

การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง
ด้วยวิธีอณูชีววิทยากับไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย
Validation of Molecular Diagnostic Key with Second Stage Juveniles
of Root-Knot Nematodes in Thailand

ไตรเดช ข่ายทอง วีรกรรม แสงไสย์ ธิติยา สารพัฒน์ รุ่งนภา ทองเคิ่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Validation of Molecular Diagnostic Key proposed by Adam *et al.* (2007) on identification of root-knot nematode population in Thailand was carried out during 2017-2018. The purpose of the study was to validate the technique in order to reduce the difficulty of morphology- based identification which require adult nematodes samples together with experienced nematologists. Primers reported by Adam *et al.* (2007) were tested, the 194/195 for general root-knot nematode identification and MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R, Finc/Rinc and F/R the specific primers for *Meloidogyne incognita*. Almost all primers yielded correct PCR product size as reported except the primer F/R which the size of PCR product was smaller than the originally reported. In this study, primer Inc- K14- F/Inc- K14- R was the best primer for *M. incognita* identification by the highest sensitivity. In 2017, 23 populations of root-knot nematodes collected from Phetchabun, Chachoengsao, Tak, Ratchaburi, Kancharaburi, Uttaradit, Mae Hong Son, Chiang Mai, Lamphun, Chiang Rai, Nakhon Si Thammarat, Chumphon, Phang Nga, Sakon Nakhon, Udon Thani and Nong Khai provinces were identified using the perineal pattern morphology and molecular technique as *M. incognita*. In 2018, soil samples were collected from Chiang Rai, Mae Hong Son, Phayao, Chiang Mai and Nan province. Root-knot nematodes were detected in 13 samples from the total of 107 soil samples. The nematodes were extracted and single eggmass populations were prepared. From 13 nematode populations, 11 populations were identified as *M. incognita* and 2 populations were *M. javanica*. This study confirmed the validity of Molecular Diagnostic Key proposed by Adam *et al.* (2007) to identify *M. incognita* population in Thailand.

Keywords: Taxonomy, Plant Parasitic Nematodes, Molecular Biology, Classification

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-09-60

บทคัดย่อ

การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อยืนยันความใช้ได้ของ Molecular Diagnostic Key ที่รายงานโดย Adam *et al.* (2007) กับประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย เพื่อนำไปใช้จำแนกชนิดของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม ลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้สัญญาณวิทยา ซึ่งต้องใช้ตัวเต็มวัยในการจำแนก และต้องใช้นักวิชาการด้านไส้เดือนฝอยที่มีความเชี่ยวชาญ ดำเนินงานระหว่างปี พ.ศ. 2560-2561 โดยเริ่มจากการทดสอบคู่มือ 194/195 ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม และคู่มือจำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้แก่ MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R, Finc/Rinc และ F/R พบว่าทุกคู่มือให้ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ตรงตามรายงานต้นฉบับ ยกเว้นคู่มือ F/R ที่ให้ผลผลิตปฏิกิริยาขนาดเล็กกว่าในรายงานต้นฉบับ และพบว่าคู่มือ Inc-K14-F/Inc-K14-R เหมาะสมในการใช้ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มากที่สุดเนื่องจากมีความไวสูงที่สุด 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. อุตรธานี จ. หนองคาย พบว่าทุกประชากรเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* โดยเปรียบเทียบกับลักษณะสัญญาณของรีวรอย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมียพบว่าให้ผลตรงกัน ในปี พ.ศ. 2561 เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกพืชต่าง ๆ 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

คำหลัก : อนุกรมวิธาน ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ชีวโมเลกุล การจัดจำแนก

