

สัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยเพศผู้ไส้เดือนฝอยรากปม
สาเหตุโรคเน่าทุดของขิงโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
Morphology of Root - Knot Nematode Mature Males
Causing Rhizome - Wart on Ginger by Scanning Electron Microscopy

มนตรี เอี่ยมวิมangsa ^{1/}
Montree Iemwimangsa ^{1/}

ABSTRACT

Several stages of root - knot nematodes were collected from rhizome-wart disease of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). The morphological character of males were identified to be *Meloidogyne javanica* by the shape of the head, cephalic organ, stylet length and shape of basal knobs and the distance of the dorsal gland orifice from the base of knobs with the transparency light microscopy (TLM). The scanning electron microscopy (SEM) could distinct the male skin or cuticle showing shape of the head, annulation and the number of incisures and the ridge in the lateral field. One hundred males of *Meloidogyne* spp. from the area of root - knot nematodes infestation ginger soils in Chiang Rai province were collected and studied with SEM. The observations and identification were specified on head structure, body with lateral field and tail to be *M. javanica*. The steps of fixation, dehydration, drying, mounting, coating and SEM observation were clearly in the process. Photos were illustrated high, wide head cap with stoma and labial sensila, shape and proportion of labial disc and median lips, and protruding sharp tip stylet. The lateral field that begins as a ridge originates at 11th body annule from the head region and fuse completely around the tail tip. The excretory pore and phasmids are not visible. The cloacal opening showed two spicules.

Key words : ginger, rhizome, disease, root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, male, SEM

^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.10900

^{1/} Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office,
Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

โรครากปมและแ่งงูต (root-knot and rhizome-wart diseases) ของขิง (ginger, *Zingiber officinale* Rosc.) เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) เมื่อนำส่วนที่เป็นทูดมาแคะออก จะพบตัวของไส้เดือนฝอยในระยะการเจริญเติบโตหลายวัยอาศัยอยู่หลายวัย (stage) มีตัวเต็มวัยเพศผู้ฝังตัวอยู่มากกว่าพืชชนิดอื่น การจำแนกชนิดของตัวเต็มวัยเพศผู้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ชนิดแสงส่องผ่านโดยการวัดขนาดอวัยวะภายในลำตัว เช่น ส่วนโครงหัว ลักษณะหลอดดูดอาหาร อวัยวะเพศ พบว่าเป็น *M. javanica* ทำการศึกษาอวัยวะที่ผิวนอกลำตัว (cuticle) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) กับตัวเต็มวัยเพศผู้ ซึ่งได้จากการแคะตุ่มทูดแ่งขิงที่เป็นโรครากปมและแ่งงูตจากแหล่งปลูกอ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย โดยมีขั้นตอนต่างๆ ตั้งแต่การดองไส้เดือนฝอย การดึ่งน้ำออก การทำให้แห้ง การติดตัวอย่าง การฉาบผิวตัวอย่าง ตลอดจนการถ่ายภาพด้วย SEM ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง และศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2538 พบว่าส่วนหัวบริเวณริมฝีปากส่วนใน มีลักษณะกลมรวมติดอยู่กับริมฝีปากส่วนกลาง มีลักษณะเหมือนหมวก คลุมเกือบเต็มหัว ไม่มีริมฝีปากด้านข้าง ทำให้เห็นช่องเปิด มีหลอดดูดอาหารปลายแหลม โผล่ออกมาตรงช่องปากใกล้กับอวัยวะรับความรู้สึก (labial sensila) บริเวณแถบข้างลำตัว (lateral field) เกิดตรงปล้องวงแหวนที่ 11 มองเห็นเป็น 4 เส้น เพราะมีรอยเว้า 4 ร่องกับสันนูน

3 สันอยู่ตรงกลาง โดยทั้งสองข้างจะไปรวมกันที่ปลายหาง มองเห็นช่องขับถ่ายรวม (cloaca) มีอวัยวะเพศผู้ทั้งสองชิ้นโผล่ออกมา ไม่พบช่องขับถ่ายของเสีย (pore) และอวัยวะรับความรู้สึกสารเคมีในทุกตัวอย่าง

คำหลัก : ขิง โรครากปม ไส้เดือนฝอยรากปม เพศผู้ *Meloidogyne javanica* กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

คำนำ

ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่สำคัญที่สุดในประเทศไทยก็คือ ไส้เดือนฝอยรากปม (root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp.) การเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมไม่เพียงแต่ทำให้เกิดโรครากปมเท่านั้นอาจเข้าทำลายส่วนอื่นของพืชที่อยู่ในดินได้ด้วย เช่น ทำให้แ่งของขิงเกิดการแ่งงูต (Figures 1 and 2) หรือทำให้หัวของมันฝรั่งเกิดการหัวทูดได้เช่นกัน (มนตรี, 2541) วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปมเริ่มจากการลอกคราบภายในไข่ 1 ครั้ง แล้วฟักออกมาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 จากนั้นก็เข้าทำลายรากหรือส่วนอื่นของพืช โดยดูดกินอาหาร น้ำ ฟังตัวอยู่กับที่จนเกิดกลุ่มเซลล์ยักษ์ ตรงบริเวณที่ปากดูดกิน หลังจากนั้นมีการลอกคราบอีก 3 ครั้ง เพศเมียเปลี่ยนขนาดและรูปร่างไปมีลักษณะคล้ายผลแตง อาศัยอยู่บริเวณที่เป็นปมตลอดไป แล้วสร้างไข่ไว้ในกลุ่มไข่ ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่นอกรากเพื่อฟักลงสู่ดินต่อไป ในขณะที่ตัวเต็มวัยเพศผู้มีขนาดใหญ่ขึ้นไม่เปลี่ยนรูปร่างมีขนาดกว้างหรือเส้นผ่าศูนย์กลางลำตัวเฉลี่ย 0.033 มม. และยาวเฉลี่ย 1.142 มม. (Figure 3) และ

อาจเคลื่อนที่จากปมรากหรือแงงหูดลงสู่ดินได้เช่นกัน โดยหูดทำลายพืชและไม่มีความจำเป็นต้องผสมพันธุ์กับเพศเมีย ไชก็ยังสามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนได้ (สืบศักดิ์, 2541)

ชิง (ginger, *Zingiber officinale* Rosc.) มีปลุกอยู่ทั่วไปทุกภาคของประเทศ (คำนึ่ง, 2532) แหล่งใหญ่ที่ปลุกเป็นการค้าอยู่บริเวณภาคกลางใน จ.ราชบุรี กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สุพรรณบุรี นครปฐม ปทุมธานี และเพชรบุรี ภาคตะวันออกที่ จ.ปราจีนบุรี ภาคใต้ที่ จ.ชุมพร และนราธิวาส ภาคเหนือที่ จ.เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา เพชรบูรณ์ และพิษณุโลก และภาคตะวันออกที่ จ.ศรีสะเกษ อุตรธานี และเลย อนุวงศ์ (2527) รายงานว่าพื้นที่ปลุกชิงที่ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย ถ้าปลุกซ้ำที่บ่อยๆ มักมีโรคเหี่ยว (bacterial wilt) จากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* และโรครากปมจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* sp. โดยไม่ได้ศึกษาการสูญเสียผลผลิต ต่อมาโรคทั้งสองมีระบาดไปหลายแห่ง มนตรี และจรัส (2533) ศึกษาการแพร่กระจายไส้เดือนฝอยในแปลงชิง พบหลายชนิดเรียงลำดับจากมากไปหาน้อยคือ *Helicotylenchus* spp., *M. incognita*, *Hoplolaimus* spp., *Tylenchorynchus* spp., *Pratylenchus* spp. และ *Heterodera* sp. พบว่า *M. incognita* ระบาดมากที่สุดที่ อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ Toida และคณะ (1990) พบ *M. incognita* และ *M. javanica* ในแปลงชิงที่ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย จากการติดตามแหล่งปลุกและแหล่งรับซื้อชิงที่ อ.ซุขันธ์ จ.ศรีสะเกษ อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์ และ อ.ภูเรือ จ.เลย มีปัญหาการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม

