

จัดจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne enterolobii*) ในแปลงปลูกพริกที่จังหวัดอุบลราชธานี Identification of the species of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne enterolobii*) occurring on Chili in Ubon Ratchathani Province

ชนากานต์ บุญรินทร์ (Chanakan Boonrin)* ดร.บุณฑรา ชินศิริ (Dr.Buncha Chinnasi)**
ดร.อนงค์นุช สารนรกกิจ (Dr.Anongnuch Sasnarukkit)** ดร.ศรีเมฆ ชาวโพพาง (Dr.Srimek Chowpongpan)***

บทคัดย่อ

จังหวัดอุบลราชธานีเป็นแหล่งปลูกพริกสำคัญในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยพบว่ามีการระบาดของโรครากปมและสร้างความเสียหายต่อพริก ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) การศึกษา ปฏิบัติโดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างรากพริกจากแปลงปลูกทั้งหมด 12 แปลง ในเขตพื้นที่ อำเภอเหล่าเสือโก้ก อำเภอวังสามสิบ อำเภอเดชอุดม และอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี เพื่อศึกษาการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมโดยวิธีทางด้านสัณฐานวิทยา (Morphology) และทางชีวโมเลกุล (Molecular Analysis) ผลการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาจากรอยข้นที่ก้น (Perineal pattern) ของไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียพบว่า มีความแปรปรวนของรูปแบบของ perineal pattern ทั้งกลมและไข่ ในส่วนของ dorsal arch ตั้งแต่สูงจนถึงปานกลาง และมี lateral line และทางด้านชีวโมเลกุลจากการใช้คู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมคือ 1108 และ C2F3 พบว่าชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมในทุกแปลงจากทั้ง 4 อำเภอให้ผลผลิตทางปฏิกิริยาที่มีขนาดเท่ากันคือ 700 bp ดังนั้นชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมที่มีการระบาดแปลงปลูกพริก ทั้ง 12 แปลง ทั้ง 4 อำเภอ จึงเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii*

ABSTRACT

Ubon Ratchathani province is an important chili cultivating area in the northeastern region of the Thailand. Nematode surveys were conducted by randomly sampling chili roots in chili fields. Roots were collected from 12 field in following districts: Lag Sua Kog, Muang Samsip, Dech Udom, and Aumphur Muang. Studies on identification of the species of root-knot nematodes using by morphological characters and molecular methods were followed. The result of the morphological studies of perineal patterns from adult females showed that they all had rounded to ovoid shapes, high to moderately high dorsal arches and lateral lines. The identification of *Meloidogyne* based on the molecular method with the specific primer set (1108 and C2F3) showed a DNA band of 700 bp was found in all root-knot nematode samples collected from the 12 fields of the 4 Districts. Consequently, the root-knot nematodes were identified as *M. enterolobii*.

คำสำคัญ: ไส้เดือนฝอยรากปม พริก การจัดจำแนกชนิด

Keywords: Root-knot nematode, Chilli, Species identification

*นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

***ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

บทนำ

พริกเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ในประเทศไทยพริกสามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ดีในทุกภูมิภาคของประเทศโดยปลูกได้ตลอดทั้งปี กรมส่งเสริมเกษตรรายงานว่าในปี พ.ศ.2558 ประเทศไทยใช้พื้นที่ปลูกพริก ขี้นุเม็ดเล็ก 100,920.84 ไร่ ได้ผลผลิต 110,024,683.05 กิโลกรัมและพริกขี้นุเม็ดใหญ่ 135,199.95 ไร่ ได้ผลผลิต 147,126,223.25 กิโลกรัม ในปี พ.ศ. 2549 พื้นที่ปลูกพริกของจังหวัดอุบลราชธานี และศรีสะเกษ พบปัญหาการระบาดของไส้เดือนฝอยสาเหตุของโรครากปมอย่างรุนแรงโดยสร้างความเสียหายของผลผลิตและคุณภาพผลผลิตตั้งแต่ร้อยละ 50-100 จนถึงปัจจุบันพบว่าบางพื้นที่ไม่สามารถปลูกพริกได้ เนื่องจากติดไปกับเครื่องมือเกษตร โดยเฉพาะดินที่มีการปนเปื้อนไส้เดือนฝอยติดไปกับดินกล้าพริกผู้แปลงปลูกและดินที่ติดกับล้อรถไถจากแปลงหนึ่งสู่อีกแปลงหนึ่งอีกทั้งพื้นที่บริเวณดังกล่าวมีการสะสมของประชากรไส้เดือนฝอยเป็นจำนวนมากเป็นระยะเวลานาน และด้วยสภาพดินร่วนปนทรายไส้เดือนฝอยจึงแพร่ระบาดตามไปกับน้ำที่ใช้ทำการเกษตรหรือน้ำฝนได้ดี (นุชนารถ, 2550)

