

การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. บางไอโซเลตของไทย โดยเทคนิค PCR

Identification of Some Thai Isolates of Root-knot Nematodes *Meloidogyne* spp. by PCR Technique

ธนากร จันทร์มาลี^{1/} และ วราภรณ์ ประกอบ^{1/}
Thanakorn Chanmalee^{1/} and Waraporn Prakob^{1/}

Abstract: Ten isolates of root-knot nematodes were isolated from soil collected from epidemic area of provinces in northern and northeastern Thailand. The nematode populations were multiplied by planting the 30 days old tomato cultivar Seeda in each soil sample. Pure cultures of each root-knot nematode isolate were prepared by using the single egg-mass inoculation technique. Identification of the species of *Meloidogyne* spp. with perineal pattern of the mature female indicated that root-knot nematode isolates CM1, CM2, CM3, LP1 and LP2 were *M. incognita* whereas isolates LN1, LN2, UB1, UB2 and TK1 were *M. javanica*. Identification by using PCR technique with the use of primer pair 194/195 that is specific to tropical species (*M. incognita*, *M. arenaria* and *M. javanica*) and also primers that are specific to each species demonstrated that all ten isolates corresponds with the results from their perineal patterns. Therefore, it can be concluded that species identification of *Meloidogyne* spp. by the use of PCR technique is quick and accurate.

Keywords: Root-knot disease, *Meloidogyne* spp., identification, PCR technique

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

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

บทคัดย่อ: ไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ทั้งหมด 10 ไอโซเลทซึ่งแยกและเตรียมได้จากดินที่เก็บจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรครากปม บางจังหวัดในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพิ่มปริมาณไล่เดือนฝอยโดยการปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 30 วัน ลงในดินแต่ละตัวอย่าง จากนั้นเตรียมเชื้อบริสุทธิ์โดยเทคนิค single egg mass inoculation สำหรับนำไปจำแนกชนิดของไล่เดือนฝอยรากปมด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยาด้วยรูปแบบรอยย่นส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย จากผลการทดลองสามารถจำแนกชนิดไล่เดือนฝอยรากปมได้ดังนี้คือ ไอโซเลท CM1, CM2, CM3, LP1 และ LP2 เป็น *M. incognita* ขณะที่ไอโซเลท LN1, LN2, UB1, UB2 และ TK1 เป็น *M. javanica* จำแนกชนิดไล่เดือนฝอยรากปมด้วยเทคนิค PCR โดยอาศัยคู่ไพรเมอร์ 194/195 ซึ่งจำเพาะต่อไล่เดือนฝอยรากปมที่พบในเขตร้อนชื้น (*M. incognita*, *M. arenaria* และ *M. javanica*) และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไล่เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด พบว่า *Meloidogyne* ทั้ง 10 ไอโซเลท ให้ผลการจำแนกชนิดที่สอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะรูปแบบรอยย่นส่วนก้น จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการจำแนก *Meloidogyne* spp. โดยเทคนิค PCR สามารถทำได้รวดเร็ว และถูกต้อง

คำสำคัญ: โรครากปม *Meloidogyne* spp. การระบุชนิด เทคนิค PCR

คำนำ

ไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. จัดอยู่ใน order *Tylenchida*, family *Meloidogynidae*, sub family *Meloidogyninae*, genus *Meloidogyne* (Hirschmann, 1985) เป็นสาเหตุของโรครากปม (root-knot disease) ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชหลายชนิด รวมไปถึงพืชผลทางการเกษตรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย พบการแพร่ระบาดทั่วทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในเขตเพาะปลูกพืชผักในหลายจังหวัดทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ไล่เดือนฝอยรากปมเข้าทำลายรากพืชโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงและรบกวนระบบการลำเลียงน้ำและแร่ธาตุของพืช ทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง เกิดอาการเหลืองแคระแกรน เกิดอาการปมปมที่ราก นอกจากนี้การเข้าทำลายของไล่เดือนฝอยรากปมยังทำให้รากเกิดแผลซึ่งเป็นช่องทางที่เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชอื่น ๆ เข้าทำลายซ้ำ ทำให้อาการของโรครุนแรงมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันมีการจัดจำแนกไล่เดือนฝอยรากปมที่อยู่ใน genus *Meloidogyne* ได้ถึง 80 ชนิด (Siddiqi, 2000) ซึ่งประเทศไทยมีลักษณะภูมิอากาศเป็นเขตร้อนชื้น ชนิดที่แพร่ระบาดและพบบ่อยที่สุด คือ *M. incognita* *M. javanica* *M. arenaria* และ *M. hapla* (Taylor and Sasser, 1978)

