ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ในไม้น้ำและไม้ดอกไม้ประดับ

Biology and Ecology of *Radopholus similis* in Aquatic Plant and Ornamental Plant

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด[1/] วานิช คำพานิช[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช [2/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาวงจรชีวิตและความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ในพรรณไม้น้ำ และหน้าวัว โดยใช้ไส้เดือนฝอย *R. similis* ที่เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในชิ้นแครอทสภาพปลอดเชื้อ ปลูกเชื้อจำนวน 20 ตัว/ต้น ในรากไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. ที่ปลูกในกล่องพลาสติกบรรจุทรายหยาบตั้งวางในระดับห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 25 วัน พบตัวเต็มวัยเพศเมียของ *R. similis* วางไข่ โดยพบไข่ของไส้เดือนฝอยติดสีแดงของสีย้อม acid fuchsin แสดงว่าไส้เดือนฝอยสามารถเข้าทำลายและเจริญเติบโตได้ในรากพืช เมื่อนำไปปลูกเชื้อในต้นไม้น้ำที่ปลูกในบ่อซีเมนต์จำนวน 100±10 ตัว/ต้น และทำการตรวจรากทุก 7 วันๆ ละ 5 ต้น โดยใช้เทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากด้วยคลื่นเสียง พบไส้เดือนฝอยเข้าสู่ระบบรากพืชทดสอบที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ และเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน พบไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตในราก โดยพบเพศเมียและเพศผู้จำนวน 22 และ 8 ตัว ตามลำดับ ในวันที่ 21 และ 28 วัน พบไข่ของไส้เดือนฝอยอยู่ภายในรากพืช และเริ่มพบตัวอ่อนระยะที่ 2 และ 3 รวมวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในไม้น้ำเท่ากับ 28 วัน สำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในหน้าววัวที่ปลูกในกระถางปลูกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว ตั้งวางในกรงปลูกพืช เป็นเวลา 3 เดือน พบไส้เดือนฝอยมีการเพิ่มปริมาณมากขึ้น 2 เท่า โดยตรวจพบระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย มีผลรวมของระยะต่างๆ ของไส้เดือนฝอยเฉลี่ยเท่ากับ 622 ตัว/ต้น

รหัสการทดลอง 07015101

คำนำ

Burrowing nematode (*Radopholus similis* Cobb, 1893; Thorne, 1949) เป็นศัตรูพืชกักกันของหลายประเทศ พบในแถบยุโรป อเมริกา และบางประเทศในเอเชีย เช่น เกาหลี และญี่ปุ่น ซึ่งแพร่ระบาดในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนทั่วโลก (Fogain, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งที่มีการปลูกกล้วย ได้แก่ ทุกประเทศในทวีปอัฟริกา บางประเทศในทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย อเมริกาใต้ และบางรัฐของอเมริกา พบมีพืชอาศัยมากกว่า 600 ชนิด แต่พืชอาศัยที่สำคัญ ได้แก่ กล้วย และส้ม ที่ปลูกในเขตร้อน กล้วยจัดเป็นพืชอาศัยที่สำคัญอันดับหนึ่งของไส้เดือนฝอยชนิดนี้ โดยพบว่า กล้วยเกือบทุกสายพันธุ์สามารถเป็นพืชอาศัยของ *R. similis* พืชชนิดอื่นๆ ที่จัดเป็นพืชอาศัย ได้แก่ มะพร้าว ขิง ปาล์ม อโวกาโด กาแฟ พริกไทย อ้อย ชา พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ หญ้า และวัชพืชหลายชนิด (Uchida *et al*., 2003) ไส้เดือนฝอย *R. similis* มีลักษณะการทำลายแบบ endoparasite โดยดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณท่อน้ำ-ท่ออาหารของรากพืช และเจริญเติบโตขยายพันธุ์อยู่ภายในรากจนครบวงจรชีวิต เริ่มจากตัวอ่อนระยะที่ 1 ฟักออกจากไข่ ใช้เวลา 3-7 วัน จากนั้นลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 3 และ 4 ตามลำดับ เจริญเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้-เพศเมีย และครบวงจรชีวิตในเนื้อเยื่อ พืชใช้เวลา 18-20 วัน ที่อุณหภูมิ 24-26 องศาเซลเซียส วงจรชีวิตนานมากขึ้น เมื่ออุณหภูมิต่ำลง ตัวเมียวางไข่โดยเฉลี่ย 2 ฟองต่อวัน ในบางครั้งพบว่า ตัวเมียสามารถออกไข่ได้โดยไม่มีการผสมพันธุ์กับตัวผู้ (parthenogenesis) และตัวผู้ของไส้เดือนฝอยชนิดนี้จะไม่เข้าทำลายหรือดูดกินน้ำเลี้ยงจากรากพืช (Evan *et al*., 1993)

