วารสารแก่นเกษตร
THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การกระจายตัวและการระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปมในพื้นที่เพาะปลูกข้าวจังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย

Distribution and identification of root-knot nematodes in rice cultivated areas of Pathum Thani province, Thailand

ณัฐธิเดช บี่สา[1,3], กานต์สิรี จินดาปัณณาพัฒน์[2], บัญชา ชิณศรี[1] และธนัญชนก ไชยรินทร์[3]*

Natthidech Beesa[1,3], Kansiree Jindapunnapat[2], Buncha Chinnasri[1] and Thanunchanok Chairin[3]*

[1] *ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร 10400*
[1] *Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen campus, Bangkok, 10400*
[2] *ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002*
[2] *Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002*
[3] *สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ (วิชาเอกการจัดการศัตรูพืช) คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110*
[3] *Agricultural Innovation and Management Division (Pest Management), Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla, 90110*

บทคัดย่อ: ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. มีการรายงานในหลายประเทศถึงการแพร่ระบาดในแปลงปลูกข้าว ซึ่งการพบไส้เดือนฝอยรากปมจำนวนมากในแปลงข้าวอาจนำไปสู่ความเสียหายของผลผลิตได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจปริมาณและระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานี จาก 6 อำเภอ ได้แก่ หนองเสือ ลำลูกกา ธัญบุรี คลองหลวง อำเภอเมือง และสามโคก โดยรอยย่นที่ก้น (perineal pattern) ที่พบในทุกอำเภอมีลักษณะเป็นวงรี ผิวหนังเรียบ และไม่มี lateral lines ซึ่งคล้ายกับ *Meloidogyne graminicola* และจากการตรวจสอบปริมาณการแยกไส้เดือนฝอยรากปมในดินโดยวิธี Christie and Perry technique พบว่าอำเภอเมืองมีจำนวนมากที่สุด (8.3 ตัว/150 กรัม) ส่วนในรากข้าวโดยวิธี Extraction Tray Method พบว่าอำเภอสามโคกพบมากที่สุด (70.6 ตัว/10 กรัม) ในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ซึ่งพบว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนระยะที่ 2 มีความยาวลำตัวเท่ากับ 427–501 ไมโครเมตร stylet มีความยาวเท่ากับ 13–15 ไมโครเมตร บริเวณหางเป็นรูปกรวย (conoid) รวมถึงจัดจำแนกเพื่อยืนยันชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ได้แก่ rDNA2/rDNA1.58s, C_2F_3/1108 และ SCAR-MgFW/SCAR-MgRev พบว่ามีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 490, 520 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ และนำผลมาวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณยีน 18S-ITS1-5.8S ชี้ให้เห็นว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่พบคือ *M. graminicola* ที่มีความเหมือนกับไส้เดือนฝอยรากปมข้าวจากประเทศเวียดนามมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานี คือ *M. graminicola*
คำสำคัญ: ข้าว; ไส้เดือนฝอยรากปม; ปทุมธานี; การระบุชนิดไส้เดือนฝอย

ABSTRACT: Root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., have been reported in rice production systems of many countries. High population densities of the nematodes in soil usually lead to yield losses of rice cultivation. Therefore, the objectives of this study were to survey the quantity and to identify the species of root-knot nematodes found in rice fields from six districts, including Nong Suea, Lam Luk Ka, Thanyaburi, Khlong Luang, Muang, and Sam Khok of Pathum Thani province. The perineal patterns of adult females of root-knot nematodes collected from all rice fields were generally oval shaped, without lateral lines, and smoothly cuticular, which matched with

* Corresponding author: thanunchanok.c@psu.ac.th

Received: date; October 17, 2020 Accepted: date; February 10, 2021 Published: date

M. graminicola. Nematode populations in soil and in rice roots were determined by Christie and Perry technique and Extraction tray method, respectively. The results demonstrated that the highest nematode population present in soil was found in Muang District (8.3 nematodes/150 g soil) and in roots in Sam Khok District (70.6 nematodes/10 g roots) where Pathum Thani 1 rice cultivar was grown. The morphological characters of the second stage juveniles included the conoid tail shape and body and stylet lengths of 427–501 µm and 13–15 µm, respectively. Molecular identification based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) with three different primer sets, including rDNA2/rDNA1.58s, C_2F_3/1108 and SCAR-MgFW/SCAR-MgRev showed DNA fragment size of 490, 520 and 650 bp, respectively. Phylogenetic tree based on 18S-ITS1-5.8S genes reiterated that the root-knot nematodes found in this study were *M. graminicola* with 98% similarity to root-knot nematodes from rice fields of Vietnam. Thus, the main species of root-knot nematodes isolated from Pathum Thani's rice fields were *M. graminicola*.
Keywords: rice; root-knot nematode; Pathum Thani; nematode identification

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยทั้งในแง่การส่งออกและการบริโภคภายในครัวเรือน ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวประมาณ 69.41 ล้านไร่ (รวมทั้งนาปีและนาปรัง) และสามารถผลิตข้าวได้สูงถึง 30.7 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) จังหวัดปทุมธานีเป็นเขตเพาะปลูกข้าวที่สำคัญแห่งหนึ่งของประเทศไทยเนื่องจากสามารถผลิตข้าวได้มากถึง 0.24 ล้านตัน/ปี อีกทั้งยังพบว่าร้อยละ 55 ของพื้นที่เป็นแหล่งเพาะปลูกข้าว (กรมการข้าว, 2563; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2563)

การระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมในแปลงข้าวก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตข้าวหลายประเทศในทวีปเอเชีย ซึ่ง Padgham et al. (2003), Jain et al. (2007) และ Pokharel et al. (2010) รายงานว่าผลผลิตข้าวในประเทศอินเดีย เนปาล บังคลาเทศ อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ ลดลง 8–70 เปอร์เซ็นต์เมื่อถูกไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola* เข้าทำลาย ในประเทศไทยได้พบความเสียหายเช่นเดียวกันในอำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก อำเภอคลองหลวงและหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี บุญหงษ์ และ วุฒิชัย (2557) รายงานว่ามีการระบาดของ *M. graminicola* เข้าทำลายรากของต้นข้าวในสภาพข้าวไร่ ทำให้ผลผลิตของพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอลดลงถึง 25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Ruanpanun and Khun-In (2015) กล่าวว่าไส้เดือนฝอย *M. incognita* เข้าทำลายข้าวพันธุ์ดอกพยอม เล็บนก และนางดำ และสามารถสร้างความเสียหายมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ การพบไข่ไส้เดือนฝอยรากปมเพียงแค่ 1 ฟอง/ดิน 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร สามารถก่อให้เกิดความเสียทางเศรษฐกิจได้เนื่องจากไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminocola* มีวงจรชีวิตเพียง 15–20 วันเท่านั้น อีกทั้งยังเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการสืบพันธุ์แบบ facultative meiotic parthenogenetic สามารถวางไข่ได้ 400-500 ฟองต่อครั้ง (Jones et al., 2013; Bellafiore et al., 2015) ดังนั้นหากพบการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมในแปลงข้าว ควรหาวิธีการที่จะป้องกันกำจัดก่อนที่จะเกิดความเสียหายขึ้นได้ในอนาคต

วิธีที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมคือการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) โดยพิจารณาจากรอยหยักส่วนก้น (perineal patterns) ของไส้เดือนฝอยเพศเมียตัวเต็มวัย และการวัดขนาดของไส้เดือนฝอยแล้วนำไปเทียบกับฐานข้อมูล (Carneiro et al., 2017) อย่างไรก็ตาม การจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นอาจเกิดข้อผิดพลาดขึ้นได้และจำเป็นต้องอาศัยความเชี่ยวชาญของนักวิจัย อีกทั้งยังใช้เวลานานในการตรวจสอบ ดังนั้นการใช้วิธีทางอณูชีววิทยา (molecular technique) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ยืนยันผลการจัดจำแนกได้ เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีความแม่นยำและรวดเร็ว (ธนากร และ วราภรณ์, 2553) ปัจจุบันพบไส้เดือนฝอยรากปม 4 ชนิด ที่เข้าทำลายรากข้าว คือ *M. graminicola* และ *M. incognita* ที่พบในระบบการปลูกข้าวเขตแถบทวีปเอเชีย (Padgham et al., 2003; Jain et al., 2007; Pokharel et al., 2010; Ruanpanun and Khun-In, 2015) *M. javanica* ที่พบในแถบทวีปแอฟริกา (Vito et al., 1996) และ *M. oryzae* ที่พบในทวีปอเมริกา (Maas et al., 1978) จากข้อมูลดังกล่าวหากทราบปริมาณและชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมในแปลงข้าวจะทำให้เกษตรกรสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้ทันท่วงที ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบปริมาณและระบุชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานีด้วยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยา

วิธีการศึกษา

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างดินและรากข้าว

ทำการเก็บและสำรวจโรครากปมจากรากและดินในแปลงข้าวทั้งหมด 6 อำเภอ ของจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ หนองเสือ (PN) ธัญบุรี (PT) ลำลูกกา (PL) คลองหลวง (PK) อำเภอเมือง (PM) และสามโคก (PS) โดยเก็บอำเภอละ 2 แปลง แปลงละ 3 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 36 ตัวอย่าง โดยทำการสุ่มเก็บดินบริเวณรอบรากข้าวที่ความลึกตั้งแต่ 0–20 เซนติเมตร และเก็บต้นข้าวที่พบอาการรากปมใส่ในถุงพลาสติกซิปล็อคเก็บความชื้น และจดบันทึกข้อมูลแปลง ชนิดของพันธุ์ข้าว อายุต้นข้าว และค่า pH ของดินด้วยเครื่อง Soil pH and moisture tester (Takemura, Japan) ตัวอย่างที่ได้ถูกนำไปศึกษาต่อ ณ ห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การตรวจสอบปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมจากดินและรากข้าว

ทำการตรวจสอบจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมจากดินโดยใช้วิธี Christie and Perry technique (Christie and Perry, 1951) โดยนำดินแช่ในน้ำในอัตราส่วน 150 กรัมต่อ 1,000 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ดินมีลักษณะอ่อนนุ่มและผสมเข้ากับน้ำได้ดี จากนั้นนำสารแขวนลอยดินไปกรองผ่านตะแกรงขนาด 250, 105 และ 37 ไมโครเมตร ตามลำดับ ทำการล้างและเก็บไส้เดือนฝอยที่ติดอยู่บนตะแกรงขนาด 37 ไมโครเมตร ลงในบีกเกอร์ นำสารแขวนลอยไส้เดือนฝอยเทลงบนกรวย ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Olympus SZ, Japan)

