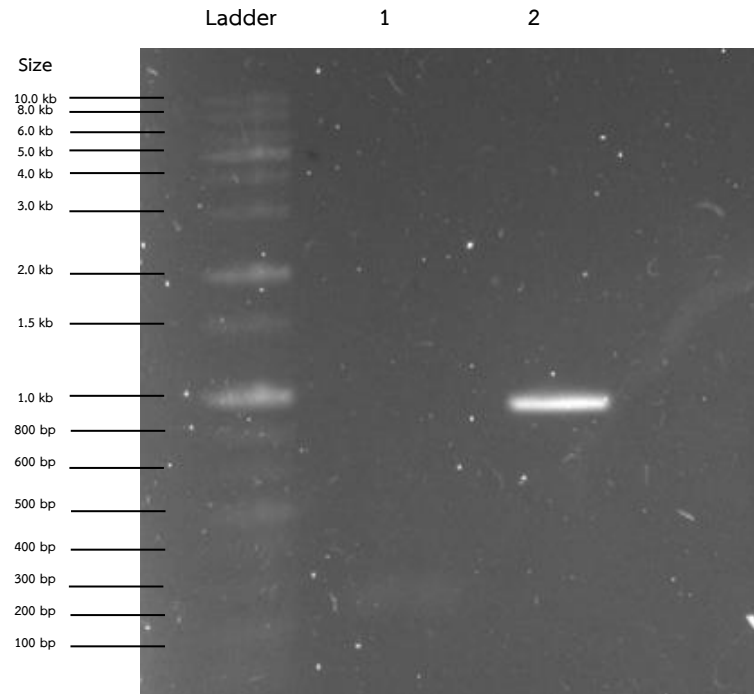
- parthenogenesis, hermaphroditism and the Antarctic species *P. davidi*. *BMC Evolutionary Biology*. 9(1): 1–13.
- Mengert, H. 1953. Nematoden und Schnecken. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*. 41: 311–349.
- Nigon, V. 1943. Le déterminisme du sexe chez un nématode libre hermaphrodite (*Rhabditis elegans* Maupas). *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologies*. 137: 40-41.
- Pal, S. and Singh, H.S. 2016. Taxonomic Identification and Phylogenetic analysis of Nematode Parasites Using 18S rDNA and 28S rDNA. *Journal of Zoological Sciences*. 4(3): 50–64.
- Ramsay, G.M. 1970. Mites with phoretic nematodes. *New Zealand Entomologist*. 4(4): 91–92.
- Seesao, Y., Gay, M., Merlin, S., Viscogliosi, E., Aliouat-Denis, C.M. and Audebert, C. 2017. A review of methods for nematode identification. *Microbiological Methods*. 138: 37–49.
- TaeSK for Bioinformatics Course. 2010. Basic local alignment search tool: BLAST. [Online]. Available from: <https://taeskforbioinf.wordpress.com/> [16 June 2021]
- UConn Home and Garden Education Center. 2019. Beneficial Nematodes. [Online]. Available from: <http://www.ladybug.uconn.edu/FactSheets/beneficial-nematodes.php>
- Van den Berg, E., Marais, M. and Swart, A. 2017. Nematode morphology and classification. *Nematology in South Africa*. 1: 33–71.
- Wang, A., Ash, G.J., Hodda, M. and Jahromi, F. 2015. Molecular phylogeny inferred from 18S rRNA gene sequences of nematodes associated with *Cernuella virgata*, a pest snail in Australia. *Journal of Phylogenetics and Evolutionary Biology*. 3(1): 1–10.
- Wilson, M.J., Glen, D.M. and George, S.K. 1993. The rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* as a potential biological control agent for slugs. *Biocontrol Science and Technology*. 3(4): 503–511.