คล้ายกัน นั่นคือการใช้แงงพันธุ์ที่เป็นหูด โดยเข้าใจผิดว่าตุ่มหูดเป็นตายอด เมื่อนำไปปลุกไส้เดือนฝอยก็จะออกมาจากตุ่มหูด ลงสู่ดินเข้าทำลายรากและแงงต่อไป และยังเกิดรวมและช่วยแพร่โรคเหี่ยวได้อีก การนำตุ่มหูดจากแงงชิงมาฟ้อออกดู จะพบไส้เดือนฝอยรากปมทุกระยะการเจริญเติบโตคือ ไช ตัวอ่อนที่มีการลอกคราบเป็นระยะต่างๆ (vermiform juveniles or larva) ตัวอ่อนระยะเริ่มพองตัวคล้ายไส้กรอก (sausage-shaped juveniles) ตัวเต็มวัยเพศเมียคล้ายแตงโมหรือลูกแพร์ (melon or pear-shaped mature females) และตัวเต็มวัยเพศผู้คล้ายปลาไหล (ell-liked mature males) ทั้งนี้เป็นเพราะเนื้อเยื่อของแงงชิงเป็นเซลล์ของลำต้นต่างไปจากเนื้อเยื่อของราก มีการสร้างสารน้ำมันหอมระเหยที่เป็นพิษและมีการสร้างเซลล์ท่อหุ้มเกิดเป็นตุ่มหูดหุ้มล้อมตัวไส้เดือนฝอยไว้ เมื่อมีการฟักตัวออกมาจากไชหรือลอกคราบเป็นระยะต่างๆ ก็ถูกขังอยู่ในบริเวณตุ่มหูดนั่นเอง ต่างจากวงจรชีวิตในรากดั้งเดิมได้กล่าวมาแล้ว

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยดังกล่าว เป็นการศึกษากายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงส่องผ่าน (transparency light microscope, TLM) โดยดูลักษณะรูปร่างส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย การวัดขนาดอวัยวะต่างๆ ภายในลำตัวของตัวเต็มวัยเพศผู้และตัวอ่อนระยะที่ 2 ตลอดจนลักษณะภายนอกที่เด่นชัดบางส่วน และบางครั้งยังใช้พืชอาศัยช่วยแยกชนิด ตลอดจน race ต่างๆ ได้อีกด้วย (Taylor and Sasser, 1978; Boonduang and Pliansinchai, 1986 ; Jepson, 1987) ต่อมาความ

ก้าวหน้าทางชีวโมเลกุล ทำให้มีการศึกษาการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยได้ละเอียดและถูกต้องมากขึ้น นุชนารถ (2540) ทำการศึกษาตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมในประเทศไทย จำนวน 15 แห่ง พบว่า 10 แห่งจัดอยู่ใน 3 ชนิด คือ *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* และ *M. javanica* ในขณะที่อีก 5 แห่งอาจเป็นชนิดใหม่ การเจริญเติบโตเป็นเพศผู้หรือเพศเมียขึ้นอยู่กับอาหาร ถ้ามีอาหารมากพอก็จะเป็นเพศเมีย แต่ถ้าอาหารไม่เพียงพอ ปริมาณไส้เดือนฝอยมีมากหรือพืชแก่เกินไปก็จะพัฒนาเป็นเพศผู้มากขึ้น (Taylor and Saser, 1978) ความสำคัญของไส้เดือนฝอยรากปมอยู่ที่เพศเมีย เพราะมีความสามารถขยายพันธุ์ได้ โดยไม่ต้องได้รับการผสมพันธุ์จากเพศผู้ (parthenogenesis) ทั้งยังสร้างไข่ได้มากเก็บไว้ในถุงไข่ มีปริมาณ 300-1,000 ฟอง การเก็บตัวอย่างโรครากปมของพืชพร้อมกับดินปลูกไปตรวจในห้องปฏิบัติการ ส่วนใหญ่พบว่ามีตัวเต็มวัยเพศเมียกลุ่มไข่ และตัวอ่อนระยะอื่นๆอีกเล็กน้อย ส่วนในดินพบตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่ฟักมาจากกลุ่มไข่ และเพศผู้บ้างเป็นครั้งคราวเป็นเพราะมีน้อยตามเหตุผลที่กล่าวมาแล้ว หรือการเคลื่อนที่ซ้ำของเพศผู้ทำให้กรรมวิธีแยกไส้เดือนฝอยจากดินโดยวิธี "Sieving and Funnel Technique" ได้เพศผู้น้อยกว่าวิธี "Centrifugal Technique" ในปี พ.ศ. 2523 Eisenback และ Hirschmann (1980) ใช้วิธีนำรากมะเขือเทศที่เป็นปมจากไส้เดือนฝอยรากปมหลายชนิดไปล้างน้ำแล้ว บ่มในตู้เก็บความชื้นที่อุณหภูมิห้อง จึงพัฒนาเป็นเพศผู้ได้ แต่ก็มีบางสายพันธุ์ เช่น *M. hapla* สายพันธุ์จาก Maryland ไม่พัฒนาเป็นเพศผู้ มนตรี (2538) พบตัวเต็ม

วัยเพศผู้ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ฝังตัวอยู่ตรงบริเวณตุ่มหูคุดของแงงชิงจาก จ.เลย เป็นจำนวนมาก (Figure 2) อาจเป็นเพราะในแงงชิงมีสารธรรมชาติหลายชนิดไม่เหมาะสมที่จะเป็นอาหารของไส้เดือนฝอย จึงถูกกักบริเวณอยู่ในแงงชิงมากกว่าในรากชิง

การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัยเพศผู้ ตัวเต็มวัยเพศเมียและตัวอ่อนระยะที่ 2 ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงส่องผ่านตรวจดูลักษณะต่างๆ ตามวิธีของ Jepson (1983) พบว่าชิงจากจ.เชียงราย เป็นไส้เดือนฝอยรากปมชนิด *M. javanica* เนื่องจากไส้เดือนฝอยมีลำตัวใส (hyaline) การย้อมสีช่วยให้ลักษณะภายใน สามารถวัดความยาวของหลอดดูดอาหาร (stylet หรือ spear) แสดงรูปร่างของฐานหลอดดูดอาหาร (basal knobs) (Figure 5) มองเห็นช่องเปิดของต่อมสันหลัง (dorsal esophageal gland orifice) สามารถมองเห็นได้ชัด แต่ลักษณะภายนอกบางอย่างมองเห็นไม่เด่นชัด เช่น ริมฝีปาก ผนังลำตัวหรือช่องเปิดปลายหาง เป็นต้น การพบตัวเต็มวัยเพศผู้ของ *M. javanica* บริเวณตุ่มหูคุดของแงงชิงในปริมาณมากเช่นนี้ จึงควรศึกษาลักษณะอย่างอื่นที่สำคัญๆ เช่น ส่วนหัว บริเวณเส้นข้างลำตัวตลอดจนปลายหาง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดแสงส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) แม้ว่าการศึกษานี้เป็นวิธีการที่ยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง แต่ในประเทศไทยยังไม่มีผู้ใดศึกษาไว้ จึงควรทำการศึกษาเปรียบเทียบกับข้อมูลจากต่างประเทศ เพื่อเป็นพื้นฐานงานวิจัยทางสัตววิทยาและไส้เดือนฝอยศัตรูพืชต่อไป



Figure 1. Healthy ginger rhizome (left) and rhizome-wart disease (right)



Figure 2. Peeled ginger rhizomes showing clear skin (left) and brownish wart (right)

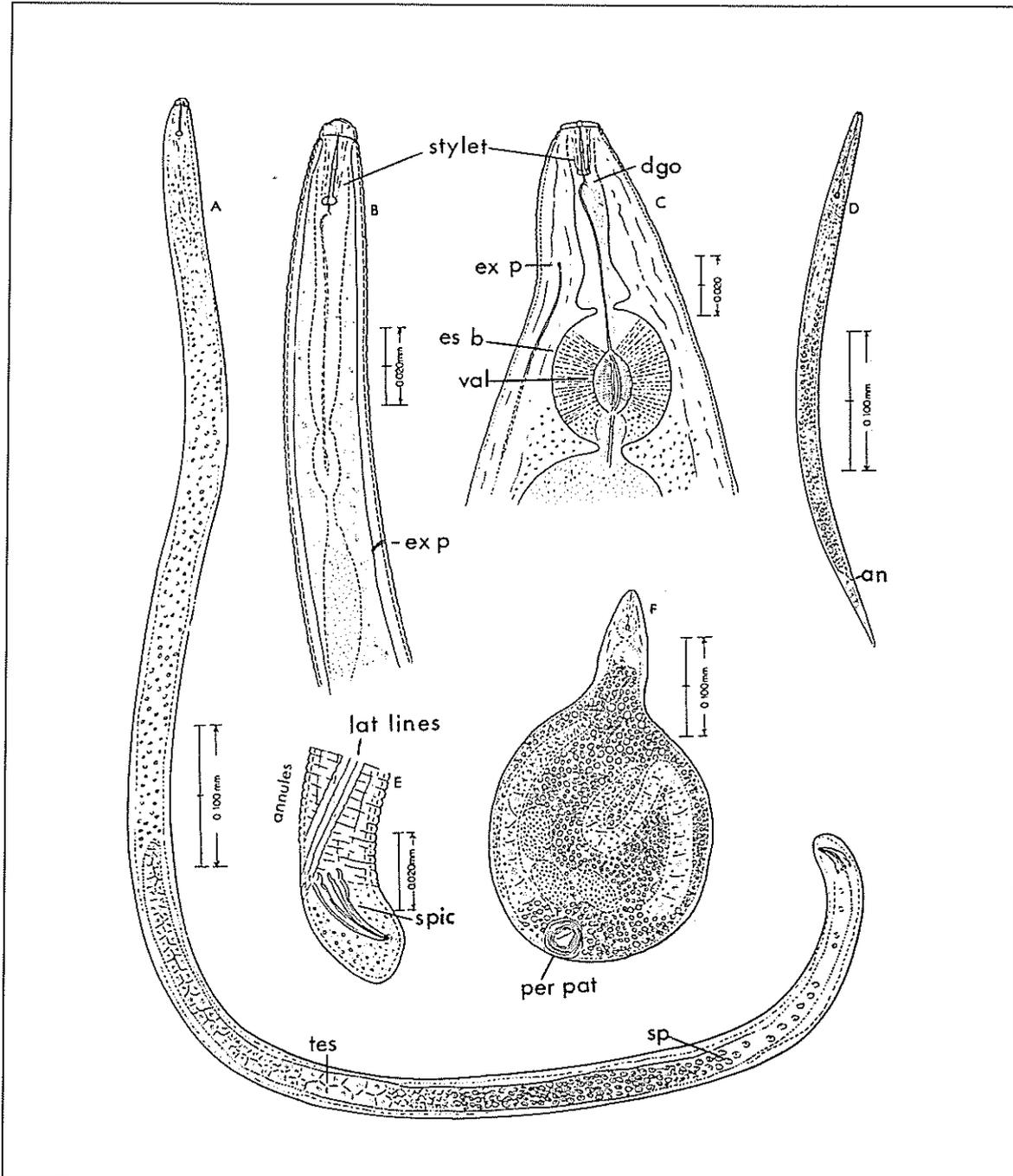


Figure 3. Anatomy of *Meloidogyne* species. A: male, full length, showing stylet, testis (tes), sperm (sp), and spicules. B: male anterior, showing stylet, esophagus and excretory pore(ex p). C: female anterior, showing stylet, dorsal gland orifice(dgo), ex p., esophageal bulb(es b), and valve (val). D: larva, showing stylet, es b.,and anus(an). The tail is the portion of the body posterior to the anus. E: male posterior, showing lateral(lat) lines, annules, and spicules, F: female, showing esophagus, ovaries, and perineal pattern. (Taylor and Sasser, 1978)

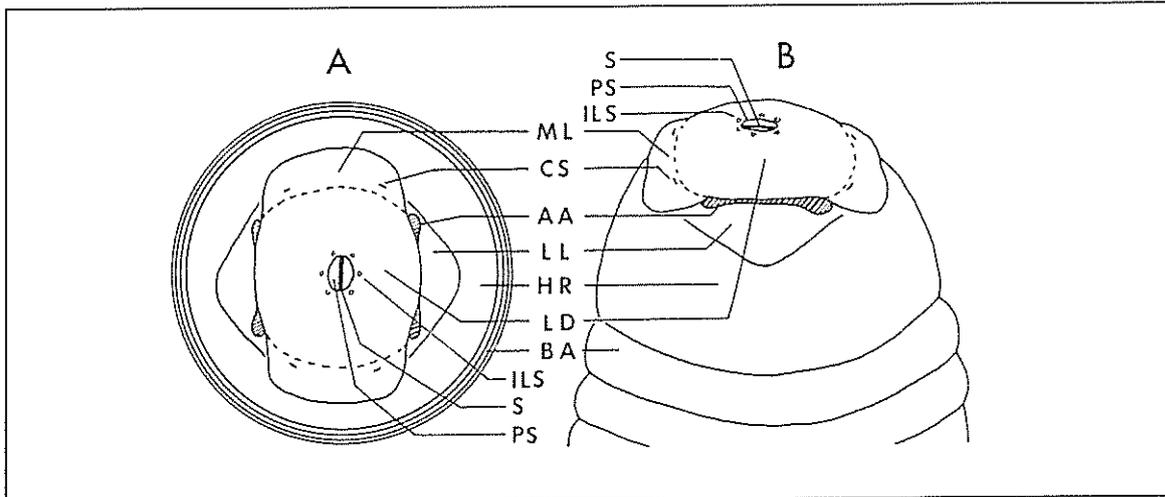


Figure 4-A,B. Diagram illustrating the generalized head morphology of a male of the genus *Meloidogyne* A) Face view B) View from the lateral side AA, amphidial aperture; BA, body annle; CS, cephalic sensillum; HR, head region; ILS, inner labial sensillum; LD, labial disc; LL, lateral lips; ML, medial lip; PS, prestoma; S, stoma (after Eisenback and Hirschmann, 1980)

