

วงจรชีวิตของ *Meloidogyne incognita* ใน พริกพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ

Life Cycle of *Meloidogyne incognita* in Resistant and Susceptible Chili Varieties

วรลักษณ์ สุปิณะ^{1/} นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด^{2/} และ วราภรณ์ ประกอบ^{1/}
Waraluk Supina^{1/} Nuchanart Tangchitsomkid^{2/} and Waraporn Prakob^{1/}

Abstract: Life cycle of *Meloidogyne incognita* in resistant chili variety, POP was compared with the susceptible variety, Hua Ruea by observing and comparing the rate of growth and development between the first and the second generations of second stage juveniles (J2). The results show that the second stage juveniles initially infected root caps of chili cultivar POP and Hua Ruea in 4.67 days and 19.33 hours, respectively, after nematode inoculation. In addition, the development times from the first to second generation were 42.33 days for cultivar POP and 26.66 days for cultivar Hua Ruea. The numbers of nematodes infecting root system were 31.67 for POP and 102 for Hua Ruea.

Keywords: Chili, *Meloidogyne incognita*, life cycle, root-knot disease

^{1/}ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาอภินิหารพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

^{1/}Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

^{2/}Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok 10900

บทคัดย่อ: จากการศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในพริกพันธุ์ด้านทานคือพันธุ์ POP เปรียบเทียบกับในพริกพันธุ์อ่อนแอต่อพันธุ์หัวเรือ โดยตรวจวิเคราะห์ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญจากตัวอ่อนระยะที่ 2 รุ่นที่หนึ่งไปเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 อีกรุ่นหนึ่ง ผลการทดลองพบว่า ตัวอ่อนระยะที่ 2 เริ่มเข้าทำลายบริเวณหมวกรากพริกพันธุ์ POP และพริกพันธุ์หัวเรือ หลังจากการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย 4.67 วัน และ 19.33 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญจากตัวอ่อนระยะที่ 2 รุ่นแรกไปเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 อีกรุ่นหนึ่งในพริกพันธุ์ POP ใช้เวลาทั้งหมด 42.33 วัน ในพันธุ์หัวเรือใช้เวลาเพียง 26.66 วัน โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้ารากพริกพันธุ์ POP ทั้งหมด 31.67 ตัว และพันธุ์หัวเรือ 102 ตัว

คำสำคัญ: พริก, *Meloidogyne incognita* วงจรชีวิต โรครากปม

คำนำ

พริกจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ มีการส่งออกทั้งในลักษณะผลผลิตสดและแปรรูป ในปี พ.ศ. 2549 พบการระบาดของไส้เดือนฝอยสาเหตุของโรครากปม (*Meloidogyne* spp.) อย่างรุนแรงในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี สร้างความเสียหายต่อผลผลิตและคุณภาพ 50-100 เปอร์เซ็นต์ และจนถึงปัจจุบันบางพื้นที่ไม่สามารถปลูกพริกได้ เนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของประชากรไส้เดือนฝอย และแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วในสภาพดินร่วนปนทราย ปัญหาดังกล่าวก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะในกลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกพริกเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง และในอนาคตไส้เดือนฝอยรากปมสามารถที่จะแพร่ระบาดไปยังพื้นที่อื่น ๆ ถ้าไม่มีการป้องกันกำจัดอย่างถูกวิธี (นุชนารถ และ วราภรณ์, 2551) การควบคุมโรครากปมสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเตรียมกล้าพริกในดินที่สะอาดไม่มีไส้เดือนฝอยระบาด การปลูกพืชหมุนเวียน การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ รวมทั้งการใช้สารเคมี (สืบศักดิ์, 2541) อย่างไรก็ตามถึงแม้การใช้สารเคมีจะให้ผลในการควบคุมการแพร่ระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดี แต่การใช้สารเคมีส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม มนุษย์และสัตว์อย่างมาก เช่น สารพิษตกค้างในผลผลิต ไส้เดือนฝอยคือต่อสารเคมี และยังพบว่าสารเคมีที่ใช้ในกำจัดส่งผลให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในดินลดปริมาณลงอีกด้วย ปัจจุบันจึงต้องเลือก