ในประเทศไทยไส้เดือนฝอยรากปมก่อความเสียหายรุนแรงต่อพืชหลายชนิด ในปัจจุบันพบว่าไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ชนิดนี้ถือเป็นหนึ่งในชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมที่สำคัญที่สุดเนื่องจากมีการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ที่กว้างขวางขึ้น และมีความสามารถในการเอาชนะความต้านทานของพืชที่สำคัญ เช่น ใน genotypes ของมะเขือเทศ พริกไทย และพืชไร่บางชนิดที่มียีน *Mi-1* ซึ่งต้านทานต่อการเข้าทำลายของ *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. incognita* (Fargette, 1987; Fargette et al., 1994) ไส้เดือนฝอยชนิดนี้ถูกพบในแอฟริกา (Fargette et al., 1994; Trudgill et al., 2000) อเมริกา (Brito et al., 2004) เอเชีย (Yang Eisenback, 1983) และยุโรป (Blok et al., 2002; Kiewnick et al., 2008) ในพืชอาศัยที่มีบันทึกไว้ ได้แก่ พืชและผักอื่นๆ เช่น พริก ฝรั่งเศส พริกหยวก ถั่วเหลือง มันฝรั่ง หวาน ยาสูบ แตงโม และฝรั่งเป็นต้น (Moens et al., 2009)

ลักษณะ Perineal pattern ของไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* มีความคล้ายคลึงเป็นอย่างมากกับไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. incognita* (European and Mediterranean Plant Protection Organization [EPPO], 2014) ซึ่งยากต่อการจัดจำแนก ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิธีการจัดจำแนกไส้เดือนฝอยโดยใช้วิธีการอนุชีวโมเลกุล (PCR) โดยใช้ชุดไพรเมอร์เฉพาะเจาะจง 1108 และ C2F3 ที่จับตำแหน่งจีโนมของไมโทคอนเดรียบริเวณระหว่าง COII และ 16s rRNA ยีน เพื่อจัดจำแนกสปีชีส์ของไส้เดือนฝอยรากปม ชุดไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถนำมาจัดจำแนกไส้เดือนฝอย *M. arenaria* มีขนาดดีเอ็นเอ 1.1 kb *M. javanica*, *M. incognita* มีขนาดดีเอ็นเอ 1.5-1.6 kb (Power, Harris, 1993) และ *M. enterolobii* พบว่ามีขนาดดีเอ็นเอ 700 bp (Long et al., 2014) ซึ่งขนาดดีเอ็นเอดังกล่าวสอดคล้องกับ Jindapunnapat (2012) ที่รายงานการพบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* จากดินฝรั่งในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทยโดยมีขนาดดีเอ็นเอที่พบคือ 700 bp ในประเทศเวียดนามขนาดดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* ที่พบมีขนาดประมาณ 705 bp (Iwahori et al., 2009) เช่นเดียวกับรายงานการพบไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* ในรัฐฟลอริดา มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 705 bp (Brito et al., 2004)

การจัดจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมที่สุ่มเก็บในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานีซึ่งเป็นพื้นที่ที่ได้รับความเสียหายอย่างรุนแรงต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมทั้งนี้ ในปี ค.ศ. 2010 EPPO จัดให้ไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* อยู่ในกลุ่มศัตรูพืชหลัก (A2) (EPPO, 2014) เนื่องจากไส้เดือนฝอยชนิดดังกล่าวพบในบางประเทศเท่านั้น ซึ่งในประเทศไทยเคยมีการรายงานพบในเขตพื้นที่ภาคกลางแต่ยังไม่เคยมีการรายงานในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมาก่อน การศึกษาการจัดจำแนก *M. enterolobii* ชนิดนี้จึงเป็นข้อมูลสำคัญต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการกักกันพืช เพื่อใช้ประโยชน์ในด้านติดตามการแพร่กระจายในเขตพื้นที่เพาะปลูกพืช ดังนั้นการมีข้อมูลการจัดจำแนกนี้เป็นส่วนหนึ่งเพื่อ

ใช้ข้อมูลการศึกษาความหลากหลายของไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* ในระดับชีวโมเลกุล (Molecular diversity) และการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆที่ยังไม่เคยค้นพบในประเทศไทยได้ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) สาเหตุโรครากปมของพริกในเขตพื้นที่ อำเภوله่าสือโลก อำเภอม่วงสามสิบ อำเภอเดชอุดม และอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบและแยกไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์จากรากพริก

