รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : -

2. **โครงการวิจัย** : โครงการวิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โคดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

   กิจกรรม : -

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การจำแนกไส้เดือนฝอยรากแผล (*Pratylenchus* spp.) ในแหล่งปลูกหอมแดงด้วยวิธีอณูชีววิทยา

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Molecular identification of lesion nematode (*Pratylenchus* spp.) in shallot fields

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : ไตรเดช ข่ายทอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.

   ผู้ร่วมงาน : ธิติยา สารพัฒน์ กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.
   วีรกรณ์ แสงไสย กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.
   รุ่งนภา ทองเครึ่ง กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ.

5. **บทคัดย่อ** : เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกหอม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนมีนาคม 2561 ในจังหวัดศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ นครราชสีมา แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน อุตรดิตถ์ ตาก ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม รวม 128 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผล พบไส้เดือนฝอยรากแผลในตัวอย่างดิน 12 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากแผลโดยการปลูกข้าวโพดลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบ และเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากแผลโดยเริ่มจากตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว ในรากข้าวโพดในสภาวะปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ประชากรที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยวิธีทางอณูชีววิทยา โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene กับฐานข้อมูล พบว่าคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Pratylenchus dellatrei* 11 ตัวอย่างและ *P. brachyurus* 1 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา การเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกหอมครั้งนี้ พบไส้เดือนฝอยรากแผลใน

พื้นที่ จ. กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และราชบุรี ยังไม่มีข้อมูลการเข้าทำลาย และความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากแผลทั้ง 2 ชนิดต่อหอม ซึ่งควรศึกษาในลำดับต่อไป

Soil samples were collected from onion fields in Si Sa Ket, Yasothon, Ubon Ratchathani, Buri Ram, Nakhon Ratchasima, Mae Hong Son, Chiang Rai, Chiang Mai, Lamphun, Uttaradit, Tak, Ratchaburi, Kanchanaburi, Suphan Buri and Nakhon Pathom provinces during October 2016 to March 2018. Nematodes were extracted from 128 soil sample to determine the presence of lesion nematodes. *Pratylenchus* spp. was detected in 12 samples and subsequently corn was grown in each soil sample to increase nematode number. Monoxenic culture of single *Pratylenchus* female was carried out using corn root tissue culture. *Pratylenchus* species were identified by comparing the D2D3 expansion region of 28S large subunit ribosomal RNA gene with database in the GenBank in combination with morphology study. *Pratylenchus dellatrei* were identified from 1 1 samples and *P. brachyurus* was identified from 1 sample. In this study lesion nematodes were found in onion fields in Kanchanaburi, Suphan Buri and Ratchaburi, provinces. However, the pathogenicity and damage potential to onion of both species is unknown and should be determined.

6. คำนำ : ไส้เดือนฝอยรากแผล (Lesion nematodes: *Pratylenchus* spp.) เป็นไส้เดือนฝอยอีกสกุลหนึ่งที่มีความสำคัญ และทำความเสียหายแก่พืชหลายชนิด นอกจากจะทำความเสียหายโดยตรงต่อผลผลิตทางการเกษตรแล้ว ไส้เดือนฝอยรากแผลบางชนิดยังเป็นศัตรูพืชกักกัน และมีความสำคัญด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ไส้เดือนฝอยรากแผลทำลายพืชโดยการเข้าทำลายรากโดยเฉพาะเนื้อเยื่อส่วน cortex parenchyma การเคลื่อนที่และดูดกินอาหารภายในราก ทำให้รากถูกทำลายเกิดแผลและเน่าตาย การเข้าทำลายรากนอกจากทำให้เกิดแผลแล้วยังส่งเสริมการเข้าทำลายรากของเชื้อราโรคพืชบางชนิดอีกด้วย ไส้เดือนฝอยรากแผลเป็นศัตรูของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น กล้วย ธัญพืชต่างๆ กาแฟ ข้าวโพด พืชตระกูลถั่ว มันฝรั่ง พืชผัก และไม้ผลต่างๆ ปัจจุบันมีการจำแนกไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* มากกว่า 60 ชนิด (Castillo and Vovlas, 2007) ในประเทศไทยมีรายงานการพบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. alleni, P. brachyurus, P. breviobesus, P. coffeae, P. delattrei*, *P. neglectus, P. nongkiensis*, *P. penetrans, P. scribneri, P. sudanensis*, *P. tenuis*, *P. thilandicus, P. thornei, P. vulnus, P. zeae* และ *Pratylenchus* sp. ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดชนิด (สืบศักดิ์, 2538) การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย

รากแผลได้มีการปรับปรุง ซึ่งปัจจุบันไม่มี *P. breviobesus, P. nongkiensis* และ *P. thailandicus* อยู่ในรายชื่อไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* แล้ว

หอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) เป็นพืชที่มีการบริโภคสูงทั้งในประเทศและต่างประเทศ ในปี 2560 มีเนื้อที่เพาะปลูกประมาณ 57,800 ไร่ ผลผลิต128,879 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) เป็นพืชส่งออกอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ ในปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยส่งออกหอมแดงไปต่างประเทศ ถึง 54,233.47 ตัน มูลค่า 585.01 ล้านบาท โดยมีตลาดส่งออกที่สำคัญคืออินโดนีเซียและมาเลเซีย อุปสรรคของการส่งออกหอมแดงประการหนึ่งคือกฎระเบียบการนำเข้าของประเทศคู่ค้า เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของศัตรูพืชที่อาจติดไปกับหอมแดง ข้อมูลการสำรวจศัตรูพืชมีความสำคัญต่อการเจรจาการส่งออกหอมแดง ทำให้ประเทศคู่ค้ามีความมั่นใจว่าสินค้าจะไม่มีการปนเปื้อนจากศัตรูพืชกักกัน อินโดนีเซียได้ประกาศการยอมรับเขตพื้นที่ปลอดศัตรูพืชสำหรับหอมแดงที่ผลิตในประเทศไทย (Pest Free Area; PFA) โดยประกาศให้หอมแดงจาก จ. ศรีสะเกษเป็นแหล่งปลอดศัตรูพืชกักกันของอินโดนีเซีย 2 ชนิด คือ ไส้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor* และเชื้อรา *Urocystis cepulae* ตั้งแต่วันที่ 16 กันยายน 2558 (กรมวิชาการเกษตร, 2558) ซึ่งเป็นผลจากข้อมูลการสำรวจพื้นที่ปลูกหอมแดงของประเทศไทย อย่างไรก็ตามประเทศอินโดนีเซียได้แจ้งเตือนการตรวจพบไส้เดือนฝอย *P. penetrans* ในหอมแดงจากประเทศไทย ทำให้ต้องมีการสุ่มตรวจตัวอย่างหอมแดงก่อนส่งออกไปยังอินโดนีเซีย ซึ่งเป็นการเพิ่มขั้นตอนและต้นทุนต่อการส่งออกหอมแดงของไทย จากการสุ่มตรวจหอมแดงส่งออกที่ผ่านมา ยังไม่เคยมีรายงานการตรวจพบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. penetrans*

ไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่มีรายงานการพบในพื้นที่ปลูกหอมในประเทศต่างๆ ได้แก่ *P. brachyurus P. coffeae P. neglectus P. penetrans P. scribneri P. thornei* และ *P. zeae* (Hodda *et al*., 2012) รายงานเกี่ยวกับความเสียหายของหอมหรือหอมแดงที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากแผลมีค่อนข้างน้อย *P. penetrans* เป็นไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่สำคัญมีพืชอาศัยกว้าง มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดนี้ค่อนข้างมาก *P. penetrans* สามารถเข้าทำลายและทำความเสียหายแก่หอม (*Allium cepa*) โดยทำให้หอมมีการเจริญเติบโต ขนาดและน้ำหนักหัวลดลง (Pang *et al*., 2009) ในประเทศไทยมีรายงานการพบ *P. penetrans* ในตัวอย่างดินจากแปลงองุ่นพันธ์ไวท์มะละกา จ. สมุทรสาคร (สืบศักดิ์, 2538) ถึงแม้ว่าหอมแดงอาจไม่ใช่พืชอาศัยหลักของไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดต่างๆ แต่ก็มีความสำคัญเนื่องจากไส้เดือนฝอยสกุลนี้สามารถติดไปกับหัวหอม และอาจไปแพร่ระบาดทำความเสียหายต่อพืชในพื้นที่ต่างๆ ได้ ข้อมูลการแพร่กระจายของชนิด

ไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ปลูกหอมจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ทราบถึงสถานการณ์ปัจจุบัน เพื่อใช้ประโยชน์ในการบริหารจัดการและสร้างความเชื่อมั่นต่อประเทศคู่ค้าในการส่งออกสินค้าเกษตร

การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างยาก จำเป็นต้องใช้นักไส้เดือนฝอยที่มีความชำนาญ ไส้เดือนฝอยรากแผลมีลักษณะทางสัณฐานน้อยประการ ที่สามารถนำไปใช้ในการจำแนกชนิด อีกทั้งยังมีความแปรปรวนของลักษณะภายในประชากร (Intraspecific variation) ด้วย การนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาประกอบกับสัณฐานวิทยา สามารถเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการตรวจวินิจฉัย สำหรับไส้เดือนฝอยรากแผลสกุล *Pratylenchus* นั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene สามารถนำมาใช้ประกอบการจำแนกชนิดได้ และมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้ในฐานข้อมูลค่อนข้างมาก Al-Banna *et al*. (1997) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA genes ศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของ *Pratylenchus* Carta *et al*. (2001) และ De Luca *et al*. (2004) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA genes ศึกษาความแตกต่างของไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม พบว่าไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกัน อาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน Al-Banna *et al*. (2004) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D3 expansion region ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากแผล 6 ชนิด ต่อมามีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2 เพิ่มเข้ามาในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* เพื่อเพิ่มความชัดเจนในการศึกษา เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D3 อาจไม่เพียงพอในการการศึกษาความสัมพันธ์ในระดับชนิด (species) จึงทำให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* ในฐานข้อมูลค่อนข้างมาก และในการรายงานการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดใหม่ๆ จึงมักจะมีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้ร่วมอยู่ด้วย การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้ร่วมกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยาจะทำให้การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ปลูกหอมมีความถูกต้องแม่นยำเพิ่มขึ้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ปลูกหอมของประเทศไทย โดยการนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาใช้ในการจำแนกเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นปัจจุบัน สำหรับใช้ประโยชน์ในการบริหารจัดการและเป็นข้อมูลประกอบการส่งออกหอมแดงต่อไป