ทำการตรวจสอบจำนวนไส้เดือนฝอยจากรากข้าวโดยใช้วิธี Extraction tray method โดยนำรากข้าวล้างด้วยน้ำจนสะอาดและตัดให้มีขนาด 0.5-1 เซนติเมตร จำนวน 10 กรัม จากนั้นนำรากข้าวดังกล่าววางบนบนตะกร้าพลาสติก ตามวิธีการของ Coyne et al. (2007) ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำสารแขวนลอยไส้เดือนฝอยไปกรองผ่านตะแกรงขนาด 37 ไมโครเมตร ทำการเก็บไส้เดือนฝอยรากปมบนตะแกรงลงในบีกเกอร์แล้วนับจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการใช้โปรแกรม SPSS software version 23.0 (SPSS Inc., USA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธีการ Duncan adjustment for multiple comparisons ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. การระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปมทางสัณฐานวิทยาด้วยเทคนิครอยหยักส่วนก้น (Perineal pattern)

นำตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในรากข้าวของแต่ละอำเภอ มาวางลงบนหยดน้ำบนสไลด์แก้ว จากนั้นตัดเนื้อเยื่อบริเวณส่วนก้นของไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และล้างด้วยกรดแลคติก (45% lactic acid) ให้สะอาด จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อดังกล่าวมาวางในหยดกลีเซอรอลบนสไลด์แก้ว และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไประบุชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope; Olympus BX50) ทำการเปรียบเทียบลักษณะรอยหยักส่วนก้นของไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้กับรายงานของ Hunt and Handoo (2009)

4. การเตรียมสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยรากปมให้บริสุทธิ์ (pure culture)

ทำการเก็บรากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ที่พบลักษณะอาการรากปมจากแปลงข้าวอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี จำนวน 20 ต้น มาล้างให้สะอาด จากนั้นตัดรากข้าวที่มีอาการเป็นปมลักษณะคล้ายตะขอ (hooked) มาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ทำการแยกกลุ่มไข่เพียง 1 กลุ่ม (single egg mass) ด้วยการใช้มีดผ่าตัดผ่าบริเวณรากปม แล้วใช้เข็มเขี่ยกลุ่มไข่ไปฟักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 จากนั้นนำไปปลูกเชื้อ (inoculation) ลงในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อีกครั้ง เพื่อเพิ่มปริมาณประชากรของไส้เดือนฝอยสำหรับใช้ในการทดลองต่อไป (กนกทิพย์ และคณะ, 2562)

5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม

นำตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้จากสายพันธุ์บริสุทธิ์ จำนวน 20 ตัว โดยทำการฆ่าไส้เดือนฝอยด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำสไลด์ชั่วคราวโดยนำไส้เดือนฝอยดังกล่าวเขี่ยขึ้นบนหยดน้ำ ซึ่งอยู่ภายในวงเทียนบนสไลด์แก้ว จากนั้นปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์และวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยโปรแกรม Axio Vision SE64 Rel. 4.9.1 โดยค่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphometric character) ถูกคำนวณตามระบบของ De Man Formula (Thorne, 1949) ดังนี้ L = ความยาวทั้งหมดของลำตัว, a = ความยาวทั้งหมดของลำตัว / ความกว้างของลำตัว, b’ = ความยาวทั้งหมดของลำตัว / ความยาวของ esophageal

gland, c = ความยาวทั้งหมดของลำตัว / ความยาวหาง, c' = ความยาวหาง / ความกว้างของหางตรงตำแหน่ง anus และ s = ความยาวของ stylet

6. การระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

6.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

นำไส้เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัยเพศเมีย จำนวน 1 ตัว ใส่ลงในน้ำ 25 ไมโครลิตร ที่อยู่ภายในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม lysis buffer [200 mM NaCl (A&D Technology, Japan), 200 mM Tris-HCl pH 8.0 (A&D Technology, Japan), 1% (v/v) β-mercaptoethanol (Sigma, Japan) และ 800 µg/mL proteinase K (Worthington Biochemical, USA)] ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลองดังกล่าว แล้วนำไปบ่มในเครื่อง Thermocycler (Biometra Tgradient Thermoblock PCR Thermocycler, UK) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ (1) อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที และ (2) อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่อง Biodrop (Biodrop Duo, UK) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Holterman et al., 2006)

6.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase chain reaction)

ทำการเตรียม PCR reaction mixture ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ดังนี้ (1) 2x PCR master mix with dye solution i-taq (Intron biotechnology, Korea) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร, (2) Forward primer และ Reverse primer (10 p mol) ตาม **Table 1** ปริมาตรอย่างละ 1.5 ไมโครลิตร, (3) ดีเอ็นเอต้นแบบ (10–20 ng/µL) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ (4) Water nuclease-free ปริมาตร 9 ไมโครลิตร จากนั้นเขย่า PCR reaction mixture ให้เข้ากัน และนำลงเครื่อง Thermocycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 1. Initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที 2. Denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 3. Annealing อุณหภูมิตาม **Table 1** เป็นเวลา 30 วินาที 4. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (ขั้นตอนที่ 2–4 ทำซ้ำจำนวนทั้งหมด 34 รอบ) และ 5. Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที

ทำการตรวจสอบขนาดของผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยวิธี electrophoresis เปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นมาตรฐาน 100+bp DNA marker (Biotechrabbit, Germany) บนแผ่นเจลที่มีความเข้มข้น 1.5% agarose gel ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้เครื่อง gel document (Bio-RAD, UK) ถ่ายภาพและบันทึกผลการทดลอง หลังจากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ที่บริษัท SOLGEN Inc. ประเทศเกาหลี และนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Table 1 Nucleotide sequences of primers

Primer name	Nucleotide sequences	Annealing temperature (°C)	References
rDNA2	5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3'	56	Bellafiore et al.
rDNA1.58s	5'-ACGAGCCCGAGTGATCCACCG-3'	56	(2015)
C_2F_3	5'-GTCAATGTTCAGAAATTTGTGG-3'	48	Long et al.
1108	5'-TACCTTTGACCAATCACGCT-3'	48	(2017)
SCAR-MgFW	5'GGGGAAGACATTTAATTGATGATCAAC-3'	60	Bellafiore et al.
SCAR-MgRev	5'-GGTACCGAAACTTAGGGAAAG-3'	60	(2015)

6.3 การศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

ทำการศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 โดยทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของข้าวบริเวณยีน 18S-ITS1-5.8S ในฐานข้อมูล GenBank แล้วนำมาจัดเรียงลำดับเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้ด้วยการใช้โปรแกรม ClustalW แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการถูกสร้างด้วยการใช้วิธี Maximum Likelihood (ML) ภายใต้ Gamma distribution (GTR + G) model การทดสอบ phylogeny ดำเนินการโดยใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 ครั้ง (Besnard et al., 2019)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การกระจายตัวของประชากรไส้เดือนฝอยรากปม

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานี พบว่ามีลักษณะเป็นดินเหนียวสีดำ ค่า pH อยู่ในช่วง 5.3–6.7 พันธุ์ข้าวที่มีการเพาะปลูกคือ กข14, กข31, กข41, กข47, ปทุมธานี 1 และพิษณุโลก 2 ซึ่งจากการศึกษาปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมในรากข้าวจำนวน 10 กรัมพบว่าแปลง PS2 ปลูกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 มีปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) คือ 70.6 ตัว รองลงมาคือแปลง PN2 ปลูกข้าวพันธุ์ กข49 พบ 50.6 ตัว ส่วนในแปลง PK2 ปลูกข้าวพันธุ์ กข41 และ PM2 ปลูกข้าวพันธุ์ กข14 พบน้อยที่สุดคือ 1 และ 0.6 ตัว ตามลำดับ

จากการศึกษาปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมในดินจำนวน 150 กรัมพบว่าแปลงข้าว PM2 มีปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญคือ 8.3 ตัว รองลงมาคือแปลง PN1 และ PM1 พบ 2.6 และ 3.3 ตัว ตามลำดับ ส่วนในแปลง PN2, PT2, PL1, PL2, PK1, PK2, PS1 และ PS2 ไม่พบไส้เดือนฝอยรากปมในดิน (**Figure 1**)

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมในรากมากกว่าในดินของทุกอำเภอ แสดงให้เห็นว่าไส้เดือนฝอยรากปมมีการอาศัยอยู่ในรากเป็นหลัก ซึ่งสอดคล้องกับ Mantelin et al. (2017) ที่กล่าวไว้ว่าไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* เป็น obligate sedentary endoparasite ดังนั้นวงจรชีวิตส่วนใหญ่จะอยู่ภายในรากพืชมากกว่าอยู่ในดิน และสายพันธุ์ปทุมธานี 1 เป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งสอดคล้องกับ กิตติพงษ์ และ พรทิพย์ (2562) ที่พบไส้เดือนฝอย *M. graminicola* ในดินและรากของข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ในจังหวัดนครนายกเป็นจำนวนมาก สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* ในแปลงข้าวจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ร้อยเอ็ด สิงห์บุรี นครนายก (กนกทิพย์ และคณะ, 2562; กิตติพงษ์ และ พรทิพย์, 2562) โดยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการแพร่ระบาด ตัวอย่างเช่น ความชื้น อุณหภูมิ โครงสร้างของดิน pH และพันธุ์พืช (Peacock, 1957; Davide, 1980) นอกจากนี้ Suong et al. (2019) รายงานว่าอายุข้าวมีผลต่อปริมาณประชากรของไส้เดือนฝอย *M. graminicola* ด้วยเช่นกัน โดยในการศึกษาครั้งนี้พบไส้เดือนฝอยรากปมเป็นจำนวนมากในข้าวอายุ 90–120 วัน และที่ดิน pH 5.3–6.7