เก็บตัวอย่างรากพริกที่แสดงอาการโรครากปมในแปลงปลูกพริกในจังหวัดอุบลราชธานี ในอำเภอที่มีการปลูกพริกมากที่สุด 4 อันดับคือ อำเภوله่าสือโลก อำเภอเมือง อำเภอม่วงสามสิบ และ อำเภอเดชอุดม ตามลำดับ ทำการสุ่มเลือกเก็บต้นพริกที่แสดงอาการใบเหลือง ต้นแคระแกร็น เหี่ยว และ รากปม จำนวน 3 ต้นต่อแปลง โดยเลือกเก็บที่หัวแปลง กลางแปลง และท้ายแปลง หลังจากนั้นรากตัวอย่างจะถูกตัดและเก็บใส่ถุงพลาสติกซิปล็อกเพื่อรักษาความชื้นโดยเก็บรากตัวอย่าง อำเภอละ 3 แปลง รวมทั้งหมด 12 แปลง จดบันทึกตำแหน่งแปลง (GPS, Compass) และสายพันธุ์พริก (ชื่อทางการค้า) ทำการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมโดยตัวอย่างในแต่ละแปลงถูกสับให้มีขนาดประมาณ 1 นิ้วและผสมกัน หยิบสุ่มประมาณ 100 กรัม ผสมลงดินร่วนผสมดินนาที่อบฆ่าเชื้อ (180 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) 400 กรัม ใส่ลงกระถางพลาสติกขนาด 5 นิ้ว หลังจากนั้นทำการย้ายต้นกล้าผักบุ้งจีน (เจียไต๋) อายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 3 ซ้ำ ต่อ 1 แปลง รวมทั้งหมด 36 ตัวอย่าง หลังจากนั้น 2 เดือนนับจากวันที่ปลูกเชื้อ ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ single egg mass โดยนำดินผักบุ้งจีนที่ปลูกเชื้อในแต่ละตัวอย่างมาล้างรากให้สะอาด ใช้เข็มเย็บเย็บแต่ละกลุ่มไขลงแต่ละช่องที่บรรจุน้ำกลั่นในถาดหลุม (24 microwell plate) นำไปควบคุมอุณหภูมิ 28 °C (Biosan) หลังจากนั้นประมาณ 3-7 วัน กลุ่มไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่สอง ในระยะเวลาภายใน 3-7 วัน ดินผักบุ้งจีนอายุ 4 สัปดาห์ที่ปลูกในดินฆ่าเชื้อจะถูกปลูกเชื้อ โดยทำการเจาะรูข้างลำต้น 2 รู ใส่เชื้อตัวอ่อนระยะที่สองลงในรูและกลบรูด้วยดินเล็กน้อย หลังจากนั้น 2 เดือน ทำการเลือกตัวแทนแปลงละ 1 ตัวอย่างเพื่อศึกษาการจำแนกชนิดทางด้านสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลต่อไป

2. การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทางด้านสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิครอยย่นที่ก้น (perineal pattern)

นำดินผักบุ้งจีนที่ปลูกเชื้อด้วยเทคนิค single eggmass จากข้อ 1 มาล้างรากให้สะอาดด้วยน้ำไหลผ่าน ใช้เข็มเย็บเย็บตัวเมียจากรากผักบุ้งจีน เก็บตัวเมียใส่ลงถาด watch glass ที่มีน้ำกลั่น จากนั้นนำตัวเมียวางบนแผ่นพลาสติกภายใต้กล้อง Stereo microscope ใช้มีดโกนตัดไส้เดือนฝอยตัวเมียแยกส่วนระหว่างส่วนบน (anterior) และส่วนล่าง (posterior) ออกจากกัน นำส่วนล่างมาตัดบริเวณรอบข้างออกให้เป็นสี่เหลี่ยมโดยเหลือบริเวณส่วนก้นที่มีรอยย่น (perineal pattern) ทำความสะอาดชิ้นส่วน pattern ด้วย 45% lactic acid (Carlo Erba Reagent SpA) แช่ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นใช้เข็มเย็บเย็บทำความสะอาดสิ่งสกปรกออก นำชิ้นส่วน pattern วางในหยด lactophenol ที่อยู่บนสไลด์สะอาด แล้วปิดด้วย cover slip และปิดขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ โดยรอบ บันทึกข้อมูลลงบนสไลด์ตัวอย่าง จากนั้นนำสไลด์ส่องดูลักษณะ perineal pattern ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS 2ZX7, Japan)(Hartman Sasser, 1985) นำมาเปรียบเทียบกับภาพของ Hunt, Hondoo (2009) เพื่อใช้ระบุชนิด (species) ไส้เดือนฝอยรากปมเบื้องต้นต่อไป

3. การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทางด้านชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.1 การสกัดดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปม

นำตัวอย่างไส้เดือนฝอยตัวเมียเต็มวัยจากเทคนิค single eggmass จากข้อที่ 1 มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นใส่ 1X PCR buffer (no MgCl₂) (Solis-biodyne) 10 ไมโครลิตร ปิดฝาให้สนิท นำหลอดทดลองใส่เครื่อง เก๊บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองเก๊บที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที แล้วจึงเก๊บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีอีกครั้ง เพื่อให้เซลล์แตกแล้วปล่อยดีเอ็นเอ เติม 1 ไมโครลิตร protease K (20 มิลลิกรัมต่อน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) (Worthington-biochemical) นำหลอดทดลองบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที หลังจากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จัดเก็บจากวิธีการของ Kwankuae (2014)