ใช้แนวทางใหม่ในการป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยที่ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม มนุษย์และสัตว์น้อยที่สุด พบว่าการใช้พันธุ์ด้านทาน เป็นแนวทางทางที่ดีที่สุดในการควบคุมไส้เดือนฝอยได้ (Richard and Judy, 2007) โดยลดจำนวนประชากรของไส้เดือนฝอยลง ซึ่งการใช้พันธุ์ด้านทานมีความเฉพาะเจาะจงต่อชนิดของไส้เดือนฝอยไม่ทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ สามารถใช้ได้กับทุกพื้นที่ที่พบการระบาด และไม่ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและมนุษย์

จุดประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คือ ศึกษาวงจรชีวิตไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) ที่เข้าทำลายภายในรากพริกของพันธุ์ด้านทาน (พันธุ์ POP) เปรียบเทียบกับพันธุ์หัวเรือซึ่งอ่อนแอต่อโรครากปม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* บริสุทธิ์** เก็บรากปมพริกจากแหล่งปลูกสำคัญ นำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการโดยวิธีตัดรีย่อยส่วนก้น (perineal pattern) จากนั้นเตรียมไส้เดือนฝอยรากปมบริสุทธิ์โดยวิธี single egg mass inoculation โดยแยกกลุ่มไข่ (egg-mass) ออกมาจากตัวไส้เดือนฝอยเพศเมียตัวเต็มวัยที่อยู่ในรากพืช โดยใช้ไม้ปลายแหลมเขี่ยกลุ่มไข่ให้หลุดออกมา จากนั้นย้ายทั้งกลุ่มไข่ไปแช่ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 3 วัน จนไข่

พักออกมาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 แล้วนำไปรดบริเวณรอบ ๆ ต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดำ อายุ 30 วันที่เตรียมไว้ โดยรดตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่พักจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม ต่อต้นมะเขือเทศ 1 ต้น ดูแลรดน้ำให้ปุ๋ย จนมะเขือเทศอายุครบ 60 วันทำการถอนต้นมะเขือเทศ แล้วล้างรากตรวจสอบการเกิดปมที่ราก เมื่อมีอาการรากปมเกิดขึ้นพร้อมกับกลุ่มไข่ ที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงนำตัวเต็มวัยเพศเมียไปวิเคราะห์ชนิดโดยดูลักษณะของรูปร่างย่นส่วนกัน จากนั้นขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *M. incognita* บริสุทธิ์ในมะเขือเทศให้เพียงพอต่อการทดสอบ

2. การเตรียมกล้าพันธุ์พริก นำเมล็ดพริกพันธุ์ต้านทาน คือ พันธุ์ POP และพันธุ์หัวเรือซึ่งอ่อนแอต่อโรครากปมเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ เพาะในกระดาดยี่สิบชู่มน้ำ เป็นเวลา 3-4 วัน นำเมล็ดพริกที่งอกไปเพาะในดินพีทที่บรรจุในภาชนะชนิด 104 หลุม จำนวน 1-2 เมล็ด/หลุม นำไปตั้งวางในโรงกันแมลง เมื่อใบจริงงอก 1 คู่ ทำการใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จำนวน 1-2 เม็ด/ต้น และใส่ปุ๋ยสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จนได้กล้าพริกอายุครบ 30 วัน

3. การเตรียมไข่ไส้เดือนฝอย *M. incognita* นำรากมะเขือเทศพันธุ์สีดำที่เป็นปม และมีกลุ่มไข่มาแช่ใน 0.525% NaOCl เป็นเวลา 3.5 นาที ด้วยเครื่องเขย่า 300 รอบ/นาที กลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยจะหลุดออกจากวุ้นที่หุ้มไข่ จากนั้นนำไข่ไปผ่านตะแกรงสองขนาด 400 mesh เพื่อแยกเศษพืชออก โดยเปิดน้ำไหลผ่าน จากนั้นเก็บไข่ไส้เดือนฝอยโดยเทน้ำที่ผ่านจากตะแกรงขนาด 400 mesh ลงบนตะแกรงขนาด 500 mesh เก็บไข่โดยล้างส่วนที่ติดอยู่บนตะแกรงขนาด 500 mesh นี้ให้หมด นำไปนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วปรับความหนาแน่นให้ได้ $1,000 \pm 100$ ฟอง ต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร โดยนับเฉพาะไข่ที่สมบูรณ์และตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่พักแล้ว

4. การปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *M. incognita* ย้ายต้นกล้าพริกแต่ละสายพันธุ์ที่มีอายุ 30 วัน ปลูกในดินชนิดร่วนปนทรายหนึ่งช่อเชื้อ (อัตราส่วน ดิน : ทราย = 50 : 50) ในภาชนะชนิด 15 หลุม จากนั้นปลูกเชื้อตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะที่ 2 จำนวน 1,000 ตัว/ต้น ที่บริเวณรากพืช นำต้นพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อแล้วไปตั้งวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ $25 \pm 1^\circ\text{C}$

5. การตรวจวงจรชีวิต ทำการถอนต้นพริกที่ปลูกเชื้อแล้ว ทุก ๆ วัน จำนวน 3 ต้น/พันธุ์ จากนั้นนำรากพริกไปย้อมสีรากด้วย acid fuchsin (McBryde, 1936) ตรวจสอบการเข้าทำลายภายในรากพริกและนับจำนวนไส้เดือนฝอย *M. incognita* ระยะต่าง ๆ ภายใต้กล้องสเตอริโอ จนครบวงจรชีวิต

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอย มีลักษณะลำตัวทรงกระบอกขนาดเล็ก หัวและท้ายแหลม เริ่มเข้าทำลายบริเวณหมวกรากพริกพันธุ์ POP และพริกพันธุ์หัวเรือ ที่ 4.67 วัน และ 19.33 ชั่วโมงตามลำดับ จากตัวอ่อนระยะที่ 2 เจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 3 ได้เดือนฝอยเริ่มหยุดนิ่ง ไม่มีการเคลื่อนที่ไปยังเซลล์พืชอื่น ดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืช ลำตัวไส้เดือนฝอยเริ่มบวมพอง ลักษณะคล้ายไส้กรอก จากนั้นไส้เดือนฝอยเจริญเป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 และมีการเจริญเป็นทั้งตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย โดยตัวเต็มวัยเพศผู้จะเคลื่อนที่ออกจากราก ส่วนตัวเต็มวัยเพศเมียมีการสร้างกลุ่มไข่ (egg mass) ตรงบริเวณก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย ฝักพันธุ์ออกมาจากราก ภายใน 1 กลุ่มไข่ มีไข่จำนวน 200-500 ฟอง และไส้เดือนฝอยลอกคราบครั้งที่ 1 ภายในไข่และฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 อีกรุ่นหนึ่ง และเข้าทำลายรากพืชต่อไป ดังภาพที่ 1 โดยในพริกพันธุ์ POP การเจริญจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ไปเป็นเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 อีกรุ่นหนึ่ง ใช้เวลาทั้งหมด 42.33 วัน

โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้ารากทั้งหมด คือ 31.67 ตัว ขณะที่ในพริกพันธุ์หัวเรือใช้เวลาจนครบวงจรเพียง 26.66 วันโดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้ารากทั้งหมด คือ 102 ตัว (Table 1) มีรายงานการพบยีน *Me1* และ *Me3* ในพริกพันธุ์ต้านทาน ซึ่ง ยีน *Me1* และ *Me3* ทำให้พริกต้านทานต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. โดยกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา hypersensitive reaction (HR) ตรงบริเวณที่ไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย และ ชะลอการเกิดเซลล์ขนาดใหญ่ (giant cell) อีกด้วย (Bleve-Zacheo et al., 1998)