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์ อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องปั่นเหวี่ยง สไลด์ กระจกปิดสไลด์ ถ้วยนับตัวอย่าง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องอิเล็กโตโฟรีสีส microcentrifuge tube, pcr tube, pipette tip, ชุด kit สำหรับสกัดดีเอ็นเอ, agarose gel, gel star, pcr buffer, pcr mix

- วิธีการ

<u>การเก็บตัวอย่างดินและแยกไส้เดือนฝอย</u>

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงหอมและกระเทียม ในพื้นที่ จ. ศรีสะเกษ จ. ยโสธร จ. อุบลราชธานี จ. บุรีรัมย์ จ. นครราชสีมา จ. แม่ฮ่องสอน จ. เชียงราย จ. เชียงใหม่ จ. ลำพูน จ. อุตรดิตถ์ จ. ตาก จ. ราชบุรี จ. กาญจนบุรี จ. สุพรรณบุรี และ จ. นครปฐม โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินที่ความลึก 15 – 20 เซนติเมตร สุ่มเก็บให้ทั่วแปลง หรือพื้นที่อย่างน้อย 1,600 ตารางเมตร ให้ได้ตัวอย่างดินประมาณ 4 กิโลกรัม คลุกเคล้าตัวอย่างดินเข้าด้วยกัน แบ่งบรรจุลงในถุงพลาสติกประมาณ 1 กิโลกรัม บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินหนัก 250 กรัม โดยวิธี Decanting and sieving with Baermann trays โดยกวนตัวอย่างดินในน้ำ 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที กรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร ที่วางอยู่บนตะแกรงโลหะขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างที่ติดอยู่บนตะแกรงอันล่างใส่ลงบนกระดาษทิชชูที่วางอยู่บนตะแกรงไนล่อน ในถาดพลาสติกกลมที่มีน้ำสะอาด ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยในน้ำไปตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ

<u>การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากแผล</u>

เพาะเมล็ดข้าวโพดลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากแผล เมื่อครบ 60 วันนำรากข้าวโพดมาล้างให้สะอาด แยกไส้เดือนฝอยรากแผลจากรากข้าวโพดโดยการนำรากข้าวโพดมาล้างให้สะอาด ตัดเป็นท่อนสั้นๆ ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร แช่ในน้ำสะอาด เลี้ยงไส้เดือนฝอยรากแผลในรากข้าวโพดในสภาพปลอดเชื้อ โดยเริ่มจากตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ สำหรับนำไปจำแนกชนิด โดยเตรียมรากข้าวโพดในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Gamborg's B5 ในจานเลี้ยงเชื้อ ฆ่าเชื้อที่ผิวไส้เดือนฝอยรากแผลโดยโดยการตักตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากแผลใส่ลงในสาร streptomycin sulfate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้วตักไส้เดือนฝอยใส่ลงบนรากข้าวโพดที่เตรียมไว้ จำนวน 1 ตัวต่อจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อได้ประชากรไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงจากตัวเต็มวัย 1 ตัวแล้วนำไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผล

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยาและสัณฐานวิทยา ตรวจสอบทางอณูชีววิทยาโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene กับฐานข้อมูล สกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอย 1 ตัวด้วย GeneReleaser® (BioVentures) ตามคำแนะนำที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ ร่วมกับวิธีการตาม Schizas *et al*. (1997) ใช้เข็มเขี่ยตักตัวไส้เดือนฝอยรากแผลใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร บดใน PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ด้วยส่วนปลายของ pipette tip นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C บ่มนาน 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมินานประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟชนิด 1000 วัตต์ นาน 6 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนใสใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่ -20°C ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ forward primer D2A (5- ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3) และ reverse primer D3B (5- TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3) (Baldwin *et al.,* 1997) โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR ที่เริ่มจาก hot start 94°C นาน 7 นาที amplification cycle 35 รอบ ประกอบด้วย denature ที่ 94°C นาน 1 นาที annealing ที่ 50°C นาน 1 นาที และ extension ที่ 72°C นาน 1 นาที เมื่อจบ amplification cycle แล้ว ตามด้วย final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที โดย มีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (ชุด Gotaq Flexi DNA Polymerase) ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ได้แก่ 5x buffer 1.5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 mM) 1.5 ไมโครลิตร dNTP (10 mM) 1.2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10 pmol/µL) อย่างละ 0.3 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (0.1 unit/µL) 0.3 ไมโครลิตร nuclease free water 7.1 ไมโครลิตรและดีเอ็นเอต้นแบบ 3 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยนำหลอดใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรุ่น T-Advanced (Biometra)