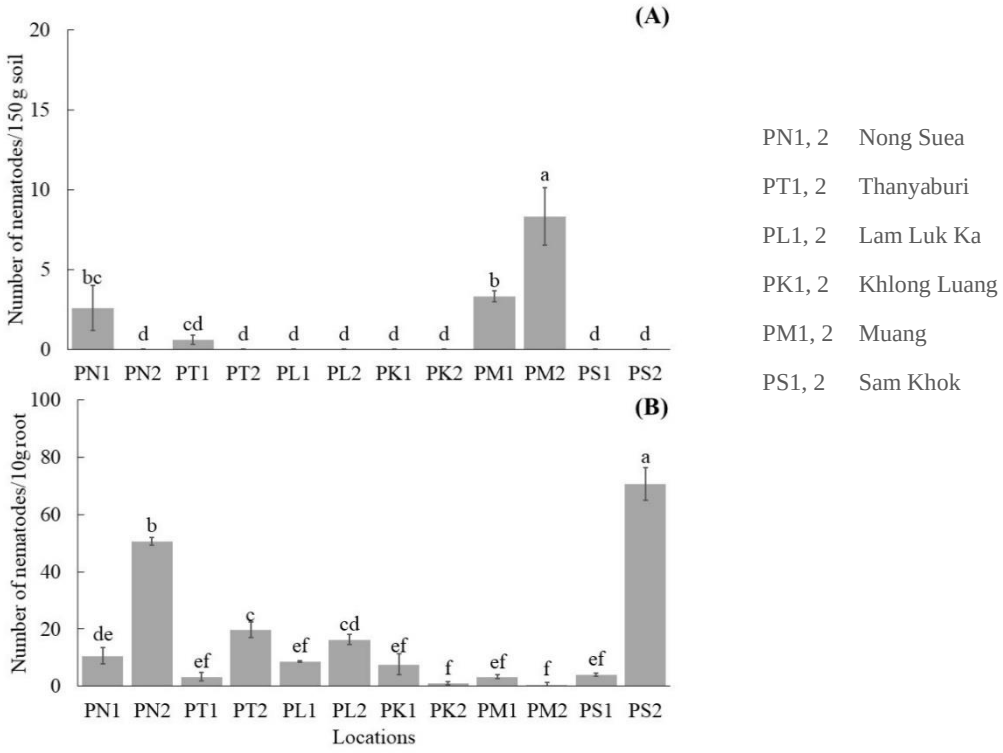
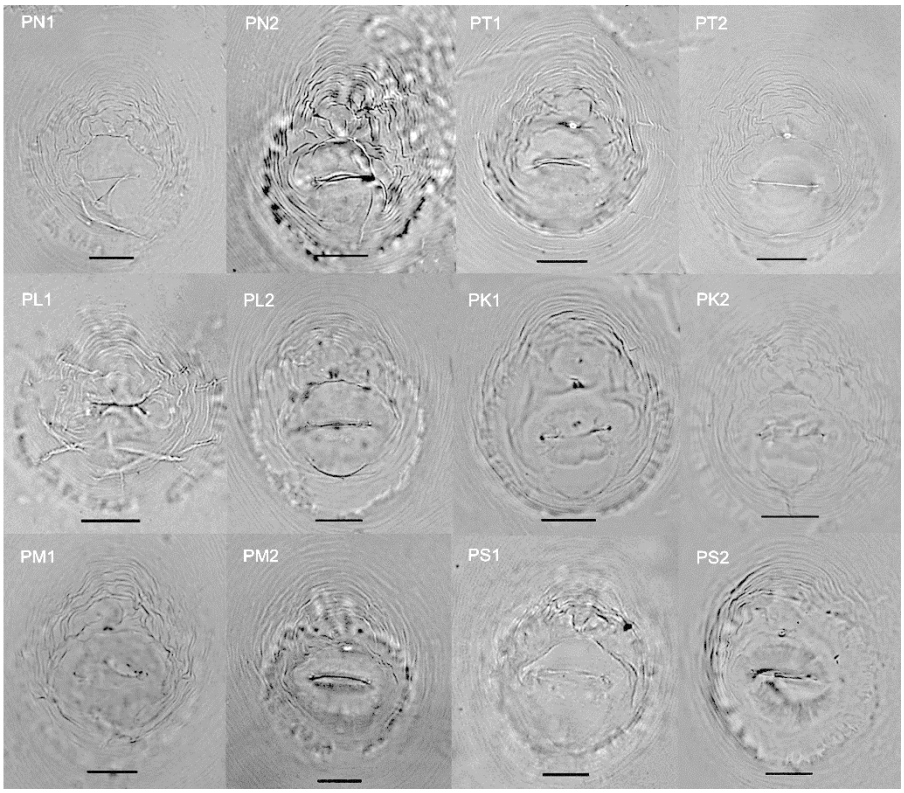


Figure 1 Population densities of root-knot nematodes in 150 g soil (A) and 10 g rice roots (B) isolated from rice fields of six districts of Pathum Thani province, Thailand. Mean of the numbers of nematodes (n=3) were compared using Duncan adjustment for multiple comparisons. Similar lower-case letters indicated that means are not significantly different (P<0.05). Bar refers to standard error

2. การระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้เทคนิคทางสัณฐานวิทยา

จากการเก็บตัวอย่างรากข้าวทั้งหมด 12 แปลงแล้วนำมาระบุชนิดด้วยการตรวจสอบลักษณะรอยหยักส่วนก้นของไส้เดือนฝอยรากปมเบื้องต้นพบว่าไส้เดือนฝอยรากปมทั้งหมดมีลักษณะกลมเป็นรูปไข่ (oval shape) และไม่พบ lateral line (**Figure 2**) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเหมือนกับลักษณะรอยหยักส่วนก้นของ *M. graminicola* ดังนั้นจึงเลือกไส้เดือนฝอยรากปมจากอำเภอสามโคก ซึ่งมีการพบปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมในรากข้าวมากที่สุดจากพื้นที่ทั้งหมด 6 อำเภอ เป็นตัวแทนเพื่อยืนยันชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม โดยลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนระยะที่ 2 และเทคนิคทางอณูชีววิทยา