การวางแผนเพื่อการป้องกันกำจัดโรครากปมที่เกิดจาก *Meloidogyne* spp. นั้น อันดับแรกจำเป็นต้องวินิจฉัยให้ทราบถึงชนิดของไล่เดือนฝอยเป้าหมายให้ชัดเจน การระบุหรือจำแนกชนิดไล่เดือนฝอยรากปมที่ปฏิบัติกันโดยทั่วไปนั้นต้องอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้ขนาดและรูปร่าง ของอวัยวะที่มีลักษณะพิเศษต่าง ๆ ของตัวผู้และตัวเมีย เช่น ลักษณะของปากหลอดดูดอาหาร (stylet) และลักษณะของหาง รวมไปถึงรอยย่นส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมีย (Hirschmann, 1985) ซึ่งเป็นรอยหยักเป็นวงล้อมรอบช่องทวารหนัก (anus) และช่องเปิดอวัยวะสืบพันธุ์ (vulva) ของผิวหนังชั้นนอก (cuticle) ซึ่งการจะจำแนกไล่เดือนฝอยด้วยรอยย่นส่วนก้นนี้ ต้องอาศัยผู้ที่เชี่ยวชาญ อีกทั้งต้องการเวลามากในการตรวจสอบเพื่อเปรียบเทียบรายละเอียดต่าง ๆ นอกจากนี้การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวยังอาจได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมต่อตัวไล่เดือนฝอยได้ ปัจจุบันมีการศึกษาการการระบุชนิดไล่เดือนฝอยโดยวิธีการทางอนุชีวโมเลกุลซึ่งนอกจากจะมีความรวดเร็วและแม่นยำกว่า และสามารถที่จะเพื่อยืนยันผลการจำแนกด้วยวิธีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้อีกด้วย

วิธีการทางอนุชีวโมเลกุลที่ใช้ในการจัดจำแนกไล่เดือนฝอยในการศึกษาครั้งนี้คือ การใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยอาศัยคู่

ไพรเมอร์ ที่จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด สำหรับประเทศไทยยังไม่ได้นำวิธีการทางด้านอนุชีวโมเลกุลเข้ามาใช้ในการจัดจำแนก species ไส้เดือนฝอยอย่างแพร่หลาย จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะศึกษาวิจัยการใช้เทคนิคดังกล่าวเพื่อจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมไอโซเลตที่พบในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การสำรวจและการเก็บตัวอย่างดิน เก็บตัวอย่างดินในแปลงปลูกพืชผักที่มีรายงานการระบาดของโรครากปม และตัวอย่างพืชที่เป็นโรครากปม ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง อุบลราชธานี และ จังหวัดตาก โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างดินบริเวณรากของพืชที่มีอาการของโรครากปม คือ แคระแกรน ใบเหี่ยว เหลืองและมีปมปมที่ราก บรรจุในถุงพลาสติก แยกถุงสำหรับแต่ละตัวอย่าง มัดปากถุง เขียนรายละเอียดติดข้างถุง นำตัวอย่างที่เก็บได้ใส่ในกล่องโฟม และเก็บให้พ้นแสงแดด