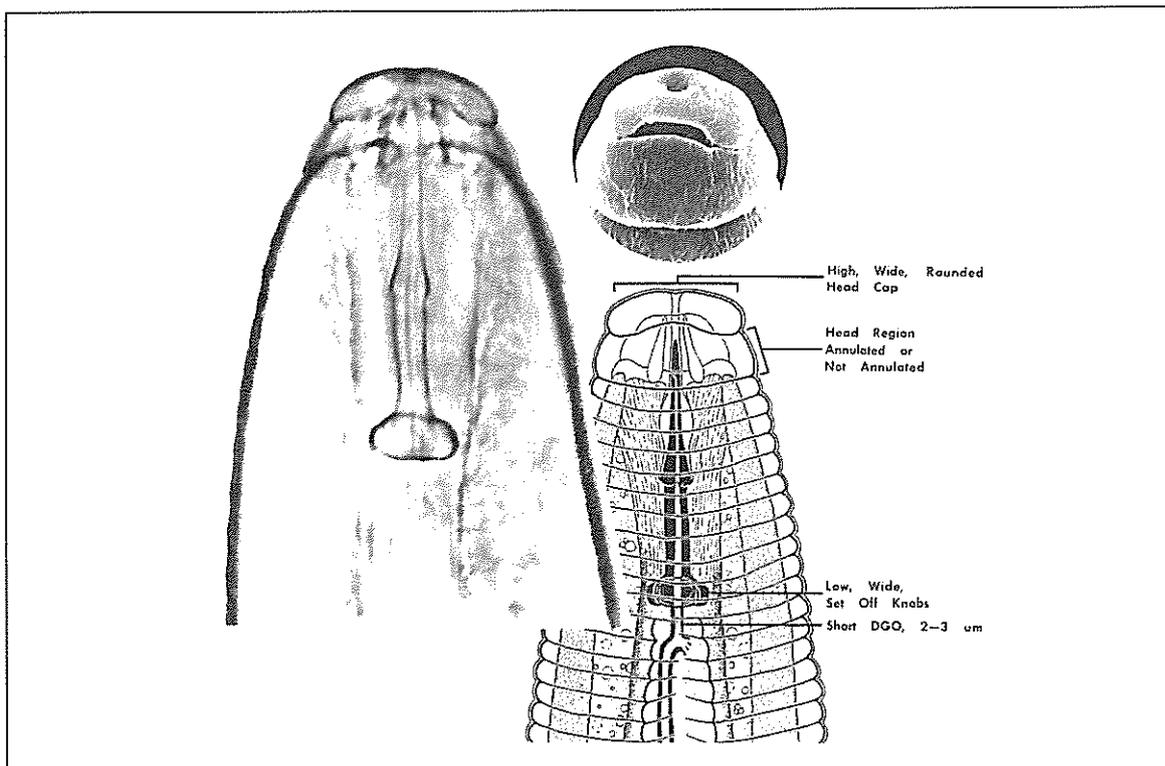


Figure 5. TLM and SEM photographs and line drawing of a male of *Meloidogyne javanica* (after Eisenback *et al.*, 1981)

อุปกรณ์และวิธีการ

นำแงงซึ่งที่เป็นโรคแ่งงหูตจากแหล่งปลูก อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย โดยการรวบรวมแงงซึ่งจากร้านรับซื้อซึ่งจากเกษตรกรรายย่อย มาแคหาตัวเต็มวัยเพศผู้ของไส้เดือนฝอยรากปม (*M. javanica*) ได้จำนวน 100 ตัว ใส่ลงในน้ำกลั่นแล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 60 °ซ. เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ไส้เดือนฝอยตาย แล้วนำไปดำเนินการต่อไปตามขั้นตอนต่างๆ ตามกรรมวิธีของอุไรวรรณ (2529) อรัญญา (2534) และ Shepherd (1970) ดังนี้

1. การรักษาตัวอย่างหรือการดองไส้เดือนฝอย ใช้ไม้ไฟปลายแหลมเขี่ยไส้เดือนฝอย ลงในขวดใสที่มีน้ำยา glutaraldehyde 2.5 % ใน buffer (0.1 MKPO₄, pH 7.2) ซึ่งเป็นน้ำยาดองขั้นแรก นำไปเก็บไว้ข้ามคืนในตู้เย็น จากนั้นเขี่ยไส้เดือนฝอยใส่กระบอกพลาสติกพิเศษชนิดทนสารเคมีขนาดเล็ก มีปลายทั้ง 2 ข้าง ปิดด้วยตะแกรง ขนาด 400 mesh นำกระบอกที่บรรจุไส้เดือนฝอยนี้ไปผ่านสารละลาย buffer ชนิดเดิมอีก 3 ครั้งๆละ 5 นาที เพื่อล้างน้ำยาดองขั้นแรกออก จากนั้นนำไปใส่น้ำยาดองขั้นที่ 2 คือ 2% Os O₄ ใน buffer ชนิดเดิมเป็นเวลา 2 ชม. ที่อุณหภูมิ 20 °ซ. เพื่อให้ Osmium ซึ่งเป็นโลหะหนักสามารถรวมกับองค์ประกอบต่างๆของไส้เดือนฝอยให้มีความทนทานและสภาพคงที่ แล้วจึงล้างออกด้วย buffer ชนิดเดิมล้างต่อด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้งๆละ 5 นาที

2. การดึงน้ำออกจากไส้เดือนฝอย แ่ชกระบอกพลาสติกในสารดูดความชื้น (dehydrant) คือ ethanol ตามลำดับความเข้มข้น คือ 30 50 70 90 และ 100% ขั้นตอนละ 30 นาที สุดท้ายแช่อยู่ใน 100% ethanol (absolute)

3. การทำตัวอย่างไส้เดือนฝอยให้แห้ง นำตัวอย่างแช่ใน amyl acetate ซึ่งมีกลิ่นฉุนเฉพาะตัวนาน 10 นาที นำไปเข้าเครื่องดูดสุญญากาศ เพื่อช่วยดึงอากาศออก จากนั้นนำไปเข้าเครื่องทำให้แห้งที่จุดวิกฤติ โดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลว ซึ่งมีจุดวิกฤติที่อุณหภูมิ 31 °ซ. ความดัน 73.8 bar เป็นเวลา 30 นาที ไส้เดือนฝอยจะแห้งสนิท โดยสภาพที่เหมือนเดิม นำกระบอกพลาสติกออกมาอย่าให้มีการกระทบกระเทือน