คำนำ

ไส้เดือนฝอยรากปมเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่มีความสำคัญ และทำความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทยเป็นอย่างมากทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ ไส้เดือนฝอยรากปมมีหลายชนิด ชนิดที่สำคัญคือ *Meloidogyne incognita* และ *M. javanica* ปัจจุบันมีไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้รับการจัดจำแนกแล้วมากกว่า 80 ชนิด (Karssen, 2002) การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทำได้ยาก ในอดีตการจัดจำแนกจะใช้ลักษณะทางสัญญาณ เช่น ลักษณะของรีวรอย่นบริเวณส่วนกัน (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ลักษณะของตัวอ่อนระยะที่สอง และตัวเต็มวัยเพศผู้ รวมทั้งข้อมูลของพืชอาศัยช่วยในการจัดจำแนก อย่างไรก็ตามลักษณะต่าง ๆ เหล่านี้มีความแปรปรวนสูงทำให้เกิดปัญหาในการจัดจำแนก ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคด้านอนุชีววิทยามาช่วยในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมได้ถูกต้องมีความสำคัญในการวางแผนการจัดการไส้เดือนฝอย เช่น การปลูกพืชหมุนเวียน การพัฒนาพันธุ์พืชต้านทาน และงานด้านการกักกันศัตรูพืช

นอกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานแล้ว ได้มีการใช้ isozyme analysis ในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมและสะดวกรวดเร็ว วิธีนี้ต้องใช้ตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัวในการทำ ไม่สามารถใช้ตัวอ่อนระยะที่สองหรือตัวเต็มวัยเพศผู้ในการทำ (Esbenshade and Triantaphyllou, 1990) เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนไม่เพียงพอ ซึ่งตัวเต็มวัยเพศเมียไม่สามารถแยกได้จากตัวอย่างดิน แต่ต้องแยกจากราก หรือส่วนของพืชเท่านั้น บางครั้งต้องเลี้ยงไส้เดือนฝอยในรากมะเขือเทศเพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยเพศเมีย การใช้ตัวอ่อนระยะที่สองซึ่งสามารถแยกได้จากตัวอย่างดินโดยตรงในการจำแนกชนิดจะสะดวกเร็วกว่ามาก 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 ด้วยวิธีต่าง ๆ 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. arenaria* 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 พบว่าได้ผลตรงกับวิธีการจำแนกชนิดโดยการใช้รูปแบบรีวิรอยย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย

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

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างดิน และรากพืช

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยรากปม โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตรโดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดิน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว คลุกเคล้าเข้าด้วยกันให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกรายการทางภูมิศาสตร์ และชนิดพืชปลูก รวมทั้งเก็บตัวอย่างราก หรือส่วนของพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมหากพบในพื้นที่

การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและพืช

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

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมในกระถาง หลังจากนั้น 45 วัน ล้างรากมะเขือเทศด้วยน้ำสะอาด เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยใช้ปากคีบ ๆ กลุ่มไข่ 1 กลุ่มแช่ในน้ำสะอาดในถ้วยน้บตัวอย่าง ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์ หากเป็นตัวอ่อนรากที่มีกลุ่มไข่ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่มาแช่ในน้ำกลั่น ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนระยะที่สอง แล้วนำไปเทใส่ในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบฆ่าเชื้อเตรียมตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยคีบกลุ่มไข่วางลงบนตะแกรงไนลอนที่แช่อยู่ในน้ำสะอาดในจานเลี้ยงเชื้อ ได้ตัวอ่อนระยะที่สองในน้ำสะอาดสำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอ

การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานโดยเปรียบเทียบลักษณะริ้วรอยย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพสเมีย (perineal patterns) เปรียบเทียบลักษณะ ความกว้างยาว และสัดส่วนของอวัยวะต่าง ๆ ของไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สองประกอบในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะริ้วรอยย่นส่วนกันในการจำแนกได้ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากตำราและรายงานตีพิมพ์

จำแนกตัวอ่อนระยะที่สองด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

จำแนกตัวอ่อนระยะที่สองด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา โดยใช้ Molecular Diagnostic Key ที่จัดทำขึ้นโดย Adam *et al.*, 2007 การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997

ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ตามเอกสารที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เชื้อใส่เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงในหลอด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตรบนสไลด์แก้ว ตัดตัวใส่เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช้ส่วนปลายของ 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 นาทีเพื่อยุติการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟชนิด 700 วัตต์ นาน 6 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยา PCR

