

การจำแนกไส้เดือนฝอยรากแผล (*Pratylenchus* spp.)
ในแหล่งปลูกหอมแดงด้วยวิธีอณูชีววิทยา
Molecular Identification of Lesion Nematode (*Pratylenchus* spp.)
in Shallot Fields

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ รุ่งนภา ทองเครื่อง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การดำเนินงานในปี 2560 เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมแดง จ. กาญจนบุรี จ. ราชบุรี จ. ตาก จ. แม่ฮ่องสอน จ. เชียงราย จ. เชียงใหม่ จ. อุตรดิตถ์ จ. ลำพูน จ. นครราชสีมา จ. ศรีสะเกษ จ. บุรีรัมย์ และ จ. อุบลราชธานี รวม 97 ตัวอย่าง ได้ตัวอย่างที่มีไส้เดือนฝอยรากแผลจำนวน 12 ตัวอย่าง นำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณและสกัดดีเอ็นเอ ตรวจดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยรากแผลด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ D2A/D3B และ คู่ไพรเมอร์จำเพาะ พบว่า ตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากแผลให้ผลบวกกับคู่ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับ *Pratylenchus brachyurus* 1 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 28S rDNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Pratylenchus delattrei* และ *Pratylenchus brachyurus*

คำหลัก: อนุกรมวิธาน ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ศัตรูพืชกักกัน ชีวโมเลกุล

คำนำ

ไส้เดือนฝอยรากแผล (Lesion nematodes: *Pratylenchus* spp.) เป็นไส้เดือนฝอยอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญ และทำความเสียหายแก่พืชหลายชนิด นอกจากจะทำความเสียหายโดยตรงต่อผลผลิตทางการเกษตรแล้ว ไส้เดือนฝอยรากแผลบางชนิดยังเป็นศัตรูพืชกักกัน และมีความสำคัญด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ประเทศอินโดนีเซียได้แจ้งเตือนการตรวจพบไส้เดือนฝอย *Pratylenchus penetrans* ในหอมแดงจากประเทศไทย ทำให้ปัจจุบันต้องมีการสุ่มตรวจตัวอย่างหอมแดงก่อนส่งออกไปยังอินโดนีเซีย อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลการแพร่กระจาย หรือความเสียหายของหอมแดงที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากแผลในประเทศไทย การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้หลักฐานวิทยาทำได้ยาก ต้องใช้นักไส้เดือนฝอยที่มีความชำนาญในการจำแนก ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีประสิทธิภาพสูง และสไลด์ตัวอย่างไส้เดือนฝอยต้องมีคุณภาพดี ข้อจำกัดสำคัญที่ทำให้การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลทำได้ยากคือไส้เดือนฝอยรากแผลมีลักษณะทางสัณฐานที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดน้อย และปัญหาจากความแปรปรวนของลักษณะทางสัณฐานต่างๆ ภายในประชากรของไส้เดือนฝอยชนิดเดียวกัน (intraspecific variation) อีกด้วย การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลให้ถูกต้องมีความสำคัญมาก เนื่องจากดินในแปลงปลูกพืชอาจมีไส้เดือนฝอยรากแผลอยู่หลายชนิด ซึ่งไส้เดือนฝอยรากแผลแต่ละชนิดจะมีพืชอาศัย ความสามารถในการเข้าทำลายและทำความเสียหายแก่พืชแตกต่างกัน การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยที่ถูกต้องจะทำให้การวางแผนการป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยก่อนการปลูกพืชมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลได้อย่างถูกต้อง ยังมีความจำเป็นต่อการพัฒนาพันธุ์พืชต้านทานต่อไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดอีกด้วย ไส้เดือนฝอยรากแผลสามารถจำแนกชนิดได้โดยใช้ ลักษณะต่างๆ เช่น จำนวน annuli บนริมฝีปาก การมีหรือไม่มี spermatheca ลักษณะของ spermatheca การมีหรือไม่มีตัวเต็มวัยเพศผู้ จำนวนและลักษณะของเส้นข้างลำตัว และลักษณะของหาง (Handoo and Golden, 1989; Loof, 1991) ลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากแผลมักจะมี ความแปรปรวน ทำให้การจำแนกไส้เดือนฝอยรากแผล ต้องใช้ตัวอย่างตัวเต็มวัยเพศเมียหลายตัวอย่าง ปัจจุบันมีการนำเทคนิคด้านอนุชีววิทยามาช่วยในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากแผล จึงควรนำมาทดสอบกับประชากรไส้เดือนฝอยในประเทศไทย การทดลองนี้เป็น การนำเทคนิคด้านอนุชีววิทยามาใช้ในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลสกุล *Pratylenchus* ในแปลงปลูกหอมแดงในประเทศไทย เพื่อให้ได้ข้อมูลชนิดและการแพร่กระจายในปัจจุบันที่มีความถูกต้อง แม่นยำ สำหรับนำไปใช้ประโยชน์ด้านการส่งออกหอมแดง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และวิธีการ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องปั่นเหวี่ยง สไลด์ กระจกปิด สไลด์ ถ้วยนับตัวอย่าง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ microcentrifuge tube, pcr tube, pipette tip, ชุด kit สำหรับสกัดดีเอ็นเอ, agarose gel, gel star, pcr buffer, pcr mix

