รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : -

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

   กิจกรรม : -

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองด้วยวิธีอณูชีววิทยากับไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Validation of Molecular Diagnostic Key with Second Stage Juveniles of Root-Knot Nematodes in Thailand

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : ไตรเดช ข่ายทอง สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ

   ผู้ร่วมงาน : ธิติยา สารพัฒน์ สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ

   วีรกรณ์ แสงไสย์ สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ

   รุ่งนภา ทองเครง สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สอพ

5. **บทคัดย่อ** : การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อยืนยันความใช้ได้ของ Molecular Diagnostic Key ที่รายงานโดย Adam *et al.* (2007) กับประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย เพื่อนำไปใช้จำแนกชนิดของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม ลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้สัณฐานวิทยา ซึ่งต้องใช้ตัวเต็มวัยในการจำแนก และต้องใช้นักวิชาการด้านไส้เดือนฝอยที่มีความเชี่ยวชาญ ดำเนินงานระหว่างปี พ.ศ. 2560-2561 โดยเริ่มจากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ 194/195 ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม และคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้แก่ MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R, Finc/Rinc และ F/R พบว่าทุกคู่ไพรเมอร์ให้ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ตรงตามรายงานต้นฉบับ ยกเว้นคู่ไพรเมอร์ F/R ที่ให้ผลผลิตปฏิกิริยาขนาดเล็กกว่าในรายงานต้นฉบับ และพบว่าคู่ไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K14-R เหมาะสมในการใช้ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มาก

ที่สุดเนื่องจากมีความไวสูงที่สุด ในปี พ.ศ. 2560 ตรวจตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม 23 ประชากร จากตัวอย่างดิน จ. เพชรบูรณ์ จ. ฉะเชิงเทรา จ. ตาก จ. ราชบุรี จ. กาญจนบุรี จ.อุตรดิตถ์ จ. แม่ฮ่องสอน จ. เชียงใหม่ จ. ลำพูน จ. เชียงราย จ.นครศรีธรรมราช จ. ชุมพร จ. พังงา จ. สกลนคร จ. อุดรธานี จ.หนองคาย พบว่าทุกประชากรเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยเปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานของริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมียพบว่าให้ผลตรงกัน ในปี พ.ศ. 2561 เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกพืชต่างๆ ใน จ. เชียงราย แม่ฮ่องสอน พะเยา เชียงใหม่ และน่าน รวม 107 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 13 ตัวอย่าง เมื่อเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมให้ได้ประชากรที่บริสุทธิ์โดยการเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม และตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 13 ประชากร พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* 11 ตัวอย่างและ *M. javanica* 2 ตัวอย่าง การทดลองนี้ยืนยันความใช้ได้ของ Molecular Diagnostic Key ที่รายงานโดย Adam *et al.* (2007) ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ประชากรในประเทศไทยได้

6. คำนำ :

ไส้เดือนฝอยรากปมเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่มีความสำคัญ และทำความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทยเป็นอย่างมากทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ ไส้เดือนฝอยรากปมมีหลายชนิด ชนิดที่สำคัญคือ *Meloidogyne incognita* และ *M. javanica* ปัจจุบันมีไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้รับการจัดจำแนกแล้วมากกว่า 80 ชนิด (Karssen, 2002) การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทำได้ยาก ในอดีตการจัดจำแนกจะใช้ลักษณะทางสัณฐาน เช่น ลักษณะของริ้วรอยย่นบริเวณส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ลักษณะของตัวอ่อนระยะที่สอง และตัวเต็มวัยเพศผู้ รวมทั้งข้อมูลของพืชอาศัยช่วยในการจัดจำแนก อย่างไรก็ตามลักษณะต่างๆ เหล่านี้มีความแปรปรวนสูงทำให้เกิดปัญหาในการจัดจำแนก ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคด้านอณูชีววิทยามาช่วยในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมได้ถูกต้องมีความสำคัญในการวางแผนการจัดการไส้เดือนฝอย เช่น การปลูกพืชหมุนเวียน การพัฒนาพันธุ์พืชต้านทาน และงานด้านการกักกันศัตรูพืช

นอกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานแล้ว ได้มีการใช้ isozyme analysis ในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมและสะดวกรวดเร็ว วิธีนี้ต้องใช้ตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัวในการทำ ไม่สามารถใช้ตัวอ่อนระยะที่สองหรือตัวเต็มวัยเพศผู้ในการทำได้ (Esbenshade and Triantaphyllou, 1990) เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนไม่เพียงพอ ซึ่งตัวเต็มวัยเพศเมียไม่สามารถแยกได้จากตัวอย่างดิน แต่ต้องแยกจากราก หรือส่วนของพืชเท่านั้น บางครั้งต้องเลี้ยงไส้เดือนฝอยในราก

มะเขือเทศเพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยเพศเมีย การใช้ตัวอ่อนระยะที่สองซึ่งสามารถแยกได้จากตัวอย่างดินโดยตรงในการจำแนกชนิดจะสะดวกรวดเร็วกว่ามาก ซึ่งมีประโยชน์ต่อการตัดสินใจในการจัดการไส้เดือนฝอยรากปมก่อนทำการปลูกพืช (Powers & Harris, 1993)

Harris *et al.* (1990) ใช้เทคนิค PCR ในการจำแนกตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเป็นครั้งแรกโดยการ amplify ส่วนของ mitochondrial DNA ต่อมา Powers & Harris (1993) ออกแบบไพรเมอร์ที่ amplify ดีเอ็นเอส่วนระหว่างยีน cytochrome oxidase II และ 16S rRNA และ digest ด้วย restriction enzymes สามารถจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่สำคัญ 5 ชนิดออกจากกันคือ *M. incognita M. javanica M. arenaria M. hapla* และ *M. chitwoodi* Williamson *et al.* (1977) จำแนก *M. hapla* และ *M. chitwoodi* โดยใช้ SCAR primers กับดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอ่อนระยะที่สองเพียง 1 ตัว ซึ่งใช้ proteinase K ร่วมในการสกัดตัวอย่าง นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ดีเอ็นเอจากตัวอ่อนระยะที่สองเพียง 1 ตัวในการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม ด้วยวิธีต่างๆ Zijlstra *et al.* (2000) ใช้ nested PCR ในการจำแนก *M. hapla M. chitwoodi* และ *M. fallax* โดยใช้ SCAR primers Randig *et al.* (2001) ประสบความสำเร็จในการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัวทำปฏิกิริยา PCR ได้ 4 ครั้ง Meng *et al.* (2004) ออกแบบ SCAR ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง สำหรับจำแนก *M. incognita M. javanica* และ *M. areneria* โดยสามารถจำแนกได้จากตัวอ่อนระยะที่สอง 1 ตัว สามารถทำปฏิกิริยา PCR ได้ 3 ครั้ง Adam *et al.* (2007) ได้จัดทำแนวทางการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม 7 ชนิดที่สำคัญทางเศรษฐกิจคือ *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. mayaguensis*, *M. hapla*, *M. chitwoodi* และ *M. fallax* โดยใช้เทคนิค SCAR (sequence characterized amplified region) และ RAPD (random amplified polymorphic DNA) ธนากร และ วราภรณ์ (2553) ใช้วิธี PCR ในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย 10 ไอโซเลต โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าได้ผลตรงกับการจำแนกชนิดโดยการใช้รูปแบบริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย

งานวิจัยนี้เป็นการทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธีอณูชีววิทยา (Molecular Diagnostic Key) กับประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย โดยเปรียบเทียบกับวิธีการทางสัณฐานวิทยา เพื่อยืนยันความใช้ได้ของ Molecular Diagnostic Key ในการนำไปใช้จำแนกชนิดของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองชนิดที่สำคัญในประเทศไทย ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่อง electrophoresis