2.การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมและการเตรียม single egg-mass inoculation นำตัวอย่างดินที่เก็บมาผสมกับดินที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตรา 1:1 นำไปใส่ในกระถางพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ 30 วันลงไปในกระถาง ดูแลรดน้ำใส่ปุ๋ย จนมะเขือเทศอายุครบ 60 วันทำการถอนต้นมะเขือเทศ แล้วล้างรากตรวจสอบการเกิดปมที่รากของต้นมะเขือเทศ เมื่อมีอาการรากปมเกิดขึ้นพร้อมกับกลุ่มไข่ (egg-mass) ที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงนำไปเตรียมเชื้อบริสุทธิ์โดยแยกกลุ่มไข่ออกมาจากตัวไส้เดือนฝอยเพศเมียตัวเต็มวัยที่อยู่ในรากพืช โดยใช้ไม้ปลายแหลมเขี่ยกลุ่มไข่ให้หลุดออกมา จากนั้นย้ายทั้งกลุ่มไข่ ไปแช่ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ทั้งไว้ประมาณ 3 วัน จนไข่ฟักออกมาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 แล้วนำไปรดบริเวณรอบ ๆ ต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ 30 วันที่เตรียมไว้ โดยรดตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่ฟักจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม ต่อต้นมะเขือเทศ 1 ต้น ดูแลรดน้ำให้ปุ๋ย จนมะเขือเทศอายุครบ 60 วันทำการถอนต้นมะเขือเทศ แล้วล้างรากตรวจสอบการเกิดปมที่รากของต้นมะเขือเทศ

เมื่อมีอาการรากปมเกิดขึ้นพร้อมกับกลุ่มไข่ (egg-mass) ที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

3.การตรวจวิเคราะห์รูปร่างส่วนกัน นำรากมะเขือเทศที่เกิดปมที่มีกลุ่มไข่ที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าในแต่ละตัวอย่าง มาเขี่ยเอาไส้เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัยเพศเมียออกมาจากราก หลังจากนั้นย้ายลงไปบนสไลด์แก้วที่มีหยด mineral oil ไว้แล้ว นำไปทำการตัดก้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereomicroscope โดยใช้เข็มปลายปากฉลามตัดระหว่างส่วนหัวและส่วนท้ายของไส้เดือนฝอยรากเพศเมียตัวเต็มวัย จากนั้นใช้ปลายเข็มแตะเศษชิ้นส่วนทางด้านท้ายของไส้เดือนฝอย ให้กลับไปมาใน mineral oil เพื่อล้างทำความสะอาดชิ้นส่วนที่ตัด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อสามารถที่จะระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปมในเบื้องต้นได้

4.การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมโดยเทคนิค PCR

การเตรียมตัวอ่อนระยะที่ 2 ไส้เดือนฝอยรากปม เขี่ยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์แต่ละตัวอย่างจากรากมะเขือเทศ และกระตุ้นให้เกิดการฟักตัวของไข่โดยแช่กลุ่มไข่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทั้งไว้ในอุณหภูมิ 25-28 °C เป็นเวลา 3 วัน จนไส้เดือนฝอยฟักออกจากไข่

การเตรียมดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปม การสกัด DNA ของไส้เดือนฝอยรากปมตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ตามวิธีการของ Adam *et al.* (2006) โดยตัดไส้เดือนฝอย J2 ที่ฟักตัวออกจากไข่แล้ว มาล้างในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นตัดมาใส่ใน WLB (worm lysis buffer: 50 nM KCL, 10 mM Tris pH 8.2, 2.5 mM MgCl₂, 60 µg mL⁻¹ proteinase K, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20 and 0.01% gelatinel) ที่หยดไว้แล้วบนสไลด์แก้วหนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาณ 15 ไมโครลิตร ตัดไส้เดือนฝอยใน WLB เป็น 2 – 3 ท่อนด้วยเข็มปลายแหลมที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นดูดสารละลาย WLB ที่มีเศษของตัวไส้เดือนฝอยใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่เติม WLB ไว้ก่อนแล้ว 10 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปแช่แข็งที่ -80 °C เป็นเวลา 15 นาที เติม mineral oil ปริมาณ 10 ไมโครลิตรบนสารแขวนลอยไส้เดือนฝอยที่แข็งตัวแล้ว

จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 90 °ซ เป็นระยะเวลา 10 นาที นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. โดยเทคนิค PCR การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. โดยเทคนิค PCR นั้นกระทำตามขั้นตอนที่ได้รายงานไว้โดย Adam *et al.* (2006) โดยเริ่มจากการเพิ่มปริมาณ DNA ของ J2 ทั้ง 10 ตัวอย่างโดยสุ่มประชากรมาเป็นตัวแทนในการศึกษา ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละ species ดังตารางที่ 1

