

การทวนสอบแนวทางการจำแนกชนิดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง
ด้วยวิธีอณูชีววิทยากับไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย

ไตรเดช ข่ายทอง วีรกรรม แสงไสย์ ธิตยา สารพัฒน์ รุ่งนภา ทองเครื่อง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การดำเนินงานในปี 2560 เก็บตัวอย่างดินจาก 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 นำมาแยกไส้เดือนฝอยรากปม และเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกได้ให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบลักษณะ รีวรอยย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย และตรวจตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* 23 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 194/195 และ Inc-K14-F/Inc-K14-R โดยเปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานของรีวรอยย่นส่วนกันพบว่าให้ผลตรงกัน จากการเก็บตัวอย่างพบไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* เพียง 2 ตัวอย่าง การตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ Fjav/Rjav โดยเปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานของรีวรอยย่นส่วนกันพบว่าให้ผลตรงกัน

คำหลัก: อนุกรมวิธาน ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ชีวโมเลกุล การจัดจำแนก

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-09-60

คำนำ

ไส้เดือนฝอยรากลปมเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่มีความสำคัญ และทำความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทยเป็นอย่างมากทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ ไส้เดือนฝอยรากลปมมีหลายชนิด ชนิดที่สำคัญคือ *Meloidogyne incognita* และ *M. javanica* ปัจจุบันมีไส้เดือนฝอยรากลปมที่ได้รับการจัดจำแนกแล้วมากกว่า 80 ชนิด (Karssen, 2002) การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากลปมทำได้ยาก ในอดีตการจัดจำแนกจะใช้ลักษณะทางสัณฐาน เช่น ลักษณะของริ้วรอยบนบริเวณส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ลักษณะของตัวอ่อนระยะที่สอง และตัวเต็มวัยเพศผู้ รวมทั้งข้อมูลของพืชอาศัยช่วยในการจัดจำแนก อย่างไรก็ตามลักษณะต่างๆ เหล่านี้มีความแปรปรวนสูงทำให้เกิดปัญหาในการจัดจำแนก ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคด้านอนุชีววิทยามาช่วยในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากลปม การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากลปมได้ถูกต้องมีความสำคัญในการวางแผนการจัดการไส้เดือนฝอย เช่น การปลูกพืชหมุนเวียน การพัฒนาพันธุ์พืชต้านทาน และงานด้านการกักกันศัตรูพืช

นอกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานแล้ว ได้มีการใช้ isozyme analysis ในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากลปม ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมและสะดวกรวดเร็ว วิธีนี้ต้องใช้ตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัวในการทำ ไม่สามารถใช้ตัวอ่อนระยะที่สองหรือตัวเต็มวัยเพศผู้ในการทำ (Esbenshade and Triantaphyllou, 1990) เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนไม่เพียงพอ ซึ่งตัวเต็มวัยเพศเมียไม่สามารถแยกได้จากตัวอย่างดิน แต่ต้องแยกจากราก หรือส่วนของพืชเท่านั้น บางครั้งต้องเลี้ยงไส้เดือนฝอยในรากมะเขือเทศเพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยเพศเมีย การใช้ตัวอ่อนระยะที่สองซึ่งสามารถแยกได้จากตัวอย่างดินโดยตรงในการจำแนกชนิดจะสะดวกรวดเร็วกว่ามาก ซึ่งมีประโยชน์ต่อการตัดสินใจในการจัดการไส้เดือนฝอยรากลปมก่อนทำการปลูกพืช (Powers & Harris, 1993)

Harris *et al.* (1990) ใช้เทคนิค PCR ในการจำแนกตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากลปมเป็นครั้งแรกโดยการ amplify ส่วนของ mitochondrial DNA ต่อมา Powers & Harris (1993) ออกแบบไพรเมอร์ที่ amplify ดีเอ็นเอส่วนระหว่างยีน cytochrome oxidase II และ 16S rRNA และ digest ด้วย restriction enzymes สามารถจำแนกไส้เดือนฝอยรากลปมชนิดที่สำคัญ 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 ตัวในการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากลปม 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. arenaria* โดยสามารถจำแนกได้

จากตัวอย่างระยะที่สอง 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 พบว่าได้ผลตรงกับผลการจำแนกชนิดโดยใช้รูปแบบริ้วรอยย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย

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 ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างไส้เดือนฝอยที่วางอยู่บนตะแกรงในลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แยกไส้เดือนฝอยรากปมจากพืชโดยการคีบกลุ่มไข่จากรากหรือส่วนของพืชโดยตรง

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมในกระถาง หลังจากนั้น 45 วัน ล้างรากมะเขือเทศด้วยน้ำสะอาด เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยใช้ปากคิบบๆ กลุ่มไข่ 1 กลุ่มแช่ในน้ำสะอาดในถ้วยนบตัวอย่าง ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์ หากเป็นตัวอ่อนรากที่มีกลุ่มไข่ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่มาแช่ในน้ำกลั่น ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนระยะที่สอง แล้วนำไปใส่ในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบฆ่าเชื้อเตรียมตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยคีบกลุ่มไข่วางลงในตะแกรงในลอนที่แช่อยู่ในน้ำสะอาดในจานเลี้ยงเชื้อ ได้ตัวอ่อนระยะที่สองในน้ำสะอาดสำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอ

การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานโดยเปรียบเทียบลักษณะ ริวรอย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย (perineal patterns) เปรียบเทียบลักษณะ ความกว้างยาว และสัดส่วนของอวัยวะต่างๆ ของไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สองประกอบในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะริวรอย่นส่วนกันในการจำแนกได้ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากตำราและรายงานตีพิมพ์

จำแนกตัวอ่อนระยะที่สองด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

จำแนกตัวอ่อนระยะที่สองด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา โดยใช้ Molecular Diagnostic Key ที่จัดทำขึ้นโดย Adam *et al.*, 2007 การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ตามเอกสารที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เชื้อไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงในหลอด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตรบนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 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 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตร ลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 6 นาที ถ้าเตาไมโครเวฟเป็นชนิด 750 วัตต์ (สามารถปรับเวลาตามกำลังไฟของเตาไมโครเวฟให้ได้ 4,500 วัตต์-นาที ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยา PCR

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างดินจาก จ. เพชรบูรณ์ จ. ฉะเชิงเทรา จ. ตาก จ. ราชบุรี จ. กาญจนบุรี จ. อุดรดิตถ์ จ. แม่ฮ่องสอน จ. เชียงใหม่ จ. ลำพูน จ. เชียงราย จ. นครศรีธรรมราช จ. ชุมพร จ. พังงา จ. สกลนคร จ. อุดรธานี จ. หนองคาย นำมาแยกไส้เดือนฝอยรากปม และเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกได้ให้ได้ ประชากรไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ โดยสุ่มกลุ่มไข่จากรากมะเขือเทศจากแต่ละตัวอย่าง จำนวน 10 กลุ่ม ไข่มาเลี้ยงขยาย ตรวจสอบลักษณะริวรอย่นส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย และตรวจตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* 23 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 194/195 และ Inc-K14-F/Inc-K14-R โดยเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานของริวรอย่นส่วนกันพบว่าให้ผลตรงกัน จากการเก็บตัวอย่างพบไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* เพียง 2 ตัวอย่าง การตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ Fjav/Rjav โดยเปรียบเทียบกับลักษณะสัณฐานของริวรอย่นส่วนกันพบว่าให้ผลตรงกัน

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

เอกสารอ้างอิง

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