



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ในแหล่งปลูกพริกทางเขต
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคอนุชีวโมเลกุล

โดย อ.ดร. บัญชา ชินศรี และคณะ

เดือน ปี ที่เสร็จสิ้นโครงการฯ: พฤษภาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ในแหล่งปลูกพริกทางเขต
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคอนุชีวโมเลกุล

คณะผู้วิจัย

1. นายบัญชา ชินศรี

2. ศาตราจารย์เบรน ไซไฟ

สังกัด

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Department of Plant and
Environmental Protection Sciences,
University of Hawaii at Manoa,
Honolulu, HI USA 96822

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5180056

ชื่อโครงการ: การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ในแหล่งปลูกพริกทางเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคอณูชีวโมเลกุล

ชื่อนักวิจัย: นายบัญชา ชินศรี ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

E-mail Address: agrbcc@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 15 พฤษภาคม 2551 ถึง 14 พฤษภาคม 2553

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematodes: *Meloidogyne* spp.) ที่แพร่กระจายในแหล่งปลูกพริกในเขตอำเภอเขื่องในและอำเภอม่วงสามสิบ จังหวัดอุบลราชธานี โดยตัวอย่างของไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้ทั้งหมดได้นำมาจำแนกหาชนิด (species) ด้วยวิธีการตัดส่วนกันและตรวจสอบ perineal pattern ของไส้เดือนฝอย นอกจากนี้ยังได้นำตัวอ่อนระยะที่สอง (second-stage juveniles) ที่ฟักออกมาจากไข่ของตัวเมียที่ได้รับการตรวจสอบ perineal pattern ดังกล่าวไปสกัด DNA และนำเข้าสู่ขบวนการ PCR-RFLP เพื่อตรวจสอบระยะห่างระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA ในไมโทครอนเดียของไส้เดือนฝอย ผลการศึกษาจากจำนวนตัวอย่างไส้เดือนฝอยทั้งหมด 250 ตัวอย่าง (จากจำนวนต้นพริก 50 ต้น ครอบคลุมพื้นที่การปลูกพริก 10 ไร่) พบว่า ไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *M. incognita* มีปริมาณสูงสุด (54.8%) รองลงมาคือ ไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *M. javanica* (22%) และ *M. arenaria* (14%) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พบว่า 15.2% ของจำนวนตัวอย่างไส้เดือนฝอยทั้งหมดนั้นไม่สามารถบ่งบอกชนิดของไส้เดือนฝอยได้เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีการ PCR-RFLP ในส่วนของการเปรียบเทียบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมในเขตที่มีปัญหาการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมอย่างรุนแรงกับเขตที่มีการระบาดไม่รุนแรงนั้น พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องของจำนวนชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยที่พบ แต่ในเขตที่มีการระบาดรุนแรงพบเปอร์เซ็นต์ของไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *M. incognita* และ *M. javanica* มากกว่าในเขตระบาดไม่รุนแรง นอกจากนี้พบว่าในเขตที่มีการระบาดไม่รุนแรงนั้นจะพบไส้เดือนฝอยชนิด *M. arenaria* และ unclassified species มากกว่าในเขตที่มีปัญหาการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง

คำหลัก: การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม, ไส้เดือนฝอยรากปม, โรครากปมในพริก

Abstract

Project Code: MRG5180056

Project Title: Molecular Identification of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) infecting Chilli in the Northeastern Region of Thailand

Investigator: Dr. Buncha Chinnasri

E-mail Address: agrbcc@ku.ac.th

Project Period: May 15, 2008 to May 14, 2010

Molecular identification based on analysis of the DNA between the cytochrome oxidase subunit II gene (COII) and 16S rRNA gene on mitochondrial DNA (mtDNA) of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., in chilli using the PCR-RFLP techniques was conducted. Surveys to collect root-knot nematodes from chilli plants grown in Khueang Nai and Muang Samseb District, Ubon Rachathani Province, were performed in the areas of high and low nematode infestations. Of all nematode samples collected from the surveys (250 females from 50 chilli plants in the area of 10 rai), 54.8% were identified as *M. incognita* (the most prevalent nematode species in Thailand), and 22%, 14%, and 15.2% as *M. javanica*, *M. arenaria*, and unidentified species, respectively. *M. incognita* was the most widespread nematode; infesting all chili plants and all chili fields. In high nematode infestation areas, more *M. incognita* and *M. javanica* were found as compared to low nematode infestation fields. *M. arenaria* and unclassified nematode species, however, existed more extensively in the low nematode infestation fields.

Keywords: cytochrome oxidase subunit II gene (COII), *Meloidogyne* spp., *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, mitochondrial DNA (mtDNA), nematode identification, PCR-RFLP, root-knot nematodes, 16S rRNA gene

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณต่อสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงาน
กองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในการสนับสนุนทุนวิจัยสำหรับโครงการฯ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอ
แสดงความขอบคุณสำหรับคำปรึกษาและแนวทางในการทำวิจัยต่อศาสตราจารย์เบรน ไซฟ์ จาก
Department of Plant and Environmental Protection Sciences, University of Hawaii at
Manoa, Honolulu, HI USA 96822

สารบัญ

	หน้า
1. หน้าสรุปโครงการฯ (executive summary)	1
2. เนื้อหางานวิจัย	8
2.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	8
2.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	10
2.3 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)	10
2.4 ระเบียบวิธีวิจัย	15
2.5 ผลการวิจัย	18
2.6 ตารางที่ 1: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: <i>Meloidogyne</i> spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง	22-26
2.7 ตารางที่ 2: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: <i>Meloidogyne</i> spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างไม่รุนแรง	27-31
2.8 ตารางที่ 3: เพอร์เซ็นต์ของชนิด (species) ไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: <i>Meloidogyne</i> spp.) ที่พบในพริกแต่ละต้นในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง	34
2.9 ตารางที่ 4: เพอร์เซ็นต์ของชนิด (species) ไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: <i>Meloidogyne</i> spp.) ที่พบในพริกแต่ละต้นในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างไม่รุนแรง	35
2.10 ภาพที่ 1: แถบ (band) ขนาด 1.5 kb (A) และ 1.0 kb (B) ที่เกิดขึ้นภายหลังขบวนการ PCR ด้วย primer set ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงถึงชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. incognita</i> หรือ <i>M. javanica</i> (A) และไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. arenaria</i> (B) ตามลำดับ	32
2.11 ภาพที่ 2: แถบ (band) ขนาด 1.15 kb และ 0.35 kb (A) และ 1.5 kb (B) ที่เกิดขึ้นภายหลังขบวนการ digest PCR fragment ขนาด 1.5 kb ด้วยเอนไซม์ <i>Hinf</i> I (ภาพ A = <i>M. incognita</i> และภาพ B = <i>M. javanica</i>)	32

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.12	ภาพที่ 3: เปอร์เซ็นต์ชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (<i>Meloidogyne</i> spp.) ที่พบในเขตการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง และไม่รุนแรง (เขตระบาดรุนแรงคือ หมู่ 8 และหมู่ 12 ตำบลก่อเอ้ อำเภอเขื่องใน จังหวัดอุบลราชธานี, เขตระบาดไม่รุนแรงคือ หมู่ 2 ตำบลหนองเหล่า อำเภอม่วงสามสิบ จังหวัดอุบลราชธานี, ตัวเลขเปอร์เซ็นต์ในแต่ละเขตการระบาดได้จากการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 125 ตัว ด้วยวิธี PCR-RFLP)	33
2.13	วิจารณ์ผลการวิจัย	36
2.14	เอกสารอ้างอิง	38
3.	Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	41

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ความสำคัญของปัญหา

โรครากปมของพริกที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) เป็นปัญหาที่สำคัญสำหรับการปลูกพริกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตอำเภอเขื่องในและอำเภอม่วงสามสิบ จังหวัดอุบลราชธานี โดยต้นพริกที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมเข้าทำลายอย่างรุนแรงโดยเฉพาะในสภาพที่เป็นต้นกล้าจะทำให้ต้นกล้าพริกตาย หรือในกรณีไส้เดือนฝอยเข้าทำลายในระยะที่ต้นพริกเจริญเติบโตแล้วจะส่งผลให้ผลผลิตที่ได้ต่ำกว่าพริกในสภาพปกติมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

การควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมนั้น สามารถปฏิบัติได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความสำคัญทางเศรษฐกิจของพืชชนิดนั้น ตลอดจนชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยและปัจจัยทางสภาพแวดล้อมอื่นๆ อย่างไรก็ตามสำหรับเกษตรกรที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งเกษตรกรทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การปลูกพืชหมุนเวียน (crop rotation) โดยใช้พืชที่ไม่ใช่พืชอาศัย (non host) ของไส้เดือนฝอยหรือการใช้พันธุ์พืชต้านทานนั้นจัดเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับเกษตรกรมากที่สุด โดยปัจจัยหลักที่จะต้องพิจารณาในการปลูกพืชหมุนเวียนหรือการใช้พันธุ์พืชต้านทานคือ ชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปมที่อาศัยอยู่ในแหล่งปลูกพืชแต่ละแหล่ง เช่น ถ้าในแปลงปลูกนั้นมีไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *Meloidogyne arenaria* อยู่ในดินแล้ว ไม่ควรปลูกถั่วลิสงเป็นพืชสลับ เพราะพืชดังกล่าวถึงแม้จะต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ แต่ก็อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *M. arenaria* ดังนั้นการทราบชนิดและการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากปมในแหล่งปลูกพริกจึงมีความจำเป็นและมีความสำคัญต่อความสำเร็จในการนำวิธีการปลูกพืชสลับมาใช้ในการจัดการไส้เดือนฝอยรากปมในพริกเป็นอย่างยิ่ง