ไส้เดือนฝอย *R. similis* จัดเป็นศัตรูพืชแบบ migratory endoparasite และทำให้เกิดโรค spreading decline ในพืชพวกส้ม (Duncan and Cohn, 1990) โดยอาการดังกล่าวมักเกิดขึ้นหลังจากไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากแล้วหนึ่งปี ส้มที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายจะมีจำนวนใบและการเจริญเติบโตลดลง สีของใบมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะซีดลง และเกิดอาการ dieback ของกิ่งส้ม ใบของส้มอาจเหี่ยวในเวลากลางวันแต่จะกลับเป็นปกติเมื่อเวลาได้รับน้ำหรือเมื่อฝนตก ส้มจะให้ผลผลิตลดลงและผลที่ได้จะมีขนาดเล็กและมีลักษณะเหมือนขาดธาตุอาหาร ในรัฐฟลอริดาพบว่าไส้เดือนฝอย *R. similis* ทำให้ผลผลิตของ grapefruit ลดลง 50 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของ orange พบว่า ไส้เดือนฝอยมีส่วนทำให้ผลผลิตลดลง 40 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ในพืชพวกอาโวกาโดก็เช่นเดียวกันพบว่า ผลผลิตลดลงเมื่อถูกไส้เดือนฝอยชนิดนี้เข้าทำลาย เมื่อทำการขุดรากที่ระดับความลึก 2.5 ฟุต จากระดับผิวดินพบว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของรากหาอาหาร (feeder roots) ได้ถูกทำลาย และเมื่อขุดลงไปลึกมากกว่านั้นพบว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของรากที่พบได้ถูกทำลายโดยไส้เดือนฝอย ในกล้วยพบว่าการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *R. similis* ทำให้เกิดอาการโค่นล้มของต้นกล้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นที่กำลังให้ผลผลิต เนื่องจากระบบรากได้ถูกทำลาย ในส่วนของรากพบว่าเกิดอาการเน่า (lesion) สีน้ำตาลหรือสีดำที่บริเวณจุดที่ไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย เมื่อไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ผ่านชั้น cortex ของรากพืช ทำให้เกิดโพรงและเปิดทางให้เชื้อโรคในดิน เช่น *Fusarium oxysporum*

และ *Rhizoctonia solani* เข้าทำลายรากพืชซึ่งทำให้เกิดอาการรุนแรงมากยิ่งขึ้น (Sipes *et al*., 2001)

ในประเทศไทย มีเพียงรายงานการสำรวจพบ *R. similis* ในพริกไทย และกล้วย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2506 (Timm, 1965) แต่ไม่มีรายงานความเสียหายและการป้องกันกำจัดที่เกิดจากไส้เดือนฝอยชนิดนี้ เนื่องจากบ้านเราไม่เคยประสบปัญหาความเสียหายในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่ในปัจจุบัน *R. similis* สร้างปัญหาให้กับพืชส่งออกไปยังกลุ่มสหภาพยุโรปหรือ EU มีการเผาทำลายทันที ณ ประเทศปลายทาง และ/หรือบางกรณีปฏิเสธการนำเข้า เนื่องจากมีการตรวจพบ *R. similis* ในพรรณไม้น้ำสกุล *Anubias* spp. โดยในปี พ.ศ. 2550-2551 ไม้น้ำจากประเทศไทยถูกเผาทำลายไป 11 ครั้ง ทำให้มีผลกระทบต่อธุรกิจการส่งออกพรรณไม้น้ำของไทยเป็นอย่างมาก นอกจากนั้นยังพบไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* spp. ในไม้น้ำที่ส่งไปประเทศโปแลนด์ ถูกเผาทำลายด้วยเช่นกัน (นุชนารถ, 2551) ดังนั้น จึงมีความจำเป็นในการศึกษาวิจัยด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยาเพื่อทราบพืชอาศัยและการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในไม้น้ำและไม้ดอก-ไม้ประดับ เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่วิธีการป้องกันกำจัด *R. similis* อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสม ตลอดจนแก้ปัญหาการปนเปื้อนไปกับรากพืชส่งออกอีกด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุ-อุปกรณ์การแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืช ได้แก่ เครื่องปั่น ตะแกรงแยกไส้เดือนฝอยขนาด 20 40 และ 200 mesh ชุดกรวยแก้วพร้อมคลิ๊ป บีกเกอร์ ตู้เขี่ยเชื้อ และ micropipette

2. วัสดุ-อุปกรณ์เพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในชิ้นส่วนพืช ได้แก่ หัวแครอท สารฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 75% และ 0.1 % Hyamine) จานเพาะเลี้ยงฆ่าเชื้อ และพาราฟิล์ม