4. การติดตัวอย่าง นำเทปกาวใสที่ติด 2 หน้า ตัดเป็นชิ้นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 ซม. ติดลงบนแท่งติดตัวอย่าง นำตัวอย่างไส้เดือนฝอยจากกระบอกพลาสติกเทลงบนจานแก้ว ระมัดระวังอย่าให้รุนแรง ไส้เดือนฝอยที่แห้งสนิทจะกรอบและเปราะ ใช้พู่กันเขี่ยตัวไส้เดือนฝอยวางลงบนเนื้อกาว จัดให้ส่วนที่ต้องการถ่ายภาพอยู่ด้านบน

5. การฉายภาพตัวอย่าง ใช้โลหะหนักที่มีคุณสมบัตินำไฟฟ้าและนำความร้อนคือทองคำเคลือบผิวไส้เดือนฝอย โดยนำแท่งติดตัวอย่างใส่ลงในเครื่องระเหย 5 นาที จากนั้นต่อด้วยขบวนการเคลือบด้วยประจุลบด้วยไอทองอีก 10 นาที ตัวอย่างไส้เดือนฝอยที่โพล์เหนือกาวจะมีทองเคลือบผิวอยู่หนาประมาณ 200-300 Å

6. การศึกษาตัวอย่างด้วย SEM นำแท่งติดตัวอย่าง ย้ายลงในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิด JEOL รุ่น JSM-35-CF กำลังไฟ 150 Amp การศึกษา SEM ภาพปรากฏออกมาที่จอ แล้วบันทึกภาพด้วยฟิล์มขาว - ดำ ชนิดม้วนขนาด 120 มม. (Kodak VP 6041) เลือกถ่ายภาพบันทึกรายละเอียดส่วนหัว ลำตัวและปลาย

ทางเฉพาะตัวอย่างที่สมบูรณ์

ทำการศึกษาในช่วงปี พ.ศ. 2537 - 2538 โดยการนำภาพที่รวบรวมไว้มาแสดงให้ผู้สนใจได้ศึกษาต่อไป ขั้นตอนที่ 1-3 ทำการทดลองที่ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เกษตรกลาง เขตจตุจักร กทม. ขั้นตอนที่ 4-6 ทำการทดลองที่ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

ผลการทดลองและวิจารณ์

ปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม (*M. javanica*) เพศผู้จำนวน 100 ตัว เมื่อติดกาวบนแท่นติดตัวอย่าง พบว่าตัวไส้เดือนฝอยกรอบ เพราะหักเสียหายบ้าง บางครั้งก็ฝังอยู่ในกาวลึกเกินไป การจัดตำแหน่งไส้เดือนฝอยเพื่อสังเกตด้านตั้งทำไม่สะดวก ภาพถ่ายที่สมบูรณ์มีเพียง 7 ภาพ ตั้งแต่ภาพที่ 6 ถึง 12 (Figures 6 to 12) เป็นภาพด้านข้างของส่วนปลาย ลำตัว ตลอดจนส่วนท้ายหาง และมีรายละเอียดของภาพ มีดังนี้

1. ลักษณะส่วนหัว เป็นส่วนสำคัญที่ใช้จำแนกความแตกต่างกับ species อื่นๆได้ เรียกชื่ออวัยวะต่างๆ ของส่วนหัวของไส้เดือนฝอย (Figure 3) แสดงลักษณะของหลอดดูดอาหารและโครงหัวจาก TLM ด้านข้างของหัวจาก SEM และภาพวาดของ Eisenback และคณะ (1981) (Figure 5) จะเห็นว่ามีส่วนคล้ายกับ *M. javanica* ที่ได้จากแ่งชิงในประเทศไทย (Figures 6 to 8) โดยที่ส่วนของแผ่นริมฝีปากส่วนใน มีลักษณะกลมรวมติดอยู่กับริมฝีปากส่วนกลาง ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า ตรงช่องปาก มีส่วนเว้าเข้าไปเล็กน้อยและมีหลอดดูดอาหารปลายแหลมโผล่ออกมาให้เห็น

ส่วนของแกน (stylet shaft) (Figure 8) ริมฝีปากส่วนกลางแผ่คลุมส่วนของหัวคล้ายหมวก (head cap) อาจมีรอยเว้าเล็กน้อย แยกเป็น subventral และ subdorsal median lips (Figure 7) ไม่พบส่วนของริมฝีปากข้าง ช่องประสาทรับความรู้สึกส่วนใน (inner labial sensillum) เห็นไม่ชัดในภาพที่ 6 แต่เน้นตรงวงแหวน (annules) ที่ 1 เริ่มเห็นชัดเจนต่อมาจากโครงหัว

2. ลักษณะลำตัว รูปร่างโครงสร้างและลักษณะต่างๆบริเวณผิวลำตัวภายนอกของไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้ แทบจะไม่มี ความแตกต่างกัน มีรอยเว้ารอบลำตัว (striation) ลงไปเล็กน้อยเกิดเป็นวงแหวนทำให้มองเห็นเป็นปล้องๆ แต่ไม่ลึกเข้าไปในลำตัวซึ่งแตกต่างจากไส้เดือนดิน และในแต่ละวงแหวนก็ยังมีริ้วรอยเป็นคลื่นๆอีกด้วย ไม่พบช่องขับถ่ายของเสีย ในบริเวณนี้ แสดงให้เห็นจุดกำเนิดของบริเวณเส้นข้างลำตัว เริ่มต้นตั้งแต่รอยหยักวงแหวนรอบลำตัวที่ 11 (Figures 6) Eisenback และ Hirschmann (1980) พบว่าเส้นข้างลำตัวเริ่มต้นที่รอยหยักระหว่าง 8-12 ไม่ถือเป็นกฎตายตัว บริเวณเส้นข้างลำตัว ซึ่งประกอบด้วยร่องหรือรอยเว้า (incisures) 4 ร่องและสันนูน (ridges) 3 สันทอดไปตามความยาวของลำตัว ถ้าส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงส่องผ่านแบบธรรมดา จะมองเห็นเส้นข้างลำตัว 4 เส้น รอยเว้าของวงแหวนตัดกันกับสันนูนทำให้เกิดลวดลายเป็นริ้วรอย (Figures 9 and 10)

3. ลักษณะส่วนหาง เป็นส่วนที่เส้นข้างลำตัวทั้งสองด้านมาเชื่อมกันตาม (Figures 11) โดยที่สันนูนทั้ง 3 สันเริ่มรวมกัน รอยเว้า 2 ร่องที่อยู่ใกล้คอค่อยๆหายไปไม่พบช่องเปิดอวัยวะรับความรู้สึกทางสารเคมี (phasmids) ที่บริเวณนี้ แต่

พบอวัยวะเพศผู้ (spicules) ซึ่งมี 2 ชั้น โผล่ออกมาจากช่องขับถ่ายรวม ให้เห็นใน (Figures 9, 11 and 12) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกล้ามเนื้อดึงกลับ (retractor muscle) ถูกทำลายไป

