

## อนุกรมวิธานและความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย migratory endoparasitic nematodes

### Taxonomy and pathogenicity of migratory endoparasitic nematodes

ไตรเดช ช่างทอง ธิติยา สารพัฒน์ มนตรี เอี่ยมวิมังสา

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

#### รายงานความก้าวหน้า

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรากพืชในพื้นที่ปลูกพืชภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ จำนวน 113 ตัวอย่างตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* จำนวน 34 ตัวอย่าง เพิ่มจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยโดย นำตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยใส่ลงในกระถางพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว และปลูกข้าวโพดเป็นระยะเวลา 45 วัน แยกไส้เดือนฝอยที่ได้ออกจากรากข้าวโพด และเลี้ยงไส้เดือนฝอยจากตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีไข่ 1 ตัวบนชิ้นแครอทที่สำเร็จจำนวน 6 ตัวอย่าง การเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนชิ้นแครอทประสบปัญหาในการเตรียมชิ้นแครอทที่ปลอดเชื้อ และเปอร์เซ็นต์ที่เลี้ยงไส้เดือนฝอยจากตัวเต็มวัย 1 ตัวได้สำเร็จอยู่ในระดับต่ำ ได้แก้ไขโดยเปลี่ยนวิธีการเลี้ยง โดยการเลี้ยงบนรากข้าวโพดบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งพบว่าได้ผลดีกว่าการเลี้ยงบนชิ้นแครอท และสามารถ sub-culture ได้ง่าย ซึ่งในปี 2555 จะใช้การเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนรากข้าวโพดในสภาพปลอดเชื้อ และเมื่อได้ไส้เดือนฝอยแล้วจะทำสไลด์ถาวรและจำแนกชนิดต่อไป

#### คำนำ

Migratory endoparasitic nematodes เป็นไส้เดือนฝอยชนิดที่เข้าสู่รากพืช ดูดกินอาหารและเคลื่อนที่ภายในรากพืช ไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ไม่ชักนำให้เซลล์รากพืชเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นแหล่งอาหาร (Feeding Site) เหมือนกับไส้เดือนฝอยรากปม (Root-knot Nematodes) หรือไส้เดือนฝอยซีสต์ (Cyst Nematodes) แต่จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อของรากในส่วน Cortex Parenchyma เป็นหลัก โดยดูดกินอาหารจากเซลล์และเคลื่อนที่ภายในรากพืช การเคลื่อนที่และดูดกินอาหารดังกล่าวทำให้รากเป็นโพรง เกิดแผลสีน้ำตาล ในบางกรณีรากอาจถูกเชื้อโรคอื่นๆ เข้าทำลายซ้ำเติม ต้นพืชที่ระบบรากถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายจะมีอาการแคระแกรน ต้นโทรม ใบเหลือง ผลผลิตลดลง *Pratylenchus* และ *Radopholus* เป็นไส้เดือนฝอยสกุลที่สำคัญของไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ ซึ่งโดยทั่วไปเป็นไส้เดือนฝอยที่มีพืชอาศัยกว้าง อย่างไรก็ตามไส้เดือนฝอยชนิดต่างๆ จะมีความสำคัญ และทำความเสียหายต่อพืช

