

การคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริกต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม
Taxonomy and Biology of *Radopholus*

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด^{1/} พเยาว์ พรหมพันธุ์ใจ^{2/}

^{1/}ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มวิชาการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4

รายงานความก้าวหน้า

การคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริกต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* จำนวน 53 สายพันธุ์ พบว่าพริกขี้หนูสวนสายพันธุ์ 715919, 162448, 101136, 513457, 141074, 861012, 513457, 49646, 861012, 101136, พริกขี้หนู Pur, Chuan Teng1, Chuan Teng6 และพริกสายพันธุ์ Accession No. 360725 01 SD, 355822 01 SD, CA 1585, 315019 01 SD, 315008 01 SD, 290972 01 SD, 281423 01 SD, 260610 01 SD-A, 260504 01 SD, 260477 01 SD, 257171 01 SD, 257136 01 SD-A, 257136 01 SD-B, 257136 01 SD-C, 257136 01 SD-D, 257079 01 SD, 238051 01 SD, 439307 01 SD, CA 1645-A, CA 1645-B, 439357 01 SD, 441628 01 SD, 506437 01 SD, 506437 01 SD-A, 506437 01 SD-B, 508433 01 SD, CA 1646-A, CA 1608, 508440 01 SD-A, CA 1608-B, 511881 01 SD, 511881 01 SD-A, CA 1609, CA 1610, 566810 01 SD, และ 281443 01 SD ไม่มีความต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม โดยพบดัชนีการเกิดปมที่ระดับ 4-5 มีจำนวนไข่ต่อต้นระหว่าง 22,440-55,300 ฟอง/กลุ่ม (egg mass) และพบว่า 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 257171 01 SD-A, 257171 01 SD-B, CA 1606 และ CA 1607 มีความต้านทานระดับมาก (VR, Very Resistant) มีจำนวนไข่ต่อต้นเท่ากับ 3,550 9,266 175 และ 195 ฟอง/กลุ่ม (egg mass) ตามลำดับ

รหัสการทดลอง 01-30-54-01-02-02-02-54



คำนำ

พริกจัดเป็นพืชที่มีศักยภาพการผลิต เนื่องจากมีปริมาณการผลิตและมูลค่าสูง สามารถปลูกได้ในทุกภาคของประเทศ มีพื้นที่ปลูกรวมทั้งประเทศ 490,000 ไร่ ผลผลิต 548,800 ตัน ผลผลิตส่วนใหญ่ใช้บริโภคภายในประเทศ มีการส่งออกไปต่างประเทศในลักษณะของพริกสดและแปรรูป จุดเด่นพริกของประเทศไทยคือสามารถปลูกได้ตลอดทั้งปีและปลูกได้ทุกภาค มีฐานพันธุกรรมที่แพร่หลาย มีลักษณะจำเพาะที่เป็นเอกลักษณ์ เช่น ความเผ็ด มีกลิ่นหอม สามารถแปรรูปได้หลากหลาย แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณพริกออกสู่ตลาดไม่ต่อเนื่องและไม่แน่นอน เป็นผลมาจากปัญหาในเรื่องราคาของผลผลิตพริก กล่าวคือในปีใดที่พริกราคาดีหรือมีราคาสูง ในปีถัดไปเกษตรกรมักจะปลูกพริกเป็นปริมาณมาก ซึ่งทำให้ราคาพริกตกต่ำ ในทางตรงกันข้ามกันหากปีใดราคาของพริกตกต่ำเกษตรกรก็จะเลิกปลูกพริกเป็นจำนวนมากในปีถัดไป ซึ่งจะหมุนเวียนเป็นวัฏจักรเช่นนี้ตลอดมา นอกจากนี้ปัญหาสำคัญของการปลูกพริกอีกประการคือ ศัตรูพืช ซึ่งมักพบการระบาดของศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยไฟ ไรโรครที่เกิดจากเชื้อรา ไวรัส แบคทีเรีย และไส้เดือนฝอย ฯลฯ การระบาดจะรุนแรงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น ปริมาณน้ำฝน น้ำค้าง หมอก กระแสนม น้ำเพาะปลูก สภาพความเป็นกรด-ด่างของดิน ชนิดของเนื้อดิน การระบายน้ำและอากาศในดิน อุณหภูมิและความชื้น ปริมาณอินทรีย์วัตถุในดิน การปนเปื้อนของเชื้อโรคที่ติดมากับปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก เมล็ดพันธุ์ รากต้นกล้า ดินเพาะปลูก เศษซากพืชเป็นโรคในแปลงปลูก และเครื่องมือเกษตรต่างๆ ฯลฯ ปัญหาศัตรูพืชเหล่านี้ส่งผลต่อผลผลิตพริกต่อพื้นที่ลดลง รวมไปถึงการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในปริมาณสูง มีพิษตกค้างในผลผลิตไม่ได้ตามมาตรฐานความปลอดภัยจากสารพิษ ทำให้พริกที่ผลิตได้คุณภาพไม่ตรงกับความต้องการของผู้บริโภคหรือโรงงานแปรรูป