3. วัสดุ-อุปกรณ์ในการปลูกพืช ได้แก่ กล่องสี่เหลี่ยมพลาสติกใสขนาด 18.5 x 27.5 x 10.0 ซม. บ่อซีเมนต์เส้นผ่าศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร ดินทรายหยาบนึ่งฆ่าเชื้อ กระถางพลาสติก และพลาสติกใส

4. พืชอาศัย ได้แก่ ได้แก่ ไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. และต้นหน้าวัว

5. วัสดุ-อุปกรณ์ในการตรวจ-นับจำนวนไส้เดือนฝอย ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ Compound microscope และ Stereo microscope และเคื่อง Ultrasonic

6. วัสดุ-อุปกรณ์ในการย้อมสีราก ได้แก่ hot plate สีย้อม acid fuchsin สาร lactophenol

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *R. similis* ในชิ้นแครอท

1.1 การแยกไส้เดือนฝอย *R. similis* ออกจากรากพืช นำรากพืชมาล้างผ่านน้ำไหลและทำการตัดรากให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำชิ้นรากใส่ลงในเครื่องปั่นพร้อมทั้งเติมน้ำกลั่นลงไป ปั่น 3 ครั้งๆ ละ 10 วินาที ทิ้งระยะเวลาห่างกันเล็กน้อย เท suspension ที่ได้จากการปั่นผ่านตะแกรงขนาด 20 mesh เศษรากพืชขนาดใหญ่จะติดอยู่บนตะแกรง ไส้เดือนฝอยจะไหลไปกับน้ำผ่านตะแกรงลงสู่ภาชนะรองรับ เทน้ำที่มีไส้เดือนฝอยเก็บไว้ในบีกเกอร์ ต่อจากนั้นเทลงในตะแกรงลวดที่มีกระดาษทิชชูรองอยู่และนำมาตั้งวางบนกรวยที่มีน้ำกลั่น เป็นเวลา 24 ชม. (ช่วงเวลานี้น้ำจะระเหย ดังนั้น suspension จะเริ่มแห้ง ไส้เดือนฝอยจะเคลื่อนที่ลงสู่ปลายกรวยผ่านกระดาษทิชชูและรูของตะแกรง ซึ่งไส้เดือนฝอยหนักกว่าน้ำจึงทำให้ไส้เดือนฝอยตกลงไปอยู่บริเวณปลายกรวย) ทำการเก็บไส้เดือนฝอยจากบริเวณปลายกรวย โดยไขน้ำประมาณ 30 มล. ลงสู่บีกเกอร์ขนาด 50 มล.

1.2 การฆ่าเชื้อที่ผิวของไส้เดือนฝอย *R. similis* ปฏิบัติในสภาพปลอดเชื้อภายในตู้เขี่ยเชื้อ โดยนำไส้เดือนฝอยที่อยู่ในน้ำ 30 มล. ตั้งวางให้ตกตะกอนบริเวณก้นบีกเกอร์ แล้วใช้ micropipette ค่อยๆ ดูดน้ำบริเวณผิวน้ำทิ้งไป ให้เหลือน้ำที่มีไส้เดือนฝอยไม่เกิน 10 มล. จากนั้นเทสารละลาย ฆ่าเชื้อที่ผิวไส้เดือนฝอย (0.1 % Hyamine) ลงไปในอัตรา 1 : 1 ใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วกวนน้ำประมาณ 1 นาที และตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอน จากนั้นดูดน้ำบริเวณผิวน้ำทิ้งและล้าง-ตั้งตกตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำซ้ำ 3 ครั้ง

1.3 การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *R. similis* ในชิ้นแครอท ปฏิบัติในสภาพปลอดเชื้อภายในตู้เขี่ยเชื้อ พ่นแอลกอฮอล์ 75 % บนหัวแครอท จากนั้นนำหัวแครอทไปลนไฟจนกระทั่งแอลกอฮอล์ 75 % หมด (เปลือกเริ่มดำและแห้ง) ตัดปลายหัวแครอทออกและทำการปอกเปลือกแครอทลงลึกด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว เผามีดทุกครั้งหลังการปอกเปลือกแครอท จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้นวงกลม และนำแครอท 1-2 ชิ้น วางลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารวุ้น 1.5 % ทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยลงในชิ้นแครอท โดยใช้ micropipette ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดไส้เดือนฝอยที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 หยดลงตรงบริเวณขอบของชิ้นแครอทที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยง จำนวน 100$\pm$10 ตัว/จาน ปิดฝาและปิดขอบฝาด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิประมาณ 28°ซ เป็นเวลา 1 เดือน