การเก็บตัวอย่างดินและแยกไส้เดือนฝอย

เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมแดง ได้แก่ จังหวัดศรีสะเกษ บุรีรัมย์ นครราชสีมา ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย อุตรดิตถ์ ราชบุรี กาญจนบุรี และ นครปฐม โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากพืชโดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 นิ้ว เก็บดินลึกประมาณ 20 เซนติเมตร โดยสุ่มเก็บ 20 จุดต่อ 1 ตัวอย่าง บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ วันที่และสถานที่เก็บตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินโดยวิธีการกวนตัวอย่างดินหนัก 250 กรัมในน้ำ และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่าง และนำตัวอย่างไส้ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจสอบไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เชื้อไส้เดือนฝอยรากแผลใสในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย DESS solution (Yoder *et al.*, 2006) เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป เชื้อไส้เดือนฝอยอีกส่วนหนึ่งไปทำสไลด์ถาวร เพื่อนำไปจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

ฆ่าไส้เดือนฝอยโดยใช้ความร้อนและคงสภาพใน TAF solution (Seinhorst, 1959) ทำสไลด์ถาวร (Cobb's Slide) ของไส้เดือนฝอย โดยเตรียมไส้เดือนฝอยให้อยู่ใน anhydrous glycerine โดยวิธีของ Hooper and Evans (1993) จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน (morphology) และวัดขนาดสัดส่วนของไส้เดือนฝอย (morphometrics) บันทึกภาพ และจำแนกชนิดโดยใช้คู่มือแนวทางการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลตาม Castillo and Vovlas, 2007

การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เชื้อไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว 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 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 6 นาที ถ้าเตาไมโครเวฟเป็นชนิด 750 วัตต์ (สามารถปรับเวลาตามกำลังไฟของเตาไมโครเวฟให้ได้ 4,500 วัตต์-นาที ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม)

การตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง (specific primers)

ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง (specific primers) กับชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลที่มีอยู่หลายชนิด (ตารางที่ 1) ในการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผล โดยเพิ่มปริมาณ DNA (DNA amplification) ในส่วน ITS1 และ ITS2 หรือ ส่วน D2-D3 expansion region ของ large subunit rDNA (Al-Banna *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2007; Uehara *et al.*, 1998) โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา PCR ตามตารางที่ 2 ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใส่ GoTaq® Green Master Mix (Promega) 10 ไมโครลิตร forward และ reverse primer (ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ DNA template 1 ไมโครลิตร ในหลอด PCR ขนาด 0.5 ไมโครลิตร