ในปี พ.ศ. 2549 เกิดปัญหาการระบาดของไส้เดือนฝอยสาเหตุของโรครากปมอย่างรุนแรง ในพื้นที่ปลูกพริกของจังหวัดอุบลราชธานี และศรีสะเกษ พบความเสียหายของผลผลิตและคุณภาพลดลง ตั้งแต่ 50-100 เปอร์เซ็นต์ จนถึงปัจจุบันในบางพื้นที่ไม่สามารถปลูกพริกได้ เนื่องจากการสะสมของประชากรไส้เดือนฝอยปริมาณมากและแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วในสภาพดินร่วนปนทราย ไส้เดือนฝอยไหลไปกับน้ำและ/หรือน้ำฝน ติดไปกับเครื่องมือเกษตร โดยเฉพาะดินที่มีไส้เดือนฝอยติดไปกับล้อรถไถจากแปลงหนึ่งสู่แปลงอื่นๆ และดินที่ติดไปกับต้นกล้าพริกสู่แปลงปลูก (นุชนารถ, 2550) เมื่อทำการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยโดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยพิจารณาจากรั้วรอยย่นส่วนกัน (perineal pattern) ของตัวตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถจัดจำแนกได้ 2 ชนิด (species) คือ *Meloidogyne incognita* และ *M. javanica* ซึ่งปะปนในแปลงปลูก โดยส่วนใหญ่ตรวจพบ *M. incognita* มากกว่า *M. javanica* ในอัตราส่วน 8 : 2 ของต้นพริก 1 ต้น

ลักษณะการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. เริ่มจากตัวอ่อนระยะที่ 2 หรือระยะเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยที่แพร่กระจายอยู่ในดินปลูกพืช เจาะไชเข้าสู่รากพริกบริเวณปลายราก เคลื่อนที่ต่อไปยังท่อน้ำท่ออาหารของพืชและหยุดนิ่ง จากนั้นเริ่มดูดกินน้ำเลี้ยงของพืช และมีการเจริญเติบโตด้วยวิธีการลอกคราบจากตัวอ่อนระยะที่ 2 เป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 และระยะที่ 4 ตามลำดับ จากนั้นพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัย (adult) มีทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยพบว่าพริกเป็นพืชอาหารที่ดี ไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายรากพริกจึงมีอัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นเพศเมียสูงกว่าเพศผู้ในสัดส่วน 4 : 1 ของจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลาย เพศเมียสามารถสร้างไข่ที่มีลักษณะเป็นกลุ่ม (egg mass) ได้โดยไม่ต้องผสมพันธุ์กับเพศผู้เป็นลักษณะการขยายพันธุ์แบบ parthenogenesis

(Triantaphyllou, 1981) ซึ่ง 1 กลุ่มไข่ ประกอบด้วยไข่จำนวน 400-500 ฟอง หลังจากนั้นไข่พัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 และลอกคราบภายในไข่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ไข่เดือนฝอยระยะนี้จะออกจากไข่ลงสู่ดินและเข้าทำลายรากพืชต่อเนื่อง โดยมีวงจรชีวิตจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ถึงตัวอ่อนระยะที่ 2 อีกรุ่น ใช้เวลาเพียง 3-4 สัปดาห์เท่านั้น ดังนั้น การที่เชื้อสาเหตุแพร่พันธุ์ได้ง่ายและเพิ่มประชากรเชื้อในปริมาณมาก ความเสียหายของโรครากปมจึงมีความรุนแรง เพียงมีไข่เดือนฝอยเข้าสู่รากพริกในระยะกล้าเพียงตัวเดียว ภายในเวลาเพียง 20 วัน จะเพิ่มจำนวนประชากร 400-500 ตัว เข้าทำลายระบบรากและขยายพันธุ์ต่อเนื่องทันที เมื่อต้นพริกอายุ 3 เดือน ไข่เดือนฝอยจะมีวงจรชีวิตรวม 3 ชั่วอายุ (generation) เกิดความเสียหายต่อพืชและสูญเสียผลผลิตมากกว่า 50 % (นุชนารถ, 2550)