การจำแนกชนิด (species identification) ของไส้เดือนฝอยรากปมสามารถปฏิบัติได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา (morphological characters) ของไส้เดือนฝอย การตรวจสอบชนิดของพืชอาศัย (host range tests) หรือการตรวจสอบลักษณะ (pattern) ของ isozymes ในไส้เดือนฝอย อย่างไรก็ตาม การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยโดยใช้ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยานั้นมีปัญหาในเรื่องของความแปรปรวน (variability) ภายในชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยสูง นอกจากนี้ยังมีความจำเป็นต้องใช้ผู้ปฏิบัติงานที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง (experts) เพื่อการจำแนกที่ถูกต้องด้วย ส่วนการใช้ลักษณะของ isozymes มาตรวจสอบนั้น ถึงแม้ว่าวิธีการนี้จะมีความถูกต้อง (reliable) สูง โดยใช้กับตัวเมีย (female) ของไส้เดือนฝอยเพียงตัวเดียว และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการดังกล่าวให้เป็นวิธีการตรวจสอบที่สะดวกและง่ายต่อการปฏิบัติแล้วก็ตาม (routine) แต่การตรวจสอบทางด้าน isozyme ก็ไม่สามารถกระทำได้ด้วยตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยได้เนื่องจากมีปริมาณ isozyme ที่ไม่เพียงพอ ซึ่งจุดบกพร่องทางด้านนี้มีผลกระทบต่อศักยภาพในการนำไปใช้ เนื่องจากในทางปฏิบัติจะมีการนำตัวอย่างดินซึ่งมีตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมอาศัยอยู่เท่านั้นมาทำการตรวจสอบ ดังนั้นเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragments Length Polymorphism) ที่พัฒนาขึ้นมาโดย Powers and Harris (1993) ซึ่งใช้ลักษณะความแตกต่างของ DNA ที่อยู่ระหว่าง cytochrome oxidase subunit II gene (COII) และ 16S rRNA gene บน mitochondrial DNA (mtDNA) ของตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยมาเป็นตัวตัดสิน จึงเป็นสิ่งที่ได้รับความสนใจเนื่องจากจะให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว เพราะจำเป็นที่จะต้องมีการตัดสินใจในการเลือกใช้วิธีการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมโดยเฉพาะอย่างยิ่งการปลูกพืชหมุนเวียน (crop rotation) หรือการใช้จุลินทรีย์บางชนิดในการควบคุมอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อทราบชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ที่แพร่ระบาดในแหล่งปลูกพริกของจังหวัดอุบลราชธานี โดยใช้เทคนิคทางด้าน PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism)

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การสำรวจเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยในพริก

ทำการเก็บตัวอย่างพริกที่เป็นโรครากปมจากแปลงเกษตรกรทั้งในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรงและไม่รุนแรง โดยในขั้นแรกให้ทำการสุ่มต้นพริกที่เป็นโรครากปมจำนวน 5 ต้นในพื้นที่ปลูกพริก 1 ไร่ นำต้นพริกที่เป็นโรครากปมที่ได้มาสุ่มเก็บตัวเมีย (females) ที่มีกลุ่มไข่ (egg masses) ของไส้เดือนฝอยรากปมติดอยู่ที่กัน จำนวน 5 ตัวเมีย (กลุ่มไข่) ต่อต้นพริก 1 ต้น

3.2 การแยก DNA จากตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม

ใช้คีมคีบกลุ่มไข่ (egg mass) และตัวเมียของไส้เดือนฝอยรากปมใส่ลงใน syracuse ขนาดเล็กที่บรรจุน้ำกลั่นอยู่ (1 กลุ่มไข่และ 1 ตัวเมียต่อ syracuse) หลังจากนั้นนำตัวเมียที่ได้ไปตรวจสอบรอยหยักของส่วนกัน (perineal pattern) ซึ่งเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological character) ที่ใช้บ่งบอกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปมโดยทั่วไป (standard)

ในส่วนกลุ่มไข่ (egg mass) ของไส้เดือนฝอย ทำการฟักตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอย หลังจากนั้นนำตัวอ่อนระยะที่สองในปริมาณ 100 ตัวใส่ลงไปในหลอดขนาดเล็กที่มีน้ำกลั่นอยู่ใน

ปริมาณ 15 ไมโครลิตร ใช้ micropipette บดขยี้ให้ลำตัวของตัวอ่อนระยะที่สองแตกออกจากกัน หลังจากนั้นทำการดูดสารแขวนลอยของตัวอ่อนใส่เตี๊ยมฝอยในปริมาณ 5 ไมโครลิตร นำมาสู่ขั้นตอนการ PCR reaction ดังต่อไปนี้

3.3 PCR reaction

ทำ PCR reaction ด้วย primer set C2F3/1108 (5' GGTCAATGTTTCAGAAA TTTGTGG 3') และ (5'TACCTTTGACCAATCACGCT 3') โดยปฏิกิริยา PCR ครั้งนี้เพื่อ amplify ส่วนของยีนที่อยู่ระหว่าง COII และ 16S ribosomal mitochondrial gene โดยขนาดและจำนวนของ amplification products ที่ได้ต่อไปนี้ จะเป็นตัวพิจารณาว่าจะทำการวิเคราะห์ต่อไปหรือไม่ อย่างไร

- 1) ถ้าขนาดของ amplification product ที่ได้มีขนาด 1 kb แล้ว ใส่เตี๊ยมฝอยรากลมดังกล่าวจัดเป็นชนิด *M. arenaria*
- 2) ถ้าขนาดของ amplification product ที่ได้มีขนาด 1.5 kb แล้ว ให้ทำการตัด (digest) product ดังกล่าวด้วย *HinfI* ถ้า product ที่ได้จากการตัดมีขนาด 1.15 kb และ 0.35 kb แล้ว ใส่เตี๊ยมฝอยรากลมดังกล่าวจัดเป็นชนิด *M. incognita* อย่างไรก็ตาม ถ้าไม่มี product เกิดขึ้นใส่เตี๊ยมฝอยชนิดดังกล่าวจะเป็น *M. javanica*
- 3) ถ้าขนาดของ amplification product ที่ได้มีขนาด 0.52 kb แล้ว ให้ทำการตัด (digest) product ที่ได้ด้วย *DraI* ถ้า product ที่ได้จากการตัดมีขนาด 243 bp 200 bp 53 bp และ 36 bp แล้วใส่เตี๊ยมฝอยดังกล่าวจัดเป็นชนิด *M. hapla* แต่ถ้า products ที่ได้มีขนาด 260 bp 120 bp 85 bp และ 40 bp ใส่เตี๊ยมฝอยรากลมดังกล่าวเป็นชนิด *M. chitwoodi*

4. อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่ products ที่ได้บ่งบอกถึงไส้เดือนฝอยรากปมเป็นชนิด *M. chitwoodi* ก็ตาม ให้ทดสอบ PCR reaction อีกครั้งหนึ่ง โดยให้กลับไปใช้ original DNA และใช้ 18S primer set (18s1.2/18sr2b: 5' GGCGATCAGATACCGCCCTAGTT 3' และ 5' TACAAAGGGCAGGGACGTAAT 3') โดย product ที่ได้จะมีขนาด 636 bp หลังจากนั้นทำการย่อยด้วย *AluI* ก็จะได้ products จำนวน 4 fragments ขนาดตั้งแต่ 350 bp 115 bp 85 bp และ 50 bp ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งบอกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. chitwoodi*

4. ผลการวิจัย

ได้ทำการสำรวจแปลงปลูกพริกในเขตที่มีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมอย่างรุนแรง (อ.เขื่องใน จ. อุบลราชธานี) และไม่รุนแรง (อ. ม่วงสามสิบ จ. อุบลราชธานี) โดยในแต่ละเขตการระบาดนั้น ทำการเก็บตัวอย่างพริกให้ครอบคลุมพื้นที่ 5 แปลง ๆ ละ 1 ไร่ นอกจากนี้ในแต่ละแปลง (พื้นที่ 1 ไร่) ได้ทำการสุ่มเก็บพริกที่เป็นโรครากปมจำนวน 5 ต้น หลังจากนั้น ทำการสุ่มตัวเมียของไส้เดือนฝอยที่มีกลุ่มไข่(egg mass) ติดอยู่จำนวน 5 ตัวต่อต้นพริก 1 ต้น นำมาทำการตัดส่วนกัน (perineal pattern) เพื่อจำแนกหาชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย ส่วนกลุ่มไข่ (egg mass) นั้น นำมาฟักเพื่อให้ได้ตัวอ่อนระยะที่สอง (second-stage juveniles) และนำไปสกัด DNA เพื่อการวิเคราะห์และจำแนกชนิด (species) โดยวิธี PCR-RFLP ต่อไป

ผลการศึกษาพบไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 3 ชนิดที่กระจายตัวในแปลงปลูกพริกที่ทำการสำรวจ คือ *M. incognita* *M. javanica* และ *M. arenaria* ในปริมาณ 54.8 22 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม พบว่า 15.8 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างไส้เดือนฝอยทั้งหมดนั้นไม่สามารถจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยได้

ไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* เป็นไส้เดือนฝอยที่พบในทั้งเขตการระบาดของไส้เดือนฝอยที่รุนแรงและไม่รุนแรง นอกจากนี้ยังพบว่า *M. incognita* มีการกระจายตัวในทุกแปลง และทุกต้นพริกที่ทำการสำรวจ ส่วนไส้เดือนฝอย *M. javanica* นั้น มีการกระจายตัวในทั้งสองเขตของการระบาด (รุนแรงและไม่รุนแรง) และในทุกแปลงพริกที่ทำการสำรวจเช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่า *M. javanica* ไม่มีการกระจายตัวในพริกทุกต้นเช่นใน *M. incognita*

ไส้เดือนฝอย *M. arenaria* และ unclassified species เป็นไส้เดือนฝอยที่พบกระจายตัวอย่างกว้างขวางในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมไม่รุนแรง โดยพบในทุกแปลงพริกที่ทำการสำรวจ นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณของไส้เดือนฝอย *M. arenaria* และ unclassified species ในเขตที่มีการระบาดไม่รุนแรงนั้นมีค่าเท่ากับ 23.2 ถึง 14.1 เปอร์เซ็นต์ ของไส้เดือนฝอยทั้งหมด ซึ่งสูงกว่าในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง

5. ผลงาน/หัวข้อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติในแต่ละปี

ปีที่ 1 และ 2: ชื่อเรื่องที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Root-knot nematodes