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของ D2-D3 expansion region

ตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากแผลที่ไม่สามารถจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน และการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง จะนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วน ribosomal RNA gene (rDNA) ในส่วนของ D2-D3 expansion region เพิ่มปริมาณ DNA ในส่วน D2-D3 expansion region โดยใช้ 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) โดย Baldwin *et al.*, (1997) สภาวะปฏิกิริยา PCR ที่ใช้เริ่มจาก hot start ที่ 94°C เป็นเวลา 7 นาที amplification cycle จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย denature ที่ 94°C เวลา 1 นาที annealing ที่ 50°C เวลา 1 นาที และ extension ที่ 72°C เวลา 1 นาที เมื่อจบ amplification cycle แล้ว ตามด้วย final extension ที่ 72°C เวลา 10 นาที

ผลผลิตปฏิกิริยา PCR จาก D2-D3 expansion region จะนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA โดยตรง (direct sequencing) ทั้ง 2 ทิศทางโดยใช้ทั้ง forward และ reverse primers โดยทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วย Qiagen QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) หรือ ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-Up (Affymetrix) โดยใช้วิธีการตามคำแนะนำที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เตรียมตัวอย่างตามคำแนะนำและส่งตัวอย่างไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล

การบันทึกข้อมูล

บันทึกจำนวนตัวอย่างดินที่เก็บ ขนาดพื้นที่ปลูก พิกัดทางภูมิศาสตร์ และ จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบไส้เดือนฝอย *Pratylenchus* spp. รวมทั้งปริมาณไส้เดือนฝอย *Pratylenchus* spp. ที่ตรวจพบในตัวอย่าง บันทึกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่นที่ตรวจพบในตัวอย่าง บันทึกข้อมูลการจำแนกชนิดด้านสัตวศาสตร์ และอนุชีววิทยา

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

วิเคราะห์ชนิด และการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากแผลแต่ละชนิดในแหล่งปลูกหอมแดง

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมแดง จ. กาญจนบุรี จ. ราชบุรี จ. ตาก จ. แม่ฮ่องสอน จ. เชียงราย จ. เชียงใหม่ จ. อุดรธานี จ. ลำพูน จ. นครราชสีมา จ. ศรีสะเกษ จ. บุรีรัมย์ และ จ. อุบลราชธานี รวม 97 ตัวอย่าง บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ (ตารางที่ 3) แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผล ได้ตัวอย่างที่มีไส้เดือนฝอยรากแผลจำนวน 12 ตัวอย่าง นำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากแผลโดยปลูกข้าวโพดลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากแผล และสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยรากแผลที่เลี้ยงได้ ตรวจดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยรากแผลด้วยวิธี PCR โดยใช้คูไพรเมอร์ D2A/D3B และคูไพรเมอร์จำเพาะ พบว่าตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากแผลให้ผลบวกกับคูไพรเมอร์จำเพาะสำหรับ *Pratylenchus brachyurus* 1 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 28S rDNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Pratylenchus delattrei* และ *Pratylenchus brachyurus*

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมแดง รวม 97 ตัวอย่าง ได้ตัวอย่างที่มีไส้เดือนฝอยรากแผลจำนวน 12 ตัวอย่าง ตรวจดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยรากแผล พบว่าตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากแผลให้ผลบวกกับคูไพรเมอร์จำเพาะสำหรับ *Pratylenchus brachyurus* 1 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 28S rDNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Pratylenchus delattrei* และ *Pratylenchus brachyurus*

เอกสารอ้างอิง

- 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.
- 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.
- Handoo, Z.A. and A.M. Golden. 1989. A key and diagnostic compendium to the species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (lesion nematode). *Journal of Nematology* 21:202-218.
- Hooper, D.J. and K. Evans. 1993. Extraction, identification and control of plant parasitic nematodes. In *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture* (K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster. Eds.). pp. 1-59. Wallingford, UK. CAB International.
- Loof, P.A.A. 1991. The family Pratylenchidae Thorne, 1949. In "Manual of Agricultural Nematology" (W.R. Nickle, ed.):363-421, Deckker, NY.
- Machado, A.C.Z., L.C.C.B. Ferraz and C.M.G. Oliveira. 2007. Development of a Species-Specific Reverse Primer for the Molecular Diagnostic of *Pratylenchus brachyurus*. *Nematropica* 37:249-257.
- 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(4): 381-383.
- Seinhorst, J. W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* (4) 67-69.
- Uehara, T., T. Mizukubo, A. Kushida and Y. Momota. 1998. Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA. *Nematologica* 44:357-368.
- Waeyenberge, L., A. Ryss, M. Moens, J. Pinochet and T.C. Vrain, 2000. Molecular characterization of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. *Nematology* 2:135-142.
- Yoder, M., I. Tandingan De Ley, I. Wm. King, M. Mundo-Ocampo, J. Mann, M. Blaxter, L. Poiras and P. De Ley. 2006. DESS: A versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology* 8(3):367-376.