3.2 Polymerase Chain Reaction

การเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR Mastermix ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย dH₂O 13 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 5 ไมโครลิตร, dNTP 2 ไมโครลิตร, DNA Template 1 ไมโครลิตร, DNA polymerase 2 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ 1108 (5'-TACCTTTGACCAATCACGCT-3') และ C2F3 (5'-GGTCAATGTTCAGAAAT-TTGTGG-3') ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมี PCR Profile คือ Initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 นาที Annealing อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 นาที Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 นาที (ขึ้นตอน Denaturation - Extension จำนวน 35 รอบ) และ Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที (Jindapunnapat, 2012) นำผลผลิตทางปฏิกิริยา (PCR product) ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี Gel electrophoresis โดยนำ PCR product จำนวน 4 ไมโครลิตร ผสมสีย้อม 2 ไมโครลิตร (Utrapower, German) บน 1.5% agarose gel ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจดูขนาด PCR product ภายใต้แสงยูวี

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบและแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพริก

แปลงปลูกพริกพื้นที่อำเภอม่วงสามสิบ อำเภอเหล่าเสือโก้ก อำเภอดงดง และอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานีทั้งหมด 12 แปลงจากการสุ่มเก็บตัวอย่างมีลักษณะดินเป็นดินทราย (ภาพที่1) และดินพริกในแปลงปลูกได้รับความเสียหายจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งมีการแสดงอาการในส่วนเหนือดินคือ ใบเหลือง ต้นแคระแกรน และเหี่ยว (ภาพที่2) เมื่อตรวจสอบบริเวณรากพบรากมีอาการปม (ภาพที่3) จากการตรวจสอบสายพันธุ์พริกที่ใช้เพาะปลูกแต่ละแปลงพบว่า อำเภอม่วงสามสิบ ใช้พริกชื่อทางการค้าคืออัมพวาและเพชรดำ อำเภอเหล่าเสือโก้กใช้อัมพวาและเพชรมงกุฎ อำเภอดงดงใช้อัมพวา และอำเภอเมืองใช้ซูเปอร์ฮอต จากรูปภาพที่ 3 ภาพ A พันธุ์ทางการค้าซูเปอร์ฮอตรากมีลักษณะเน่าสั่นกุดเนื่องจากระบบรากฝอยถูกเข้าทำลาย พบอาการรากปมขนาดใหญ่ซึ่งอาการรากปมมีความรุนแรงมากกว่าพันธุ์พริกการค้าชนิดอื่นๆ

2. การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทางด้านสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิครอยย่นที่ก้น (perineal pattern)

จากการจัดจำแนกจากการตรวจสอบลักษณะ Perineal pattern โดยศึกษาลักษณะ Perineal pattern 3 pattern ต่อ 1 แปลงพริก พบว่าในพื้นที่ อำเภอเหล่าเสือโก้ก (ภาพที่ 4 A-C) มีลักษณะกลม (ภาพที่ 4 A) และ dorsal arch สูงปาน

กลาง อำเภอม่วงสามสิบ(ภาพที่ 4 D-F) มีลักษณะ dorsal arch สูงปานกลาง และมี lateral line (ภาพที่ 4 D) อำเภอดงอคูม (ภาพที่ 4 G-I) มีลักษณะรูปไข่ (ภาพที่ 4 I) dorsal arch สูง และอำเภอมือง (ภาพที่ 4 J-L) โดยมีลักษณะหลักทั่วไปคือ dorsal arch สูงปานกลาง มีลักษณะรูปไข่ Perineal pattern พบว่า ลักษณะ pattern บางส่วน (ภาพที่4) มีรูปร่างกลมทรงไข่ และมีบริเวณ dorsal arch สูงปานกลาง มีลักษณะที่ใกล้เคียงอย่างมากหรือเล็กน้อยกับไส้เดือนฝอย *M. incognita*, *M. arenaria* ซึ่งลักษณะ pattern ดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับ *M. enterolobii* เช่นเดียว



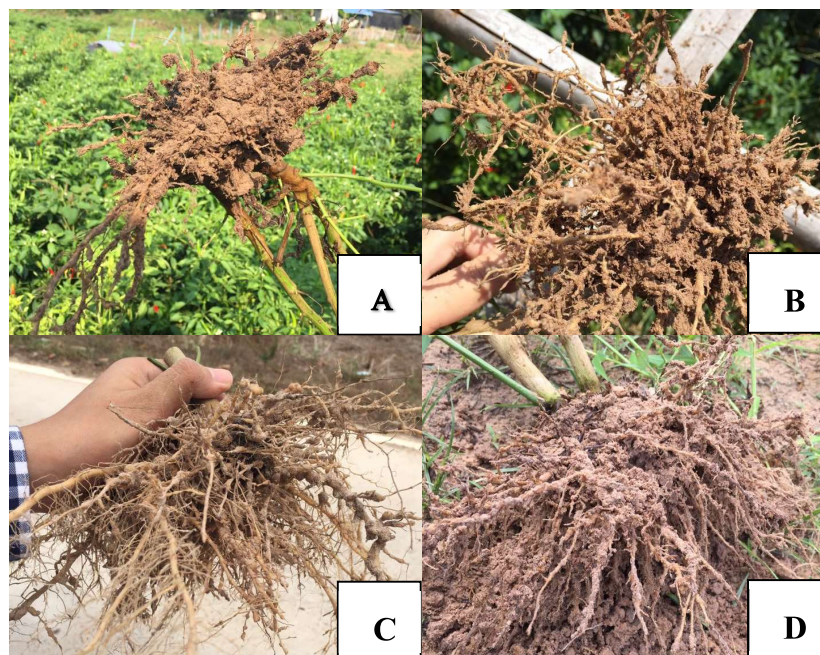
ภาพที่ 1 แสดงลักษณะแปลงพริกที่มีการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมในจังหวัดอุบลราชธานี โดยดินเป็นลักษณะดินทราย