(*Meloidogyne* spp.) infecting chilli in Thailand

ชื่อวารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Journal of Nematology ของสหรัฐอเมริกา

6. งบประมาณโครงการ

	ปีที่ 1	ปีที่ 2	รวม
1. หมวดค่าตอบแทน			
- ค่าตอบแทนหัวหน้าโครงการ เดือนละ 10,000 บาท จำนวน 12 เดือน	120,000	120,000	240,000
- ค่าตอบแทนนักวิจัยที่ปรึกษา	10,000	10,000	20,000
2. หมวดค่าวัสดุ			
- สารเคมี	90,000	90,000	180,000
- วัสดุสำนักงาน	5,000	5,000	10,000
3. หมวดค่าใช้สอย			
- ค่าเดินทาง ที่พัก	10,000	10,000	20,000
4. หมวดค่าจ้าง			
- ค่าจ้างคนงานช่วยเก็บตัวอย่างรากพริก	5,000	5,000	10,000
รวมงบประมาณโครงการ	240,000	240,000	480,000

เนื้อหางานวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรครากปมของพริกที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) เป็นปัญหาที่สำคัญสำหรับการปลูกพริกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบระบาดมากในเขตจังหวัดอุบลราชธานีและศรีสะเกษ ต้นพริกที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมเข้าทำลายอย่างรุนแรงโดยเฉพาะในสภาพที่เป็นต้นกล้าจะทำให้ต้นกล้าพริกตาย หรือในกรณีไส้เดือนฝอยเข้าทำลายในระยะที่ต้นพริกเจริญเติบโตแล้วจะส่งผลให้ผลผลิตที่ได้ต่ำกว่าพริกในสภาพปกติมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปมเริ่มจากตัวอ่อนระยะที่ 2 หรือระยะเข้าทำลาย (infective stage) ที่แพร่กระจายอยู่ในดินปลูกพืช เจาะไชเข้าสู่รากพริกบริเวณปลายราก เคลื่อนที่ต่อไปยังท่อน้ำท่ออาหาร (vascular bundle) ของพืชและหยุดนิ่ง จากนั้นเริ่มดูดกินน้ำเลี้ยงของพืชและมีการเจริญเติบโตด้วยวิธีลอกคราบ (molting) และพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัย (adult) มีทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยในพริกซึ่งจัดเป็นพืชอาหารที่ดี ไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายจะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงเป็นเพศเมียสูงกว่าเพศผู้ในสัดส่วน 4 : 1 ของจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายทั้งหมด เพศเมียสามารถสร้างไข่ที่มีลักษณะเป็นกลุ่ม (egg mass) ได้โดยไม่ต้องผสมพันธุ์กับเพศผู้ ซึ่ง 1 กลุ่มไข่ประกอบด้วยไข่จำนวน 400-500 ฟอง หลังจากนั้นไข่พัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 และลอกคราบภายในไข่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ไส้เดือนฝอยระยะนี้จะออกจากไข่ลงสู่ดินและเข้าทำลายรากพืชต่อเนื่อง โดยวงจรชีวิตจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ถึงตัวอ่อนระยะที่ 2 อีกรุ่น ใช้เวลาเพียง 3-4 สัปดาห์เท่านั้น ดังนั้น การที่เชื้อสาเหตุแพร่พันธุ์ได้ง่ายและเพิ่มประชากรเชื้อในปริมาณมาก ความเสียหายของโรครากปมจึงมีความรุนแรง เพียงมีไส้เดือนฝอยเข้าสู่รากพริกในระยะกล้าเพียงตัวเดียว ภายในเวลาเพียง 20 วัน จะเพิ่มจำนวนประชากร 400-500 ตัว เข้าทำลายระบบรากและ

ขยายพันธุ์ต่อเนื่องทันที เมื่อต้นพริกอายุ 3 เดือน ไล่เดือนฝอยจะมีวงจรชีวิตไม่น้อยกว่า 3ชั่วอายุ (generation) เกิดความเสียหายต่อพืชและสูญเสียผลผลิตมากกว่า 50 %

ลักษณะอาการของโรครากปม เมื่อถอนต้นพริกจะพบระบบรากเป็นปุ่มปม สาเหตุจาก ไล่เดือนฝอยดูดกินน้ำเลี้ยงของพืชบริเวณท่อน้ำ-ท่ออาหาร (xylem and phloem) มีผลทำให้เซลล์ ของพืชบริเวณดังกล่าวมีการแบ่งตัวอย่างผิดปกติ เกิดเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ (giant cell) ไปปิดกั้น ทางเดินน้ำและแร่ธาตุอาหารจากรากไปเลี้ยงลำต้นส่วนเหนือดิน ทำให้พริกแสดงอาการเหี่ยวเฉา ต้นแคระแกร็นและทรุดโทรมหรือแห้งตายในที่สุด

การแพร่ระบาด ไล่เดือนฝอยสามารถแพร่ระบาดได้ดีในเนื้อดินชนิดร่วนปนทราย ไปกับ ระบบการให้น้ำหรือไหลไปกับน้ำฝน รวมทั้งติดไปกับดินเพาะกล้าพริกและติดไปกับเครื่องมือ เกษตรต่างๆ เช่น ล้อรถไถ รองเท้าเกษตรกร และเครื่องมือเกษตรอื่นๆ

การควบคุมไล่เดือนฝอยรากปมนั้น สามารถปฏิบัติได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความสำคัญทาง เศรษฐกิจของพืชชนิดนั้น ตลอดจนชนิด (species) ของไล่เดือนฝอยและปัจจัยทางสภาพแวดล้อม อื่นๆ อย่างไรก็ตามสำหรับเกษตรกรที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งเกษตรกรทางภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ การปลูกพืชหมุนเวียน (crop rotation) โดยใช้พืชที่ไม่ใช่พืชอาศัย (non host) ของไล่เดือนฝอยหรือการใช้พันธุ์พืชต้านทานนั้นจัดเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและไม่สิ้นเปลือง ค่าใช้จ่ายเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี นอกจากนี้การปลูกพืชหมุนเวียนยังไม่ก่อให้เกิดพิษ ตกค้างในดินหรือในแหล่งน้ำเพื่อการเกษตรและการบริโภคของเกษตรกร การบริหารจัดการ ศัตรูพืชดังกล่าวจัดเป็นระบบที่ยั่งยืน (sustainable agriculture) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยหลักที่จะต้อง พิจารณาในการปลูกพืชหมุนเวียนหรือการใช้พันธุ์พืชต้านทานคือ ชนิด (species) ของไล่เดือนฝอย รากปมที่อาศัยอยู่ในพืชที่ปลูกพริกในแต่ละแหล่ง

ปัจจุบันพืชที่นำมาใช้ในระบบการปลูกพืชหมุนเวียนที่กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ แนะนำให้กับเกษตรกรที่ปลูกพริกในเขตจังหวัดอุบลราชธานีคือ ปอเทือง และถั่วลิสง อย่างไรก็ตาม การคัดเลือกพืชปลูกนั้นขึ้นอยู่กับความตั้งใจที่อยู่บนพื้นฐานของรายได้เสริมที่จะเกิดขึ้นจากการปลูกพืชสลับเป็นสำคัญ สำหรับงานวิชาการนั้นต้องให้ความสำคัญกับชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยที่อยู่ในดิน เช่น ถ้าในแปลงปลูกนั้นมีไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *Meloidogyne arenaria* อยู่ในดินแล้ว ไม่ควรปลูกถั่วลิสงเป็นพืชสลับ เพราะพืชดังกล่าวถึงแม้จะต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ แต่ก็อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *M. arenaria* ดังนั้นการทราบชนิดและการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากปมในแหล่งปลูกพริกจึงมีความจำเป็นและมีความสำคัญต่อความสำเร็จในการนำวิธีการปลูกพืชสลับมาใช้ในการจัดการไส้เดือนฝอยรากปมในพริกเป็นอย่างยิ่ง

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อทราบชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ที่แพร่ระบาดในแหล่งปลูกพริกที่สำคัญของจังหวัดอุบลราชธานี โดยเทคนิค PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism)

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (literature review)

การจำแนกชนิด (species identification) ของไส้เดือนฝอยรากปมสามารถปฏิบัติได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา (morphological characters) ของไส้เดือนฝอย การตรวจสอบชนิดของพืชอาศัย (host range tests) หรือการตรวจสอบลักษณะ (pattern) ของ isozymes ในไส้เดือนฝอย (Eisenback and Triantaphyllou, 1991) อย่างไรก็ตาม การจำแนก

ชนิดของไส้เดือนฝอยโดยใช้ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยานั้นมีปัญหาในเรื่องของความแปรปรวน (variability) ภายในชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยสูง (Williamson *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีความจำเป็นต้องใช้ผู้ปฏิบัติงานที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง (experts) เพื่อการจำแนกที่ถูกต้องด้วย ส่วนการใช้ลักษณะของ isozymes มาตรวจสอบนั้น ถึงแม้ว่าวิธีการนี้จะมีความถูกต้อง (reliable) สูง โดยใช้กับตัวเมีย (female) ของไส้เดือนฝอยเพียงเพศเดียว และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการดังกล่าวให้เป็นวิธีการตรวจสอบที่สะดวกและง่ายต่อการปฏิบัติแล้วก็ตาม (routine) แต่การตรวจสอบทางด้าน isozyme ก็ไม่สามารถกระทำได้ดีกับตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยได้เนื่องจากมีปริมาณ isozyme ที่ไม่เพียงพอ (Williamson *et al.*, 1997) ซึ่งจุดบกพร่องทางด้านนี้มีผลกระทบต่อศักยภาพในการนำไปใช้ เนื่องจากในทางปฏิบัติจะมีการนำตัวอย่างดินซึ่งมีตัวอ่อนระยะที่สองหรือไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมอาศัยอยู่เท่านั้นมาทำการตรวจสอบ ดังนั้นเทคนิคใดก็ตามที่สามารถใช้จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมโดยการใช้ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยจึงเป็นเทคนิคที่จะได้รับความสนใจ เนื่องจากจะให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว เพราะจำเป็นที่จะต้องมีการตัดสินใจในการเลือกใช้วิธีการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปลูกพืชหมุนเวียน (crop rotation) หรือการใช้จุลินทรีย์บางชนิดในการควบคุมอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป (Blok, 2004)