ภาคผนวก

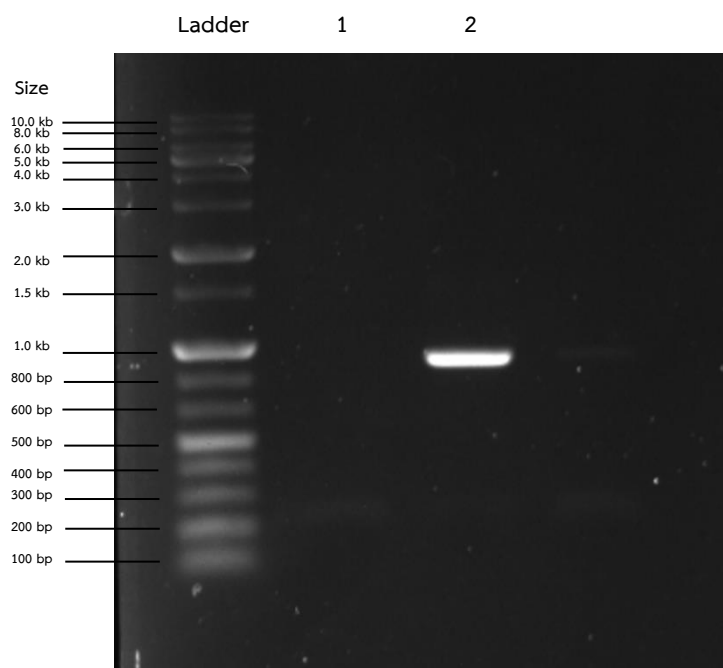
ภาคผนวกที่ 1 ค่าพารามิเตอร์ (parameter) ที่ใช้ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยการจัดกลุ่มแบบ neighbor-joining

MX: Analysis Preferences	
Phylogeny Reconstruction	
Option	Setting
ANALYSIS	
Scope	→ All Selected Taxa
Statistical Method	→ Neighbor-joining
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny	→ Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications	→ 1000
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type	→ Nucleotide
Genetic Code Table	→ Not Applicable
Model/Method	→ Kimura 2-parameter model
Fixed Transition/Transversion Ratio	→ Not Applicable
Substitutions to Include	→ d: Transitions + Transversions
RATES AND PATTERNS	
Rates among Sites	→ Uniform Rates
Gamma Parameter	→ Not Applicable
Pattern among Lineages	→ Same (Homogeneous)
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment	→ Pairwise deletion
Site Coverage Cutoff (%)	→ Not Applicable
Select Codon Positions	→ <input checked="" type="checkbox"/> 1st <input checked="" type="checkbox"/> 2nd <input checked="" type="checkbox"/> 3rd <input checked="" type="checkbox"/> Noncoding Sites
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads	→ 3
<input type="button" value="Help"/> <input type="button" value="Cancel"/> <input type="button" value="OK"/>	

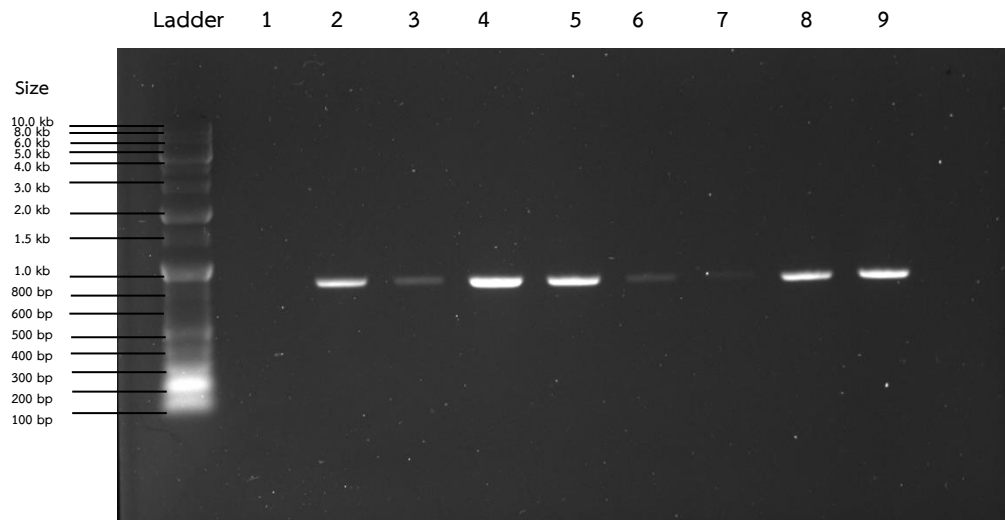
ภาคผนวกที่ 2 แถบดีเอ็นเอของ control และไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A3 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ



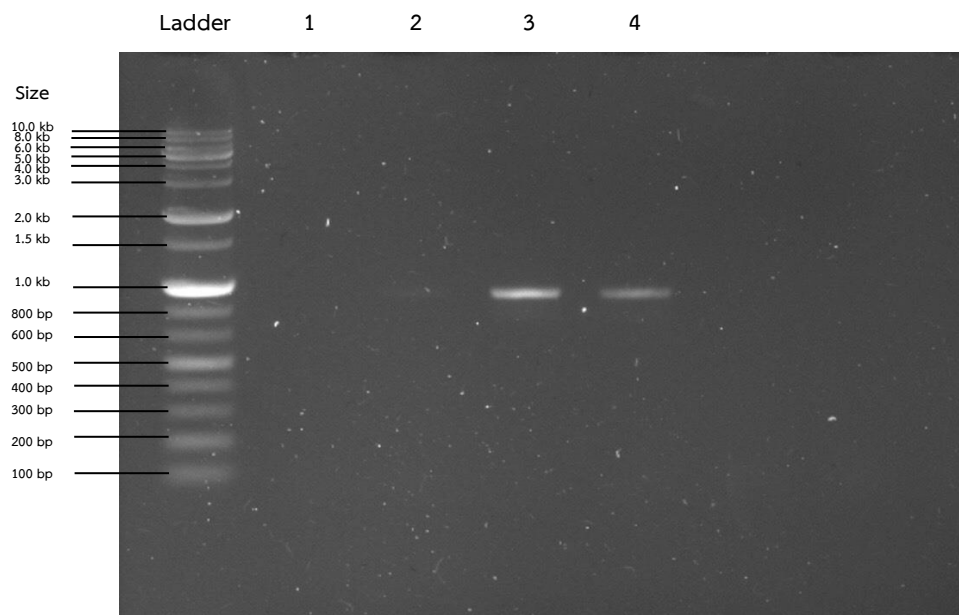
ภาคผนวกที่ 3 แถบดีเอ็นเอของ control และไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 26A1 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ



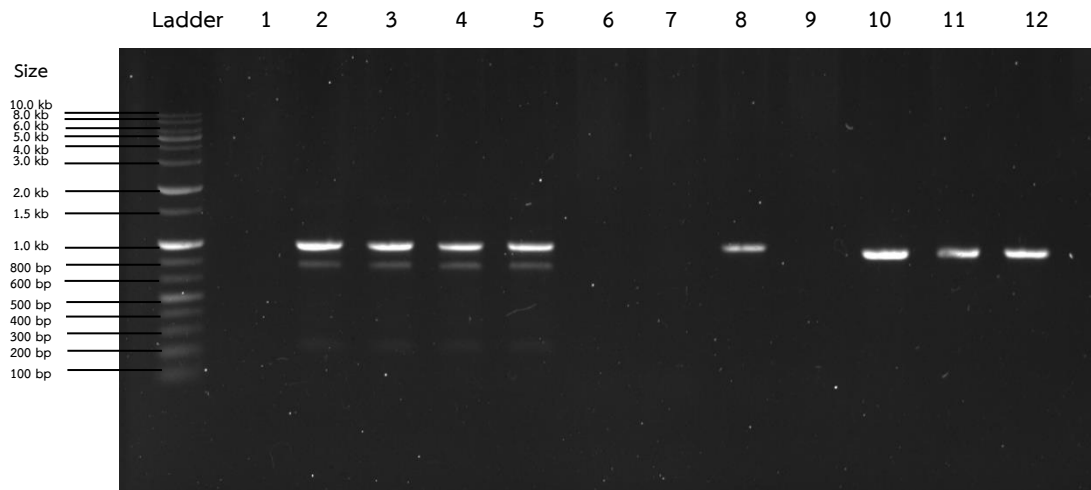
ภาคผนวกที่ 4 แอบริเอ็นเอของ control, ไข่เดือนฝอยสายพันธุ์ 22A1, สายพันธุ์ 22A1 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 17C1, สายพันธุ์ 17C1 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 20B1, สายพันธุ์ 20B1 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 10A1 และสายพันธุ์ 10A1 เจือจาง 10 เท่า ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ



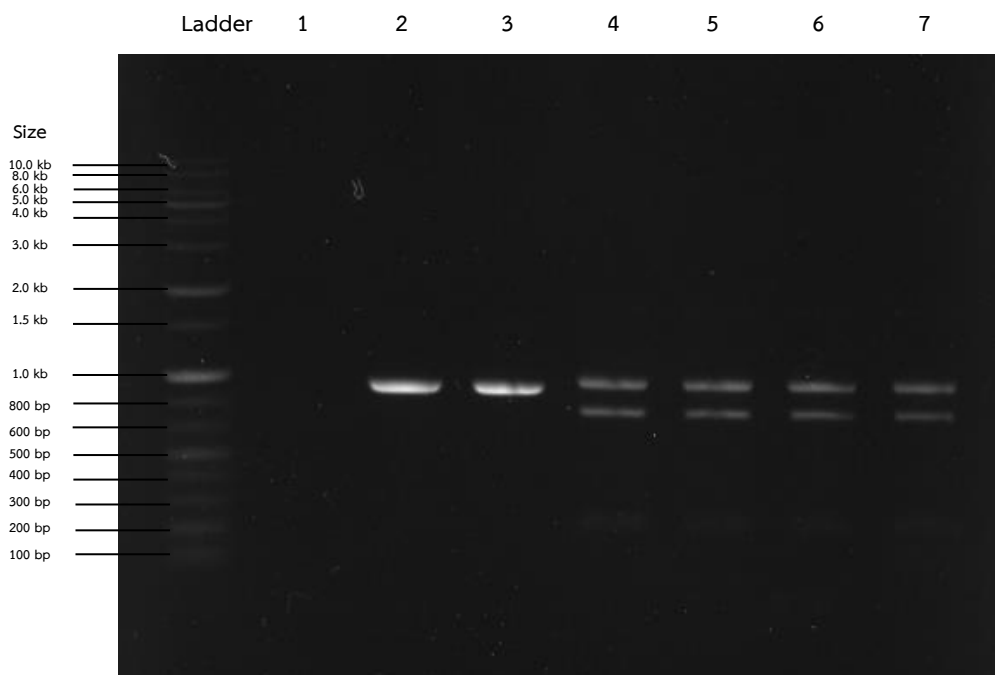
ภาคผนวกที่ 5 แอบริเอ็นเอของ control, ไข่เดือนฝอยสายพันธุ์ 12B8, สายพันธุ์ 17B1 และสายพันธุ์ 10B7 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย ไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ



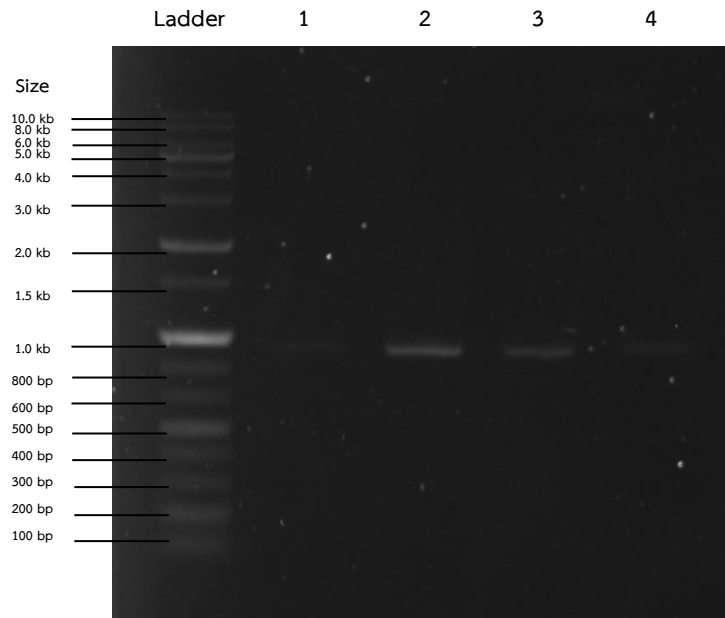
ภาคผนวกที่ 6 แถบตีเอ็นเอของ control, ไม้เดือนฝอยสายพันธุ์ 16A1, สายพันธุ์ 16A1 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 16C5, สายพันธุ์ 16C5 เจือจาง 10 เท่า, control, ไม้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10C7, สายพันธุ์ 10C7 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 20A1, สายพันธุ์ 20A1 เจือจาง 10 เท่า, สายพันธุ์ 10C2 และสายพันธุ์ 10C8 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ