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเจลอีเอ็กโตรโฟรีซีส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 10 ไมโครลิตรผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร ใช้ 100 bp DNA Ladder 1 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบ นำ agarose gel ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์นาน 30 นาที แล้วนำแผ่น agarose gel มาย้อมด้วย ethidium bromide นาน 10 นาที และแช่น้ำเปล่าอีก 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation ทำปฏิกิริยา PCR อีกครั้งในปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แบบ direct sequencing ทั้ง 2 ทิศทางโดยใช้ทั้ง forward และ reverse primers นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จัดเรียงในโปรแกรม ClustalW เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank สร้าง

phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA4 โดยวิธี neighbor-joining หลังจากเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว หากพบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่มีคู่ไพรเมอร์จำเพาะในการตรวจสอบ จะตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยนั้นๆ ด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะอีกครั้งหนึ่ง เพื่อเป็นการยืนยัน

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยตรวจสอบลักษณะของไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างสด และตัวอย่างที่ทำการคงสภาพและทำสไลด์ถาวรตามวิธีของ Ryss (2003) จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้คู่มือการจัดจำแนกของ Castillo and Vovlas (2007) บันทึกภาพ

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

<u>การเก็บตัวอย่างดินและตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผล</u>

จากการเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมจังหวัดศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ นครราชสีมา แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน อุตรดิตถ์ ตาก ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนมีนาคม 2561 รวม 128 ตัวอย่าง เมื่อแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผล พบไส้เดือนฝอยรากแผลในตัวอย่างดิน 12 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณโดยปลูกข้าวโพดลงในตัวอย่างดินและเลี้ยงบนรากข้าวโพดในสภาวะปลอดเชื้อได้ครบทุกตัวอย่าง สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่นที่ตรวจพบในตัวอย่างดิน ได้แก่ *Meloidogyne Rotylenchulus Tylenchorhynchus Hirschmanniella Helicotylenchus Aphelenchoides* และ *Hoplolaimus*

<u>การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์</u>

การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยคู่ไพรเมอร์ D2A/D3B ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 760 คู่เบส (ภาพที่ 1) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับไส้เดือนฝอยรากแผล *P. dellatrei* จำนวน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่แยกได้จากตัวอย่างดิน อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี 7 ตัวอย่าง อ. เลาขวัญ จ. กาญจนบุรี 1 ตัวอย่าง อ. อู่ทอง จ. สุพรรณบุรี 1 ตัวอย่าง อ. จอมบึง จ. ราชบุรี 1 ตัวอย่าง และ อ. บ้านคา จ. ราชบุรี 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ และคล้ายกับ *P. brachyurus* จำนวน 1 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่แยกได้จากตัวอย่างดินจาก อ. ท่ามะกา จ. กาญจนบุรี ตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. brachyurus* ด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะ forward primer 18S (5- TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT -3) และ reverse primer ACM7R (5- GCW CCA TCC AAA CAA YGA G -3) โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR เริ่มจาก hot start ที่ 94°C นาน 2

นาที 45 วินาที amplification cycle จำนวน 40 รอบ ประกอบด้วย denature ที่ 94°C นาน 1 นาที annealing ที่ 57°C นาน 45 วินาที และ extension ที่ 72°C นาน 2 นาที เมื่อจบ amplification cycle แล้ว ตามด้วย final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที ผลการตรวจได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 267 คู่เบส (ภาพที่ 2)

การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

P. dellatrei

สามารถจำแนกด้วยลักษณะดังนี้ จำนวนรอยย่นบริเวณโครงหัว (Lip annuli) 3 วง เส้นข้างลำตัว 4 เส้น หางของตัวเต็มวัยเพศเมียมีลักษณะ subcylindrical ปลายหางมนมีผิวเรียบ ไม่พบตัวเต็มวัยเพศผู้ matrix code สำหรับ tabular key คือ A2, B1, C3, D1, E2, F3, G3, H1, I1, J1, K1 (ตารางที่ 2)

ลักษณะโดยทั่วไปของตัวเต็มวัยเพศเมีย *P. dellatrei* ส่วนโครงหัวเชื่อมต่อเนื่องกับลำตัวมีลักษณะ off set เล็กน้อย มีรอยย่น (annuli) 3 วง stylet แข็งแรง stylet knob มีลักษณะแบนทางด้านบน ขนาดประมาณ 1.6 x 4.0 ไมโครเมตร ส่วน dorsal oesophageal gland orifice อยู่ห่างจากฐานของ stylet ประมาณ 1.6-2.4 ไมโครเมตร oesophageal gland ซ้อนทับลำไส้ด้าน ventral ส่วน median bulb กลมหรือรี มีระบบวาล์วเห็นชัดเจน ส่วน nerve ring อยู่เหนือ excretory pore ตำแหน่งของ excretory pore ห่างจากส่วนปลายหัว 66.4-76.8 ไมโครเมตร ส่วน hemizonid อยู่เหนือ excretory pore ขนาดประมาณ 3 annuli มี lateral field ขนาดประมาณ 1/3 ของความกว้างลำตัว มีเส้นข้างลำตัว (lateral line) 4 เส้น ovary แบบเดี่ยว prodelphic เหยียดตรงไปทางด้านหัว oocyte เรียงเป็นแถวเดี่ยว spermatheca กลม ไม่มี sperm ส่วน post-vulval uterine sac ยาวกว่าความกว้างลำตัวช่วง vulva หางมีลักษณะ subcylindrical ปลายมนผิวเรียบ ไส้เดือนฝอยรากแผล *P. dellatrei* ไม่พบตัวเต็มวัยเพศผู้