และใช้สารละลายที่ใช้ในปฏิกิริยาทั้งหมด ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยส่วนผสมต่างๆดังนี้ DNA template 1.0 ไมโครลิตร, Forward Primers 1.0 ไมโครลิตร Reward Primers 1.0 ไมโครลิตร, 10x buffer 2.5 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 1.5 ไมโครลิตร, 20 mM dNTPs 0.5 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (2 unit) 0.5 ไมโครลิตรและ น้ำ 17.0 ไมโครลิตร

จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (เครื่อง thermal cycle รุ่น geneamp PCR system 2400 บริษัท PERKIN ELMER ประเทศไทย) โดยตั้งโปรแกรมให้ได้สภาวะที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ตามตารางที่ 2

ตรวจสอบ PCR products ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1% ซึ่งหยด ethidium bromide 6 ไมโครลิตรผสมรวมกันก่อนการเทลงในแม่แบบ จากนั้นทำไปเข้าเครื่องปล่อยกระแสไฟฟ้าที่มีสารละลาย 1x TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลายที่มี ethidium bromide ผสมอยู่ เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้แสง ultra violet โดยใช้เครื่อง gel document system

ผลการศึกษา

1.การจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างรอยย่นส่วนกัน จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้สามารถแยกได้ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินในพื้นที่ทางการเกษตรที่ใช้ในการปลูกผักและพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ 6 จังหวัด จากผลการวิเคราะห์ลักษณะของรอยย่นส่วนกันในตัวเต็มวัยเพศเมีย ทั้ง 10 ไอโซเลท สามารถที่จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ที่มีลักษณะรอยย่นส่วนกันที่มีแนวเส้นกรอบด้านบน (dorsal arch) สูง เส้นรอยย่น (striae) หรืออาจเป็น

Table 1 Primer codes used for identification of *Meloidogyne* species, their sequences and sources.

Code	Primer sequence 5'- 3'	Specificity and source
194	TTAACTTGCCAGATCGGACG	5S-18S ribosome region
195	TCTAATGAGCCGTACGC	Blok <i>et al.</i> (1997)
Far	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	<i>M. arenaria</i> -specific SCAR
Rar	TCGGCGATAGACACTACAACT	Zijlstra <i>et al.</i> (2000)
Fjav	GGTGCGCGATTGAACTGAGC	<i>M. javanica</i> -specific SCAR
Rjav	CAGGCCCTTCAGTGGAACATATAC	Zijlstra <i>et al.</i> (2000)
Finc	CTCTGCCCAATGAGCTGTCC	<i>M. incognita</i> specific SCAR
Rinc	CTCTGCCCTCACATTAGG	Zijlstra <i>et al.</i> (2000)

เส้นขยุกขยิก (zigzag) หรืออาจเรียบจนเป็นแบบคลื่น (smooth to wavy) ซึ่งเป็นลักษณะของรอยย่นส่วนก้นของ *M. incognita* (Taylor and Sasser, 1978) ในขณะที่กลุ่มที่ 2 รอยย่นส่วนก้นมี lateral line เด่นชัดโดยแบ่งแนวเส้นกรอบด้านบนและด้านล่าง (ventral arch) ออกจากกันเป็นสองส่วน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ ภาพมาตรฐานของ International *Meloidogyne* Project (IMP)(Taylor and Sasser, 1978) เป็นลักษณะของ *M. javanica* (ตารางที่ 3)

2.การจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมโดยเทคนิค PCR ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอย

รากปม ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการของ Adam *et al.* (2006) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 194/195 หลังจากตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis ปรากฏว่าพบผลิตภัณฑ์ PCR ในทุกตัวอย่างที่ได้ศึกษา ซึ่งแถบดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากับ 720 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ molecular diagnostic key (RNK) แล้ว พบว่าสามารถระบุลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏว่าทั้ง 10 ไอโซเลตเป็นไส้เดือนฝอยชนิดที่พบในเขตร้อนชื้น (tropical species) ก็คือสามารถเป็นได้ทั้ง *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* และ *M. arenaria* (ภาพที่ 1 A)

Table 2 PCR amplification profiles used with different primers for identification of *Meloidogyne* species.