- วิธีการ

การเก็บตัวอย่างดิน และรากพืช

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยรากปม โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตรโดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดินเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว คลุกเคล้าเข้าด้วยกันให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ และชนิดพืชปลูก รวมทั้งเก็บตัวอย่างราก หรือส่วนของพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมหากพบในพื้นที่

การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและพืช

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน 250 กรัมโดยวิธีการล้างตัวอย่างดิน และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แยกไส้เดือนฝอยรากปมจากพืชโดยการคีบกลุ่มไข่จากรากหรือส่วนของพืชโดยตรง

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมในกระถาง หลังจากนั้น 45 วัน ล้างรากมะเขือเทศด้วยน้ำสะอาด เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยใช้ปากคีบๆ กลุ่มไข่ 1 กลุ่มแช่ในน้ำสะอาดในถ้วยนับตัวอย่างตรวจดูการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์ หากเป็นตัวอย่างรากที่มีกลุ่มไข่ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่มาแช่ในน้ำกลั่น ตรวจดูการฟักของตัวอ่อนระยะที่สอง แล้วนำไปเทใส่ในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบฆ่าเชื้อ เตรียมตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยคีบกลุ่มไข่วางลงบนตะแกรงไนล่อนที่แช่อยู่ในน้ำสะอาดในจานเลี้ยงเชื้อ ได้ตัวอ่อนระยะที่สองในน้ำสะอาดสำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอ

การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานโดยเปรียบเทียบลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย (perineal patterns) เปรียบเทียบลักษณะ ความกว้างยาวและสัดส่วนของอวัยวะต่างๆ ของไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สองประกอบในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นในการจำแนกได้ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากตำราและรายงานตีพิมพ์

จำแนกตัวอ่อนระยะที่สองด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

จำแนกตัวอ่อนระยะที่สองด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา โดยใช้ Molecular Diagnostic Key ที่จัดทำขึ้นโดย Adam *et al.,* 2007 การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยใช้วิธีการตาม Schizas *et al.,* 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ตามเอกสารที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เขี่ยไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตรบนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช่ส่วนปลายของ pipette tip ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟชนิด 700 วัตต์ นาน 6 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยา PCR

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561
กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ทดสอบคู่ไพรเมอร์ 194/195 ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม และทดสอบคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้แก่ MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R, Finc/Rinc และ F/R ในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการทำปฏิกิริยาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีการรายงานไว้ พบว่าไพรเมอร์ MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R และ Finc/Rinc สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ได้ขนาดประมาณ 999, 400 และ 670 คู่เบสตามลำดับ ตรงตามขนาดที่มีรายงานไว้ ส่วนคู่ไพรเมอร์ F/R เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ไม่ตรงตามที่มีรายงานไว้ที่ขนาด 1,350 คู่เบส (ภาพที่ 2) คู่ไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K14-R มีความไวในการตรวจมากที่สุด สามารถตรวจได้ที่ความเข้มข้นของจีโนมิคดีเอ็นเอต่ำสุด 10 นาโนกรัม ส่วนคู่ไพรเมอร์อื่น สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 30 นาโนกรัม (ตารางที่ 2) เมื่อทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* กับตัวอย่างดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* พบว่าทุกคู่ไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* ได้ (ภาพที่ 2)

การเก็บตัวอย่างดินจาก จ. เพชรบูรณ์ จ. ฉะเชิงเทรา จ. ตาก จ. ราชบุรี จ. กาญจนบุรี จ. อุตรดิตถ์ จ. แม่ฮ่องสอน จ. เชียงใหม่ จ. ลำพูน จ. เชียงราย จ. นครศรีธรรมราช จ. ชุมพร จ. พังงา