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานใส่เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ทดสอบคูไพรเมอร์ 194/195 ในการตรวจสอบใส่เดือนฝอยรากปม และทดสอบคูไพรเมอร์จำเพาะต่อใส่เดือนฝอยรากปม *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 คู่เบสตามลำดับตรงตามขนาดที่มีรายงานไว้ ส่วนคูไพรเมอร์ F/R เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 500 คู่เบสไม่ตรงตามที่มีรายงานไว้ที่ขนาด 1,350 คู่เบส (Figure 2) คูไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K14-R มีความไวในการตรวจมากที่สุด สามารถตรวจได้ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบต่ำสุด 10 นาโนกรัม ส่วนคูไพรเมอร์อื่น สามารถตรวจสอบได้ที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 30 นาโนกรัม (ตารางที่ 2) เมื่อทดสอบคูไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* กับตัวอย่างดีเอ็นเอของใส่เดือนฝอยรากปม *M. javanica* พบว่าทุกคูไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างดีเอ็นเอของใส่เดือนฝอยรากปม *M. javanica* ได้ (figure 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. อุตรธานี จ.หนองคาย นำมาแยกใส่เดือนฝอยรากปม และเลี้ยงใส่เดือนฝอยรากปมที่แยกได้ให้ได้ประชากรใส่เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ โดยสุ่มกลุ่มไข่จากรากมะเขือเทศจากแต่ละตัวอย่างจำนวน 10 กลุ่มไข่มาเลี้ยงขยาย ตรวจสอบลักษณะรูปร่างส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย และตรวจตัวอย่างใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ทั้ง 23 ประชากร (Table 1) โดยใช้คูไพรเมอร์ 194/195 และคูไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อใส่เดือนฝอยรากปมทั้ง 4 คู่ พบว่าคูไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่มีความจำเพาะเจาะจงกับใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* อย่างไรก็ตามการใช้คูไพรเมอร์ Inc-K14-F/Inc-K14-R ในการตรวจใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มีความเหมาะสมที่สุดนอกจากมีความจำเพาะเจาะจงแล้วยังมีความไวของการตรวจสูงกว่าคูไพรเมอร์คู่อื่น ๆ ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์คู่นี้ในการตรวจใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* แทนคูไพรเมอร์ MI-F/MI-R ตามรายงานของ Adam *et al.*, 2007

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากปม โดยใช้ลักษณะรูปร่างรอยย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย พบว่าไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 23 ประชากรคือ *M. incognita* โดยลักษณะรูปร่างรอยย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมียของ *M. incognita* จะมีลักษณะรูปไข่ หรือกลม ส่วน dorsal arch สูงมีลักษณะเป็นเหลี่ยม เส้น striae มีลักษณะเป็นเส้นสั้น ๆ ขยุกขยิก ไม่มี lateral field หรือมีเป็นลักษณะการสานกันของเส้น striae อย่างไรก็ตามการใช้ลักษณะรูปร่างรอยย่นส่วนกันในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมทำได้ยาก เนื่องจากมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง (Figure 1) ในปี พ.ศ. 2561 เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกพืชต่าง ๆ 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 (Figure 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 ไปใช้ในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ ในประเทศไทยก็ควรมีการทวนสอบด้วยเช่นเดียวกัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

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 เพื่อเพิ่มความมั่นใจในการนำคู่มือ Fjav/Rjav ไปใช้ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* ต่อไป การนำไปใช้ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ ก็ควรมีการทวนสอบถึงความถูกต้องเช่นเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

- ธนากร จันทร์มาลี และวารภรณ์ 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.

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

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

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

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

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

1. Amplify the amplify 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	<i>M. mayaguensis</i> (now <i>M. enterolobii</i>)	
c)	700-bp product	<i>M. hapla</i>	go to (3)
d)	1,700- to 1,800-bp products	<i>M. fallax</i> and <i>M. chitwoodi</i>	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	<i>M. javanica</i>	
b)	No product.....		go to (2)
2.2 MI-F and MI-R primers			
a)	999-bp product	<i>M. incognita</i>	
b)	No product.....		go to (2)
2.3 Far and Rar primers			
a)	420-bp product	<i>M. arenaria</i>	
3. JMV primers			
a)	540-bp product	<i>M. chitwoodi</i>	
b)	670-bp product	<i>M. fallax</i>	
c)	440-bp product	<i>M. hapla</i>	