Methods	Preparing	Denaturati on	Annealing (45 cycles)	Primer extension		
Temperature	94 °C	94 °C	50 °C for Primers 194/195	72 °C	72 °C	4 °C
			61 °C for Primers Far/Rar			
			64 °C for Primers Fjav/Rjav			
			62 °C for Primers MI-F/MI-R			
Times	2 min	2 min	30 sec	1 min (90 sec for Primers 194/195)	7 min	∞

Table 3 Species identification of *Meloidogyne* by perineal pattern analysis.

Population code	Origin	Species
CM1	Maewang, Chiang Mai	<i>M. incognita</i>
CM2	Maewang, Chiang Mai	<i>M. incognita</i>
CM3	Chiang Dao, Chiang Mai	<i>M. incognita</i>
LP1	Banhong, Lamphun	<i>M. incognita</i>
LP2	Banhong, Lamphun	<i>M. incognita</i>
LN1	Koh Kha, Lampang	<i>M. javanica</i>
LN2	Koh Kha, Lampang	<i>M. javanica</i>
UB1	Muang, Ubon Ratchathani	<i>M. javanica</i>
UB2	Muang, Ubon Ratchathani	<i>M. javanica</i>
TK1	Pobpra, Tak	<i>M. javanica</i>

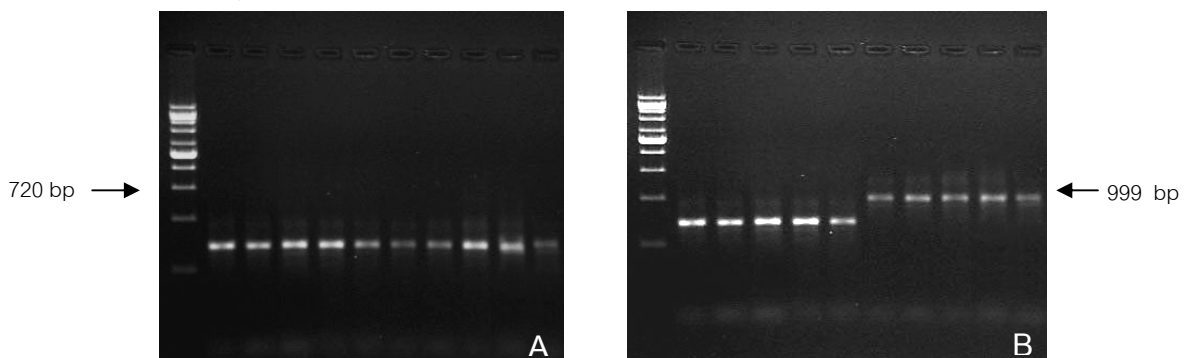
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม เมื่อเปรียบเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จาก RNK molecular diagnostic key (Adam *et al.*, 2006) พบว่าจากตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดพบเพียง 2 species เท่านั้น ได้แก่ *M. javanica* และ *M. incognita* โดยพบว่าไฮโซเลท TK1, UB1, UB2, LN1 และ LN2 ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาดเท่ากับ (720 bp) เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ Fjav/Rjav และไม่ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์อื่น ในขณะที่ไฮโซเลท LP1, LP2, CM1, CM2, และ CM3 ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด (999 bp) เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ Finc / Rinc เท่านั้น และไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์อื่น (ภาพที่ 1 B)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการตรวจรอยย่นส่วนกัน เพื่อระบุชนิดในเบื้องต้นของไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกได้จากตัวอย่างของไส้เดือนฝอยรากปมบริสุทธิ์ 10 ตัวอย่าง ที่แยกได้จากดินที่เก็บจากแหล่งเพาะปลูกพืชผักในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่าเมื่อวิเคราะห์รอยย่นส่วนกันของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. สามารถจำแนกชนิดได้ดังนี้คือ ไฮโซเลท LP1, LP2, CM1, CM2 และ CM3 มีลักษณะรอยย่นส่วนกันที่มีแนวเส้นกรอบด้านบนสูง เส้นรอยย่นอาจเป็นเส้นขยุกขยิก