จ. สกลนคร จ. อุดรธานี จ.หนองคาย นำมาแยกไส้เดือนฝอยรากปม และเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกได้ให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ โดยสุ่มกลุ่มไข่จากรากมะเขือเทศจากแต่ละตัวอย่างจำนวน 10 กลุ่มไข่มาเลี้ยงขยาย ตรวจสอบลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย และตรวจตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ทั้ง 23 ประชากร (ตารางที่ 1) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 194/195 และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 4 คู่ พบว่าคู่ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่มีความจำเพาะเจาะจงกับไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* อย่างไรก็ตามการใช้คู่ไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K14-R ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มีความเหมาะสมที่สุดนอกจากมีความจำเพาะเจาะจง แล้วยังมีความไวของการตรวจสูงกว่าคู่ไพรเมอร์คู่อื่นๆ ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์คู่นี้ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* แทนคู่ไพรเมอร์ MI-F/MI-R ตามรายงานของ Adam *et al*., 2007

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากปม โดยใช้ลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย พบว่าไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 23 ประชากรคือ *M. incognita* โดยลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมียของ *M. incognita* จะมีลักษณะรูปไข่ หรือกลม ส่วน dorsal arch สูงมีลักษณะเป็นเหลี่ยม เส้น striae มีลักษณะเป็นเส้นสั้นๆ ขยุกขยิก ไม่มี lateral field หรือมีเป็นลักษณะการสานกันของเส้น striae อย่างไรก็ตามการใช้ลักษณะริ้วรอยย่นส่วนก้นในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมทำได้ยาก เนื่องจากมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง (ภาพที่ 1) ในปี พ.ศ. 2561 เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกพืชต่างๆ ใน จ. เชียงราย แม่ฮ่องสอน พะเยา เชียงใหม่ และน่าน รวม 107 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 13 ตัวอย่าง เมื่อเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมให้ได้ประชากรที่บริสุทธิ์โดยการเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม และตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 13 ประชากร โดยใช้ Molecular Diagnostic Key ตามรายงานของ Adam *et al*., 2007 พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* 11 ตัวอย่างและ *M. javanica* 2 ตัวอย่าง (ภาพที่ 3)

การทดลองนี้พบไส้เดือนฝอยรากปมเพียง 2 ชนิดคือ *M. incognita* และ *M. javanica* ซึ่งจากการใช้ Molecular Diagnostic Key ตามรายงานของ Adam et al., 2007 ในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มีความถูกต้องแม่นยำน่าเชื่อถือ ไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* ในการทดลองนี้มีเพียง 2 ประชากร อาจไม่เพียงพอสำหรับการสรุปความถูกต้องแม่นยำ การนำ Molecular Diagnostic Key ตามรายงานของ Adam *et al*., 2007 ไปใช้ในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ ในประเทศไทยก็ควรมีการทวนสอบด้วยเช่นเดียวกัน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ประชากรในประเทศไทย โดยใช้ Molecular Diagnostic Key ตามรายงานของ Adams *et al*., 2007 ให้ผลถูกต้อง มีความน่าเชื่อถือ สามารถนำมาใช้ตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในประเทศไทยได้ สำหรับการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* มีตัวอย่างเพียง 2 ตัวอย่าง จำเป็นต้องมีจำนวนตัวอย่างเพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มความมั่นใจในการนำคู่ไพรเมอร์ Fjav/Rjav ไปใช้ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* ต่อไป การนำไปใช้ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ ก็ควรมีการทวนสอบถึงความถูกต้องเช่นเดียวกัน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

ได้ข้อมูลการใช้ Molecular Diagnostic Key ในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่สำคัญในประเทศไทย ทำให้เกิดความเชื่อมั่นในการนำไปใช้ การใช้วิธีทางอณูชีววิทยาในการจำแนกตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว และจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการจัดการ การคัดพันธุ์ต้านทาน และงานด้านการกักกันศัตรูพืช

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง

ธนากร จันทร์มาลี และวราภรณ์ ประกอบ. 2553. การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. บางไอโซเลทของไทย โดยเทคนิค PCR. วารสารเกษตร 26: 195-202.

Adam, M. A. M., M.S. Phillips and V.C. Blok. 2007. Molecular diagnostic key for identification for single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* sp.). Journal of Plant Pathology 56: 190-197.

Esbenshade, P.R., and A.C. Triantaphyllou. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 22: 10 –5.