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	<i>M. incognita</i> SCAR
MI-R	ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC	Meng et al. (2004)
Inc-K14-F	GGGATGTGTAATGCTCCTG	<i>M. incognita</i> SCAR
Inc-K14-R	CCCGCTACACCCTCA ACT TC	Randig et al. (2002)
Finc	CTCTGCCCAATGAGCTGTCC	<i>M. incognita</i> SCAR
Rinc	CTCTGCCCTCACATTAGG	Zijlstra et al. (2000)
F	CTCTGCCCTCACATTAGG	<i>M. incognita</i> 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	94°C	54 °C (Finc/Rinc)	72°C	72°C	4°C
5 min	1 min	50°C (F/R)	90 secs (194/195)	7min	∞
		1 min	1min		

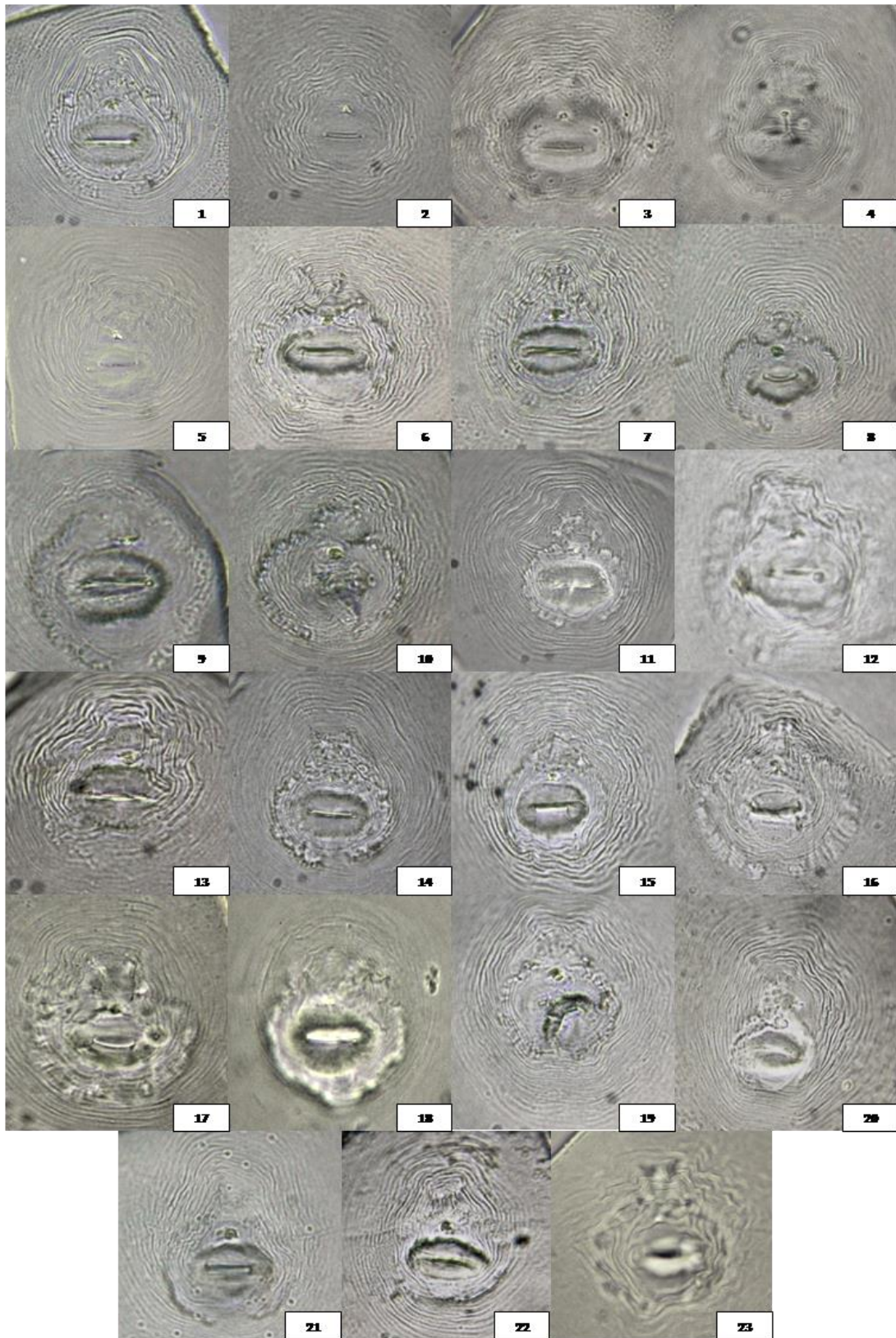


Figure 1 Perineal patterns of 23 *M. incognita* populations

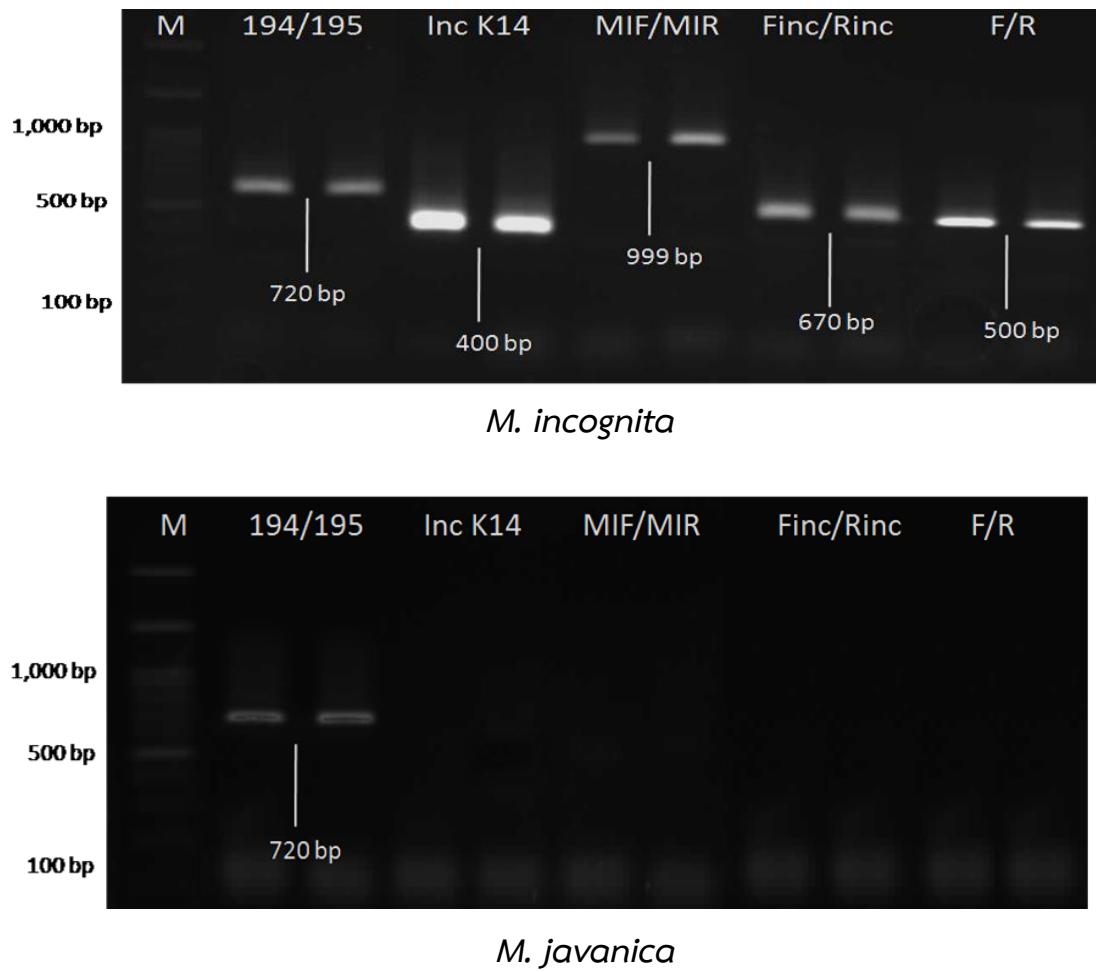


Figure 2 Test of 194/195 primer for root-knot nematode identification and 4 specific primers (MI-F/MI-R, Inc-K14-F/Inc-K14-R, Finc/Rinc and F/R) for *M. incognita* identification. *M. incognita* (above) *M. javanica* (below)