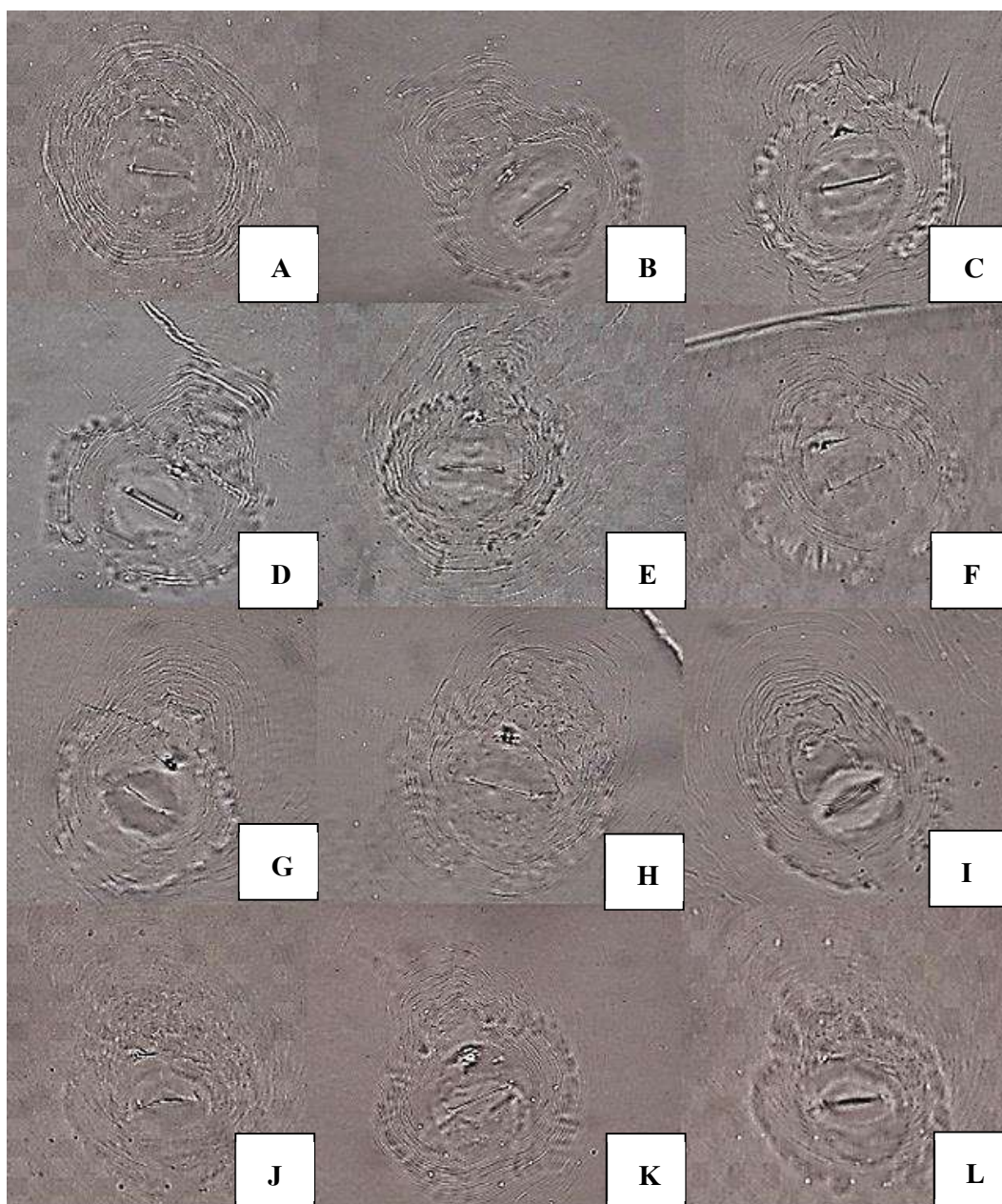
ภาพที่ 2 อาการพริกที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมเข้าทำลายโดยมีอาการใบเหลือง ต้นแคระแกรน และเหี่ยว