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-09-54

แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป เช่น *P. coffeae* และ *P. goodeyi* เป็นศัตรูที่สำคัญของกล้วย (Gowen et al., 2005) *P. coffeae*, *P. brachyurus*, *P. goodeyi*, *P. pratensis*, *P. loosi*, *P. panamaensis*, *P. zae* and *P. vulnus* เป็นศัตรูของกาแฟ (Campos and Villain, 2005) *P. penetrans* ทำลายพืชได้มากเกือบ 400 ชนิด (Evans et al., 1993) ไร้เดือนฝอยรากโพรง *Radopholus similis* สามารถทำลายพืชได้มากกว่า 250 ชนิด (O'Bannon, 1977) จำนวนไร้เดือนฝอย *R. similis* เริ่มต้นเพียง 10 ตัว สามารถสร้างความเสียหายแก่ต้นหน้าวัวได้ (Sipes and Lichty, 2002) การทดลองนี้เป็นการรวบรวมไร้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* เป็นหลัก ปัจจุบันไร้เดือนฝอยรากแผลได้ถูกจำแนกแล้วมากกว่า 60 ชนิด มีรายงานการพบไร้เดือนฝอยรากแผล *P. brachyurus*, *P. coffeae*, *P. zae*, *P. vulnus*, *P. minyus*, *P. delattrei*, *P. nongkiensis*, *P. sudanensis*, *P. thornei* และ *Pratylenchus* spp. ในแหล่งปลูกพืชของประเทศไทย (Chunram, 1972; Pliansinchai and Boonduang, 1978; Pliansinchai and Boonduang, 1986) ข้อมูลของไร้เดือนฝอยรากแผลในประเทศไทยค่อนข้างเก่า ซึ่งปัจจุบันการจำแนกชนิดไร้เดือนฝอยรากแผลได้เปลี่ยนไป ทำให้ชนิดของไร้เดือนฝอยรากแผลในปัจจุบันแตกต่างจากข้อมูลในอดีต การศึกษาการจำแนกชนิดของไร้เดือนฝอยกลุ่มนี้จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อปรับปรุงฐานข้อมูลให้มีความทันสมัย นอกจากนี้ข้อมูลด้านผลกระทบต่อพืชของไร้เดือนฝอยกลุ่มนี้ยังมีไม่มากนัก การศึกษาถึงความสามารถในการทำให้เกิดโรคต่อพืชของไร้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* ทำให้ทราบถึงข้อมูลในการเข้าทำลายพืช ความเสียหายที่ไร้เดือนฝอยกระทำต่อพืช ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการจัดการไร้เดือนฝอยในสกุลนี้ต่อไป

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์และวิธีการ

การดำเนินงานในปีงบประมาณ 2554 เป็นการเก็บตัวอย่างดิน จากแหล่งปลูกพืชชนิดต่างๆ ในประเทศไทย เพื่อตรวจหาไร้เดือนฝอย ทำการคงสภาพไร้เดือนฝอย และทำสไลด์ถาวร จำแนกชนิดของไร้เดือนฝอย รวมทั้งเพิ่มจำนวนไร้เดือนฝอยในพืชอาศัย เพื่อให้ได้จำนวนประชากรของไร้เดือนฝอยมากพอในการศึกษาด้านชีววิทยาต่อไป

#### การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินและรากพืชจากแปลงปลูกพืชในจังหวัดต่างๆ ทั้งพืชล้มลุกและพืชยืนต้นโดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 นิ้ว เก็บดินลึกประมาณ 20 เซนติเมตร โดยสุ่มเก็บจำนวน 20 จุดต่อ 1 ตัวอย่าง บันทึกวันที่เก็บตัวอย่าง ชนิดพืช บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

#### การแยกไร้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและการเลี้ยงเพิ่มจำนวนไร้เดือนฝอย

แยกไร้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินโดยวิธีการล้างตัวอย่างดิน และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่าง และนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรง

ในลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจไล่เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ นำตัวอย่างดินที่ตรวจพบไล่เดือนฝอย *Pratylenchus* ใส่ลงในกระถางพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว และปลูกข้าวโพด เพื่อเพิ่มจำนวนประชากรไล่เดือนฝอย เป็นระยะเวลา 45 วัน เตรียมชิ้นแครอท (Carrot disc) ที่ปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการเลี้ยงไล่เดือนฝอย โดยการฆ่าเชื้อที่ผิวแครอท ด้วยการพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70% นำแครอทไปเผาไฟจนผิวด้านนอกไหม้เกรียม ใช้มีดที่สะอาดปกเปลือกแครอทและหั่นตามขวางหนาประมาณ 0.7 เซนติเมตร วางลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร แยกไล่เดือนฝอย ออกจากรากข้าวโพดโดยวิธี Baermann's Tray Technique นำไล่เดือนฝอยที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่ผิว โดยการเขี่ยตัวเต็มวัยเพศเมียของไล่เดือนฝอยที่มีไข่ใส่ลงใน streptomycin sulfate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3-6 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเย็บที่สะอาด เขี่ยตัวเต็มวัยเพศเมียของไล่เดือนฝอยที่มีไข่ วางลงบนชิ้นแครอทที่เตรียมไว้ ชิ้นละ 1 ตัว นำไล่เดือนฝอยที่ได้จากชิ้นแครอทไปทำสไลด์ถาวร

### เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2558

กลุ่มงานไล่เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในปี 2554 ทำการเก็บตัวอย่างดินจำนวนทั้งสิ้น 113 ตัวอย่าง ตรวจพบไล่เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* 34 ตัวอย่าง เลี้ยงไล่เดือนฝอยจากตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีไข่ 1 ตัวบนชิ้นแครอทได้สำเร็จ 6 ตัวอย่าง ซึ่งการเลี้ยงไล่เดือนฝอยบนชิ้นแครอทประสบปัญหาในการเตรียมชิ้นแครอทที่ปลอดเชื้อ เนื่องจากแครอทที่ซื้อมาจากตลาดส่วนใหญ่มีแบคทีเรียอยู่ภายใน ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อขึ้นในภายหลัง นอกจากนี้การเลี้ยงไล่เดือนฝอยจากตัวเต็มวัยเพียง 1 ตัว ใช้เวลานาน สภาพของชิ้นแครอทที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้ออาจเปลี่ยนไป ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของไล่เดือนฝอย ทำให้ไล่เดือนฝอยตายในที่สุด การเลี้ยงไล่เดือนฝอยบนชิ้นแครอทตรวจสอบการเจริญเติบโตของไล่เดือนฝอยได้ยาก ต้องรอจนกระทั่งไล่เดือนฝอยมีจำนวนมากพอที่จะสังเกตเห็นได้ ได้แก่ปัญหาโดยการเลี้ยงไล่เดือนฝอยบนรากข้าวโพด บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งประสบผลสำเร็จมากกว่า และสามารถตรวจดูการเจริญเติบโตของไล่เดือนฝอยและ sub-culture ได้ง่าย ดังนั้นในปี 2555 จะใช้การเลี้ยงไล่เดือนฝอย *Pratylenchus* บนรากข้าวโพดแทน ซึ่งทำได้ง่ายกว่า และคาดว่าจะมีเปอร์เซ็นต์การเลี้ยงที่สำเร็จเพิ่มมากขึ้น ในปี 2554 ได้เก็บตัวอย่างดินจากรากกล้วย เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งโดยปกติดินบริเวณรากกล้วยมักจะพบไล่เดือนฝอย *Pratylenchus* จึงเน้นการเก็บดินจากรากกล้วยก่อน เพื่อให้โอกาสในการตรวจพบไล่เดือนฝอย *Pratylenchus* มากขึ้น ในปี 2555 จะเก็บตัวอย่างดินจากพืชหลายชนิดมากขึ้น

### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ทำการเก็บตัวอย่างดินจำนวนทั้งสิ้น 113 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* 34 ตัวอย่าง เลี้ยงไส้เดือนฝอยจากตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีไข่ 1 ตัวบนชิ้นแครอทได้สำเร็จ 6 ตัวอย่าง

### เอกสารอ้างอิง

- Campos, V.P., and L. Villain. 2005. Nematode parasites of coffee and cocoa. Pp. 529-579. in Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, 2<sup>nd</sup> edition. M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge, eds. CAB International.
- Chunram, C. 1972. A list of plant parasitic nematodes in Thailand. Plant Protection Service Technical Bulletin No.1 Pp. 23-26. The Plant Industry Division. Ministry of Agriculture, Thailand.
- Evans, K., D.L. Trudgill, and J.M. Webster. 1993. Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. Pp. 648. CAB International. Wallingford, UK.
- Gowen, R.S., P. Quénéhervé, and R. Fogain. 2005. Nematode parasites of bananas and plantains. Pp. 611-643. in Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture, 2nd edition. M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge, eds. CAB International.
- O'Bannon, J.H. 1977. Worldwide dissemination of *Radopholus similis* and its importance in crop production. Journal of Nematology 9:16-25.
- Pliansinchai, U., and A. Boonduang. 1978. A systematic study of plant parasitic nematodes of Black pepper in Thailand. Nematology Section Technical Bulletin No.2 Pp. 22-30. Plant Pathology Division, Department of Agriculture, Thailand.
- Pliansinchai, U., and A. Boonduang. 1986. A systematic study of plant parasitic nematodes of Sugarcane in Thailand. Nematology Section Technical Bulletin No.5 Pp. 48-61. Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Thailand.
- Sipes, B.S., and J.S. Lichty. 2002. *Radopholus similis* damage to *Anthurium andraeanum*. Nematropica 32:77-81.