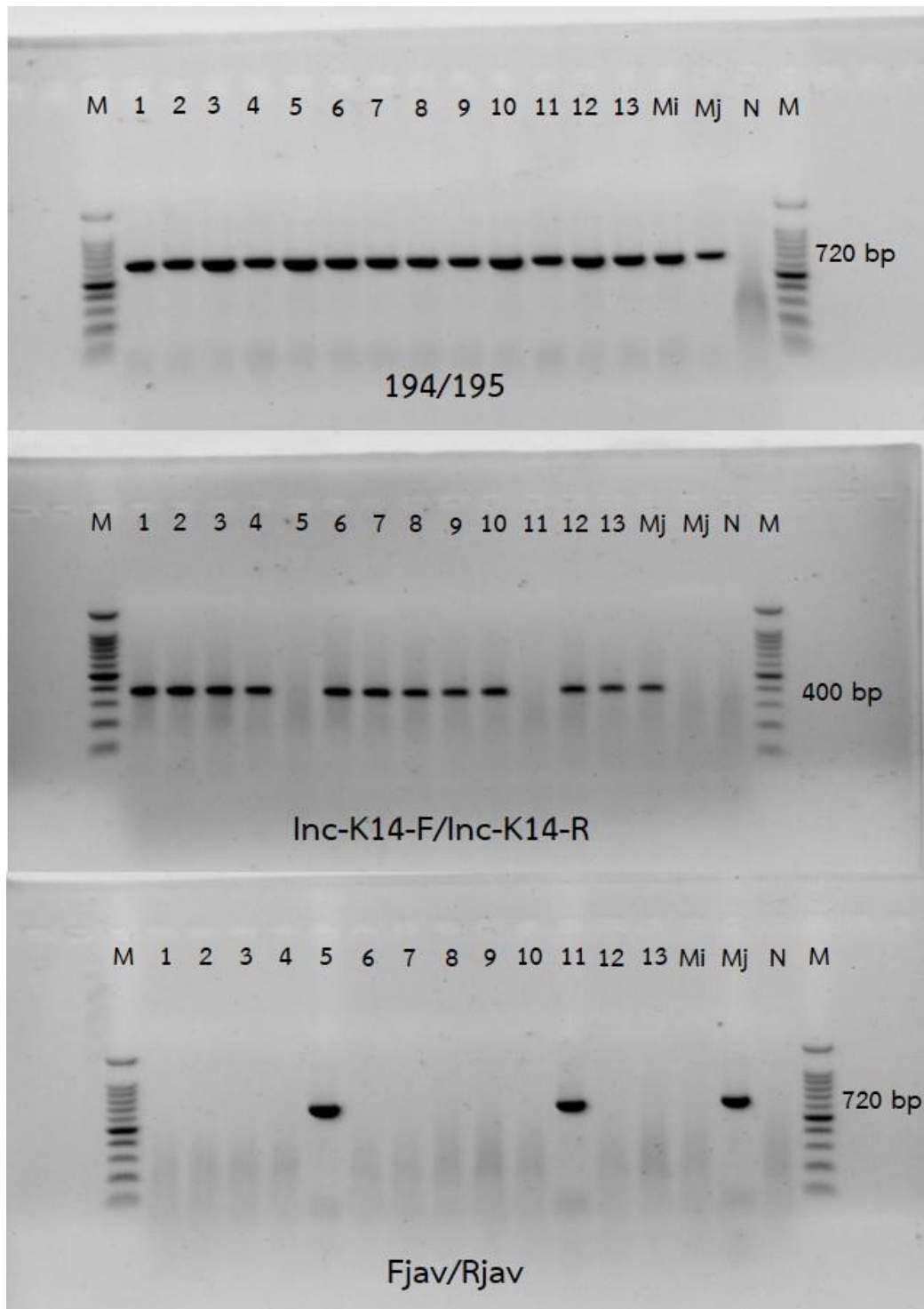


Figure 3 Identification of *M. incognita* and *M. javanica* using 194/195, Inc-K14-F/Inc-K14-R and Fjav/Rjav primers