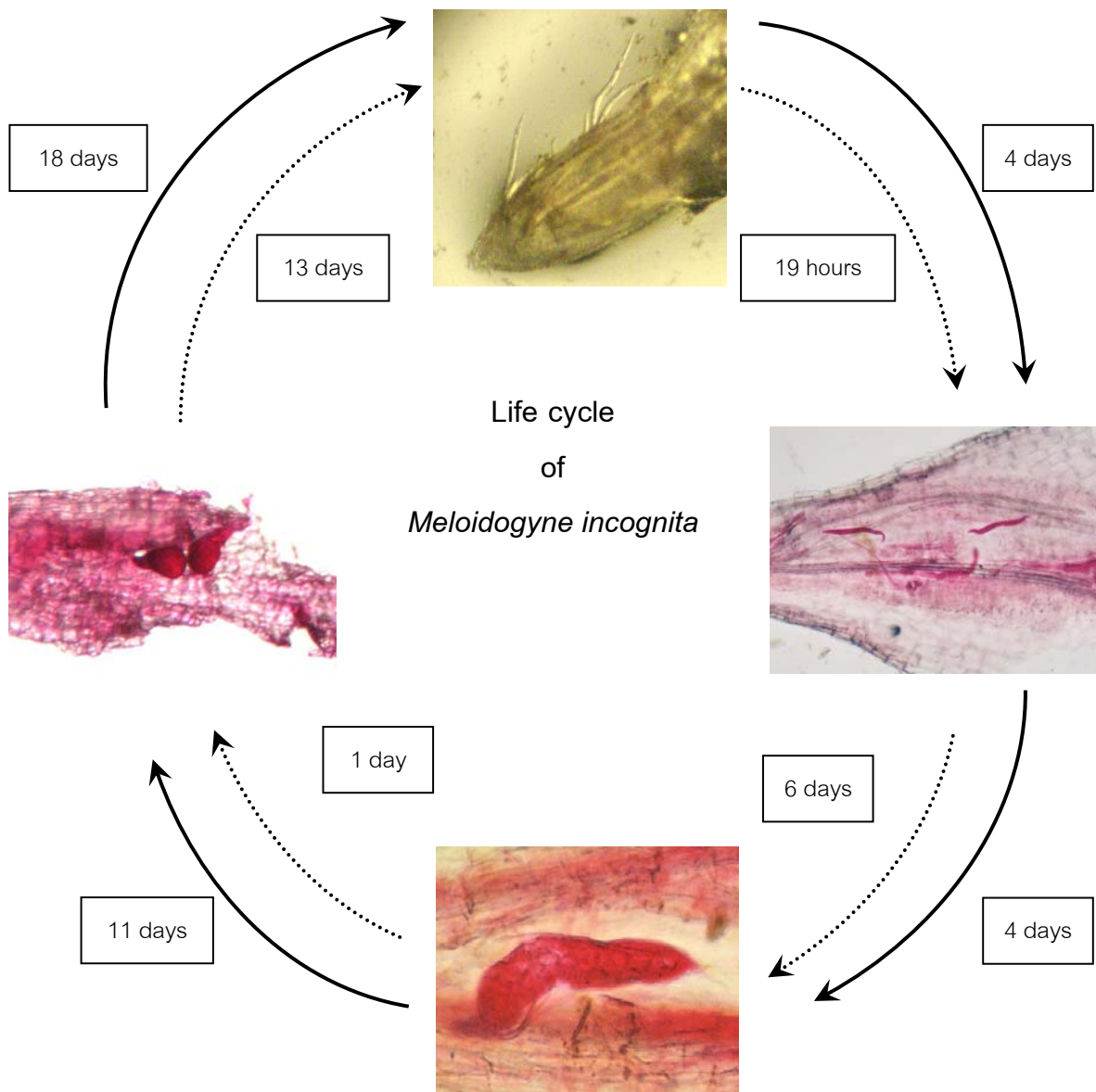


Figure 1 Life cycle of *Meloidogyne incognita* in root of chili resistant and susceptible to the nematode.

Table 1 Time required for each developmental stage and the number of *Meloidogyne incognita* observed within the root system of resistant and susceptible chili varieties.

Chili variety	Amount of time for each stage					Number of nematode
	J2	J3	J4	FEMALE	J2 (2 nd generation)	
POP	4.67 days	8.67 days	13.33 days	23.67 days	42.33 days	31.67
Hao Ruea	19 hrs. 33 min.	6.67 days	12.67 days	14.33 days	26.66 days	102

J2, J3, J4 = second, third, forth stage juvenile

นอกจากนั้นมีการศึกษาพบว่าการสร้างสารชีวโมเลกุลขึ้นมาหลังจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย ส่งผลต่อระยะเวลาที่มากขึ้นในการเจริญเป็นตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอยและจำนวนไส้เดือนฝอยในการเข้าทำลายพริกพันธุ์ต้านทานอีกด้วย (Pegard *et al.*, 2005)