Harris, T.S., L.J. Sandal., and T.O. Powers. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. Journal of Nematology 22: 518 –24.

Karssen, G. 2002. The Plant-Parasitic Nematode Genus *Meloidogyne* Goldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Leiden, Netherlands: Brill.

Meng, Q.P., H. Long, and J.H. Xu. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. Acta Phytopathologica Sinica 34: 204 –10.

Powers, T.O., and T.S. Harris. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* spp. Journal of Nematology 25: 1– 6.

Randig, O., F. Leroy, M. Bongiovanni, and P. Castagnone-Sereno. 2001. RAPD characterization of single females of the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. European Journal of Plant Pathology 107: 639 – 43.

Williamson, V.M., E.P. Caswell-Chen, B.B. Westerdahl, F.F. Wu, and G. Caryl, 1997. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Journal of Nematology 29: 9 –15.

Zijlstra, C., D.T.H.M. Donkers-Venne, and M. Fargette. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. Nematology 2: 847–53.

13. ภาคผนวก

Table 1 List of 23 *M. incognita* population, crops and locations

No.	Crop	Location
1	*Solanum tuberosum*	Mae Ramat, Tak
2	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
3	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
4	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
5	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
6	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
7	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
8	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
9	*Solanum tuberosum*	Phop Phra, Tak
10	*Solanum tuberosum*	Fang, Chiangmai
11	*Curcuma longa*	Thap Put, Phangnga
12	*Curcuma longa*	Takua Pa, Phangnga
13	*Curcuma longa*	Lang Suan, Chumphon
14	*Curcuma longa*	Lamae, Chumphon
15	*Curcuma longa*	Thung Tako, Chumphon
16	*Curcuma longa*	Cha-uat, Nakhon Si Thammarat
17	*Manihot esculenta*	Kumphawapi, Udon Thani
18	*Vigna unguiculata*	Phon Phisai, Nong Khai
19	*Musa* spp.	Phon Phisai, Nong Khai
20	*Capsicum annuum*	Sangkhom, Nong Khai
21	*Musa* spp.	Sangkhom, Nong Khai
22	*Manihot esculenta*	Nam Som, Udon Thani
23	*Solanum lycopersicum*	Phu Phan, Sakon Nakhon