หรืออาจเรียบจนเป็นแบบคลื่น จึงระบุชนิดเป็น *M. incognita* ในขณะที่ไฮโซเลท TK1, UB1, UB2, LN1 และ LN2 มีลักษณะรอยย่นส่วนกันที่มี lateral line เด่นชัดแบ่งแนวเส้นกรอบด้านบน และด้านล่าง ออกจากกันเป็นสองส่วน จึงจำแนกชนิดเป็น *M. javanica* อย่างไรก็ตามจากการทดลองครั้งนี้พบว่า ลักษณะรอยย่นส่วนกันของ *M. incognita* มีความผันแปรมาก ยากแก่การแปลผล ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสุภารัตน์ (2550) ที่ได้ศึกษาการจำแนก race ของไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้พีชอาศัย พบความแปรปรวนระหว่างกลุ่มประชากร *M. incognita* ส่งผลให้ปฏิกิริยาการตอบสนองของพริกต่อ *M. incognita* แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากร ซึ่งเป็นไปได้ว่ากลุ่มประชากรดังกล่าวอาจจะมีลักษณะรอยย่นส่วนกันที่คล้ายกับ *M. incognita* ดังนั้นการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม ควรใช้ในการตรวจสอบเพื่อระบุชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมในเบื้องต้นเท่านั้น ในกรณีที่ต้องการข้อมูลที่แน่นอนชัดเจนกว่านี้ จำเป็นต้องใช้วิธีการอื่นร่วมด้วย (สุภารัตน์, 2550) นอกจากนี้ การจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยานี้จำเป็นต้องอาศัยผู้มีความรู้และความชำนาญในการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวเปรียบเทียบกับรูปวาดหรือรูปถ่ายที่ได้มีการศึกษาหรือรายงานไว้ จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผลการวิเคราะห์สูง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับตัวผู้ตรวจสอบเองรวมทั้งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของไส้เดือนฝอยจากสภาพแวดล้อมได้ (อนันต์ และพิศาล, 2538)

Figure 1 DNA fingerprint from *Meloidogyne* spp. (J2) when using primer 194 /195 (A), primer Fjav/Rjav and primer Finc / Rinc (B). (CM1, CM2 and CM3 = Chiang Mai isolates; LP1 and LP2 = Lamphun isolates; LN1 and LN2 = Lampang isolates ; UB1 and UB2 = Ubon Ratchathani isolates and TK1 = Tak isolate)



การจำแนก species ของไส้เดือนฝอยรากปม นั้นจำเป็นสำหรับการวางแผนการป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปม (สืบศักดิ์, 2541) และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น การคัดพันธุ์พืชต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม (ลือชัย, 2544) โดยการวินิจฉัยไส้เดือนฝอยรากปมให้รู้ถึง species ที่ชัดเจน เพื่อศึกษาอุปฏิกิริยาการเข้าทำลาย การต้านทานของต้นพืช ซึ่งในแต่ละ species นั้น จะมีลักษณะรายละเอียดที่แตกต่างปลีกย่อยกันออกไป ยกตัวอย่างเช่น พบการเข้าทำลายร่วมกันในพริกที่ปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่าง *M. incognita* และ *M. javanica* ซึ่งจำนวนของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่เข้าทำลายจะมีปริมาณมากกว่า *M. javanica* อย่างเห็นได้ชัดเจน (สุดารัตน์, 2550) นอกจากนี้ยังสามารถนำผลการวิจัยไปประยุกต์ใช้ได้ ในด้านการกักกันพืช (Wishart *et al.*, 2002) โดยการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปมที่ติดไปกับผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นสินค้านำเข้าหรือส่งออกในแต่ละประเทศ ซึ่งเป็นข้อกำหนดและข้อตกลงทางการค้าที่สำคัญ เช่น หากมีการปนเปื้อนของไส้เดือนฝอยรากปมติดไปกับสินค้าส่งออกก็จะทำให้ได้รับผลกระทบกับสินค้านั้น ๆ เนื่องจากไม่ผ่านมาตรฐานข้อกำหนดที่ได้รับอนุญาตไว้ของประเทศที่ส่งนำเข้าสินค้านั้น โดยสินค้าที่มีการปนเปื้อนของไส้เดือนฝอยรากปมนั้นอาจถูกส่งกลับหรือเผาทำลาย ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจของประเทศผู้ส่งออกสินค้านั้น ๆ ด้วย อย่างไรก็ตามสุดารัตน์ (2550) รายงานว่าการใช้เทคนิค PCR-RAPD ในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมนั้นใช้เวลาที่สั้นกว่าการตรวจสอบโดยหลักฐานวิทยา และมีความไวสูงในการตรวจสอบ อย่างไรก็ตามเทคนิค PCR-RAPD ดังกล่าวไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง race 2 และ race 4 ที่แยกโดยพืชทดสอบได้ (สุดารัตน์, 2550) ดังนั้นควรมีการวิจัยเพิ่มเติมในอนาคตถึงการนำเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จะเพาะ ไปใช้ในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ ที่พบในประเทศไทย โดยเพิ่มจำนวนไอโซเลตที่ศึกษาให้มากขึ้น และครอบคลุม พื้นที่เพาะปลูกที่พบการระบาดของโรครากปมในจังหวัดอื่น ๆ ของประเทศไทย รวมไปถึงการศึกษาเปรียบเทียบกับ การจำแนก race โดยใช้พืชอาศัย