ในปัจจุบันส่วนของ DNA ที่นำมาใช้กับงานจัดจำแนกไส้เดือนฝอยประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ribosomal DNA และ mitochondrial DNA (Powers, 2004) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ribosomal DNA นั้นได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางและประกอบด้วย 3 ส่วนคือ 18S 5.8S และ 28S(26S) โดยส่วนประกอบทั้ง 3 ส่วนซึ่งก็รวมถึง spacers ด้วยนั้นจัดเรียงตัวกันอย่างซ้ำ ๆ (repeat) และจัดเป็นส่วนสำคัญในการนำมาใช้จำแนกไส้เดือนฝอยรากปมโดยทั่วไป ส่วน mitochondrial genome นั้นก็ได้รับการศึกษาเพื่อนำมาใช้ในการจัดจำแนกไส้เดือนฝอยเช่นกัน เนื่องจากยีนใน

mitochondria นั้นมีจำนวน copy ที่สูงมาก และยังประกอบด้วยยีนที่มีการวิวัฒนาการอย่างรวดเร็ว และบางส่วนของ mitochondria genome นั้นก็มี conserve region ที่เหมาะสมในการศึกษาทางด้าน phylogeny ของไส้เดือนฝอยเช่นกัน นอกจากนี้คุณลักษณะของ mitochondria genome ที่มีลักษณะเป็น uniparental inheritance คือได้มาจากส่วนของเพศแม่เท่านั้นจึงทำให้สามารถใช้ศึกษาประวัติความเป็นมาของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ ได้อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น (Powers, 2004)

การจัดจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะของยีนเริ่มจาก De Ley *et al.* (2002) ได้จัดจำแนก *Meloidogyne* spp. ออกเป็น 14 ชนิด (species) โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสของ 18S rDNA Chen *et al.* (2003) ได้เปรียบเทียบส่วนของ D3 expansion ใน 28S ribosomal DNA ของ *Meloidogyne* spp. และพบว่าส่วนของ D3 expansion ดังกล่าวสามารถนำมาใช้แยก *Meloidogyne* ส่วนใหญ่ออกจากกัน แต่จะมีปัญหาเมื่อใช้แยก *M. arenaria*, *M. incognita* และ *M. javanica* เนื่องจากการเกิดขึ้น D3 haplotypes ที่แตกต่างกันจำนวน 5 ชนิดในทั้ง 3 ชนิดของไส้เดือนฝอย และนอกจากนี้ยังพบว่า มี haplotype จำนวน 1 ชนิดที่พบในทุก isolate ของทั้งไส้เดือนฝอยทุกชนิดดังที่กล่าวมา ดังนั้นจะต้องระมัดระวังไม่นำลักษณะของ D3 expansion อย่างเดียวมาใช้ในการจำแนกไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp.

ส่วนของ Internal transcribed spacer (ITS) และ intergenic spacer region (IGS) ใน *Meloidogyne* นั้นพบว่ามีการศึกษาเช่นกัน เนื่องจาก ITS และ IGS นั้นมีลักษณะที่มีความหลากหลาย (variation) มากกว่าในส่วนของ D3 expansion ในปี 1996 Petersen and Vrain พบว่า การใช้ primers ที่เฉพาะเจาะจงต่อส่วนของ IGS สามารถแบ่งแยกชนิดของไส้เดือนฝอย *M. chitwoodi* ออกจากไส้เดือนฝอย *M. fallax* ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการใช้ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถนำมาใช้ในการแบ่งแยกไส้เดือนฝอยทั้งสองชนิดออกจากกัน โดยพบว่า amplified product ของไส้เดือนฝอยทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันจำนวน 100 bp นอกจากนี้ยัง

พบว่า IGS product ของ *M. hapla* นั้นมีขนาดเล็กกว่า IGS product ของ *M. chitwoodi* และ *M. fallax* อยู่ประมาณ 2 kb ในปี 1995 Zijlstra *et al.* ได้ศึกษาไส้เดือนฝอย *M. hapla* *M. chitwoodi* และ *M. fallax* จำนวน 25 isolates และพบว่า การใช้ restriction enzymes ในการย่อย (digestion) ส่วนของ ITS products สามารถแบ่งแยกไส้เดือนฝอยทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ นอกจากนี้ Zijlstra *et al.* (1995) ยังพบว่า วิธีการตรวจสอบดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ร่วมกันในลักษณะที่เป็น mixed population ได้ด้วย โดยอัตราส่วนของ digestion fragments ที่ได้สามารถใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงปริมาณหรือจำนวนของไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดที่อยู่ใน mixture นั้นได้ด้วย การนำ ITS มาใช้ในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* นั้นสามารถปฏิบัติได้กับ *Meloidogyne* ที่มีการสืบพันธุ์ในลักษณะอาศัยเพศ (sexual) และไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* ที่สืบพันธุ์กันในลักษณะ facultative parthenogenesis แต่ในส่วนของ *Meloidogyne* ที่มีลักษณะการสืบพันธุ์เป็นแบบ mitotic parthenogenesis นั้นอาจมีข้อผิดพลาดได้ (Hugall *et al.*, 1999)

ในปี 1997 Blok *et al.* ได้ออกแบบ primers ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับ 5S ribosomal gene ในส่วนของ IGS ของ *Meloidogyne* (primer เฉพาะเจาะจงต่อ 5S gene และ 5' portion ของ 18S gene) ผลการทดลองพบว่า amplified product ที่ได้สามารถนำมาใช้ในการแยกไส้เดือนฝอยที่พบในเขตร้อนคือ *M. mayaguensis* ออกจากไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม Blok *et al.* (1997) ก็พบว่า วิธีการดังกล่าวนี้ไม่สามารถนำมาใช้แยกไส้เดือนฝอย *M. incognita* *M. arenaria* และ *M. javanica* ออกจากกันได้เนื่องจากลำดับเบสที่ได้ (sequence) มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก

สำหรับการใช้ประโยชน์จาก mitochondrial genome นั้น ในปี 1994 และ 1997 Hugall *et al.* พบว่า การจัดกลุ่มของ *Meloidogyne* โดยใช้ลักษณะ mitochondrial haplotypes นั้นให้ผล

เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มของไส้เดือนฝอยโดยใช้ลักษณะของเอนไซม์ esterase โดยผลการศึกษาในไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* จำนวน 46 ประชากรจาก 14 จังหวัดของประเทศไทยให้ผลการยืนยัน (Xu *et al.*, 2004) Hugall *et al.* (1997) ได้จัดให้ mitochondrial haplotype B เท่ากับ I1 esterase ของ *M. incognita* haplotype D เท่ากับ J3 esterase ของ *M. javanica* ส่วน *M. arenaria* นั้นพบว่ามี 2 haplotypes คือ A ซึ่งเท่ากับ A1 esterase และ C ซึ่งเท่ากับ A2 และ A3 esterase ในปี 1993 Powers and Harris ได้ทำการศึกษาส่วนของยีนระหว่าง 5' portion ของ cytochrome oxidase subunit II (COII) gene และ large (16S) ribosomal gene โดยในส่วนของยีนดังกล่าวนี้พบว่าเป็นที่ตั้งของ tRNA histidine และ intervening region ที่มีขนาดไม่เท่ากัน ซึ่งก็เหมาะสำหรับการศึกษาความหลากหลาย (variation) ของไส้เดือนฝอย จากการศึกษาโดยการทำ PCR ในส่วน intervening region นี้ พบว่า สามารถแบ่งแยก amplified products ออกเป็น 4 กลุ่ม (class) เป็นอย่างน้อย โดยกลุ่มที่มีขนาดเล็กที่สุดมีจำนวน nucleotide ไม่เกิน 60 nucleotides ซึ่งก็พบใน *Meloidogyne* ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) หรือ *Meloidogyne* พวกที่มีการสืบพันธุ์แบบ facultative parthenogenesis หรือในไส้เดือนฝอย *M. hapla* ที่มีการสืบพันธุ์แบบ mitotic parthenogenesis ในส่วนของไส้เดือนฝอย *M. mayaguensis* นั้นพบว่า มี tRNA histidine ยีนจำนวน 2 copies ดังนั้นจึงมี amplified product ที่ใหญ่กว่าของ *M. hapla* อยู่ประมาณ 160 bp (Blok *et al.*, 2002) *M. arenaria* Haplotype A (esterase A1) นั้นมีขนาดของ amplified product ใหญ่กว่า *M. mayaguensis* ประมาณ 370 bp แต่ก็มีขนาดเล็กกว่า mitochondrial haplotypes B C และ D หรือไส้เดือนฝอย *M. incognita* *M. arenaria* และ *M. javanica* ตามลำดับ อยู่ประมาณ 600 bp ในปี 1997 Stanton *et al.* ได้พัฒนาเทคนิควิธีการ PCR-RFLP ในการศึกษา mitochondrial DNA เพื่อใช้ในการแบ่งแยก haplotypes ที่พบใน *Meloidogyne* ที่มีความใกล้ชิดกันจำนวน 6 ชนิด ในปี 1991 Okimoto *et al.* ได้ศึกษาส่วนของ

noncoding tandem repeats ใน mitochondrial genome ของ *Meloidogyne* และแนะนำว่า ส่วนดังกล่าวอาจนำมาใช้ในการแยกชนิด (species) หรือ host races ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การนำลักษณะดังกล่าวมาใช้แบ่งแยกไส้เดือนฝอย *M. mayaguensis* ออกจาก *Meloidogyne* ชนิดอื่น ๆ เนื่องจากจะพบ amplified product ขนาด 322 bp ในไส้เดือนฝอย *M. mayaguensis* เสมอเมื่อใช้ primers ที่จับเข้ากับ tRNA serine และในส่วนของ noncoding region (Blok *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อใช้ primers คู่เดียวกันนี้กับไส้เดือนฝอยชนิดอื่น ๆ ก็จะได้ products ที่มีจำนวนและขนาดแตกต่างกันไป หรือไม่มี product เกิดขึ้นเลยเช่นในกรณีของ *M. hapla*

การจัดจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ในประเทศไทยที่ผ่านมามีใช้ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาเป็นสำคัญ จากรายงานของ Boonduang and Pliansinchai (1986) พบไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 6 ชนิดในประเทศไทยคือ *M. arenaria*, *M. exigua*, *M. graminicola*, *M. incognita*, *M. javanica*, และ *M. nassi* โดย 3 ชนิดคือ *M. arenaria*, *M. incognita* และ *M. javanica* มีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิด ส่วน *M. exigua*, *M. graminicola* และ *M. nassi* มีการกระจายตัวในวงแคบ การจัดจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทยอีกครั้งจึงเป็นเรื่องที่มีความจำเป็นเนื่องจากฐานข้อมูลที่มีอยู่ค่อนข้างเก่า การนำเทคนิควิธีการตรวจสอบทางด้านชีวโมเลกุลเข้ามาใช้จัดเป็นการพัฒนางานทางด้านการจัดจำแนกให้มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การสำรวจเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยในพริก

ทำการเก็บตัวอย่างพริกที่เป็นโรครากปมจากแปลงเกษตรกร โดยในขั้นแรกให้ทำการสุ่มต้นพริกที่เป็นโรครากปมจำนวน 5 ต้นในพื้นที่ปลูกพริก 1 ไร่ นำต้นพริกที่เป็นโรครากปมที่ได้มาสุ่ม

เก็บตัวเมีย (females) ที่มีกลุ่มไข่ (egg masses) ของไส้เดือนฝอยรากปมติดอยู่ที่กัน จำนวน 5 ตัว
เมีย (กลุ่มไข่) ต่อต้นพริก 1 ต้น

2. การแยก DNA จากตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยราก

ใช้คีมคีบกลุ่มไข่ (egg mass) และตัวเมียของไส้เดือนฝอยรากปมใส่ลงใน syracuse ขนาดเล็กที่บรรจุน้ำกลั่นอยู่ (1 กลุ่มไข่และ 1 ตัวเมียต่อ syracuse) หลังจากนั้นนำตัวเมียที่ได้ไปตรวจสอบรอยหยักของส่วนกัน (perineal pattern) ซึ่งเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological character) ที่ใช้บ่งบอกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปมโดยทั่วไป (standard)

ในส่วนกลุ่มไข่ (egg mass) ของไส้เดือนฝอย ทำการฟักตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอย หลังจากนั้นนำตัวอ่อนระยะที่สองในปริมาณ 100 ตัวใส่ลงไปในหลอดขนาดเล็กที่มีน้ำกลั่นอยู่ในปริมาณ 15 ไมโครลิตร ใช้ micropipette บดขยี้ให้ลำตัวของตัวอ่อนระยะที่สองแตกออกจากกัน หลังจากนั้นทำการดูดสารแขวนลอยของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยในปริมาณ 5 ไมโครลิตร นำมาสู่ขบวนการ PCR reaction ดังต่อไปนี้

3. PCR reaction

ทำ PCR reaction ด้วย primer set C2F3/1108 (5' GGTCAATGTTTCAGAAA TTTGTGG 3') และ (5'TACCTTTGACCAATCACGCT 3') โดยปฏิกิริยา PCR ครั้งนี้เพื่อ amplify ส่วนของยีนที่อยู่ระหว่าง COII และ 16S ribosomal mitochondrial gene ส่วนของ PCR master mix ประกอบด้วย 1.5 units JumpStart Taq Polymerase (Sigma#D-6558, St. Louis, MO) ในสารละลาย buffer 1x (เตรียมจาก 10x stock buffer) (Sigma#P-2192) Mg^{+2} ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 3 mM dNTP ความเข้มข้นสุดท้ายของแต่ละตัวเท่ากับ 200 uM primer แต่

ละตัวมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.36 uM หลังจากนั้นทำการดูดสารจาก master mix ในปริมาณ 25 ul ใส่ลงไปในหลอด PCR ที่มีสารแขวนลอยของไส้เดือนฝอยในปริมาณ 5 ul อยู่ ทำการผสมให้เข้ากัน สภาพของการ amplification condition มีดังต่อไปนี้ initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที โดยมีจำนวน cycle ทั้งหมดเท่ากับ 45 cycles (เมื่อเสร็จ cycle สุดท้าย ให้ตามด้วย extension step ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

นำ Amplification products ที่ได้ในปริมาณ 5 ul ผสมกับ 1 ul ของ loading dye ใส่ลงไปใน 1% agarose gel (made with Agarose Low EEO Electrophoresis Grade : Fisher Scientific, St. Louis, MO) และ 0.5x TBE buffer โดยใช้ Size standard ขนาด 1 kb หรือ 100 bp ladder

ขนาดและจำนวนของ amplification products ที่ได้จะเป็นตัวพิจารณาว่าจะทำการวิเคราะห์ต่อไปหรือไม่ อย่างไร โดย

- 4) ถ้าขนาดของ amplification product ที่ได้มีขนาด 1 kb แล้ว ไส้เดือนฝอยรากปมดังกล่าวจัดเป็นชนิด *M. arenaria* (Powers and Harris, 1993)
- 5) ถ้าขนาดของ amplification product ที่ได้มีขนาด 1.5 kb แล้ว ให้ทำการตัด (digest) product ดังกล่าวด้วย *HinfI* ถ้า product ที่ได้จากการตัดมีขนาด 1.15 kb และ 0.35 kb แล้ว ไส้เดือนฝอยรากปมดังกล่าวจัดเป็นชนิด *M. incognita* อย่างไรก็ตาม ถ้าไม่มี product เกิดขึ้นไส้เดือนฝอยชนิดดังกล่าวจะเป็น *M. javanica* (Blok et al., 2002)
- 6) ถ้าขนาดของ amplification product ที่ได้มีขนาด 0.52 kb แล้ว ให้ทำการตัด (digest) product ที่ได้ด้วย *DraI* ถ้า product ที่ได้จากการตัดมีขนาด 243 bp 200 bp 53 bp และ 36 bp แล้วไส้เดือนฝอยดังกล่าวจัดเป็นชนิด *M. hapla* แต่ถ้า products ที่ได้มี

ขนาด 260 bp 120 bp 85 bp และ 40 bp ไม้เต็งฝอยรากปมดังกล่าวเป็นชนิด *M. chitwoodi* (Powers and Harris, 1993)

- อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่ products ที่ได้บ่งบอกถึงไม้เต็งฝอยรากปมเป็นชนิด *M. chitwoodi* ก็ตาม ให้ทดสอบ PCR reaction อีกครั้งหนึ่ง โดยให้กลับไปใช้ original DNA และใช้ 18S primer set (18s1.2/18sr2b: 5' GGCGATCAGATACCGCCCTAGTT 3' และ 5' TACAAAGGGCAGGGACGTAAT 3') โดย product ที่ได้จะมีขนาด 636 bp หลังจากนั้นทำการย่อยด้วย *AluI* ก็จะได้ products จำนวน 4 fragments ขนาดตั้งแต่ 350 bp 115 bp 85 bp และ 50 bp ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งบอกชนิดของไม้เต็งฝอยรากปม *M. chitwoodi*

ผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างพริกที่มีอาการรากปม (root galls) ในเขตที่มีการระบาดของไม้เต็งฝอยอย่างรุนแรง คือ ที่หมู่ 8 และหมู่ 12 ตำบลก่อเอ้ อำเภอเขื่องใน จังหวัดอุบลราชธานี และในเขตที่มีการระบาดของไม้เต็งฝอยไม่รุนแรง คือ ที่หมู่ 2 ตำบลหนองเหล่า อำเภอม่วงสามสิบ จังหวัดอุบลราชธานี โดยในแต่ละเขตของการระบาด (รุนแรงและไม่รุนแรง) ได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 5 แปลง ๆ ละ 1 ไร่ ได้จำนวนต้นพริกทั้งหมด 25 ต้น (ตารางที่ 1 และ 2)

จากการศึกษาลักษณะรอยหยักส่วนกัน (perineal pattern) ของไม้เต็งฝอยและนำ DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างที่สองของไม้เต็งฝอยไปศึกษาด้วยเทคนิคทางด้าน PCR-RFLP พบว่าสามารถจำแนกชนิด (species) ของไม้เต็งฝอยออกได้เป็น 3 ชนิดคือ 1) *M. incognita* (เกิด band ขนาด 1.5 kb และเมื่อตัด (digest) ด้วย *HinfI* ได้ band ขนาด 1.15 kb และ 0.35 kb) (ภาพที่ 1A

และ 2A) 2) *M. javanica* (เกิด band ขนาด 1.5 kb และเมื่อตัด (digest) ด้วย *HinfI* แล้ว ไม่เกิด band ทั้งสองชนิด) (ภาพที่ 1A และ 2B) 3) *M. arenaria* (เกิด band ขนาด 1 kb หลังจากผ่าน ขบวนการ PCR ด้วย primer set C2F3/1108) (ภาพที่ 1B) อย่างไรก็ตาม พบว่า เทคนิคทางด้าน PCR-RFLP ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ ไม่สามารถจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมในบาง ตัวอย่างได้ เนื่องจากไม่เกิด band หลังจากขบวนการ PCR ด้วย primer set C2F3/1108

จากการเปรียบเทียบชนิดและจำนวนไส้เดือนฝอยซึ่งจำแนกได้โดยวิธีการ PCR-RFLP ใน เขตที่มีการระบาดของโรครากปมรุนแรงและไม่รุนแรง พบว่า จำนวนชนิด (species) ไส้เดือนฝอยที่ พบไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3) โดยชนิดที่พบในทั้งสองเขตได้แก่ *M. incognita* *M. javanica* *M. arenaria* และ unidentified species นอกจากนี้ยังพบว่า ในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่าง รุนแรงนั้นจะพบไส้เดือนฝอย *M. incognita* ในปริมาณที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของไส้เดือนฝอยที่ พบทั้งหมด ตามด้วย *M. javanica* *M. arenaria* และ unidentified species ในปริมาณ 25.6 4.8 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตาม ในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมไม่ รุนแรงนั้น พบไส้เดือนฝอย *M. incognita* และ *M. javanica* ในปริมาณที่น้อยกว่าในเขตที่มีการ ระบาดอย่างรุนแรง ส่วน *M. arenaria* และ unidentified species นั้นพบในปริมาณ 23.2 และ 14.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง (ภาพที่ 3)