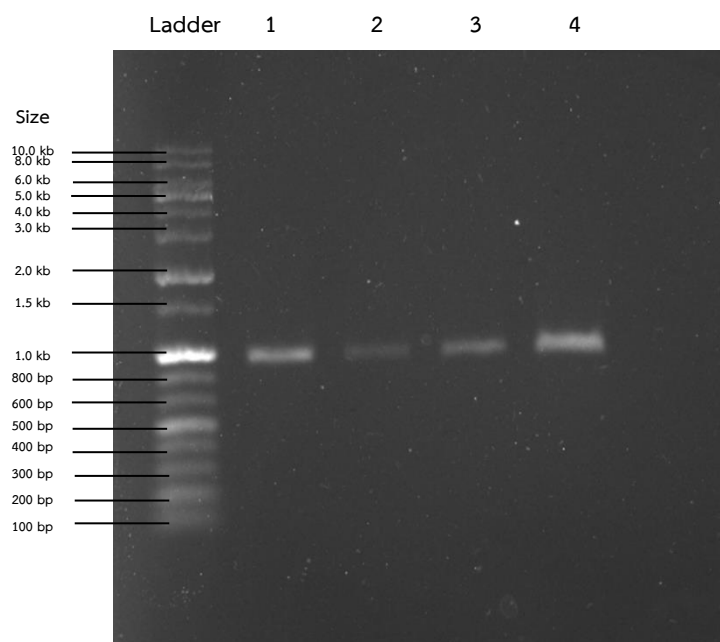
ภาคผนวกที่ 7 แถบตีเอ็นเอของ control, ไม้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10B2, สายพันธุ์ 10A12, สายพันธุ์ 16A1, สายพันธุ์ 16A1, สายพันธุ์ 16C5 และสายพันธุ์ 16C5 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ SSU18A และ ไพรเมอร์ SSU26R ตามลำดับ



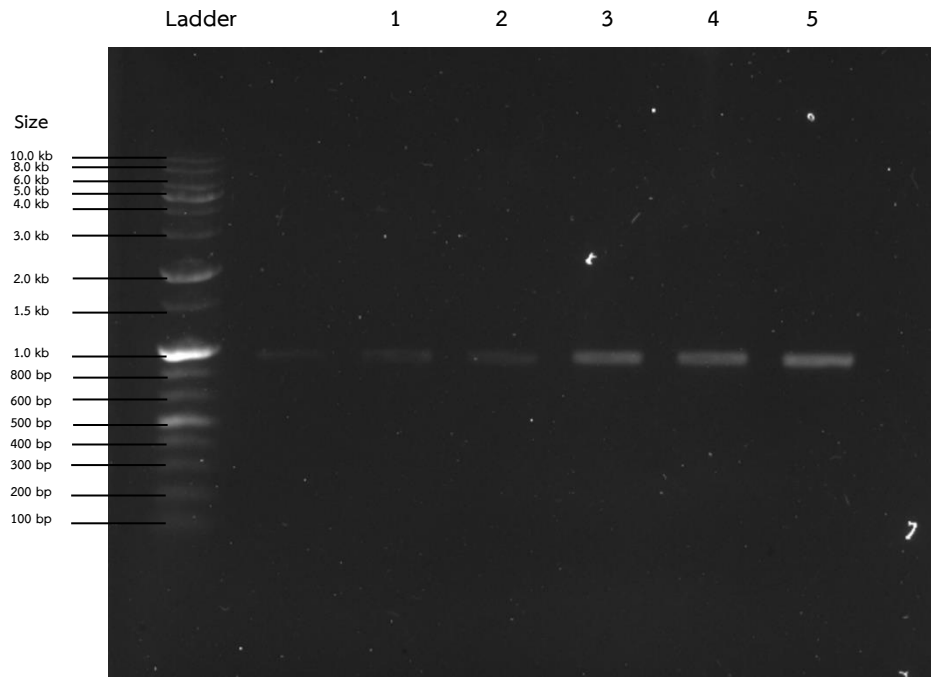
ภาคผนวกที่ 8 แถบตีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A3, สายพันธุ์ 17C1, สายพันธุ์ 22A1 และสายพันธุ์ 26A1 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ SSU18A และไพรเมอร์ SSU26R และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ตามลำดับ



ภาคผนวกที่ 9 แถบตีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10A1, สายพันธุ์ 10B7, สายพันธุ์ 17B1 และสายพันธุ์ 20B1 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ SSU18A และไพรเมอร์ SSU26R และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ตามลำดับ



ภาคผนวกที่ 10 แถบดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10C2, สายพันธุ์ 10C7, สายพันธุ์ 10C8, สายพันธุ์ 12B8 และสายพันธุ์ 20A1 ที่ได้จากการทำ PCR ด้วย โพรเมอร์ SSU18A และ โพรเมอร์ SSU26R และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ตามลำดับ



ภาคผนวกที่ 11 แถบดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 10B2, สายพันธุ์ 10A12, สายพันธุ์ 16A1 และสายพันธุ์ 16C5 ได้จากการทำ PCR ด้วย โพรเมอร์ SSU18A และ โพรเมอร์ SSU26R และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ตามลำดับ