PN1, 2 Nong Suea
PT1, 2 Thanyaburi
PL1, 2 Lam Luk Ka
PK1, 2 Khlong Luang
PM1, 2 Muang
PS1, 2 Sam Khok

Figure 2 Perineal pattern analysis of root-knot nematodes collected from rice fields of Pathum Thani province, Thailand. Scale bars= 20 µm

จากการศึกษาตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมในอำเภอสามโคกพบว่ามีความยาวลำตัวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 427–501 ไมโครเมตร stylet มีความยาวเท่ากับ 13–15 ไมโครเมตร ความกว้างของลำตัวเท่ากับ 13–17 ไมโครเมตร ความยาวหางเท่ากับ 65–98 ไมโครเมตร ความกว้างบริเวณหางเท่ากับ 8-12 ไมโครเมตร ส่วนค่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphometric character) มีดังนี้ a = 26.7–35.3, b' = 5.0–6.4, c = 4.8–7.1 และ c' = 6.1–9.2 บริเวณหางจะมีลักษณะมน เป็นรูปกรวย (conoid) และเป็นติ่งใส (**Figure 3**) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ กนกทิพย์ และคณะ (2562), Hunt and Handoo (2009) และ Salalia et al. (2017) ที่รายงานว่าลักษณะรอยหยักส่วนก้นและลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบเป็นลักษณะของไส้เดือนฝอย *M. graminicola*

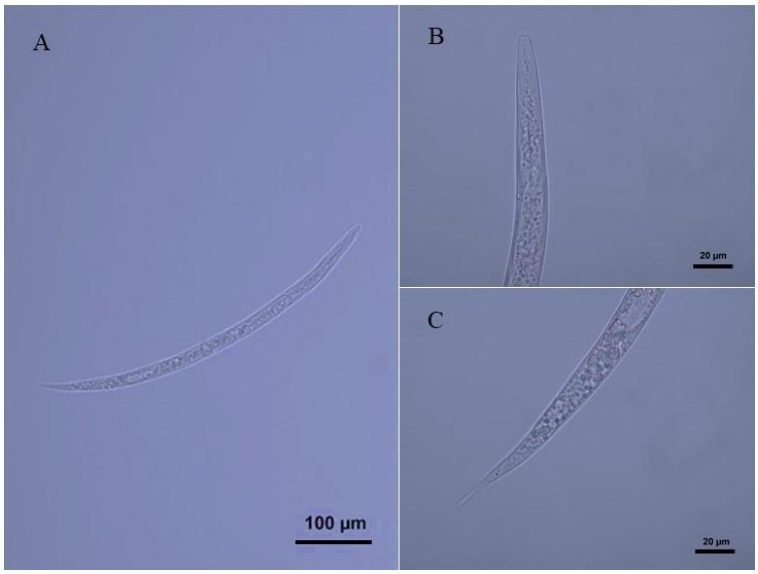


Figure 3 Photographs of second stage juvenile of *Meloidogyne graminicola*, (A) Whole body (100×); (B) Anterior region (1,000×); (C) Posterior region (1,000×)

3.การระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s, C_2F_3/1108 และ SCAR-MgFW/ SCAR-MgRev พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาด 450, 520 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ (**Figure 4**) จากนั้นนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับไส้เดือนฝอย *M. graminicola* เท่ากับ 98–99 เปอร์เซ็นต์ และทำการบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมี accession no. คือ MT271019–MT271021 นอกจากนี้ผลของการศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยรากปมที่บริเวณยีน 18S-ITS1-5.8S พบว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกได้จากอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี อยู่ในกลุ่มเดียวกับไส้เดือนฝอย *M. graminicola* จากประเทศเวียดนาม (MN602297, MN602698 และ MT818612) (**Figure 5**) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Bellé et al. (2019) ที่รายงานขนาดดีเอ็นของไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* เท่ากับ 439 คู่เบสเมื่อใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s

ในปัจจุบันพบว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่เข้าทำลายข้าวในประเทศแถบทวีปเอเชียมีอยู่ 2 ชนิดคือ *M. graminicola* และ *M. incognita* (Pokharel et al., 2010; Ruanpanun and Khun-In, 2015) โดยพบว่าหากใช้ไพรเมอร์ C_2F_3/1108 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปมข้าว *M. graminicola* และ *M. incognita* จะมีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 520 และ 1,500 คู่เบส ตามลำดับ (Powers and Harris, 1993; Long et al., 2017) ส่วนการใช้ SCAR-MgFW/ SCAR-MgRev ผลพบว่ามีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 650 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bellafiore et al. (2015) ที่รายงานว่าไส้เดือนฝอยดังกล่าวเป็นไส้เดือนฝอย *M. graminicola* ดังนั้นจากการระบุชนิดด้วยการใช้ไพรเมอร์ 3 คู่จึงยืนยันได้ว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานี คือ ไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola*