M. incognita เป็นไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในเขตปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปม อย่างรุนแรงและไม่รุนแรง นอกจากนี้ยังพบว่า *M. incognita* มีการกระจายตัวในพริกทุกต้นที่ทำการ สุ่ม (25 ต้น ในเขตรุนแรง และ 25 ต้น ในเขตไม่รุนแรง) (ตารางที่ 3 และ 4) อย่างไรก็ตาม พบว่า ในต้นพริกแต่ละต้นของเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรงนั้นจะพบเป็นไส้เดือน

ฝอยชนิด *M. incognita* ตั้งแต่ 40 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ของไส้เดือนฝอยทั้งหมด (ตารางที่ 3) (คือ พบเป็นชนิด *M. incognita* ตั้งแต่ 2 ถึง 5 ตัว ตามลำดับ จากจำนวนไส้เดือนฝอยทั้งหมด 5 ตัว ที่สุ่มมาทำการจำแนกหาชนิดของไส้เดือนฝอยจากพริก 1 ต้น) ส่วนในเขตที่มีการระบาดไม่รุนแรง พบว่า เปอร์เซ็นต์ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ที่จำแนกได้ในแต่ละต้นพริกนั้นเท่ากับ 20 ถึง 60 (ตารางที่ 4) (คือ พบเป็นชนิด *M. incognita* ตั้งแต่ 1 ถึง 3 ตัว ตามลำดับ จากจำนวนไส้เดือนฝอยทั้งหมด 5 ตัว ที่สุ่มมาทำการจำแนกหาชนิดของไส้เดือนฝอยจากพริก 1 ต้น)

M. javanica เป็นไส้เดือนฝอยที่พบมากเป็นอันดับสองรองจาก *M. incognita* โดยพบในทุกแปลงทั้งในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมรุนแรงและไม่รุนแรง (ตารางที่ 3 และ 4) อย่างไรก็ตามพบว่า *M. javanica* มีการกระจายตัวในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมรุนแรงมากกว่าในเขตที่มีการระบาดไม่รุนแรง (พบ *M. javanica* กระจายตัวในพริกจำนวน 16 และ 20 ต้น จากจำนวนต้นพริกทั้งหมด 25 ต้นที่ทำการสำรวจในเขตที่มีการระบาดไม่รุนแรงและรุนแรง ตามลำดับ) นอกจากนี้พบว่า จากจำนวนไส้เดือนฝอยทั้งหมด 5 ตัว ที่สุ่มมาเพื่อจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยในต้นพริก 1 ต้นในเขตการระบาดรุนแรงนั้น พบเป็น *M. javanica* ตั้งแต่ 1 ถึง 3 ตัว หรือ 20 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ในขณะที่ค่าดังกล่าวนี้เท่ากับ 1 ถึง 2 หรือ 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ในเขตที่มีการระบาดไม่รุนแรง (ตารางที่ 4)

ไส้เดือนฝอยรากปม *M. arenaria* และ unidentified species นั้นพบมีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในเขตปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครากปมไม่รุนแรง (ตารางที่ 4) โดยพบ *M. arenaria* และ unidentified species กระจายตัวในเกือบทุกแปลงของเขตที่มีการระบาดของโรคไม่รุนแรง นอกจากนี้ยังพบว่า *M. arenaria* และ unidentified species มีการกระจายตัวในต้นพริกจำนวน 21

และ 10 ต้น ตามลำดับ (จากจำนวนต้นพริกทั้งหมด 25 ต้นที่ทำการสำรวจในเขตที่มีการระบาดของโรคไม่รุนแรง) ในปริมาณ 20 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ของไส้เดือนฝอยทั้งหมด อย่างไรก็ตามพบว่า *M. arenaria* และ unidentified species มีการกระจายตัวในเพียงบางแปลงในเขตการปลูกพริกที่มีการระบาดของโรครุนแรงเท่านั้น (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	ไส้เดือนฝอย	ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย	
				ด้วยวิธีการทางด้าน สัณฐานวิทยา*	ด้วยวิธีการทางด้านอนุ ชีวโมเลกุล**
อุบลราชธานี	แปลงที่ 1 เลขที่ 12 หมู่ 8 ต. ก่อเอื้อง อ. เขื่องใน	1	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		2	1	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			2	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		3	1	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		4	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		5	1	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>

*ลักษณะรอยหยักของส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเมียไส้เดือนฝอย

**ระยะห่างและ DNA sequence ระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA บน mitochondrial DNA (mtDNA) ของไส้เดือนฝอย

ตารางที่ 1: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง (ต่อ)

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	ไส้เดือนฝอย	ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย	
				ด้วยวิธีการทางด้าน สัณฐานวิทยา*	ด้วยวิธีการทางด้านอนุ ชีวโมเลกุล**
อุบลราชธานี	แปลงที่ 2 เลขที่ 28 หมู่ 8 ต. ก่อเอื อ. เขื่องใน	1	1	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			2	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		2	1	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		3	1	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		4	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		5	1	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>

*ลักษณะรอยหยักของส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเมียไส้เดือนฝอย

**ระยะห่างและ DNA sequence ระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA บน mitochondrial DNA (mtDNA) ของไส้เดือนฝอย

ตารางที่ 1: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง (ต่อ)

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	ไส้เดือนฝอย	ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย	
				ด้วยวิธีการทางด้าน สัณฐานวิทยา*	ด้วยวิธีการทางด้านอนุ ชีวโมเลกุล**
อุบลราชธานี	แปลงที่ 3 เลขที่ 99 หมู่ 8 ต. ก่อเอื้อง อ. เขื่องใน	1	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		2	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		3	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		4	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		5	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>

*ลักษณะรอยหยักของส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเมียไส้เดือนฝอย

**ระยะห่างและ DNA sequence ระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA บน mitochondrial DNA (mtDNA) ของไส้เดือนฝอย

ตารางที่ 1: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง (ต่อ)

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	ไส้เดือนฝอย	ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย	
				ด้วยวิธีการทางด้าน สัณฐานวิทยา*	ด้วยวิธีการทางด้านอนุ ชีวโมเลกุล**
อุบลราชธานี	แปลงที่ 4 เลขที่ 8 หมู่ 12 ต. ก่อเอ้ง อ. เขื่องใน	1	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		2	1	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			2	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		3	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
		4	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		5	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>

*ลักษณะรอยหยักของส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเมียไส้เดือนฝอย

**ระยะห่างและ DNA sequence ระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA บน mitochondrial DNA (mtDNA) ของไส้เดือนฝอย

ตารางที่ 1: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง (ต่อ)

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	ไส้เดือนฝอย	ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย	
				ด้วยวิธีการทางด้าน สัณฐานวิทยา*	ด้วยวิธีการทางด้านอนุ ชีวโมเลกุล**
อุบลราชธานี	แปลงที่ 5 เลขที่ 73 หมู่ 12 ต. ก่อเอื้อง อ. เขื่องใน	1	1	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		2	1	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			2	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		3	1	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		4	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		5	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>

*ลักษณะรอยหยักของส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเมียไส้เดือนฝอย

**ระยะห่างและ DNA sequence ระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA บน mitochondrial DNA (mtDNA) ของไส้เดือนฝอย

ตารางที่ 2: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างไม่รุนแรง

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	ไส้เดือนฝอย	ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย	
				ด้วยวิธีการทางด้าน สัณฐานวิทยา*	ด้วยวิธีการทางด้านอนุ ชีวโมเลกุล**
อุบลราชธานี	แปลงที่ 1 เลขที่ 95 หมู่ 2 ต.หนองเหล่า อ. ม่วงสามสิบ	1	1	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. incognita</i>	Unidentified
		2	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		3	1	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			2	<i>M. arenaria</i>	Unidentified
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		4	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		5	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>

*ลักษณะรอยหยักของส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเมียไส้เดือนฝอย

**ระยะห่างและ DNA sequence ระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA บน mitochondrial DNA (mtDNA) ของไส้เดือนฝอย

ตารางที่ 2: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างไม่รุนแรง (ต่อ)

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	ไส้เดือนฝอย	ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย	
				ด้วยวิธีการทางด้าน สัณฐานวิทยา	ด้วยวิธีการทางด้าน ชีวโมเลกุล
อุบลราชธานี	แปลงที่ 2 เลขที่ 123 หมู่ 2 ต.หนองเหล่า อ. ม่วงสามสิบ	1	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		2	1	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
		3	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			3	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. incognita</i>	Unidentified
		4	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		5	1	<i>M. arenaria</i>	Unidentified
			2	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. arenaria</i>	Unidentified
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>

*ลักษณะรอยหยักของส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเมียไส้เดือนฝอย

**ระยะห่างและ DNA sequence ระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA บน mitochondrial DNA (mtDNA) ของไส้เดือนฝอย

ตารางที่ 2: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างไม่รุนแรง (ต่อ)

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	ไส้เดือนฝอย	ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย	
				ด้วยวิธีการทางด้าน สัณฐานวิทยา*	ด้วยวิธีการทางด้าน ชีวโมเลกุล**
อุบลราชธานี	แปลงที่ 3 เลขที่ 96 หมู่ 2 ต.หนองเหล่า อ. ม่วงสามสิบ	1	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			3	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		2	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
		3	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		4	1	<i>M. arenaria</i>	Unidentified
			2	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
		5	1	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. incognita</i>	Unidentified

*ลักษณะรอยหยักของส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเมียไส้เดือนฝอย

**ระยะห่างและ DNA sequence ระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA บน mitochondrial DNA (mtDNA) ของไส้เดือนฝอย

ตารางที่ 2: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างไม่รุนแรง (ต่อ)