ลักษณะอาการของโรครากปม เมื่อถอนต้นพริกจะพบระบบรากเป็นปุ่มปม สาเหตุจากไข่เดือนฝอยดูดกินน้ำเลี้ยงของพืชบริเวณท่อน้ำ-ท่ออาหาร มีผลทำให้เซลล์ของพืชบริเวณที่ถูกทำลายแบ่งตัวผิดปกติ เกิดเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (giant cell) ไปปิดกั้นทางเดินน้ำและแร่ธาตุอาหารจากรากไปเลี้ยงลำต้นส่วนเหนือดิน ทำให้พริกแสดงอาการเหี่ยวเฉา ต้นแคระแกร็นและทรุดโทรมหรือแห้งตายในที่สุด (นุชนารถ, 2552)

การแพร่ระบาด ไข่เดือนฝอยสามารถแพร่ระบาดได้ดีในเนื้อดินชนิดร่วนปนทราย ไปกับระบบการให้น้ำหรือไหลไปกับน้ำฝน รวมทั้งติดไปกับดินเพาะกล้าพริกและติดไปกับเครื่องมือเกษตรกรต่างๆ เช่น ล้อรถไถ รองเท้าเกษตรกร และเครื่องมือเกษตรกรอื่นๆ (นุชนารถ, 2552)

ปัญหาดังกล่าว ก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะในกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกพริกเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างที่กำลังประสบปัญหาในขณะนี้ และในอนาคตโรครากปมสามารถที่จะแพร่ระบาดไปยังพื้นที่อื่นๆ ถ้าไม่มีการป้องกันกำจัดอย่างถูกวิธี โดยการควบคุมโรครากปมมีหลายวิธีที่กรมวิชาการเกษตรให้คำแนะนำ ได้แก่ การเตรียมกล้าพริกในดินที่สะอาดไม่มีไข่เดือนฝอยปนเปื้อนในดิน การปลูกพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัยของไข่เดือนฝอย เช่น ดาวเรือง ถั่วลิสง และปอเทือง สลับหมุนเวียนกับพริก การเก็บเศษซากพืชเป็นโรคเผาทำลายนอกแปลง เป็นต้น (นุชนารถ, 2552) แต่อย่างไรก็ตามวิธีการป้องกันกำจัดเหล่านี้อาจใช้ได้ในพื้นที่หรือเกษตรกรในบางพื้นที่ไม่ยอมรับ ดังนั้น วิธีที่ดีที่สุดในการป้องกันกำจัดโรคพืชคือการใช้พันธุ์ต้านทาน โดยลักษณะของพืชต้านทานไข่เดือนฝอย

Huang (1985) ได้แบ่งเป็น 2 ลักษณะคือ แบบ Pre-infectional resistance เกิดขึ้นเนื่องจาก 1) พืชสามารถผลิตสารเคมีบางชนิดออกมาจากราก (root exudates) ซึ่งสารเคมีดังกล่าวไปมีผลในการขับไล่ไม่ให้ไข่เดือนฝอยเข้าทำลายรากพืช หรือ 2) การที่พืชบางชนิดสามารถพัฒนาตัวเองให้มีผิวราก (root surface) ที่แข็งแรงจนกระทั่งไข่เดือนฝอยไม่สามารถเข้าทำลายได้ และแบบ Post-infectional resistance เกิดขึ้นได้เนื่องจากพืชสามารถสร้างสาร phenolic compounds หรือการเกิดความไม่สมดุลในเรื่องธาตุอาหารในตัวพืช (nutritional imbalance) จนไข่เดือนฝอยไม่สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ หรือการเกิดปฏิกิริยา hypersensitivity reaction หรือการสร้างสาร phytoalexins หรือสารจำพวก peroxidases หรือ superoxide dismutase ขึ้นในตัวพืช ตัวอย่างการเกิด hypersensitivity reaction ในมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานพบสาร phenolic compounds สูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ ทำให้ไข่เดือนฝอยไม่เจริญเติบโต หรือพืชสร้างสาร glyceolin (สาร phytoalexins) ทำให้เกิด necrotic cell บริเวณรอบๆ ตัวไข่เดือนฝอย

Hung and Rohde (1973) พบว่าความเข้มข้นของสาร phenolic compound “chlorogenic acid” นั้นจะสูงในมะเขือเทศพันธุ์ Nemared ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานไส้เดือนฝอยที่มีถิ่น Mi เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ B-5 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ

Brueske (1980) พบว่า ในมะเขือเทศพันธุ์ Nematex ที่อยู่ในสภาพความต้านทานคือ ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส จะมีการสร้างเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสาร phenolic compounds มากกว่าในมะเขือเทศพันธุ์เดียวกันแต่อยู่ในสภาพอ่อนแอคือที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