Eisenback และ Hirschmann (1981) รายงานศึกษารายละเอียดของหลอดดูดอาหารไว้

มากแล้ว ตัวอย่างไส้เดือนฝอยบางตัวมีลักษณะบิดงอถ่ายภาพยากอาจมีผลมาจากลำแสงอิเล็กตรอนก็ได้ (Sher and Bell, 1975) ขั้นตอนในการศึกษาค้างนี้อาจจะยุ่งยากและสิ้นเปลืองบ้าง แต่ก็เห็นว่าเป็นข้อมูลอย่างดีสำหรับผู้สนใจทางด้านนี้นำไปปรับปรุงแก้ไขต่อไป

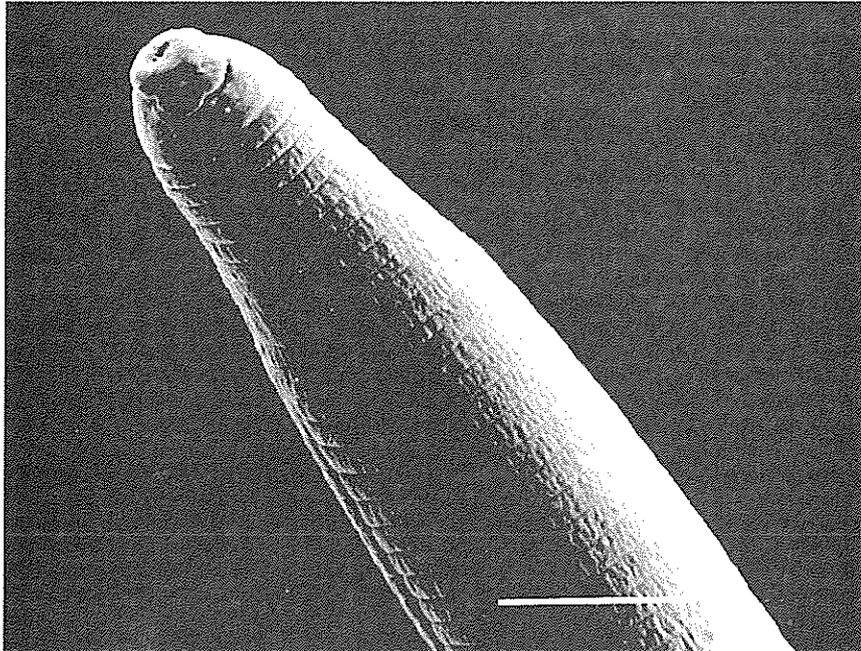


Figure 6. An approximately lateral view of male of *M. javanica* from ginger rhizome showing a head region with head cap. The lateral field begins as a ridge that originated at 11th body annule. (bar = 20 microns)

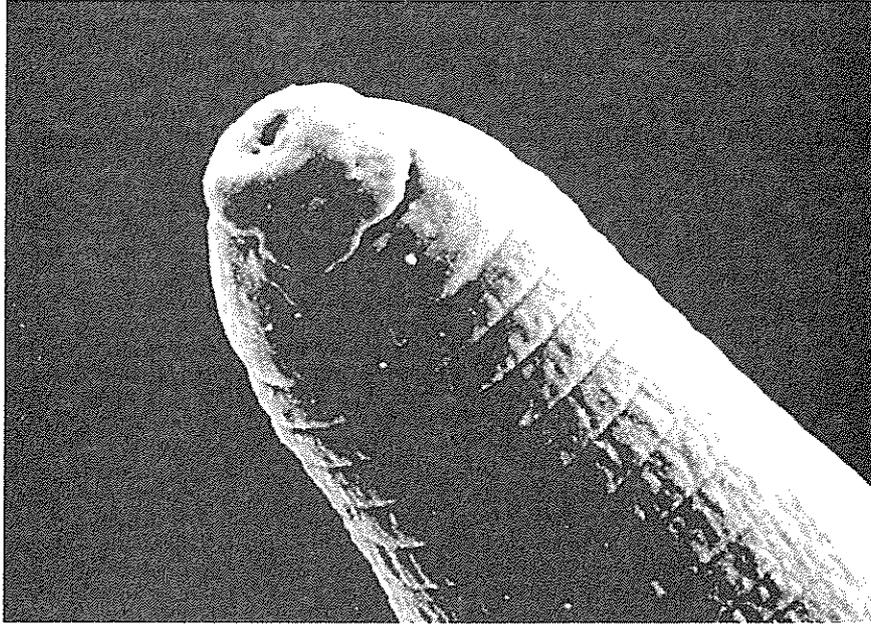


Figure 7. An close-up head view of *M. javanica* showing stoma, prestoma, inner labial sensillum, labial disc, sub ventral and sub dorsal median lips are in the same contour and fuse to form a continuous elongate structure (head cap), lateral lips are absent, amphid aperture are exposed. (bar = 2 microns)

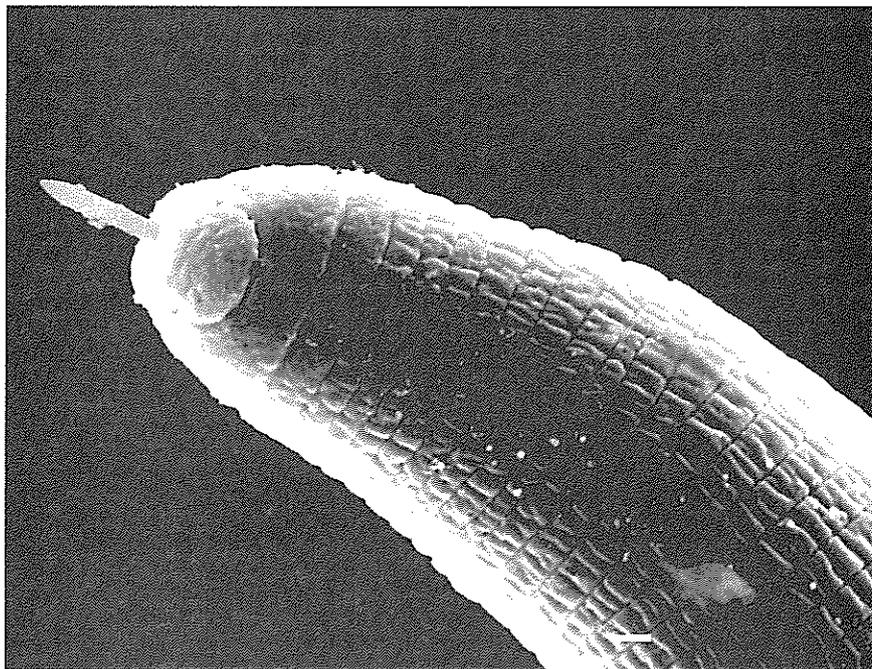


Figure 8. The sharp tip stylet shaft protruding from stoma, the median lips are AAwider than the labial disc and extend onto the head region. (bar = 2 microns)