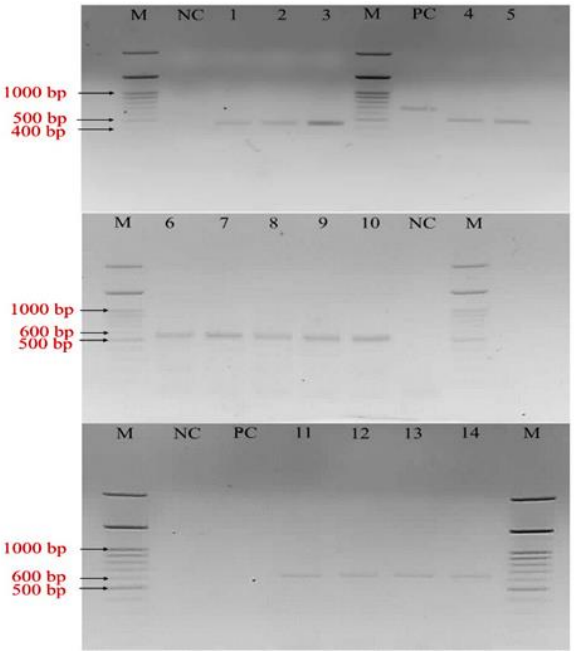


Figure 4 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified DNA of *Meloidogyne graminicola*, isolated from Sam Khok district, Pathum Thani province, Thailand, by using primers rDNA2/rDNA1.58s (lane no. 1–3), C_2F_3/1108 (lane no. 4–10) and SCAR-MgFW/ SCAR-MgRev (lane no. 11-14). (M) 100+bp DNA marker; (NC) negative control without DNA template; (PC) positive control with DNA template of *Meloidogyne enterolobii*

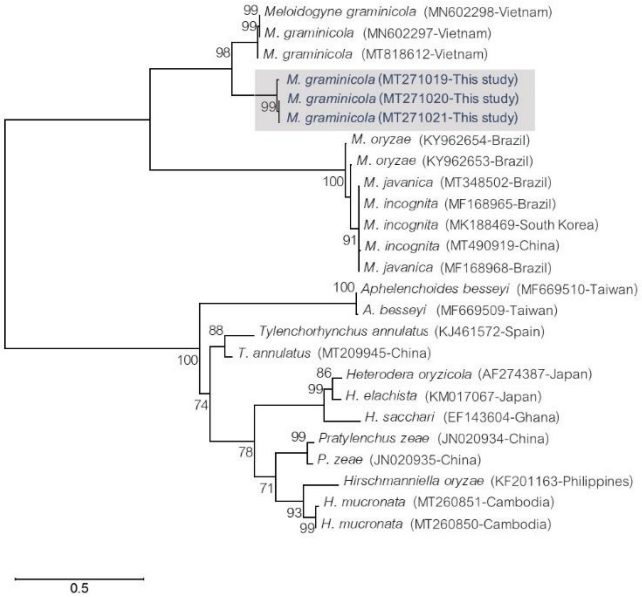


Figure 5 Phylogenetic reconstruction based on 18S-ITS1-5.8S regions of *Meloidogyne graminicola* isolated from Sam Khok's rice field, Pathum Thani province, Thailand and some other plant-parasitic nematodes in rice. Numbers beside branches represent ML bootstrap support values ≥ 70%. Scale bar represents substitutions per nucleotide position. NCBI accession numbers are listed behind the species names

สรุป

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา ทำให้ระบุได้ว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่ระบาดในทั้ง 6 อำเภอของจังหวัดปทุมธานี คือ *M. graminicola* ซึ่งจะพบอยู่อย่างหนาแน่นภายในรากข้าวมากกว่าในดิน แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องผลของการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมต่อผลผลิตข้าวพันธุ์ต่าง ๆ และวางแผนหาแนวทางป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปมข้าวต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน ที่สนับสนุนพื้นที่และอุปกรณ์สำหรับการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบคุณโครงการ PISAI project ภายใต้ the Erasmus+ programme ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กนกทิพย์ ทะลือ, บัญชา ชิณศรี, อนงค์นุช สาสนรักกิจ และธานี ศรีวงศ์ชัย. 2562. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจำแนกชนิดและความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของ *Meloidogyne graminicola* ที่พบในพื้นที่ต่าง ๆ. น. 723–730. ใน: การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 20 วันที่ 15 มีนาคม 2562. บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

กิตติพงษ์ ศรีม่วง และพรทิพย์ เรือนปานันท์. 2562. ไส้เดือนฝอยศัตรูข้าวที่ต้องเฝ้าระวังในจังหวัดนครนายก. น. 138–145. ใน: ประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวครั้งที่ 36 วันที่ 12-15 พฤษภาคม 2562. กรมการข้าว, กรุงเทพฯ.

กรมการข้าว. 2563. แผนที่เขตศักยภาพการผลิตข้าว. แหล่งข้อมูล: http://brrd.ricethailand.go.th/ricemap/riceCD52/index.php-url=detail.php&region_id=1&province_id=13.htm. ค้นเมื่อ 13 สิงหาคม 2563.

ธนากร จันทร์มาลี และวราภรณ์ ประกอบ. 2553. การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. บางไอโซเลทของไทย โดยเทคนิค PCR. วารสารเกษตร. 26: 195–202.