Kaplan *et al.* (1980) พบว่าปริมาณของสาร glyceollin ซึ่งเป็นสาร phytoalexins ชนิดหนึ่งนั้นเพิ่มขึ้นในลำเลียงสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม เมื่อเปรียบเทียบกับลำเลียงพันธุ์อ่อนแอ นอกจากนี้ ยังพบว่าความเข้มข้นของสาร glyceollin นั้นจะมีปริมาณสูงขึ้นในบริเวณท่อน้ำท่ออาหาร (vascular tissues) ของพืชซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่อาศัยของไส้เดือนฝอย

Bleve-Zacheo *et al.* (1982) พบว่าในมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานต่อไส้เดือนฝอยนั้นจะเกิด necrotic cells ในบริเวณรอบๆ ตัวไส้เดือนฝอย นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มของสาร callose ในส่วนของเซลล์ที่อยู่ติดกับ necrotic cells นั้นด้วย

Zacheo *et al.* (1982) พบว่าเมื่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* เข้าทำลายมะเขือเทศพันธุ์ต้านทาน มะเขือเทศพันธุ์ดังกล่าวจะสร้าง peroxidase มากขึ้น ในขณะที่เดียวกันพบว่าปริมาณของสาร superoxide dismutase จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากว่า peroxidase นั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิต free radicals ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มความต้านทานในพืช ส่วน superoxide dismutase นั้นทำงานตรงกันข้ามคือ คือกำจัด free radicals ให้เป็น hydrogen peroxide ซึ่งจะสลายตัวไปเป็นออกซิเจนและน้ำในที่สุดด้วยเอนไซม์ catalase

Tylka (1995) รายงานว่าการปฏิบัติอย่างผสมผสานด้วยวิธีการใช้พันธุ์ต้านทานและการปลูกพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัยของไส้เดือนฝอย สามารถป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอย soybean cyst nematode ซึ่งมีแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกถั่วเหลืองกว่า 30 รัฐของสหรัฐอเมริกาได้ ส่งผลให้ประชากรของไส้เดือนฝอยลดลงต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจ และเกษตรกรสามารถปลูกถั่วเหลืองสายพันธุ์ที่อ่อนแอหรือสายพันธุ์ที่ต้องการปลูกลงไปในฤดูปลูกถัดไป

Hussey and Janssen (2001) รายงานถึงขั้นตอนสำหรับการคัดพันธุ์มะเขือเทศ ถั่วเหลือง มันฝรั่ง และพืชอื่นๆ ที่ต้านทานไส้เดือนฝอยรากปมหลายชนิด (*Meloidogyne* spp.)

Richard and Judy (2007) รายงานถึงการปรับปรุงพันธุ์พริกไทยในสหรัฐอเมริกา โดยการผสมพันธุ์ (conventional breeding) ระหว่างพันธุ์ต้านทาน Scotch Bonnet กับพันธุ์ Habanero-type ได้ผลผลิตคือพริกไทยพันธุ์ TigerPaw – NR ที่สามารถต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. arenaria* และ *M. javanica* ได้

จรัส (2529) ได้แบ่งระดับความต้านทานของพืช ออกเป็น 4 ระดับคือ

1. Immune เป็นพืชที่สามารถป้องกันการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยโดยไม่แสดงอาการเป็นโรค
2. Resistance เป็นพืชที่ไม่สามารถป้องกันการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยได้ แต่สามารถป้องกันและจำกัดขอบเขตหรือลดการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยได้
3. Susceptible เป็นพืชที่ไม่สามารถต้านทานต่อการทำลายของไส้เดือนฝอยได้ และเป็นผลให้ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตเต็มที่

4. Tolerant เป็นพืชที่ทนต่อการทำลายของไส้เดือนฝอยโดยไม่แสดงอาการว่าเป็นโรคหรือได้รับผลเสียหาย

พืชแสดงอาการต้านทานต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม สามารถสรุปได้คือ

1. ตัวอ่อนระยะเข้าทำลายไม่สามารถเจริญเติบโตจนเป็นตัวแก่ได้
2. ตัวอ่อนเจริญเป็นตัวแก่ได้แต่ใช้เวลานานกว่าปกติ
3. บริเวณที่ตัวอ่อนเข้าทำลาย เนื้อเยื่อพืชจะตายและไส้เดือนฝอยตายตามด้วย
4. ไซฟอกออกเป็นเพศผู้มากกว่าเพศเมีย
5. ตัวอ่อนออกจากรากในไม่ช้าหลังจากเข้าราก
6. ตัวเมียสร้างไซฟอกได้จำนวนน้อย/กลุ่ม หรือไม่สร้างไซฟอก
7. ลักษณะการสร้างปมมีขนาดเล็กหรือไม่สร้างเลย
8. จำนวนตัวเมียในรากน้อย

การคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริกต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม จึงเป็นงานวิจัยที่จะเป็นองค์ความรู้ใหม่ของประเทศไทย ซึ่งเป็นแหล่งของการผลิตพริกเพื่อการบริโภคภายในประเทศและส่งออก และเรายังมีความหลากหลายของพันธุกรรมพริกอยู่มากมายหลายสายพันธุ์ที่ควรนำมาศึกษาวิจัย เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคพืช ผลของงานวิจัยที่ได้จะสามารถส่งต่อให้นักปรับปรุงพันธุ์หรือนักวิจัยด้านชีวโมเลกุล นำไปขยายผลต่อยอดเพื่อได้ยีนและ/หรือพันธุ์พริกต้านทานไส้เดือนฝอย ใช้สำหรับแก้ปัญหาโรครากปมในพริกและช่วยเพิ่มศักยภาพในการผลิตภายในประเทศอย่างยั่งยืนต่อไป

โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกและประเมินเชื้อพันธุกรรมพริกของกรมวิชาการเกษตร ที่มีลักษณะต้านทาน และ/หรือทนทานต่อโรครากปมสาเหตุจากไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) อย่างน้อย 50 สายพันธุ์/ปี

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดพริกจำนวน 53 สายพันธุ์ จากสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร และศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม และพันธุ์พริกอื่นๆ
2. ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* แยกได้จากรากพริกที่ปลูกในพื้นที่การระบาด จ.อุบลราชธานี
3. กรงกันแมลงขนาด 85x120x80 ซม.
4. โรงเรือนปลูกพืช
5. บล็อกซีเมนต์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80 ซม. สำหรับปลูกพืชอาศัย
6. วัสดุปลูกพืช ได้แก่ ดินร่วน ดินร่วนปนทราย (ดินสีดา 50 : ดินทราย 50) และดินพีทมอส (Pindstrup compressed peat product)
7. ภาชนะปลูก ได้แก่ ภาชนะปลูกชนิด 15 หลุม (กระถางพลาสติกสีดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 ซม. สูง 5.5 ซม.) ภาชนะปลูกชนิด 104 หลุม และกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 และ 12 นิ้ว
8. เครื่องเขย่า 300 รอบ/นาที
9. สารละลาย 0.525 % NaOCl

10. เครื่องแก้ว ได้แก่ ปีกเกอร์ขนาด 50-1,000 มล. Elenmeyer flask ขนาด 250-500 มล. Petri dish ใช้สำหรับเพาะเมล็ด และจานนับจำนวนไส้เดือนฝอย
11. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (Stereo microscope) และกำลังขยายสูง (Compound microscope)
12. วัสดุอื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ เช่น ไมโครไปเปต ขนาด 500-1,000 มล. สไลด์หลุม กระดาษกรอง และกระดาษทิชชู เป็นต้น
13. เครื่องมือสำหรับปลูกพืชและสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ปุ๋ย และฮอร์โมน

วิธีการ

1. การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม (*M. incognita*) บริสุทธิ์จากกลุ่มไข่ (egg mass) 1 กลุ่ม เลือกตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม ที่มีกลุ่มไข่สมบูรณ์จากรากของพริกที่เก็บมาจากจังหวัดอุบลราชธานี ซึ่งเป็นพื้นที่การระบาดของโรครากปม นำตัวเต็มวัยเพศเมียจำแนกชนิดโดยวิธีตัดรีวรอยย่นส่วนกัน (Perineal pattern) เพื่อยืนยันชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมเป็น *M. incognita* ส่วนของกลุ่มไข่ทำการแยกกลุ่มไข่ให้ฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 หรือระยะเข้าทำลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปปลูกเชื้อในพีชอาศัย 3 ชนิด ได้แก่ กล้าพริกพันธุ์หัวเรืออายุ 30 วัน กล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 20 วัน และถั่วเขียวผิวมันอายุ 7 วัน ที่ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว ดูแลพืชเป็นเวลา 45 วันในถั่วเขียว และ 60 วันในพริกและมะเขือเทศ ได้ระบบรากของพีชอาศัยเป็นปุ้มปมจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย จากนั้นแยกกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยจากรากของพีชอาศัยแต่ละชนิด นำมาแช่ในสารละลาย 0.525 % NaOCl เป็นเวลา 3.5 นาที และนำไปปลูกเชื้อในพีชอาศัยทั้งสามชนิดที่ปลูกในบล็อกซีเมนต์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80 ซม. เพื่อเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย *M. incognita* ให้พอเพียงพอการทดสอบ และ maintain เพื่อการใช้ตลอดโครงการฯ