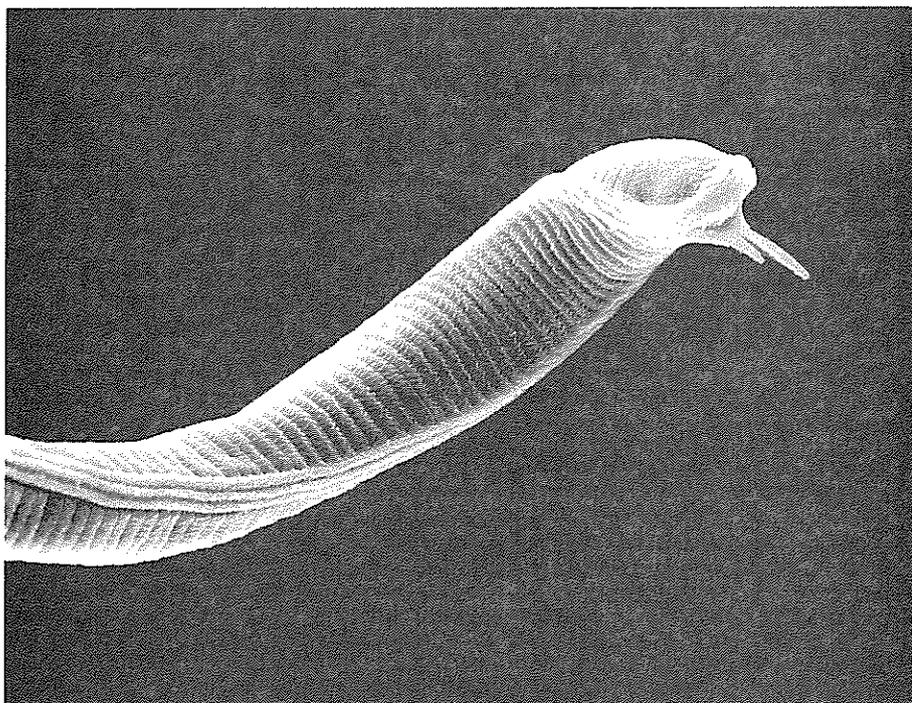


Figure 9. Twisting body with annulation and lateral field, and tail with spicules
(bar = 20 microns)

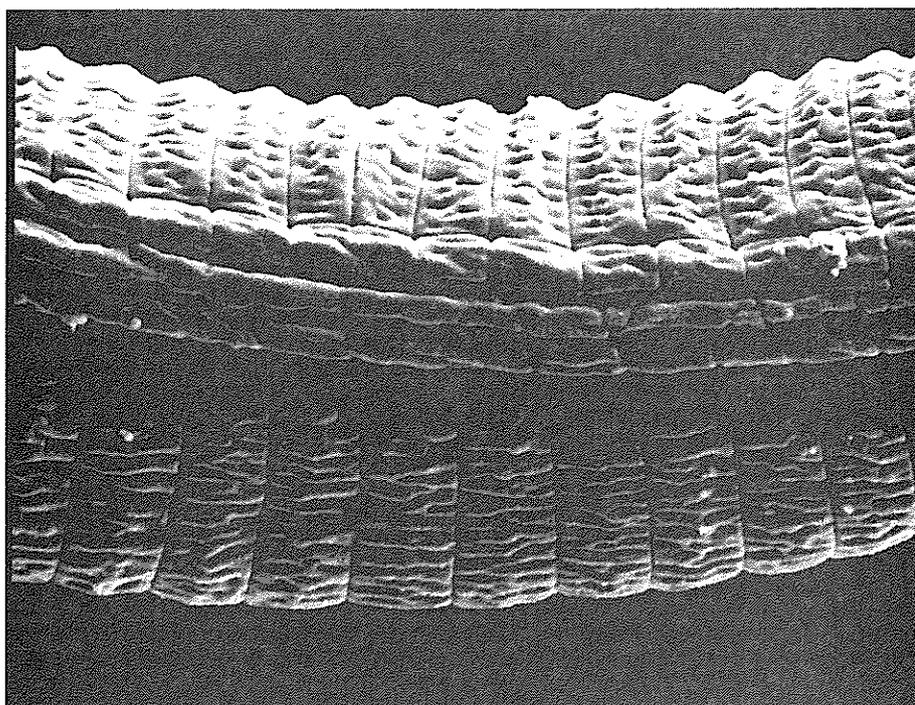


Figure 10. The body with aerolation, the 4 lateral lines in the lateral field illustrating 4
incisures and 3 ridges, and wavy cuticle in the annule

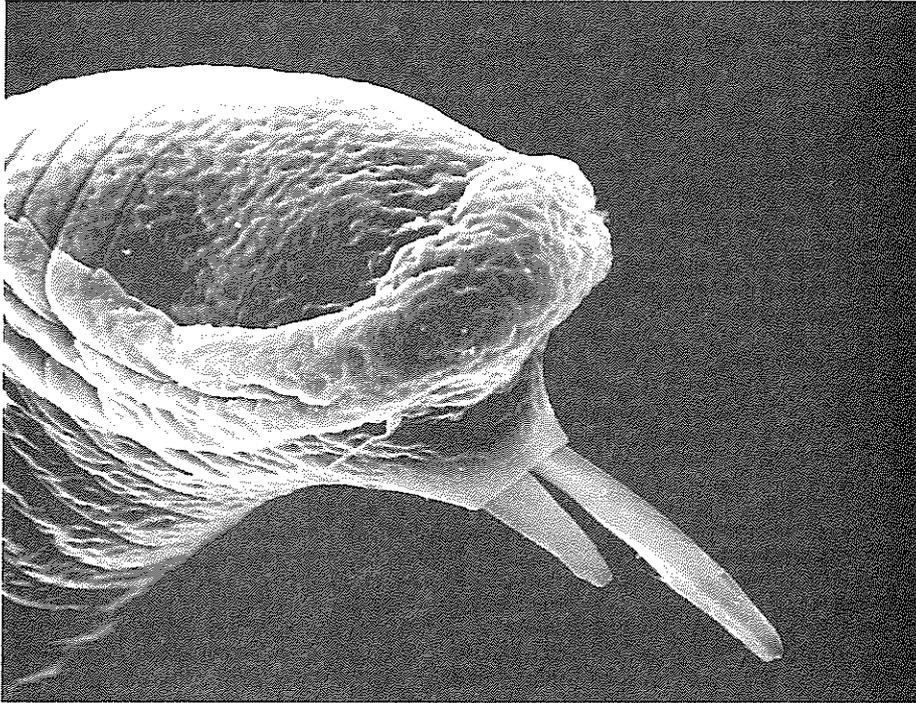


Figure 11. The posterior end of the tail showing the lateral field merges into the tail tip, the short and long retracted spicules from cloaca