P. brachyurus

สามารถจำแนกด้วยลักษณะดังนี้ จำนวนรอยย่นบริเวณโครงหัว (Lip annuli) 2 วง วงบนสุดมีลักษณะเป็นมุมแหลม ส่วน stylet แข็งแรง basal knob กลม vulva 82-89% ของความยาวลำตัว ส่วน post-vulval uterine sac สั้นกว่าความกว้างลำตัว ส่วน spermatheca ไม่เด่นชัด และใช้งานไม่ได้ หางมีลักษณะกว้างรูปโคน (broadly conoid) ปลายหางเรียบ มีลักษณะกลม (rounded) ปลายตัด (truncated) หรือ คล้ายใบพาย (spatulated) พบตัวเต็มวัยเพศผู้ แต่ค่อนข้างพบได้น้อย matrix code สำหรับ tabular key คือ A1, B2, C4, D1, E4, F3, G3, H1, I4, J2-3, K1 (ตารางที่ 2)

ลักษณะโดยทั่วไปของ *P. brachyurus* ตัวเต็มวัยเพศเมียมีส่วนโครงหัว off set จากส่วนลำตัว มีรอยย่น (annuli) 2 วง โดยวงด้านบนมีลักษณะเป็นมุมแหลม โครงหัวแข็งแรง ส่วน lateral field มี lateral line 4 เส้น บริเวณกลางลำตัว และอาจแบ่งเป็น 5-6 เส้นบริเวณ vulva และสองเส้น บริเวณปลายหาง ส่วน stylet แข็งแรง basal knob กลม excretory pore อยู่หลัง hemizonid และห่างจากปลายหัวประมาณ 57-108 ไมโครเมตร oesophageal gland ซ้อนทับ

ลำไส้ด้าน ventral และ lateral ovary มีลักษณะเหยียดตรง หรือบางครั้งมีลักษณะพับงอ หรือบางครั้งอาจเหยียดยาวจนถึง pharyngeal lobe ซึ่งพบค่อนข้างน้อย oocyte อาจเป็นแถวเดี่ยวหรือบางครั้งอาจเป็นแถวคู่ ตำแหน่ง vulva 82-89% ของความยาวลำตัว post-vulval uterine sac สั้นกว่าความกว้างลำตัวบริเวณ vulva ส่วน spermatheca ไม่ชัดเจน และไม่ทำงาน หางมีลักษณะเป็นรูปโคน ผิวเรียบ ปลายหางมีลักษณะ กลมมน (round) truncate หรือ spatulate มี ventral annuli 13-24 วง phasmid อยู่กึ่งกลางหาง

การศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ปลูกหอมครั้งนี้ พบไส้เดือนฝอยรากแผล 2 ชนิด คือ *P. dellatrei* และ *P. brachyurus* ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดมีรายงานการพบในประเทศไทย ข้อมูลเกี่ยวกับ *P. delattrei* มีไม่มากนัก มีรายงานว่าพบในตัวอย่างดินจาก ถั่วลิสง ส้ม แมนดาริน ฝ้าย มันเทศ หม่อน มะเขือเทศ แตงกวา และ อ้อย (สืบศักดิ์, 2538) ส่วน *P. brachyurus* มีรายงานการพบในตัวอย่างดิน สับปะรด ตะไคร้ ทุเรียน ยูคาลิปตัส ฝ้าย มันสำปะหลัง มะละกอ มะม่วง อ้อย หม่อน ข้าวฟ่าง ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วลิสง พริก พริกไทย ยาสูบ มะเขือเทศ (สืบศักดิ์, 2538) และ กล้วย (ไตรเดช และคณะ, 2558) จากการตรวจสอบข้อมูลไม่พบข้อมูลการเข้าทำลายหอมของ *P. dellatrei* แต่สำหรับ *P. brachyurus* มีรายงานการพบในพื้นที่ปลูกหอมและสามารถเข้าทำลายหอมได้ อย่างไรก็ตามหอมอาจไม่ใช่พืชอาศัยหลักของ *P. brachyurus* Machado and Inomoto (2001) ทดสอบความเป็นพืชอาศัยของพืชผัก 18 ชนิดต่อ *P. brachyurus* พบว่า onion cv. Baia Periforme (*Allium cepa* L.) และ green onion cv. Todo ano (*Allium fistulosum* L.) เป็นพืชอาศัยที่ไม่ดี (poor host) ของ *P. brachyurus* พืชอาศัยที่มีการศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายและระดับความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* ได้แก่ ถั่วเหลือง และกาแฟ ส่วน พืชอาศัยที่มีการศึกษาการเข้าทำลายและระดับความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *P. dellatrei* ได้แก่ *Crossandra undulaefolia* (Castillo and Vovlas, 2007) การสำรวจเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมครั้งนี้ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. penetrans* อย่างไรก็ตามควรมีการสำรวจเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมอย่างต่อเนื่อง ครอบคลุมทุกพื้นที่ และช่วงเวลาและฤดูต่างๆ รวมทั้งการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชชนิดอื่นที่อยู่ใกล้เคียงแปลงปลูกหอม เพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มขึ้น และควรศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายหอมของไส้เดือนฝอยรากแผล *P. dellatrei* และ *P. brachyurus* เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อไป