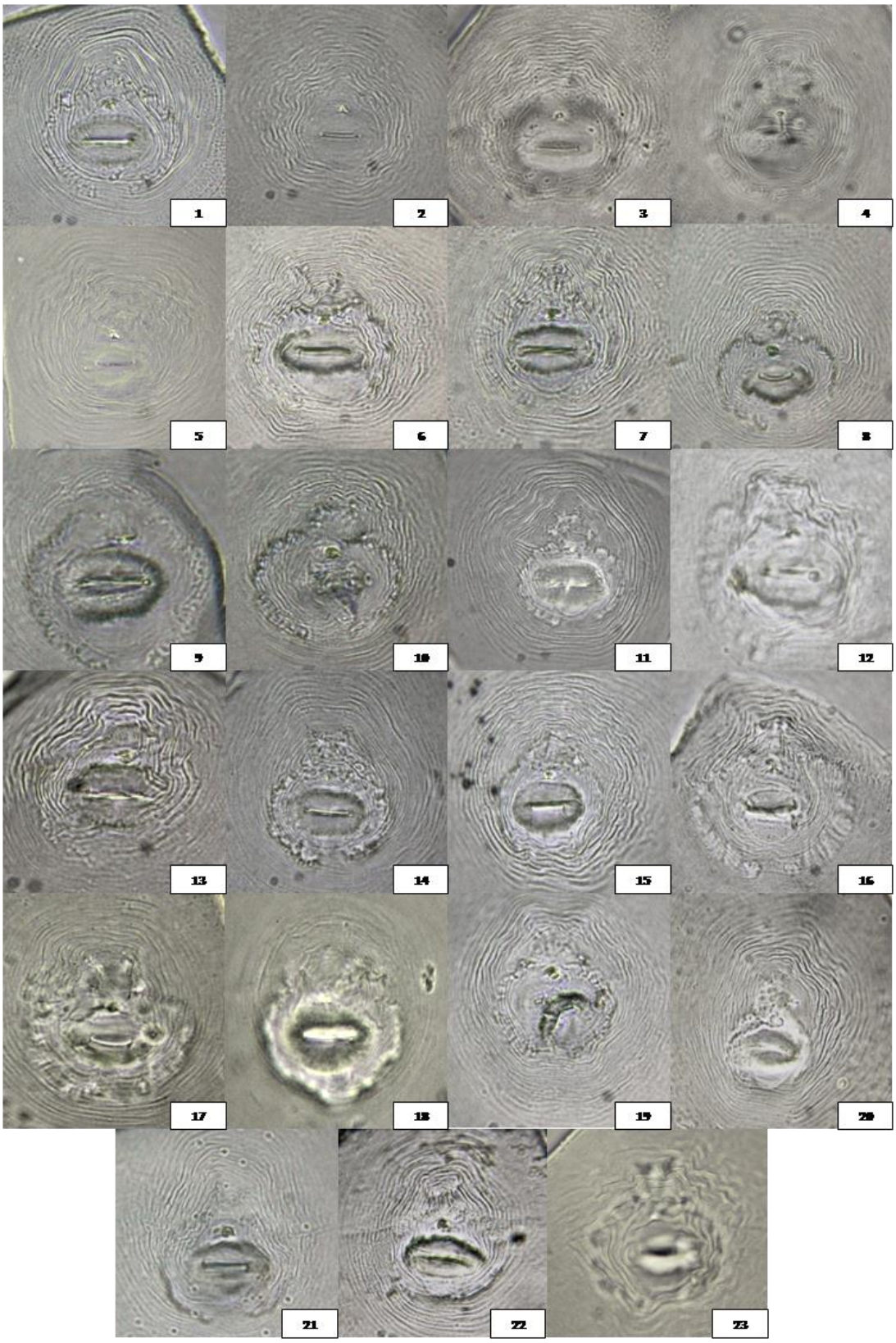
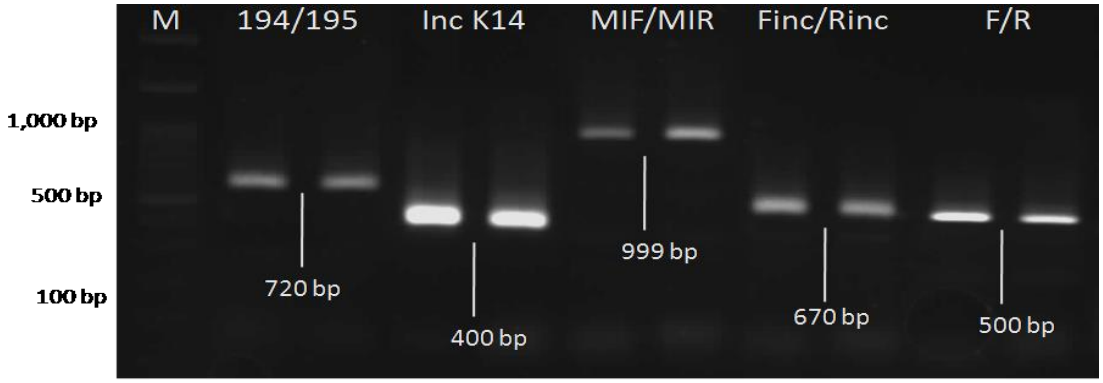
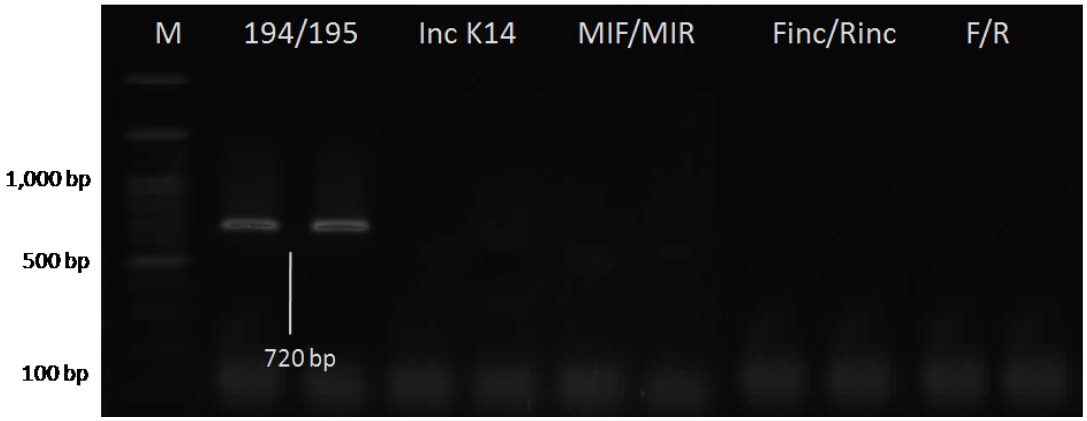