นอกจากนั้นยังมีการศึกษาถึง *Mi* gene (Milligan *et al.*, 1998) ในมะเขือเทศพันธุ์ต้านทานต่อ *Meloidogyne* spp. พบการเกิดปฏิกิริยา Hypersensitive reaction (HR) หลังจากไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย 12 ชั่วโมง ส่งผลให้มีความรุนแรงในการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยลดลงเช่นกัน และยังพบว่าแสดงออกของ lectin (GNA) มีผลต่อการต้านทานไส้เดือนฝอย สามารถลดจำนวนรากปมลง 50% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Burrows and de Waele, 1997, Burrows *et al.*, 1998, Ripoll *et al.*, 2003)

จากการรายงานผลงานวิจัยดังกล่าว จึงเป็นไปได้ว่ายีนต้านทานภายในพืช มีผลต่อไส้เดือนฝอยในการเข้าทำลายรากพืช โดยมีการกระตุ้นให้เกิด hypersensitive reaction (HR) ตรงบริเวณที่ไส้เดือนฝอยเข้าทำลายส่งผลให้จำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายน้อยลง และยืดยาวระยะเวลาในการเจริญจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ไปเป็นตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอย งานวิจัยครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นถึงการเจริญของไส้เดือนฝอยรากปมในพริกพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ ในอนาคตควรมีการศึกษาถึงระดับชีวโมเลกุลเพื่อหายีนต้านทาน เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พริกให้สามารถต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* เปรียบเทียบระหว่างพริกพันธุ์ต้านทานคือ พันธุ์ POP และพริกพันธุ์อ่อนแอคือ พันธุ์หัวเรือ พบว่าไส้เดือนฝอยเริ่มเข้าทำลาย และเจริญเติบโตจนครบวงจรได้ในพันธุ์หัวเรือได้เร็วกว่า ในพันธุ์ POP นอกจากนั้นยังพบจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายพันธุ์หัวเรือได้มากกว่าพันธุ์ POP

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประจำปี พ.ศ.2551 และศูนย์พันธุ์และวิศวกรรมแห่งชาติ (สวทช) ภายใต้โครงการการคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริกต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม รหัสโครงการ BT-B-01-PT-34-5059

เอกสารอ้างอิง

- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ วราภรณ์ ประกอบ. 2551. เทคนิคการคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริกต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม. วารสารอารักขาพืช 2: 31-40.
- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2541. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช: โรคและการจัดการ. สำนักพิมพ์วิบูลย์กิจ, กรุงเทพฯ.

- Bleve-Zacheo, T., Bongiovanni, M. Melillo, M.T. and Castagnone-Sereno, P. 1998. The pepper resistance genes *Me1* and *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultrastructural changes upon nematode infection. *Plant Science* 133: 79–90.
- Burrows P. R. and D. de Waele, 1997. Engineering resistance against plant parasitic nematodes using anti-nematode genes. Pp 217-236. In: Fenoll, C, Grundler, F.M.W, Ohi, S.A, (eds.). *Cellular and Molecular Aspects of Plant-nematode Interactions*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Press.
- Burrows, P. R., A. D. P, Barker, Newell C. A. and Hamilton, W. D. O. 1998. Plant-derived enzyme inhibitors and lectins for resistance against plant-parasitic nematodes in transgenic crops. *Pesticide Science* 52: 176–183.
- McBryde, M.C. 1936. A method of demonstrating rust hyphae and haustoria in unsectioned leaf tissue. *Am. J. Bot.* 23: 686–689.
- Milligan, S. B., J. Bodeau, J. Yaghoobi, I. Kaloshian, P. Zabel, and V.M. Williamson, 1998. The root-knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell* 10: 1307–1319.
- Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P. and Djian-Caporalino, C. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95: 158–165.
- Richard, L. F. and Judy, A. T. 2007. TigerPaw-NR, a root-knot nematode-resistance, Habanero-type Pepper. *Hortscience* 42:1721-1722.
- Ripoll, C., Favory, B., Lecomte, P., Van Damme, E., Peumans, W., Abad, P. and Jouanin, L. 2003. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. *Plant Science* 164: 517–523.
-