ตารางที่ 1 ตำแหน่งละติจูดและลองจิจูดของแปลงที่สุ่มเก็บตัวอย่างรากพริก และข้อมูลสายพันธุ์พริกที่เพาะปลูกในพื้นที่เขตอำเภอม่วงสามสิบ อำเภอเหล่าเสือโก้ก อำเภอเดชอุดม และอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี

Name of district	Position(Longitude and Latitude)	Trade name
Muang Samsip	15°23'55"N 104°49'56"E	Amphawa
	15°23'57"N 104°50'6"E	Amphawa
	15°23'54"N 104°50'12"E	Petdam
Lag Sus Kog	15°24'7"N 104°53'4"E	Petmonggut
	15°24'15"N 104°53'9"E	Amphawa
	15°24'14"N 104°53'13"E	Amphawa
Dech Udom	14°56'11"N 104°56'3"E	Amphawa
	14°56'8"N 104°56'7"E	Amphawa
	14°56'1"N 104°56'3"E	Amphawa
Aumphur Muang	15°23'22"N 104°49'48"E	Superhot
	15°23'25"N 104°50'4"E	Superhot
	15°22'47"N 104°50'3"E	Superhot



ภาพที่ 3 อาการรากปมของพริกจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *M. enterolobii*: อำเภอเมือง (A), อำเภอม่วงสามสิบ(B), อำเภอเดชอุดม (C) และ อำเภอเหล่าเสือโก้ก(D).

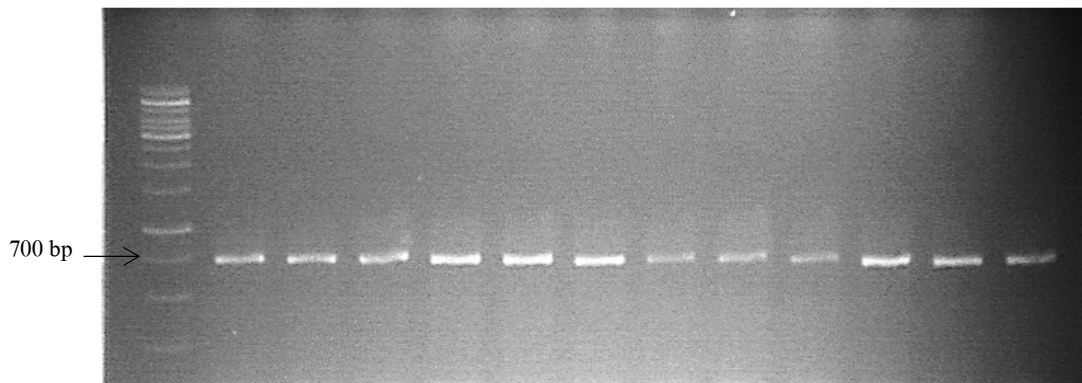


ภาพที่ 4 ลักษณะ Perineal pattern (100X) ที่พบของไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* จากตัวอย่างไส้เดือนฝอยเพศเมียเต็มวัยในเขตพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี อำเภอเหล่าเสือโก้ก (A,B,C), อำเภอม่วงสามสิบ (D,E,F), อำเภอเดชอุดม (G,H,I) และอำเภอเมือง (J,K,L)

3. การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมียจากแปลงพริก จำนวน 12 แปลง จากเขตพื้นที่อำเภอเหล่าเสือโก้ก อำเภอม่วงสามสิบ อำเภอเดชอุดม และอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี พบว่าขนาดดีเอ็นเอจาก

ตัวอย่างทั้ง 4 อำเภอ หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจง (1108 และ C2F3) และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel พบว่าขนาดผลผลิตปฏิกิริยาประมาณ 700 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA ladder ที่ขนาด 1 kb โดยผลการศึกษาตัวอย่างในแต่ละแปลงที่แตกต่างกันทั้งในอำเภอเดียวกัน และต่างอำเภอ ก็ปรากฏขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาที่เท่ากัน (ภาพที่ 5) จากผลการใช้ชุดไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทำให้ผลขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน จึงสามารถสรุปได้ว่าชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในอำเภอเหล่าเสือโก้ก อำเภอม่วงสามสิบ อำเภอเดชอุดม และอำเภอเมือง ในจังหวัดอุบลราชธานี คือไส้เดือนฝอยรากปม *M. Enterolobii*



ภาพที่ 5 ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างตัวเต็มวัยไส้เดือนฝอยรากปมตัวเมียที่มาจากพื้นที่แปลงพริกในเขต อำเภอเหล่าเสือโก้ก อำเภอม่วงสามสิบ อำเภอเดชอุดม และอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดไพรเมอร์เฉพาะเจาะจง (1108 และ C2F3) และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างด้วยวิธี gel electrophoresis ใน 1.5% (w/v) agarose gel M คือ DNA ladder 1kb