9. **สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ** : จากการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกหอม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนมีนาคม 2561 ในจังหวัดศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ นครราชสีมา แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน อุตรดิตถ์ ตาก ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม

รวม 128 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากแผลในตัวอย่างดิน จ. กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และราชบุรี รวม 12 ตัวอย่าง จำแนกชนิดด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาและสัณฐานวิทยาได้เป็น *Pratylenchus dellatrei* 11 ตัวอย่าง และ *P. brachyurus* 1 ตัวอย่าง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

- ได้ข้อมูลชนิดและการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากแผลที่เป็นปัจจุบัน มีความถูกต้องแม่นยำ ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีประโยชน์ต่อการส่งออกหอมแดง และการเจรจานำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรอื่นๆ
- ได้สไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยเพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงและประกอบการสอน

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง :

กรมวิชาการเกษตร. 2558. กองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/psco/index.php?option=com_content&view=article&id=225:2015-10-01-08-20-01&catid=42:2010-08-06-04-08-08&Itemid=71, 18 กรกฎาคม 2561

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ มนตรี เอี่ยมวิมังสา. 2558. อนุกรมวิธานและความสามารถในการ ทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย migratory endoparasitic nematodes. หน้า 2375-2387. ใน: รายงานผลการวิจัยประจำปี 2558. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร, ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/production/หอมแดง60.pdf, 18 กรกฎาคม 2561.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2538. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 275 หน้า.

Al-Banna, L., V. Williamson and S.L. Gardner. 1997. Phylogenetic analysis of nematodes of the genus *Pratylenchus* using nuclear 26S rDNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 7:94-102.

Al-Banna, L., A.T. Ploeg, V.M. Williamson and I. Kaloshian. 2004. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. Journal of Nematology 36:142-146.

Carta, L.K., A.M., Skantar and Z.A. Handoo. 2001. Molecular, morphological and thermal characters of 19 *Pratylenchus* spp. and relatives using the D3 segment of the nuclear LSU rRNA gene. Nematropica 31: 193-207.

Castillo, P., and N. Vovlas. 2007. Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. Nematology Monographs and Perspectives, vol. 6. Leiden, NL: Koninklijke Brill NV.

De Luca, F., E. Fanelli, M. di Vito, A. Reyes, C. de Giorgi. 2004. Comparison of the sequences of the D3 expansion of the 26S ribosomal genes reveals different degrees of heterogeneity in different populations and species of *Pratylenchus* from the Mediterranean region. European Journal of Plant Pathology 110: 949-957.

Hodda, M., N. Banks and S. Singh. 2012. Nematode threats in the NAQS region. CSIRO Canberra, Australia. 82 p.

Machado, A.C.Z. and M.M. Inomoto. 2001. Host status of eighteen vegetable crops for *Pratylenchus brachyurus*. Nematropica. 31:259-265.

Pang, W., S.L. Hafez, P. Sundararaj, B. Shafii and E. Fallah. 2009. Pathogenicity of *Pratylenchus penetrans* on onion. Nematropica 39:35-46.

Ryss, A.Y. 2003. Express technique to prepare permanent collection slides of nematodes. Zoosystematica Rossica 11: 257-260.

Schizas, N.V., G.T. Street, B.C. Coull, G.T. Chandler and J.M. Quattro. 1997. An efficient DNA extraction method for small metazoans. Molecular Marine Biology and Biotechnology 6: 381-383.

13. ภาคผนวก

Table 1 Location and numbers of soil samples collected from onion and shallot fields during October 2016 - June 2018 showing number of soil samples which lesion nematodes were detected and species identified.

Province	District	Sub-district	Number of Soil Samples	Number of positive samples	Type of Lesion Nematode
Chiang Rai	Wiang Pa Pao	Mae Chedi	3	0	
	Mae Suai	Mae Phrik	1	0	
	Phan	Pa Hung	2	0	
Chiang Mai	Chiang Dao	Mae Na	1	0	
	Chai Prakan	Si Dong Yen	7	0	
		Nong Bua	2	0	
		Pong Tam	1	0	
	Fang	Mae Ngon	1	0	
		Mae Sun	1	0	
		Pong Nam Ron	1	0	
		Mon Pin	1	0	
		San Sai	2	0	
		Mae Kha	2	0	
	San Sai	Mae Faek	1	0	
	Hot	Bo Sali	2	0	
Mae Hong Son	Pai	Mae Na Toeng	2	0	
	Pang Mapha	Tham Lot	1	0	
		Pang Mapha	1	0	
	Mueang	Huai Pong	3	0	
	Khun Yuam	Mueang Pon	3	0	
	Mae La Noi	Mae La Luang	1	0	
		Mae La Noi	1	0	
Lamphun	Pa Sang	Muang Noi	1	0	
		Mae Raeng	2	0	
		Ban Ruean	1	0	
	Thung Hua Chang	Thung Hua Chang	1	0	
		Takhian Pom	1	0	
	Ban Hong	Lao Yao	2	0	
		Pa Phlu	1	0	
Uttaradit	Laplae	Chai Chumphon	2	0	
		Fai Luang	1	0	
Tak	Phop Phra	Phop Phra	1	0	
		Chong Khaep	2	0	
		Ruam Thai Phatthana	1	0	

Continue...