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยทั้ง 10 ไอโซเลต โดยใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากไส้เดือนฝอยรากปมตัวอ่อนระยะที่ 2 จำนวน 1 ตัว ด้วยเทคนิค PCR เมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ 194/195 และคู่ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด และเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดกับ molecular diagnostic key ที่พัฒนาขึ้นโดย Adam *et al.* (2006) พบว่าให้ผลการจำแนกที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ร้อยละส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยเทคนิค PCR นี้สามารถทำได้รวดเร็ว และง่ายแก่การแปลผลกว่าการวิเคราะห์ร้อยละส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย

เอกสารอ้างอิง

- ลือชัย อารยะรังษฤษฎ์. 2544. ข้าว: ไส้เดือนฝอยและการจัดการ. เอกสารวิชาการ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร. 85 หน้า.
- สืบศักดิ์ สนิธิรัตน์. 2541. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช: โรคและการจัดการ. สำนักพิมพ์วิบูลย์, กรุงเทพฯ. 204 หน้า.
- สุดารัตน์ โชคแสน. 2550. การจัดจำแนก species และ race ของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne*) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยวิธีทางโมเลกุล และวิธีใช้พืชจำเพาะ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 84 หน้า.
- อนันต์ หิรัญสาลี และพิศาล ศิริธร. 2538. ไส้เดือนฝอยรากปมของมะละกอในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. เกษตร 23(4): 172-178.
- Adam M.A.M., M.S. Phillips and V.C. Blok. 2006. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of

- root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.).
Plant Pathology 56: 190–197.
- Blok V.C., M.S. Phillips and M. Fargette. 1997.
Comparison of sequences from the
ribosomal DNA intergenic region of
Meloidogyne mayaguensis and other
major tropical root-knot nematodes.
Journal of Nematology 29: 16–22.
- Hirschmann, H. 1985. The classification of the family
Meloidogynidae. pp.35-45 In: J.N. Jasser
and C.C. Carter (edr). An Advanced
Treatise on *Meloidogyne*. Vol. I: Biology
and Control. North Carolina state
University Raleigh.
- Siddiqi, M.R. 2000. Parasites of plants and Insects.
2nd ed. Wallingford. UK: CABI Publ. 833 p.
- Taylor, A. L. and J.N. Sasser. 1978. Biology,
identification and control of root knot
nematode (*Meloidogyne* species) Dept. of
Plant Pathology, North Carolina state
University Raleigh. 111 p.
- Wishart J., M. S. Phillips and V.C. Blok. 2002.
Ribosomal intergenic spacer: A
Polymerase chain reaction diagnostic for
Meloidogyne chitwoodi, *M. fallax*, and *M.*
hapla. Phytopathology 92: 884-892
- Zijlstra C., DTHM Donkers-Venne and M. Fargette.
2000. Identification of *Meloidogyne*
incognita, *M. javanica* and *M. arenaria*
using sequence characterized amplified
region (SCAR) based PCR assays.
Nematology 2: 47–53.
-