Fig. 1 Perineal patterns of 23 *M. incognita* populations.



M. incognita



M. javanica

Fig. 2 Test of 194/195 primer for root-knot nematode identification and 4 specific primers (MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R, Finc/Rinc and F/R) for *M. incognita* identification. *M. incognita* (above) *M. iavanica* (below)

Table 2 Sensitivity of each primers sets on the detection of *M. incognita* DNA.

Primers	*M. incognita* DNA concentration		
	30 ng	20 ng	10 ng
IncK-14-F/Inck-14-R	√	√	√
MI-F/MI-R	√	-	-
194/195	√	-	-
Finc/Rinc	√	-	-
F/R	√	-	-

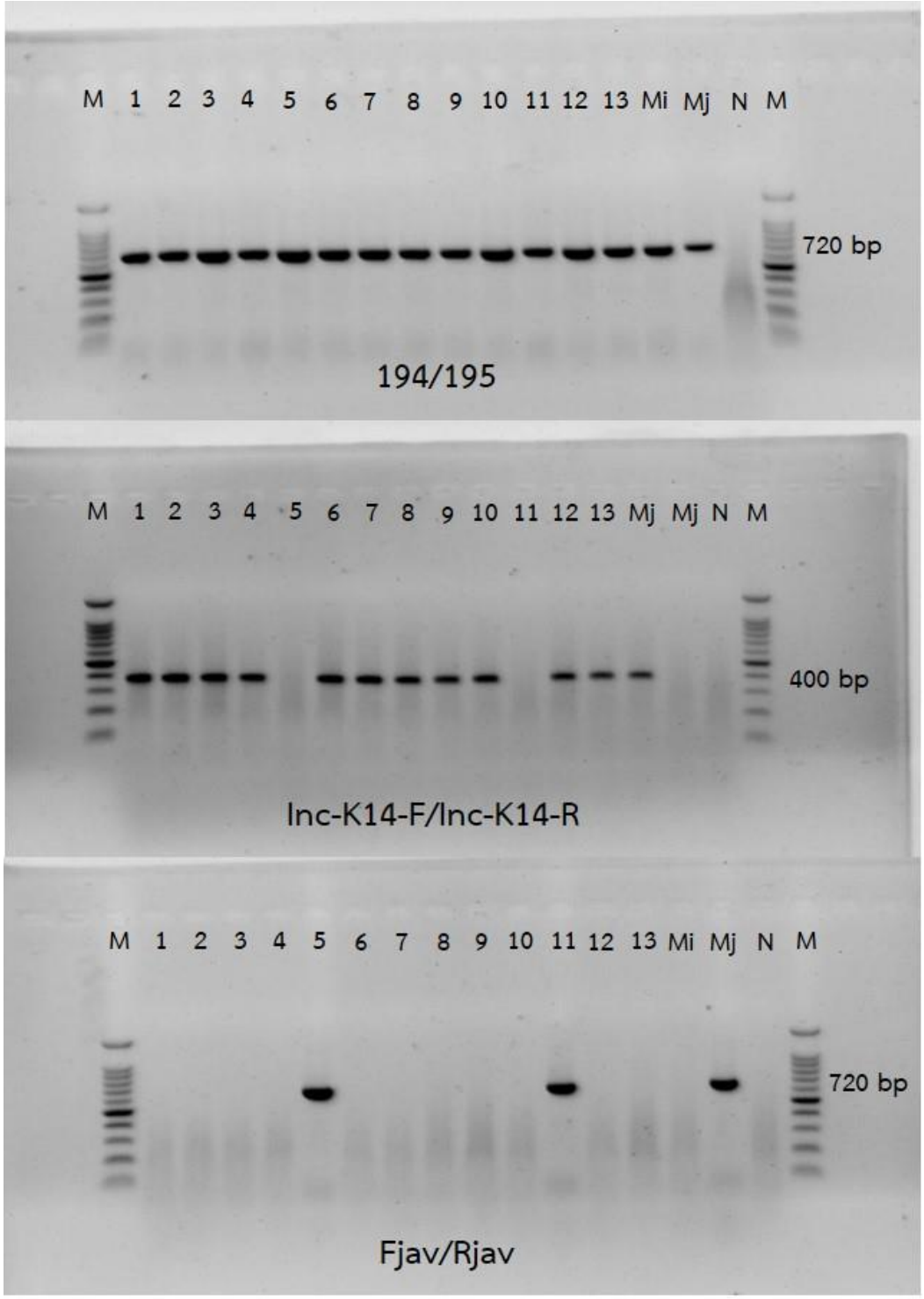


Fig. 3 Identification of *M. incognita* and *M. javanica* using 194/195, Inc-K14-F/Inc-K14-R and Fjav/Rjav primers.

Table 3 Root-knot nematodes molecular diagnostic key (Adam *et al*., 2007)

1. Amplify the amplifly the IGS between 5S and 18S ribosomal genes using 194/195 primers			
a)	720-bp product	Tropical species.....	go to (2)
b)	780-bp product	*M. mayaguensis* (now *M. enterolobii*)	
c)	700-bp product	*M. hapla*.....	go to (3)
d)	1,700- to 1,800-bp products	*M. fallax and M. chitwoodi*.....	go to (3)
e)	Other size, clone and sequence		
2. Tropical RKN specific SCAR primers			