Province	District	Sub-district	Number of Soil Samples	Number of positive samples	Type of Lesion Nematode
Kanchanaburi	Tha Muang	Tha Muang	7	6	*P. delattrei*
		Wang Sala	1	0	
		Wang Khanai	1	1	*P. delattrei*
	Tha Maka	Tha Ruea	1	1	*P. brachyurus*
	Bo Phloi	Lum Rang	1	0	
		Nong Krang	1	0	
	Lao Khwan	Nong Nok Kaeo	2	1	*P. delattrei*
Suphan Buri	U Thong	Chorakhe Sam Phan	1	1	*P. delattrei*
Nakhon Pathom	Mueang	Nong Ngu Luam	1	0	
Ratchaburi	Chom Bueng	Kaem On	3	0	
		Dan Thap Tako	1	1	*P. delattrei*
	Ban Kha	Ban Kha	1	1	*P. delattrei*
		Nong Pan Chan	1	0	
Nakhon Ratchasima	Mueang	Si Mum	1	0	
		Phon Krung	1	0	
Yasothon	Kho Wang	Fa Huan	4	0	
Buri Ram	Mueang	Thalung Lek	1	0	
		Phra Khru	1	0	
	Nong Hong	Thai Samakkhi	2	0	
		Sa Kaeo	1	0	
Si Sa Ket	Yang Chum Noi	Yang Chum Noi	6	0	
		Non Khun	1	0	
		Khon Kam	2	0	
	Mueang	Mueang Tai	1	0	
		Mak Khiap	2	0	
	Kanthararom	Mueang Noi	1	0	
		Lathai	1	0	
	Wang Hin	Bu Sung	2	0	
		Duan Yai	1	0	
	Rasi Salai	Mueang Khong	1	0	
		Mueang Khaen	1	0	
		Som Poi	4	0	
		Nong Mi	12	0	
		Sang Pi	2	0	
Ubon Ratchathani	Khueang Nai	Sang Tho	1	0	
		That Noi	1	0	
Total			128	12	

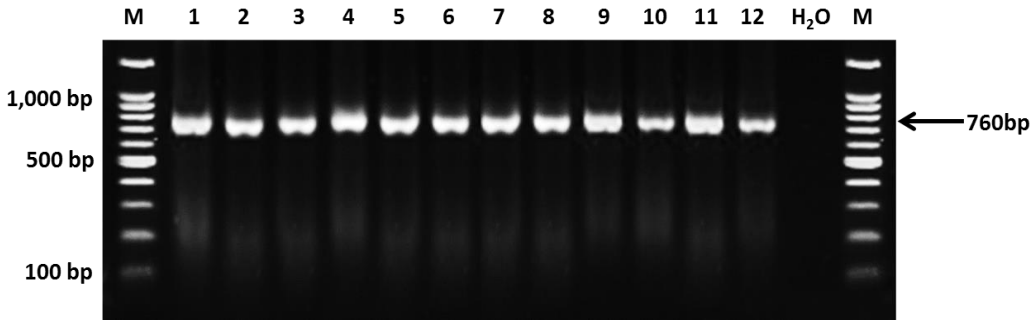

Fig 1. Amplicons of D2D3 expansion segments of 12 *Pratylenchus* amplified with the universal primer D2A/D3B yielded approximately 760 bp products.

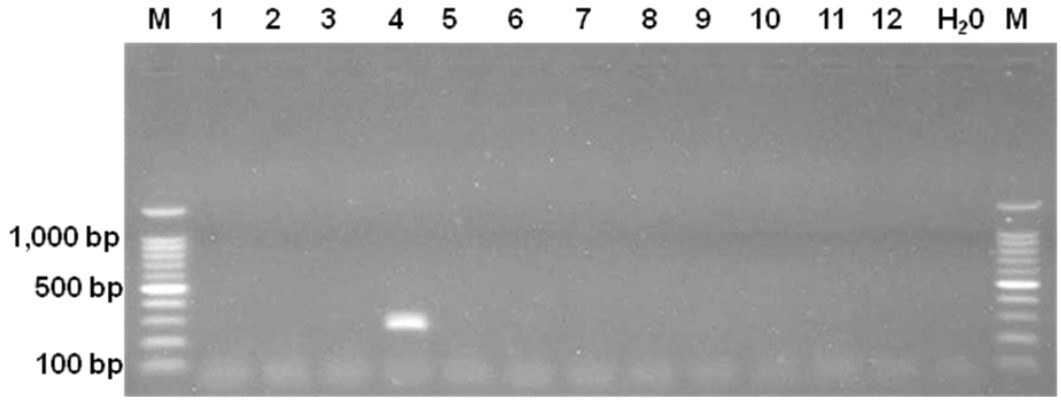

Fig 2. Detection of *P. brachyurus* using specific primers 18S/ACM7R, approximately 267 bp DNA fragment was obtained