ตารางที่ 1 โพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Species	Forward primer		Reverse primer		Reference
<i>P. brachyurus</i>	18S	5- TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT -3	ACM7R	5- GCW CCA TCC AAA CAA YGA G -3	Machado <i>et al.</i> (2007)
<i>P. coffeae</i>	Pc1	5- ATG CGC ACA TTG CAT TCA GC -3	Pc2	5- GAG CGA GAA ACA CCT CTC AC -3	Uehara <i>et al.</i> (1998)
<i>P. loosi</i>	PL1	5- CAG TCA GCT AGC TGC TGG AT -3	PL2	5- ATG AGA GCA TAG TCG CTG TG -3	Uehara <i>et al.</i> (1998)
<i>P. neglectus</i>	PNEG	5- ATG AAA GTG AAC ATG TCC TC -3	D3B	5- TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3	Al-Banna <i>et al.</i> (2004)
<i>P. penetrans</i>	PPEN	5- TAA AGA ATC CGC AAG GAT AC -3	D3B	5- TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3	Al-Banna <i>et al.</i> (2004)
<i>P. scribneri</i>	PSCR	5- AAA GTG AAC GTT TCC ATT TC -3	D3B	5- TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3	Al-Banna <i>et al.</i> (2004)
<i>P. thornei</i>	PTHO	5- GAA AGT GAA GGT ATC CCT CG -3	D3B	5- TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3	Al-Banna <i>et al.</i> (2004)
<i>P. vulnus</i>	PVUL	5- GAA AGT GAA CGC ATC CGC AA -3	D3B	5- TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3	Al-Banna <i>et al.</i> (2004)
D2-D3	D2A	5- ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3	D3B	5- TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3	Baldwin <i>et al.</i> (1997)

ตารางที่ 2 สภาวะปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในการทดลอง

	hot start	denature	annealing	extension	final extension
<i>P. coffeae</i>	95°C 11 นาที 45 วินาที	95°C 30 วินาที	66°C เวลา 2 นาที	72°C 5 นาที	72°C 5 นาที
<i>P. loosi</i>	95°C 11 นาที 45 วินาที	95°C 30 วินาที	66°C เวลา 2 นาที	72°C 5 นาที	72°C 5 นาที
<i>P. neglectus</i>	95°C 3 นาที	95°C 1 นาที	63°C 1 นาที	72°C 1 นาที	72°C 7 นาที
<i>P. penetrans</i>	95°C 3 นาที	95°C 1 นาที	62°C 1 นาที	72°C 1 นาที	72°C 7 นาที
<i>P. scribneri</i>	95°C 3 นาที	95°C 1 นาที	63°C 1 นาที	72°C 1 นาที	72°C 7 นาที
<i>P. thornei</i>	95°C 3 นาที	95°C 1 นาที	68°C 1 นาที	72°C 1 นาที	72°C 7 นาที
<i>P. vulnus</i>	95°C 3 นาที	95°C 1 นาที	68°C 1 นาที	72°C 1 นาที	72°C 7 นาที
D2-D3	94°C 7 นาที	94°C 1 นาที	50°C 1 นาที	72°C 1 นาที	72°C 10 นาที

ตารางที่ 3 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดิน จำนวน 97 ตัวอย่าง