- ช่องที่ 1-3 : อำเภอเหล่าเสือโก้ก : *Meloidogyne enterolobii*
- ช่องที่ 4-6 : อำเภอม่วงสามสิบ : *Meloidogyne enterolobii*
- ช่องที่ 7-9 : อำเภอเดชอุดม : *Meloidogyne enterolobii*
- ช่องที่ 10-12 : อำเภอเมือง : *Meloidogyne enterolobii*

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษากำหนดจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมในแปลงปลูกพริก โดยทำการสุ่มเลือกเก็บตัวอย่างรากพริกที่แสดงอาการ ส่วนเหนือดินคือใบเหลือง ต้นแคระแกรน เหี่ยว และ อาการส่วนใต้ดินคือ รากปม จากแปลงปลูกของเกษตรกร ในเขตพื้นที่ อำเภอเหล่าเสือโก้ก อำเภอม่วงสามสิบ อำเภอเดชอุดม และอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี อำเภอละ 3 แปลง รวมทั้งหมด 12 แปลง ทำการศึกษากำหนดจำแนกในสองด้านคือ ด้านสัณฐานวิทยา และ ด้านชีวโมเลกุล ผลจากการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาโดยใช้การตรวจสอบ Perineal pattern พบว่าลักษณะรูปแบบจากตัวอย่างไส้เดือนฝอยตัวเมียทั้ง 4 อำเภอ มีความแปรปรวนเช่น บริเวณ dorsal arch มีความสูงในระดับปานกลางถึงมาก รูปร่างกลมหรือเป็นรูปไข่ และมีการปรากฏ lateral line ในตัวอย่างบางพื้นที่ โดย Perineal pattern ที่มีบริเวณ dorsal arch ที่สูงและ lateral line เป็นลักษณะเด่นของ *M. incognita* และ *M. arenaria* ตามลำดับ (Hunt, Handoo, 2009) และผลของ Perineal pattern ในแต่ละแปลงมาจากเทคนิค single eggmass ซึ่งไส้เดือนฝอยรากปมแม่ตัวเท่านั้น โดยไส้เดือนฝอยรากปมมีการสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะทำให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมรุ่น

ต่อไปมีลักษณะและดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (Moens et al., 2009) แต่เทคนิค Perineal pattern นี้สามารถให้ความแตกต่างและแปรปรวนของชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่มาจากเทคนิค single eggmass ในตัวอย่างและแปลงในพื้นที่เดียวกันได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ของ Jindapunnapat (2012) ระบุว่า การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* จากลักษณะ Perineal pattern เพียงอย่างเดียวเช่นเดียวกับเป็นเรื่องยากต่อการจัดจำแนกออกจาก *M. incognita* และ *M. arenaria* อย่างชัดเจนของ Perineal pattern ของไส้เดือนฝอยดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกันเป็นอย่างมากต้องอาศัยคนชำนาญและมีประสบการณ์ในการจัดจำแนก Perineal pattern แต่อย่างไรก็ตามลักษณะ Perineal pattern ส่วนใหญ่ที่พบคือ มี dorsal arch เป็นแบบสูงปานกลางและรูปทรงไข่ (oval shape) ซึ่งลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Brito (2004) ที่รายงานว่า Perineal pattern ของ *M. enterolobii* มีรูปร่างกลมทรงไข่ และ สอดคล้องกับรายงานของ Jindapunnapat (2012) มี dorsal arch แบบสูงปานกลาง (moderate arch) ซึ่งเป็นลักษณะ Perineal pattern ดังกล่าวยังมีผลรายงานว่าไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* เช่นเดียวกัน

ในส่วนการจัดจำแนกทางชีวโมเลกุลโดยใช้วิธีการ PCR และใช้ชุดไพรเมอร์เฉพาะเจาะจง 1108 (5'-TA C CTTTG ACCAATCAGCT-3') และ C2F3 (5'-GGTCAATGTTCAGAAATTTGTGG-3') จับตำแหน่งยีนใน ไมโทคอนเดรีย บริเวณระหว่าง Cytochrome Oxidase II (COII) และ 16 small subunit ribosomal RNA (16s rRNA) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้จัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม โดยดูไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่สำคัญ ได้แก่ *M. arenaria* มีขนาดดีเอ็นเอ 1.1 kb *M. javanica*, *M. incognita* มีขนาดดีเอ็นเอ 1.7 kb และ *M. enterolobii* (Power Harris, 1993) พบว่ามีขนาดดีเอ็นเอ 700 bp ซึ่งเป็นชนิดเดียวเท่านั้นที่ได้ขนาดเท่านี้ (Long et al., 2014) จากการทดลองพบว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมในพริกที่เก็บตัวอย่างรากทั้งหมด 12 แปลง จากเข้ออำเภอเหล่าเสือโก้ก อำเภอม่วงสามสิบ อำเภอเดชอุดม และอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี พบว่าขนาดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมดมีขนาด 700 bp ซึ่งเป็นขนาดดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* สอดคล้องกับ jindapunnapat (2012) ได้รายงานการพบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ในดินฝรั่งในพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทยโดยมีขนาดดีเอ็นเอที่พบคือ 700 bp ในประเทศเวียดนามขนาดดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* ที่พบมีขนาด 705 bp (Iwahori et al., 2009) เช่นเดียวกับ Brito et al (2004) ได้รายงานการพบไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* ในรัฐฟลอริดาประเทศสหรัฐอเมริกามีขนาดดีเอ็นเอ 705 bp จากผลการจัดจำแนกดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่เข้าทำลายพริกในเขตพื้นที่ อำเภอเหล่าเสือโก้ก อำเภอม่วงสามสิบ อำเภอเดชอุดม และอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี เป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. Enterolobii*