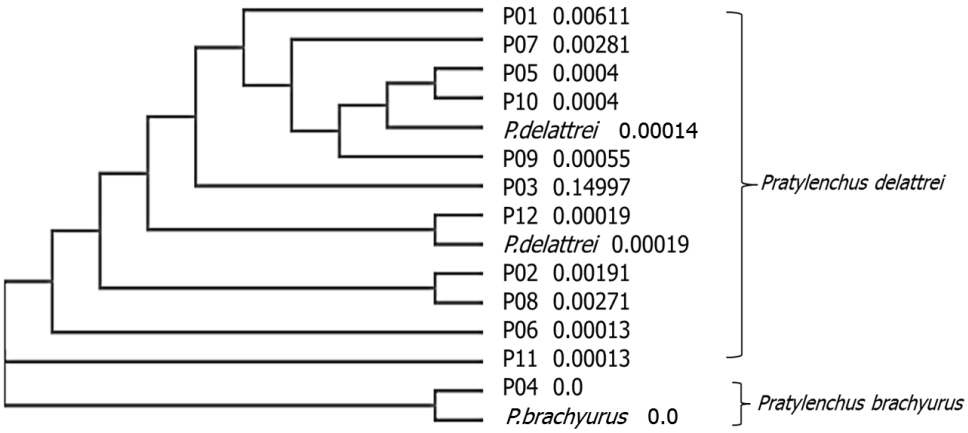

Fig 3. Phylogenetic tree of the *Pratylenchus* species constructed using D2D3 expansion segments of the 28S rDNA.

Table 2 Morphological characteristics used for *Pratylenchus* identification with Tabular key (Castillo and Vovlas, 2007)

A. จำนวนรอยย่นบริเวณโครงหัว (Lip annuli)	E. ตำแหน่งและอัตราส่วนของ vulva (Valva position, ratio V)	I. ความยาวของการซ้อนทับของ pharynge กับลำไส้ (Pharyngeal overlapping length)
กลุ่มที่ 1: 2 วง	กลุ่มที่ 1: < 75%	กลุ่มที่ 1: < 30 ไมโครเมตร
กลุ่มที่ 2: 3 วง	กลุ่มที่ 2: 75 - 79.9%	กลุ่มที่ 2: 30 - 39.9 ไมโครเมตร
กลุ่มที่ 3: 4 วง	กลุ่มที่ 3: 80 - 85%	กลุ่มที่ 3: 40 - 50 ไมโครเมตร
	กลุ่มที่ 4: > 85%	กลุ่มที่ 4: > 50 ไมโครเมตร
B. การปรากฏของตัวเต็มวัยเพศผู้ (Male)	F. ความยาวของ Post-vulval uterine sac (PUS)	J. จำนวนเส้นข้างลำตัวบริเวณตำแหน่งvulva (Lateral field lines at vulval region)
กลุ่มที่ 1: ไม่พบ	กลุ่มที่ 1: < 16 ไมโครเมตร	กลุ่มที่ 1: 4 เส้น
กลุ่มที่ 2: พบ	กลุ่มที่ 2: 16 - 19.9 ไมโครเมตร	กลุ่มที่ 2: 5 เส้น
	กลุ่มที่ 3: 20 - 24.9 ไมโครเมตร	กลุ่มที่ 3: 6 - 8 เส้น
	กลุ่มที่ 4: 25 - 29.9 ไมโครเมตร	
	กลุ่มที่ 5: 30 - 35 ไมโครเมตร	
	กลุ่มที่ 6: > 35 ไมโครเมตร	
C. ความยาว Stylet (Stylet Length)	G. ลักษณะหางของตัวเต็มวัยเพศเมีย (Female tail shape)	K. ลักษณะของ Lateral field บริเวณตำแหน่งvulva (Lateral field structure at vulval region)
กลุ่มที่ 1: < 13 ไมโครเมตร	กลุ่มที่ 1: cylindrical	กลุ่มที่ 1: smooth bands
กลุ่มที่ 2: 13 - 15.9 ไมโครเมตร	กลุ่มที่ 2: subcylindrical	กลุ่มที่ 2: partially or completely areolated bands
กลุ่มที่ 3: 16 - 17.9 ไมโครเมตร	กลุ่มที่ 3: conoid	
กลุ่มที่ 4: 18 - 20 ไมโครเมตร		
กลุ่มที่ 5: > 20 ไมโครเมตร		
D. ลักษณะของ Spermatheca (Shape of spermatheca)	H. ลักษณะปลายหางของตัวเต็มวัยเพศเมีย (Female tail tip)	
กลุ่มที่ 1: absent or reduced	กลุ่มที่ 1: smooth	
กลุ่มที่ 2: rounded to spherical	กลุ่มที่ 2: striated	
กลุ่มที่ 3: oval	กลุ่มที่ 3: pointed	
กลุ่มที่ 4: rectangular	กลุ่มที่ 4: with ventral projection	

Fig 4. *P. dellatrei* is characterised by three lip annuli, stylet 16-17.9 µm, spermatheca absent or reduced, vulva position 75-79.9%, post-vulval uterine sac 20-24.9 µm, female tail shape conoid, female tail tip smooth, pharyngeal overlapping length <30 µm, lateral field smooth.

Fig 5. *P. brachyurus* is characterised by two lip annuli, stylet 18-20 μm, spermatheca absent or reduced, vulva position > 85%, post-vulval uterine sac 20-24.9 μm, female tail shape conoid, female tail tip smooth, pharyngeal overlapping length >50 μm, lateral field smooth with 5-8 lines.