ลำดับที่	พื้นที่สำรวจ	ผลการสำรวจ
1	ตำบลแม่ณะ อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
2	ตำบลศรีดงเย็น อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
3	ตำบลศรีดงเย็น อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
4	ตำบลศรีดงเย็น อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
5	ตำบลหนองบัว อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
6	ตำบลหนองบัว อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
7	ตำบลบ่งคำ อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
8	ตำบลศรีดงเย็น อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
9	ตำบลศรีดงเย็น อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
10	ตำบลศรีดงเย็น อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
11	ตำบลแม่ฮอน อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
12	ตำบลแม่สุน อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
13	ตำบลโป่งน้ำร้อน อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
14	ตำบลหมอนปิน อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
15	ตำบลสันทราย อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
16	ตำบลสันทราย อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
17	ตำบลแม่คะ อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
18	ตำบลแม่คะ อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
19	ตำบลศรีดงเย็น อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
20	ตำบลแม่แฝก อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
21	ตำบลบ่อสาลี อำเภอสอด จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
22	ตำบลบ่อสาลี อำเภอสอด จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
23	ตำบลแม่เจดีย์ อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
24	ตำบลแม่เจดีย์ อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
25	ตำบลแม่เจดีย์ อำเภอลำปาง จังหวัดเชียงใหม่	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
26	ตำบลแม่พริก อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
27	ตำบลแม่ณาเต็ง อำเภอป่าสัก จังหวัดแม่ฮ่องสอน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
28	ตำบลแม่ณาเต็ง อำเภอป่าสัก จังหวัดแม่ฮ่องสอน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
29	ตำบลถ้ำลอด อำเภอปางมะผ้า จังหวัดแม่ฮ่องสอน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
30	ตำบลห้วยโป่ง อำเภอเมือง จังหวัดแม่ฮ่องสอน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล

ตารางที่ 3 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดิน จำนวน 97 ตัวอย่าง (ต่อ)

ลำดับที่	พื้นที่สำรวจ	ผลการสำรวจ
31	ตำบลห้วยโป่ง อำเภอมะนัง จังหวัดแม่ฮ่องสอน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
32	ตำบลห้วยโป่ง อำเภอมะนัง จังหวัดแม่ฮ่องสอน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
33	ตำบลเมืองปอน อำเภอขุนยวม จังหวัดแม่ฮ่องสอน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
34	ตำบลเมืองปอน อำเภอขุนยวม จังหวัดแม่ฮ่องสอน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
35	ตำบลเมืองปอน อำเภอขุนยวม จังหวัดแม่ฮ่องสอน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
36	ตำบลแม่ลาหลวง อำเภอแม่ลาน้อย จังหวัดแม่ฮ่องสอน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
37	ตำบลแม่ลาน้อย อำเภอแม่ลาน้อย จังหวัดแม่ฮ่องสอน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
38	ตำบลม่วงน้อย อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
39	ตำบลแม่แรง อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
40	ตำบลแม่แรง อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
41	ตำบลบ้านเรื่อน อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
42	ตำบลทุ่งหัวช้าง อำเภอทุ่งหัวช้าง จังหวัดลำพูน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
43	ตำบลตะเคียนปม อำเภอทุ่งหัวช้าง จังหวัดลำพูน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
44	ตำบลเหล่ายาว อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
45	ตำบลเหล่ายาว อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
46	ตำบลป่าพลู อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
47	ตำบลช่องแคบ อำเภอพบพระ จังหวัดตาก	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
48	ตำบลรวมไทยพัฒนา อำเภอพบพระ จังหวัดตาก	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
49	ตำบลช่องแคบ อำเภอพบพระ จังหวัดตาก	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
50	ตำบลพบพระ อำเภอพบพระ จังหวัดตาก	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
51	ตำบลชัยภูมิพล อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
52	ตำบลชัยภูมิพล อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
53	ตำบลฝายหลวง อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
54	ตำบลยางชุมน้อย อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
55	ตำบลยางชุมน้อย อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
56	ตำบลเมืองใต้ อำเภอเมือง จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
57	ตำบลเมืองน้อย อำเภอกันทรารมย์ จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
58	ตำบลละทาย อำเภอกันทรารมย์ จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
59	ตำบลบุสูง อำเภอวังหิน จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล

ตารางที่ 3 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดิน จำนวน 97 ตัวอย่าง (ต่อ)

ลำดับที่	พื้นที่สำรวจ	ผลการสำรวจ
60	ตำบลบุงสูง อำเภอวังหิน จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
61	ตำบลดวนใหญ่ อำเภอวังหิน จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
62	ตำบลหมากเขียบ อำเภอเมือง จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
63	ตำบลหมากเขียบ อำเภอเมือง จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
64	ตำบลเมืองคง อำเภอราชไห้ไล จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
65	ตำบลเมืองแคน อำเภอราชไห้ไล จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
66	ตำบลสัมปอ่ย อำเภอราชไห้ไล จังหวัดศรีสะเกษ	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
67	ตำบลถลุงเหล็ก อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
68	ตำบลพระครู อำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
69	ตำบลไทยสามัคคี อำเภอหนองหงส์ จังหวัดบุรีรัมย์	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
70	ตำบลไทยสามัคคี อำเภอหนองหงส์ จังหวัดบุรีรัมย์	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
71	ตำบลสระแก้ว อำเภอหนองหงส์ จังหวัดบุรีรัมย์	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
72	ตำบลสีมูม อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
73	ตำบลพลกรัง อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
74	ตำบลสร้างถ่อ อำเภอเขื่องใน จังหวัดอุบลราชธานี	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
75	ตำบลธาตุน้อย อำเภอเขื่องใน จังหวัดอุบลราชธานี	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
76	ตำบลแก้มอ้น อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
77	ตำบลแก้มอ้น อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
78	ตำบลแก้มอ้น อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
79	ตำบลด่านทับตะโก อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล
80	ตำบลบ้านคา อำเภอบ้านคา จังหวัดราชบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล
81	ตำบลหนองพันจันทร์ อำเภอบ้านคา จังหวัดราชบุรี	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
82	ตำบลท่าม่วง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล
83	ตำบลท่าม่วง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล
84	ตำบลท่าเรือ อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล
85	ตำบลวังศาลา อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
86	ตำบลวังกระต่าย อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล
87	ตำบลท่าม่วง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล
88	ตำบลท่าม่วง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล
89	ตำบลท่าม่วง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล

ตารางที่ 3 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างดิน จำนวน 97 ตัวอย่าง (ต่อ)

ลำดับที่	พื้นที่สำรวจ	ผลการสำรวจ
90	ตำบลท่าม่วง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
91	ตำบลท่าม่วง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล
92	ตำบลหลุมรั้ง อำเภอบ่อพลอย จังหวัดกาญจนบุรี	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
93	ตำบลหนองกร่าง อำเภอบ่อพลอย จังหวัดกาญจนบุรี	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
94	ตำบลหนองนกแก้ว อำเภอเลาขวัญ จังหวัดกาญจนบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล
95	ตำบลหนองนกแก้ว อำเภอเลาขวัญ จังหวัดกาญจนบุรี	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล
96	ตำบลจรเข้สามพัน อำเภออุ้มทอง จังหวัดสุพรรณบุรี	พบไส้เดือนฝอยรากแผล
97	ตำบลหนองงูเหลือม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม	ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล

พบไส้เดือนฝอยรากแผล 12 ตัวอย่าง

สรุปพื้นที่สำรวจ :

จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง
จังหวัดเชียงใหม่	22
จังหวัดเชียงราย	4
จังหวัดแม่ฮ่องสอน	11
จังหวัดลำพูน	9
จังหวัดอุตรดิตถ์	3
จังหวัดตาก	4
จังหวัดศรีสะเกษ	13
จังหวัดบุรีรัมย์	5
จังหวัดอุบลราชธานี	2
จังหวัดนครราชสีมา	2
จังหวัดราชบุรี	6
จังหวัดกาญจนบุรี	14
จังหวัดนครปฐม	1
จังหวัดสุพรรณบุรี	1
รวม	97