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	ไส้เดือนฝอย	ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย	
				ด้วยวิธีการทางด้าน สัณฐานวิทยา*	ด้วยวิธีการทางด้าน ชีวโมเลกุล**
อุบลราชธานี	แปลงที่ 4 เลขที่ 152 หมู่ 2 ต.หนองเหล่า อ. ม่วงสามสิบ	1	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		2	1	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		3	1	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		4	1	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			2	<i>M. arenaria</i>	Unidentified
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. arenaria</i>	Unidentified
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
		5	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			4	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>

*ลักษณะรอยหยักของส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเมียไส้เดือนฝอย

**ระยะห่างและ DNA sequence ระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA บน mitochondrial DNA (mtDNA) ของไส้เดือนฝอย

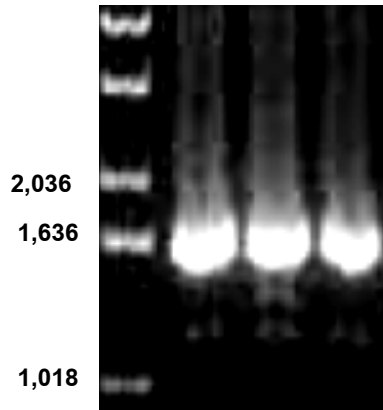
ตารางที่ 2: ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างไม่รุนแรง (ต่อ)

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	ไส้เดือนฝอย	ผลการจำแนกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย	
				ด้วยวิธีการทางด้าน สัณฐานวิทยา*	ด้วยวิธีการทางด้าน ชีวโมเลกุล**
อุบลราชธานี	แปลงที่ 5 เลขที่ 40 หมู่ 2 ต.หนองเหล่า อ. ม่วงสามสิบ	1	1	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
		2	1	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			2	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	Unidentified
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		3	1	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. javanica</i>	<i>M. javanica</i>
		4	1	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			2	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			5	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
		5	1	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>
			2	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			3	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			4	<i>M. incognita</i>	<i>M. incognita</i>
			5	<i>M. arenaria</i>	<i>M. arenaria</i>

*ลักษณะรอยหยักของส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเมียไส้เดือนฝอย

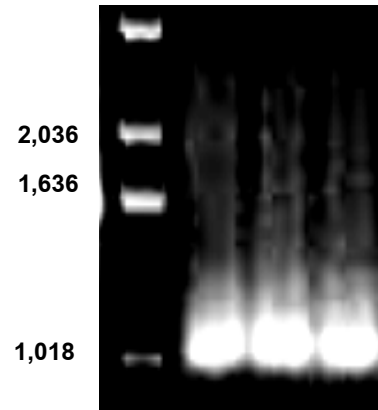
**ระยะห่างและ DNA sequence ระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA บน mitochondrial DNA (mtDNA) ของไส้เดือนฝอย

1 kb Ladder



(A)

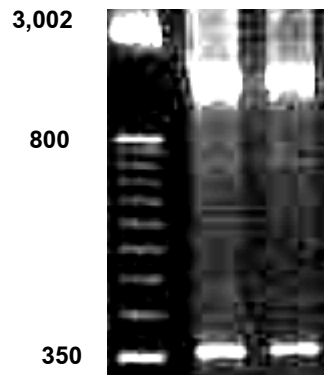
1 kb Ladder



(B)

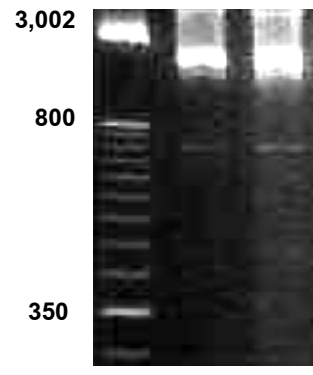
ภาพที่ 1: แถบ (band) ขนาด 1.5 kb (A) และ 1.0 kb (B) ที่เกิดขึ้นภายหลังขบวนการ PCR ด้วย primer set ที่ใช้ในการศึกษารังนี้ แสดงถึงชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* หรือ *M. javanica* (A) และไส้เดือนฝอยรากปม *M. arenaria* (B) ตามลำดับ

50 bp Ladder



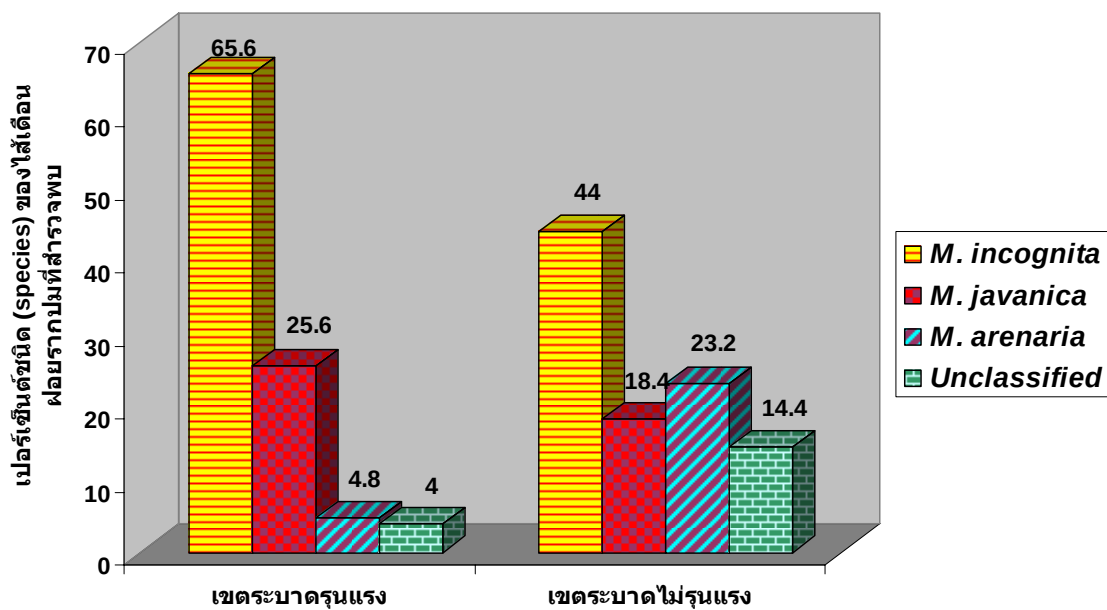
(A)

50 bp Ladder



(B)

ภาพที่ 2: แถบ (band) ขนาด 1.15 kb และ 0.35 kb (A) และ 1.5 kb (B) ที่เกิดขึ้นภายหลังขบวนการ digest PCR fragment ขนาด 1.5 kb ด้วยเอนไซม์ *HinfI* (ภาพ A = *M. incognita* และภาพ B = *M. javanica*)



ภาพที่ 3: เปอร์เซนต์ชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ที่พบในเขตการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรงและไม่รุนแรง (เขตระบาดรุนแรงคือ หมู่ 8 และหมู่ 12 ตำบลก่อเอ้ อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดนครราชสีมา, เขตระบาดไม่รุนแรงคือ หมู่ 2 ตำบลหนองเหล่า อำเภอม่วงสามสิบ จังหวัดอุบลราชธานี, ตัวเลขเปอร์เซ็นต์ในแต่ละเขตการระบาดได้จากการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 125 ตัว ด้วยวิธี PCR-RFLP)

ตารางที่ 3: เพอร์เซ็นต์ของชนิด (species) ไข่เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกแต่ละต้นในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างรุนแรง

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	เปอร์เซ็นต์ของชนิด (species) ไข่เดือนฝอยรากปมที่พบในต้นพริก*			
			<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>	<i>M. arenaria</i>	Unidentified Species
อุบลราชธานี	แปลงที่ 1 เลขที่ 12 หมู่ 8 ต. ก่อเอื้ อ. เขื่องใน	1	100			
		2	60	40		
		3	60	40		
		4	100			
		5	60	40		
	แปลงที่ 2 เลขที่ 28 หมู่ 8 ต. ก่อเอื้ อ. เขื่องใน	1	60	40		
		2	80	20		
		3	40	60		
		4	60	20	20	
		5	60	20	20	
	แปลงที่ 3 เลขที่ 99 หมู่ 8 ต. ก่อเอื้ อ. เขื่องใน	1	100			
		2	60	40		
		3	60	40		
		4	80	20		
		5	80	20		
	แปลงที่ 4 เลขที่ 8 หมู่ 12 ต. ก่อเอื้ อ. เขื่องใน	1	80	20		
		2	40	60		
		3	60	20	20	
		4	60	20	20	
		5	80	20		
	แปลงที่ 5 เลขที่ 73 หมู่ 12 ต. ก่อเอื้ อ. เขื่องใน	1	40	60		
		2	40			60
		3	60	40		
		4	60	20		20
		5	60		20	20

*จากการจำแนกชนิด (species) ด้วยวิธี PCR-RFLP

ตารางที่ 4: เปอร์เซ็นต์ของชนิด (species) ไข่เดือนฝอยรากปม (root-knot nematode: *Meloidogyne* spp.) ที่พบในพริกในแต่ละต้นในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมอย่างไม่รุนแรง

จังหวัด	ที่อยู่	ต้นพริก	เปอร์เซ็นต์ของชนิด (species) ไข่เดือนฝอยรากปมที่พบในต้นพริก*			
			<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>	<i>M. arenaria</i>	Unidentified Species
อุบลราชธานี	แปลงที่ 1 เลขที่ 95 หมู่ 2 ต.หนองเหล่า อ. ม่วงสามสิบ	1	20	40		40
		2	60		20	20
		3	40	20	20	20
		4	60	20	20	
		5	60	20	20	
	แปลงที่ 2 เลขที่ 123 หมู่ 2 ต.หนองเหล่า อ. ม่วงสามสิบ	1	60	40		
		2	40	20	40	
		3	40		20	40
		4	60			40
		5	20		40	40
	แปลงที่ 3 เลขที่ 96 หมู่ 2 ต.หนองเหล่า อ. ม่วงสามสิบ	1	40	40	20	
		2	40	20	40	
		3	60	20	20	
		4	20	20	20	40
		5	40		20	40
	แปลงที่ 4 เลขที่ 152 หมู่ 2 ต.หนองเหล่า อ. ม่วงสามสิบ	1	60	20	20	
		2	40	40	20	
		3	40	40	20	
		4	20		40	40
		5	60		40	
	แปลงที่ 5 เลขที่ 40 หมู่ 2 ต.หนองเหล่า อ. ม่วงสามสิบ	1	40	40	20	
		2	20	40		40
		3	40	40	20	
		4	60		40	
		5	60		40	