อย่างไรก็ตามการสำรวจและจัดจำแนกไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* พบว่าเป็นครั้งแรกที่รายงานการเข้าทำลายพริกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือประเทศไทย ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทางด้านกักกันพืชในประเทศ เนื่องจาก *M. enterolobii* เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดใหม่ที่ยังไม่ค่อยมีการรายงานข้อมูลการพบในประเทศ ไทย ตลอดจนข้อมูลดังกล่าวเป็นประโยชน์ต่อการนำไปศึกษาความหลากหลายของไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* ในระดับชีวโมเลกุล (Molecular diversity) และต่อยอดการจัดจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆที่ไม่เคยพบในประเทศไทยต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์การทดลอง สถานที่และโรงเรือนเพื่อใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. สารสนเทศส่งเสริมการเกษตร [ออนไลน์] 2558 [อ้างเมื่อวันที่ 10 มิถุนายน 2558] จาก
<http://www.agriinfo.doae.go.th/>
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. การควบคุมโรครากปมในพริก. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ:
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช; 2550.
- Blok VC, Wishart J, Fargette M, Berthier K, MS Phillips. Mitochondrial differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the other major species of tropical root-knot nematodes. *Nematology* 2002; (4): 773-81.
- Brito J, Rammah TO, Mullin PG, Insera RN, Dickson DW. Morphological and molecular Characterization of *Meloidogyne Mayaguensis* isolates from Florida. *Nematology* 2004; 36(3): 232-40.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. *Meloidogyne enterolobii*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 2014; 44(2): 159-163.
- Fargette M. Use of esterase phenotype in the taxonomy of the genus *Meloidogyne*. 2. Esterase phenotypes observed in West African populations and their characterization. *Revue de Nématologie* 1987; 10(1): 45-56.
- Fargette M, Davies KG, Robinson MP, Trudgill DL. Characterization of resistance breaking *Meloidogyne incognita*-like populations using lectins, monoclonal antibodies and spores of *Pasteuria penetrans*. *Fundamental and Applied. Nematology* 1994; 17(6): 537-42.
- Hartman KM, Sasser JN. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: Barker KR, Carter CC, Sasser JN, editors. An advanced treatise on *Meloidogyne*. Volume II: Methodology. North Carolina: North Carolina State University; 1985. p. 69-77.
- Hunt DJ, Handoo ZA. Taxonomy, Identification and Principal species, In R.N. Perry, M. Moens, JL Starr, editors. Root-knot nematodes. Massachusetts: CABI; 2009. p.74-80.
- Iwahori H, Truc NTN, Ban DV, Ichinose K. First report of root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* on guava in Vietnam. *Plant Disease* 2009; 6(93): 675.
- Jindapunnapat K. Development of the molecular marker for species identification of root-knot nematode infesting Guava in Thailand. M.S. The Graduate School, Thesis, Kasetsart University; 2012[Thai].
- Kiewnick S, Karssen G, Brito JA, Oggenfuss M, Frey JE. First report of root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* on tomato and cucumber in Switzerland. *Plant Disease* 2008; 9 (92): 1370.
- Kwankuae S. Identification of the species of root-knot nematodes found in cassava in Nakhon Ratchasima province and their symptomatology M.S. The Graduate School, Thesis, Kasetsart University; 2014[Thai].
- Long HB, Bai C, Peng J, Zeng FY. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* infecting jujube in China .*Plant Disease* 2014; 98(10): 1451-52.
- Moens M, Perry RN, Starr JL. *Meloidogyne* Species - a diverse group of novel and important Plant Parasites, In R.N. Perry, M. Moens, JL Starr, editors. Root-knot nematodes. Massachusetts: CABI; 2009. p. 3-9.
- Powers TO, Harris TS. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 1993; 25(1): 1-6.



20th NGRC
March 15, 2019

การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 20
วันที่ 15 มีนาคม 2562 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

BMP18-11

Trudgill DL, Bolla G, Blok VC, Daudi A, Davies KG, Gowen SR, et.al. The importance of tropical root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and factors affecting the utility of *Pasteuria penetrans* as a biocontrol agent. *Nematologica* 2000; 2(8): 823–45.

Yang B, Eisenback JD. *Meloidogyne enterolobii* n.sp. (*Meloidogynidae*), A root-knot nematode parasitizing pacara carpot tree in China. *Journal of Nematology* 1983; 15(3): 381–91.