2. การเตรียมกล้าพันธุ์พริก นำเมล็ดพริกแต่ละสายพันธุ์ (accession) เพาะในกระดาษทิชชู ชุ่มน้ำเป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อเมล็ดพริกงอก นำไปเพาะในดินพีท-มอสที่บรรจุในภาชนะชนิด 104 หลุม จำนวน 1-2 เมล็ด/หลุม นำไปตั้งวางในกรงกันแมลง (ขนาด 85x120x80 ซม.) เมื่อใบจริงงอก 1 คู่ ทำการใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จำนวน 1-2 เม็ด/ต้น และใส่ปุ๋ยสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จนได้กล้าพริกอายุครบ 30 วัน

3. การเตรียมไข่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* นำรากถั่วเขียวระยะที่ไส้เดือนฝอยสร้างไข่เป็นกลุ่ม (egg mass) มาแช่ใน 0.525 % NaOCl เป็นเวลา 3.5 นาที ด้วยเครื่องเขย่า 300 รอบ/นาที กลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยจะหลุดออกจาก gelatinous matrix ที่หุ้มไข่ จากนั้นนำไปผ่านตะแกรง 2 ขนาด (400 และ 500 mesh) เพื่อแยกเศษพืชออก โดยเปิดน้ำไหลผ่าน จากนั้นเก็บไข่ไส้เดือนฝอยจากตะแกรง 500 mesh นำไปนับจำนวน 1,000 + 100 ฟอง/น้ำ 1 มิลลิลิตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนับเฉพาะไข่ที่สมบูรณ์และมีตัวอ่อนระยะที่ 1 อยู่ภายในไข่

4. การ inoculate ไข่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* ย้ายต้นกล้าอายุ 30 วัน ที่เตรียมจากข้อ 3.1 ของพริกแต่ละ accession ปลูกในดินชนิดร่วนปนทราย (อัตราส่วน 50 : 50) ในภาชนะชนิด 15 หลุม จำนวนต้นกล้าพริก 15-20 ต้น/accession จากนั้นทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *M. incognita* โดยใช้ไข่ที่เตรียมจากข้อ 3 จำนวน 1,000 ฟอง/ต้น ที่บริเวณรากพืช นำพืชไปตั้งวางในกรงกันแมลง (ขนาด 85x120x80 ซม.) และดูแลพืชปลูกโดยใส่ปุ๋ย 4-5 ครั้ง จนอายุครบ 40 วันหลังปลูกเชื้อ

บันทึกผล การวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก ทำการถอนต้นพริกอายุ 70 วัน (หรือ 40 วัน หลังปลูกเชื้อ) จำนวน 10 ต้น/accession ตรวจวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก/ต้น ตามวิธีของชุนา

รถ และวารสาร (2550) ดัดแปลงตามวิธีของ Hussey and Jansaen (2001) แบ่งเป็น 5 ระดับ ความต้านทาน (ภาพที่ 1) ดังนี้ :-

- 1 = มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย ระดับความต้านทาน Highly Resistant (HR)
- 2 = เกิดปมน้อยกว่า 25% ของระบบราก ระดับความต้านทาน Very Resistant (VR)
- 3 = เกิดปม 25-50% ของระบบราก ระดับความต้านทาน Moderately resistant (MR)
- 4 = เกิดปม 51-75% ของระบบราก ระดับความต้านทาน Slightly Resistant (SR)
- 5 = เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก ระดับความต้านทาน Susceptible (S)



ภาพที่ 1 ดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากของพริกแบ่งเป็น 5 ระดับ

- A) 1 = มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย
- B) 2 = เกิดปมน้อยกว่า 25% ของระบบราก
- C) 3 = เกิดปม 25-50% ของระบบราก
- D) 4 = เกิดปม 51-75% ของระบบราก
- E) 5 = เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก

การนับจำนวนไข่ไส้เดือนฝอยต่อต้น นำรากพริกแต่ละต้นที่ตรวจวัดดัชนีการเกิดปมของแต่ละ accession แล้ว มาแช่ใน 0.525 % NaOCl เป็นเวลา 3.5 นาที ด้วยเครื่องเขย่า 300 รอบ/นาาที เพื่อแยกไข่ออกจาก gelatinous matrix และนำไปผ่านตะแกรง 2 ขนาด (400 และ 500 mesh) เพื่อแยกเศษพืชออก โดยเปิดน้ำไหลผ่าน จากนั้นเก็บไข่ไส้เดือนฝอยจากตะแกรง 500 mesh นำไปนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับเฉพาะไข่ที่สมบูรณ์