บุญหงษ์ จงคิด และวุฒิชัย แตงทอง. 2557. ผลการทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมต่อผลผลิตของข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์กลาย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22: 222–226.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร. แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th. ค้นเมื่อ 9 มกราคม 2563.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2563. ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร. แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/second%20rice%2062%20province%2030-1-63-2(2).pdf. ค้นเมื่อ 5 กรกฎาคม 2563.

Bellafiore, S., C. Jougla, E. Chapuis, G. Besnard, M. Suong, P.N. Vu, D.D. Waele, P. Gantet, and X.N. Thi. 2015. Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. Comptes Rendus Biologies. 338: 471–483.

Bellé, C., T.E. Kaspary, R.R. Balardin, and Z.I. Antoniolli. 2019. Detection of *Meloidogyne graminicola* parasitising *Cyperus rotundus* in Rio Grande do Sul, Brazil. Australasian Plant Disease Notes. 14: 2.

Besnard, G., N. Thi-Phan, H. Ho-Bich, A. Dereeper, H.T. Nguyen, P. Queneherve, J. Aribi, and S. Bellafiore. 2019. On the close relatedness of two rice-parasitic root-knot nematode species and the recent expansion of *Meloidogyne graminicola* in Southeast Asia. Gene. 10: 175.

Carneiro, R.M.D.G., F.S.O. Lima, and V.R. Correia. 2017. Methods and tools currently used for the identification of plant parasitic nematodes. P. 19-35. In: M.M. Shah, and M. Mahamood. Nematology: Concepts, Diagnosis and Control. IntechOpen, London.

Christie, J. R., and V.G. Perry. 1951. Removing nematodes from soil. Proceedings of the Helminthological Society of Washington. 18: 106–108.

Coyne, D.L., J.M. Nicol, and B. Claudius-Cole. 2007. Practical Plant Nematology: A Field and Laboratory Guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.

Davide, R.G. 1980. Influence of cultivar, age, soil texture, and pH on *Meloidogyne incognita* and *Radopholus similis* on banana. Plant Disease. 64: 572–573.

Holterman, M., A. Wurff, S. Elsen, H. Megan, T. Bongers, O. Holovachov, J. Bakker, and J. Helder. 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep Phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. Molecular Biology and Evolution. 23: 1792–1880.

Hunt, D.J., and Z.A. Handoo. 2009. Taxonomy identification and principal species. P. 55-88. In: R.N. Perry, M. Moens, and J.L. Starr. Root-knot Nematodes. CABI, Massachusetts.

Jain, R.K., K.N. Mathur, and R.V. Singh. 2007. Estimation of losses due to plant parasitic nematodes on different crops in India. Indian Journal of Nematology. 37: 219–220.

Jones, J.T., A. Haegeman, E.G.J. Danchin, H.S. Gaur, J. Helder, M.G.K. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-Lopez, J.E. Palomares-Rius, W.M.L. Wesemael, and R.N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology. 14: 946–961.

Long, H.B., Y.F. Sun, T.Z. Feng, Y.L. Pei, and D.L. Peng. 2017. First report of *Meloidogyne graminicola* on soybean (*Glycine max*) in China. Plant Disease. 101: 1554.

Maas, P.W., H. Sanders, and J. Dede. 1978. *Meloidogyne oryzae* n. sp. (nematoda, Meloidogynidae) infesting irrigated rice in Surinam (South America). Nematologica. 24: 305–312.

Mantelin, S., S. Bellafiore, and T. Kyndt. 2017. *Meloidogyne graminicola*: a major threat to rice agriculture. Molecular Plant Pathology. 18: 3-15.

Padgham, J.L. 2003. Impact of the rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) on lowland rainfed rice in northern western Bangladesh. Ph.D. Thesis. Cornell University, New York, USA.

Peacock, F.C. 1957. Studies on root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* in the gold coast. Nematologica. 2: 114–122.

Pokharel, R.R., G.S. Abawi, J.M. Duxbury, C.D. Smat, X. Wang, and J.A. Brito. 2010. Variability and the recognition of two races in *Meloidogyne graminic*ola. Australasian Plant Pathology. 39: 326–333.

Powers, T.O., and T.S. Harris. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. Journal of Nematology. 25: 1–6.

Ruanpanun, P., and A. Khun-In. 2015. First report of *Meloidogyne incognita* caused root knot disease of upland rice in Thailand. Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences. 21: 68–77.

Salalia, R., R.K. Walia, V.S. Somvansh, P. Kumar, and A. Kumar. 2017. Morphological, morphometric, and molecular characterization of intraspecific variations within Indian populations of *Meloidogyne graminicola*. Journal of Nematology. 49: 254–267.

Suong, M., E. Chapuis, V. Leng, F. Tivet, D. Waele, H.N. Thi, and S. Bellafiore. 2019. Impact of a conservation agriculture system on soil characteristics, rice yield, and root-parasitic nematodes in a Cambodian lowland rice field. Journal of Nematology. 51: 1–15.

Thorne, G. 1949. On the classification of the Tylenchida, new order (Nematode, Phasmidia). Proceedings of the Helminthological Society of Washington. 16: 37–73.

Vito, M.D., N. Vovlas, F. Lamberti, G. Zaccheo, and F. Catalano. 1996. Pathogenicity of *Meloidogyne javanica* on Asian and African rice. Nematologia Mediterranea. 24: 95-99.