*จากการจำแนกชนิด (species) ด้วยวิธี PCR-RFLP

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ไล้เดือนฝอยรากปมชนิด *M. incognita* เป็นไล้เดือนฝอยที่พบมากที่สุดและพบในพริกทุกต้นที่มีการสำรวจ นอกจากนี้ยังพบว่า *M. incognita* มีการกระจายตัวในแปลงปลูกพริกอย่างกว้างขวางทั้งในเขตที่มีการระบาดของรุนแรงและไม่รุนแรง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในประเทศไทยที่พบว่าไล้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* มีการกระจายตัวและเข้าทำลายพืชมากกว่า 60 ชนิดเช่น มันฝรั่ง พริก ผักกาดหอม ผักคะน้า ผักชี แตงกวา กระเจี๊ยบเขียว มะละกอ เป็นต้น (สืบศักดิ์, 2552) ส่วนไล้เดือนฝอยชนิด *M. javanica* นั้นพบมากเป็นอันดับสองรองจาก *M. incognita* โดยข้อมูลจากการสำรวจพบว่า *M. javanica* มีการกระจายตัวในทุกแปลงที่มีการสำรวจ (ทั้งแปลงระบาดรุนแรงและไม่รุนแรง) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า *M. javanica* นั้นไม่กระจายตัวในพริกทุกต้น ในปี 2552 สืบศักดิ์ ได้รายงานการกระจายตัวของ *M. javanica* ในประเทศไทยและในพืช เช่น ช่อนกลิ่น และเยอบีรา บวบ กล้วย บร็อคโคลี่ มะเขือเทศ ทุเรียน เงาะ กาแฟ องุ่น ข้าวโพด เป็นต้น นอกจากนี้ยังรายงานว่า *M. javanica* นั้นมีการกระจายตัวในวงแคบกว่า *M. incognita*

ไล้เดือนฝอย *M. arenaria* นั้นพบเฉพาะในบางแปลงพริกที่มีการระบาดของโรครากปมรุนแรง อย่างไรก็ตามพบว่า *M. arenaria* มีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในแปลงที่มีการระบาดของโรครากปมที่ไม่รุนแรง จากผลการวิจัยในครั้งนี้ ชี้ให้เห็นว่า *M. arenaria* มีการกระจายตัวในวงแคบที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ *M. incognita* และ *M. javanica* นอกจากนี้จากรายงานของ สืบศักดิ์ ในปี 2552 พบว่า *M. arenaria* มีการกระจายตัวในพืชพวกหอมที่ปลูกในประเทศไทยเท่านั้น

จากการจำแนกชนิดของไล้เดือนฝอยรากปมในพริกโดยเปรียบเทียบลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา (โดยรอยหยักส่วนก้นหรือ perineal pattern) กับลักษณะของยีนของไล้เดือนฝอย (ระยะห่างและ DNA sequence ระหว่างยีน cytochrome oxidase subunit II (COII) และ 16S rRNA บน

mitochondrial DNA (mtDNA) ของไส้เดือนฝอย) นั้น พบว่ามีความสอดคล้องกันเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม พบว่า ในบางตัวอย่างของไส้เดือนฝอยนั้นไม่สามารถนำเทคนิควิธีการ PCR-RFLP ที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้มาจำแนกได้ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากเหตุผลที่ว่า ตัวอย่างเหล่านั้นเป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ (new species) หรือเป็นชนิดที่อยู่นอกเหนือจากศักยภาพในการจำแนกของเทคนิค หรือวิธีที่ใช้ในครั้งนี้ (เทคนิควิธีการ PCR-RFLP ในครั้งนี้อาจสามารถจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมได้ 5 ชนิด คือ *M. incognita* *M. javanica* *M. arenaria* *M. hapla* และ *M. chitwoodi*)

การศึกษาในครั้งนี่ยังพบว่า ในพริกแต่ละต้นนั้นประกอบไปด้วยไส้เดือนฝอยรากปมมากกว่า 1 ชนิด (species) อาศัยอยู่ร่วมกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่พบในปริมาณมากที่สุดในแต่ละต้นนั้นคือ *M. incognita* เหตุผลที่ไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิดมีความสามารถที่แตกต่างกันในการดำรงชีวิตในต้นพริก คือ ความชอบในอุณหภูมิในการดำรงชีวิตและการสืบพันธุ์ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้พบว่า *M. incognita* มีการปรับตัวในการอยู่รอดในพืชหรือในแหล่งอาหารที่กว้างกว่าไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ (Manzannilla-Lopez and Starr, 2009)

การพบไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *M. arenaria* ในแหล่งปลูกพริกทั้งในเขตที่มีการระบาดของโรครากปมที่รุนแรงและไม่รุนแรงในครั้งนี้นั้น ชี้ให้เห็นว่า แนวทางการจัดการไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธีการปลูกพืชสลับโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำถั่วลิสงมาใช้ในระบบการปลูกพืชนั้นไม่สามารถปฏิบัติได้ ทั้งนี้เนื่องจาก *M. arenaria* เป็นไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวที่สามารถเข้าทำลายและขยายพันธุ์ในถั่วลิสงได้ ดังนั้น ในเขตปลูกพริกที่พบการกระจายของไส้เดือนฝอย *M. arenaria* นั้น จำเป็นต้องหลีกเลี่ยงการใช้ถั่วลิสงปลูกเป็นพืชสลับเพื่อป้องกันการขยายพันธุ์หรือการลุกลามของไส้เดือนฝอยที่มากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

สืบศักดิ์ สุนทรรัตน์. 2552. ไข่เดือนฝอยในประเทศไทย. สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย.

กรุงเทพฯ. 274 หน้า.

Blok, V. C. 2004. Molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes. *Nematology Monographs and Perspectives* 2: 195-206.

Blok, V. C., J. Wishart, M. Fargette, K. Berthier, and M. S. Phillips. 2002. Mitochondrial DNA differences distinguishing *Meloidogyne mayaguensis* from the major species of tropical root-knot nematodes. *Nematology* 4: 773-781.

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.

Boonduang, A., and U. Pliansinchai. 1986. A systemic study of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Thailand. *Nematology Section technical Bulletin* No.6, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand. 17 pp.

Chen, P., P. A. Roberts, A. E. Metcalf, B. C. Hyman. 2003. Nucleotide substitution patterning within the *Meloidogyne* rDNA D3 region and its evolutionary implications. *Journal of Nematology* 35: 404-410.

De Ley, I. T., P. De Ley, A. Vierstraete, G. Karssen, and M. Moens. 2002. Phylogenetic analyses of *Meloidogyne* small subunit rDNA. *Journal of Nematology* 34: 319-327.

- Eisenback, J. D., and H. H. Triantaphyllou. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. Pp. 191-274 In W. R. Nickle, ed. Manual of Agricultural Nematology. New York: Marcel Dekker.
- Hugall, A., C. Mortiz, J. Stanton, and D. R. Wolstenholme. 1994. Low, but strongly structured mitochondrial DNA diversity in root-knot nematodes (*Meloidogyne*). Genetics 136: 903-912.
- Hugall, A., J. Stanton, and C. Mortiz. 1997. Evolution of the AT rich mitochondrial DNA of *Meloidogyne hapla*. Molecular Biology in Evolution 14: 40-48.
- Hugall, A., J. Stanton, and C. Mortiz. 1999. Reticulate evolution and the origins of ribosomal internal transcribed spacer diversity in apomictic *Meloidogyne*. Molecular Biology in Evolution 16: 157-164.
- Manzanilla-Lopez, R. H. and J. L. Starr. 2009. Interactions with other pathogens. Pp. 223-245. In R. N. Perry, M. Moens, and J. L. Starr, eds. Root-knot Nematodes. Oxfordshire: CABI.
- Okimoto, R., H. M. Chamberlin, J. L. Macfarlane, and D. R. Wolstenholme. 1991. Repeated sequence sets in mitochondrial DNA molecules of root-knot nematodes (*Meloidogyne*): nucleotide sequences, genome location and potential for host-race identification. Nucleic Acids Research 19: 1619-1626.
- Petersen, D. J., and T. C. Vrain. 1996. Rapid identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. hapla* and *M. fallax* using PCR primers to amplify their ribosomal intergenic spacer. Fundamental and Applied Nematology 19: 601-605.

- Powers, T. O. 2004. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. Annual Review of Phytopathology 42: 367-383.
- Powers, T. O., and T. S. Harris. 1993. A polymerase chain reaction method for the identification of five major *Meloidogyne* species. Journal of Nematology 25: 1-6.
- Stanton, J., A. Hugall, and C. Moritz. 1997. Nucleotide polymorphisms and an improved PCR-based mtDNA diagnostic for parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Fundamental and Applied Nematology 20: 261-268.
- Williamson, V. M., E. P. Caswell-Chen, B. B. Westerdahl, F. F. Wu, and G. Caryl. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Journal of Nematology 29: 9-15.
- Xu, J., P. Liu, Q. Meng, and H. Long. 2004. Characterization of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms. European Journal of Plant Pathology 110: 309-315.
- Zijlstra, C., A. E. M. Lever, B. J. Uenk, and C. H. Van Silfhout. 1995. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. Phytopathology 85: 1231-1237.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ

1.1 Chinnasri, B. and B.S. Sipes. Root-knot nematodes

(*Meloidogyne* spp.) infecting chilli in Thailand. Journal of

Nematology. USA. (กำลังดำเนินการส่งเรื่องตีพิมพ์)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
- เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
- เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

“พัฒนาการเรียนการสอนวิชา

01008431 Plant Parasitic Nematodes

01008531 Advanced Nematology

01008561 Advanced Plant Pathology I”

3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

จะนำเสนอในที่ประชุม Annual Meeting of Society of Nematologists

สหรัฐอเมริกา ปี 2012