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา 5 ปี เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2558

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริกต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม จำนวน 53 สายพันธุ์ ตาม Screening protocol มาตรฐานเดียวกัน ผลการประเมินระดับความต้านทาน สามารถคัดเลือก ได้สายพันธุ์พริกต้านทาน/ทนทาน จำนวน 4 สายพันธุ์ โดยวิธีการวัดดัชนีการเกิดปมที่ราก ใช้ประเมิน ความต้านทานตั้งแต่ระดับต้านทานสูง (Highly resistant, HR) ถึงต้านทานมาก (Very resistant, VR) หรือดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากตั้งแต่ 0 ถึง 2.5 (0 = ไม่มีปม; 1 = มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย; 2 = เกิดปม น้อยกว่า 25% ของระบบราก) แสดงตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยดัชนีการเกิดปม จำนวนไข่ต่อต้น และระดับความต้านทานของพริก จำนวน 53 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกและประเมินความต้านทานต่อไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุของโรครากปม ณ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร

ลำดับ ที่	Accessions No.	จำนวนต้นพริก ที่วัดได้	ค่าเฉลี่ย		ประเมิน ระดับความต้านทาน ^{2/}
			ดัชนีการเกิดปม ^{1/}	จำนวนไข่/ต้น (ฟอง)	
1	715919	8	4.90	53,080	S
2	162448	10	4.88	28,820	S
3	101136	10	5.00	35,970	S
4	513457	10	5.00	40,620	S
5	141074	10	4.90	43,160	S
6	861012	6	5.00	36,240	S
7	513457	5	4.90	26,480	S
8	49646	7	5.00	46,780	S
9	861012	10	5.00	46,267	S
10	101136	10	5.00	37,580	S
11	พริกชี้หนู Pur	10	5.00	24,667	S
12	Chuan Teng1	10	5.00	27,850	S
13	Chuan Teng6	10	5.00	38,500	S
14	360725 01 SD	10	4.90	27,580	S
15	355822 01 SD	10	4.50	47,450	S
16	CA 1585	10	4.00	30,500	SR
17	CA 1607	10	1.90	195	VR
18	315019 01 SD	10	4.80	22,720	S
19	315008 01 SD	10	4.80	79,040	S
20	290972 01 SD	10	5.00	55,300	S
21	281423 01 SD	10	3.80	48,680	SR
22	260610 01 SD-A	7	5.00	33,229	S
23	260504 01 SD	10	4.60	43,740	S
24	260477 01 SD	10	3.90	47,300	SR
25	257171 01 SD	8	2.70	22,440	MR
26	257136 01 SD-A	10	4.40	52,040	S
27	257136 01 SD-B	10	3.00	24,620	MR
28	257136 01 SD-C	10	3.90	52,080	SR
29	257136 01 SD-D	3	5.00	28,860	S

ลำดับ ที่	Accessions No.	จำนวนต้นพริก ที่วัดได้	ค่าเฉลี่ย		ประเมิน ระดับความต้านทาน ^{2/}
			ดัชนีการเกิดปม ^{1/}	จำนวนไข่/ต้น (ฟอง)	
30	257079 01 SD	10	5.00	46,280	S
31	238051 01 SD	10	4.70	61,280	S
32	439307 01 SD	5	4.60	32,920	S
33	CA 1645-A	5	3.75	46,400	SR
34	CA 1645-B	7	3.40	37,060	SR
35	439357 01 SD	10	3.70	31,040	SR
36	CA 1606	8	2.00	175	VR
37	441628 01 SD	10	3.90	37,280	SR
38	506437 01 SD	8	3.30	48,720	MR
39	506437 01 SD-A	9	2.80	13,740	MR
40	506437 01 SD-B	10	2.80	35,320	MR
41	508433 01 SD	10	3.80	34,760	SR
42	CA 1646-A	10	4.30	57,420	SR
43	CA 1608	10	3.70	42,860	SR
44	508440 01 SD-A	10	4.67	37,100	S
45	CA 1608-B	8	4.40	40,860	SR
46	511881 01 SD	9	2.90	40,120	MR
47	511881 01 SD-A	8	3.20	46,780	MR
48	CA 1609	8	4.80	48,900	S
49	CA 1610	10	5.00	47,680	S
50	566810 01 SD	10	4.67	51,956	S
51	281443 01 SD	10	5.00	27,140	S
52	257171 01 SD-A	10	2.40	3,500	VR
53	257171 01 SD-B	10	2.20	9,266	VR