2.1 Fjav and Rjav primers			
a)	720-bp product	*M. javanica*	
b)	No product.....		go to (2.2)
2.2 MI-F and MI-R primers			
a)	999-bp product	*M. incognita*	
b)	No product.....		go to (2.3)
2.3 Far and Rar primers			
a)	420-bp product	*M. arenaria*	
3. JMV primers			
a)	540-bp product	*M. chitwoodi*	
b)	670-bp product	*M. fallax*	
c)	440-bp product	*M. hapla*	

Table 4 Primer sequences, specificity and sources.

Primer code	Primer sequence 5′-3′	Specificity and source
194	TTAACTTGCCAGATCGGACG	5S-18S rDNA
195	TCTAATGAGCCGTACGC	Blok et al. (1997)
MI-F	GTGAGGATTCAGCTCCCCAG	*M. incognita* SCAR
MI-R	ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC	Meng et al. (2004)
Inc-K14-F	GGGATGTGTAAATGCTCCTG	*M. incognita* SCAR
Inc-K14-R	CCCGCTACACCCTCA ACT TC	Randig et al. (2002)
Finc	CTCTGCCCAATGAGCTGTCC	*M. incognita* SCAR
Rinc	CTCTGCCCTCACATTAGG	Zijlstra et al. (2000)
F	CTCTGCCCTCACATTAGG	*M. incognita* SCAR
R	CAGATATCTCTGCATTGGTGC	Dong et al. (2001)

Tabel 5 PCR amplification profiles for different primers.

		45 cycles			
		50 °C (194/195) 62 °C (MI-F/ MI-R) 64 °C (Inc-k14-F/ Inc-k14-R)			
94 °C 5 min	94°C 1 min	54 °C (Finc/Rinc) 50°C (F/R) 1 min	72°C 90 secs (194/195) 1min	72°C 7min	4°C ∞