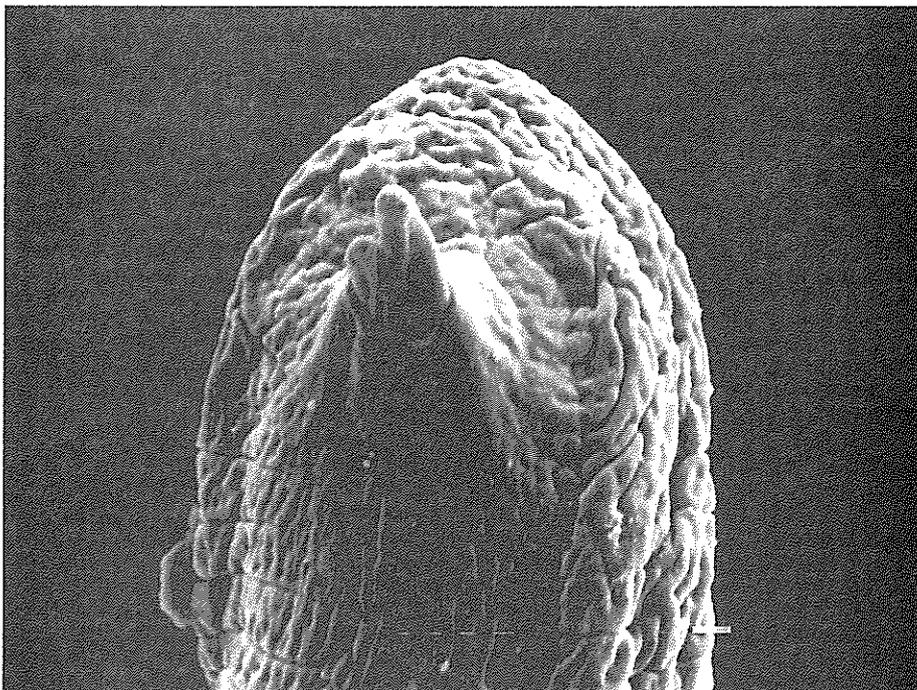


Figure 12. The dorsal view of the tail showing 2 spicules in the cloacal opening, tail tip with waxy cuticle and unannulation.

สรุปผลการทดลอง

ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชส่วนใหญ่ เพศเมียมีบทบาทในการทำลายและแพร่กระจายได้มากกว่าเพศผู้ การศึกษาลักษณะภายนอกของตัวเต็มวัยเพศผู้ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* ซึ่งพบมากในซิงที่เป็นโรคแคงทูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบส่วนของหัวที่มีแฟนนิมฟีปากด้านในเว้าเข้าเล็กน้อยรวมกับนิมฟีปากกลาง มีลักษณะเหมือนหมวกคลุมพื้นที่โครงหัวที่มีขนาดใหญ่ติดกับปล้องที่ 1 มีช่องประสาทรับความรู้สึกภายในมองเห็นบางส่วน ไม่มีนิมฟีปากข้างจึงมีช่องเปิดบางส่วน ผนังของลำตัวไม่ราบเรียบหยักเป็นรอยคลื่นมีเส้นขวางลำตัวเป็นวงแหวนคล้ายปล้องแต่ไม่เว้าเข้าในลำตัวเหมือนไส้เดือนดินโดยที่วงแหวนที่ 1 มองเห็นชัดเจน พบจุดเริ่มต้นของแถบข้างลำตัวบริเวณวงแหวนที่ 11 เป็นรอยเว้า 4 ร่องและสันนูน 3 สัน ทอดขนานไปตามสองข้างลำตัวแล้วไปรวมกันที่ปลายหาง ไม่พบรายละเอียดทั้งหมดเช่นช่องขับถ่ายของเสียและอวัยวะรับความรู้สึกทางสารเคมี กลับพบหลอดดูดอาหารและอวัยวะเพศทั้งสองชิ้น โผล่ออกมาจากช่องขับถ่ายรวม

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.พงศ์พันธุ์ เขียรศิริ ณ แห่งมหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ที่ช่วยเหลือการปฏิบัติในการศึกษาครั้งนี้จนสำเร็จลงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- คำนึ่ง คำอุดม. 2532. การปลูกซิง. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ. 63 หน้า.
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2540. การจัดจำแนกไส้เดือนฝอย *Meloidogyne species* โดยใช้ enzyme phenotype. *วารสารโรคพืช* 12 (2) : 91-98.
- มนตรี เอี่ยมวิม้งสา. 2538. ผลของสารเคมีและเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในแง่งพันธุ์ซิง. วิทยานิพนธ์, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 94 หน้า.
- มนตรี เอี่ยมวิม้งสา. 2541. โรคของมันฝรั่งที่เกิดจากไส้เดือนฝอย. หน้า 71-79. ใน มันฝรั่งและศัตรูที่สำคัญ. *เอกสารวิชาการฉบับที่ 22*, สถาบันวิจัยพืชสวน, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- มนตรี เอี่ยมวิม้งสา และ จรัส ชื่นราม. 2533. ศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในซิง. หน้า 10 -16. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2533 กลุ่มงานไส้เดือนฝอย, กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2541. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช : โรคและการจัดการ. สำนักพิมพ์รั้วเขียว กรุงเทพฯ. 215 หน้า.
- อนงค์ จันทศรีกุล. 2527. โรคและศัตรูบางชนิดของผักและการป้องกันกำจัด. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิชย์. กรุงเทพฯ. 141 หน้า.

- อรัญญา ดันติปัญจพร. 2534. การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน. *วารสารศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*. 1 (2) : 170-180.
- อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. 2529. อันตรายจากสารเคมีที่ใช้ในงานจุลทรรศน์อิเล็กตรอน. เอกสารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ฯ, สถาบันวิจัยและพัฒนา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 11 หน้า.
- Boonduang, A. and U. Pliansinchai. 1986. Identification of plant parasitic nematodes of Thailand: A systematic study of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Thailand. Nematology Section Technical Bulletin No. 6, Plant Pathology and Microbiology Div., Dept. of Agriculture, Bangkok. 17 p.
- Eisenback, J. D. and H. Hirschmann. 1980. Morphological comparison of *Meloidogyne* males by scanning electron microscopy. *Journal of Nematology* 12 : 23-32.
- Eisenback, J. D. and H. Hirschmann. 1981. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of head shape and stylet morphology of the male. *Journal of Nematology* 13 : 513-521.
- Eisenback, J. D., H. Hirschmann, J. N. Sasser and A. C. Triantaphyllou. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key. A Cooperative Publication of the Dept. of Plant Pathology N.C. State Univ. and the U. S. Agency for International Development, N.C. State Graphics, Raleigh, N.C., 48 p.
- Jepson, S.B. 1983. Identification of *Meloidogyne* : a general assessment and a comparison of male morphology using light microscopy with a key to 24 species. *Revue De Nematologie* 6 : 219-309.
- Jepson, S.B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) C. A. B. International, UK, 265 p.
- Shepherd, A. M. 1970. Preparation of nematodes for electron microscopy. Pages 88-95. *In* Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. *Technical Bulletin 2*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London.
- Sher, S. A. and A. H. Bell. 1975. Scanning electron micrographs of the anterior region of some species of Tylenchoidea (Tylenchida : Nematoda). *Journal of Nematology* 7 (1) : 69-83.
- Taylor, A. L. and J. N. Sasser. 1978. Biology, identification and control of root-knot

nematodes (*Meloidogyne* species). A Cooperative Publication of the Dept. of Plant Pathology N.C. State Univ. and the U. S. Agency for International Development, N.C. State Graphics, Raleigh, N.C., 111 p.

Toida, Y., S. Keereewan, Z. Sano, T. Mizukubo, M. Iemwimangsa and C.

Chunram. 1990. Studies on prevention of crop damage caused by nematodes in Thailand. Under the Cooperative Research Work between Tropical Agriculture Research Centre, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan and Department of Agriculture and Cooperatives, Thailand. 107 p.