^{1/} ดัชนีการเกิดปม : 0 = ไม่มีปม; 1 = มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย; 2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%; 3 = เกิดปม 25-50%; 4 = เกิดปม 51-75% และ 5 = เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก

^{2/} ระดับการประเมินความต้านทาน : HR (Highly resistant) = ต้านทานสูง; VR (Very resistant) = ต้านทานมาก; MR (Moderately resistant) = ต้านทานปานกลาง; SR (Slightly resistant) = ต้านทานเล็กน้อย และ S (Susceptible) = อ่อนแอ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการคัดเลือกและประเมินพันธุ์/สายพันธุ์พริกต้านทานต่อไส้เดือนฝอย *M. incognita* สาเหตุโรครากปม จำนวน 53 สายพันธุ์ พบพันธุ์พริกที่แสดงความต้านทานมาก (Very resistant, VR) ได้แก่ 257171 01 SD-A, 257171 01 SD-B, CA 1606 และ CA 1607 มีดัชนีการเกิดปมเท่ากับ 2.40 2.20 2.00 และ 1.90 มีจำนวนไข่ต่อต้นเท่ากับ 3,550 9,266 175 และ 195 ฟอง/กลุ่ม (egg mass) ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- จรัส ชื่นราม. 2529. การคัดเลือกพืชพันธุ์ต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม. เอกสารทางวิชาการ ฉบับที่ 7 กลุ่มงานไส้เดือนฝอย. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 17 หน้า.
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2550. การควบคุมโรครากปมในพริก. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 4 น.
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2552. โรครากปม, หน้า 9-10. ใน คู่มือโรคผัก. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ วราภรณ์ ประกอบ. 2550. เทคนิคการคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริก ต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม. 10น.
- Bleve-Zacheo, T., G. Zacheo, M. T. Melillo, and F. Lamberti. 1982. Ultrastructural aspects of the hypersensitive reaction in tomato root cells resistant to *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea* 10 :81-90.
- Boerma, H.R. and R.S. Hussey. 1992. Breeding plants for resistance to nematodes. *Journal of Nematology* 24 : 242-252.
- Brown, C.R., H. Mojtahedi, G.S. Santo and S. Austin-Phillips. 1994. Enhancing resistance to root-knot nematodes derived from wild *Solanum* species in potato germplasm, pp. 426-438. In G.W. Zehnder, M.L. Powelson, R.K. Jansson and K.V. Raman. (eds.). *Advances in Potato Pest Biology and Management*. APS Press, St Paul, Minnesota.
- Brueske, C. H. 1980. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato roots infected and resistant to the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology* 16 :409-414.
- Huang, J.S. 1985. Mechanisms of resistance to root-knot nematodes, pp. 165-174. In J. Sasser and C. C. Carter (eds.). *An advanced Treatise on Meloidogyne*, Vol. 1 Biology and Control
- Hung, C.-L. and R. A. Rohde. 1973. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. *Nematology* 5 : 253-258.
- Hussey, R.S. and G.J.W. Janseen. 2001. Root-knot nematodes : *Meloidogyne* species, pp. 43-70 In J.L. Starr, R. Cook and J. Bridge (eds.). *Plant Resistance To Parasitic Nematodes*. CAB Publishing, New York.
- Hussey, R.S. and H.R. Boerma. 1981. A greenhouse screening procedure for root-knot nematode resistance in soybean. *Crop Science* 21 : 794-796.
- Hussey, R.S. and K.R. Barker. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57 : 1025-1028.

- Kaplan, D. T., N. T. Keen, and I. J. Thomason. 1980. Association of glyceollin with the incompatible response of roots to *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology* 16 :309-318.
- Richard, L. Fery. and A.T. Judy. 2007. TigerPaw-NR, a Root-knot Nematode-resistance, Habanero-type Pepper. *Hortscience* 42 :1721-1722.
- Roberts, P.A. and I.J. Thomason. 1989. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. Measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoology Reviews* 3 : 225-252.
- Taylor, A.L. 1971. Introduction to research on plant nematology, an FAO guide to the study and control of plant parasitic nematodes, FAO, Rome. PL : CP/5 - rev. 1.
- Triantaphyllou, A.C. 1981. Oogenesis and the chromosomes of the parthenogenetic root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 13 : 95-104.
- Tylka, G. 1995. Soybean Cyst Nematode. Iowa State University. University Extension Plant Pathology Publication. 879 pp.
- Zacheo, G., T. Bleve-Zacheo, and F. Lamberti. 1982. Role of peroxidase and superoxide dismutase activity in resistant and susceptible tomato cultivars infested by *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Mediterranea* 10 :75-80.