1.4 การแยกล้างไส้เดือนฝอย *R. similis* ออกจากชิ้นแครอท นำชิ้นแครอทใส่ลงในเครื่องปั่นพร้อมทั้งเติมน้ำกลั่นลงไป ปั่น 3 ครั้งๆ ละ 10 วินาที ทิ้งระยะเวลาห่างกันเล็กน้อย (ระยะเวลาของการปั่นขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นแครอท) เท suspension ผ่านตะแกรงหยาบขนาด 40 mesh เศษชิ้นแครอทขนาดใหญ่จะติดอยู่บนตะแกรง ไส้เดือนฝอยจะไหลไปกับน้ำผ่านตะแกรงลงสู่ภาชนะรองรับ เทน้ำที่มีไส้เดือนฝอยเก็บไว้ในบีกเกอร์ ต่อจากนั้นเทลงในตะแกรงลวดที่มีกระดาษทิชชูรองอยู่และนำมาตั้งวางบนกรวยที่มีน้ำกลั่น เป็นเวลา 24 ชม. ทำการเก็บไส้เดือนฝอยจากบริเวณปลายกรวย โดยไขน้ำประมาณ 50 มล. ลงสู่บีกเกอร์ เพื่อเตรียมนับจำนวนไส้เดือนฝอยสำหรับการปลูกเชื้อในต้นพืชอาศัยต่อไป

2. การศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในรากไม้น้ำ

2.2 การปลูกพืชอาศัย (ไม้น้ำสกุล *Anubias* sp.)

- การปลูกในกล่องพลาสติก นำต้นไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. ปลูกลงในกล่องสี่เหลี่ยมพลาสติกใสขนาด 18.5 x 27.5 x 10.0 ซม. ซึ่งบรรจุดินทรายหยาบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว มีความสูงจากพื้นกล่องเท่ากับ 3 ซม. จำนวน 20 ต้น/กล่อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ท่วมโคนต้นไม้น้ำประมาณ 3 ซม. ปิดฝากล่องด้วยพลาสติกใสและเจาะรูระบายอากาศ (ภาพที่ 1) นำไปตั้งวางในห้องปกติ ดูแลเติมน้ำกลั่นทุก 7 วัน

ภาพที่ 1 การปลูกไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. เพื่อใช้เป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน *Radopholus similis*

- การปลูกในบ่อซีเมนต์ เตรียมบ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร ทำการบรรจุวัสดุปลูก (ดินทรายหยาบ) ในบ่อที่ตั้งวางในโรงเรือน จากนั้นปลูกไม้น้ำ *Anubias* sp. ลงในบ่อ 20 ต้น/บ่อ ใช้พลาสติกคลุมปิดปากบ่อ ปลูกดูแลเป็นเวลา 2 เดือนก่อนทำการทดลอง

2.3 การปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *R. similis* ในพืชอาศัย

- การปลูกเชื้อในกล่องพลาสติก ใช้ micropipette ดูดไส้เดือนฝอย *R. similis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope จำนวน 20 ตัว/น้ำ 200 ไมโครลิตร/ต้น และหยดลงใกล้บริเวณรากพืช โดยในขณะปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย ให้ดินทรายภายในกล่องปลูกชุ่มน้ำเท่านั้น เพื่อให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่เข้าหารากพืชได้เร็วกว่าการที่ต้นพืชแช่น้ำ หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 12 ชม. จึงเติมน้ำเท่าระดับเดิม ดูแลต้นพืชตามปกติ

- การปลูกเชื้อในบ่อซีเมนต์ ใช้ micropipette ดูดไส้เดือนฝอย *R. similis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope จำนวน 100$\pm$10 ตัว/น้ำ 1,000 ไมโครลิตร/ต้น และหยดลงใกล้บริเวณรากพืช โดยในขณะปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย ให้ดินทรายภายในบ่อปลูกชุ่มน้ำเท่านั้น เพื่อให้

ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่เข้าหารากพืชได้เร็วกว่าการที่ต้นพืชแช่น้ำ หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 12 ชม. จึงเติมน้ำเท่าระดับเดิม ดูแลต้นพืชตามปกติ

2.4 การตรวจไส้เดือนฝอยในรากพืชโดยวิธีย้อมสีราก

นำรากพืชที่ปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยแล้วเป็นเวลา 25 วัน มาย้อมสีเพื่อตรวจดูการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยภายในรากพืช โดยนำรากพืชมาล้างผ่านน้ำไหล จากนั้นใช้กรรไกรตัดรากให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในบีกเกอร์และเติมสีย้อม acid fuchsin ใน lactophenol (1 % acid fuchsin 5 มล. + lactophenol 100 มล.) ให้ท่วมราก นำไปต้มที่อุณหภูมิประมาณ 80 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำรากพืชขึ้นจากสารละลาย แล้วล้างผ่านน้ำไหลเพื่อล้างสีส่วนเกินออก และดูดซับน้ำออกด้วยกระดาษทิชชู นำชิ้นรากที่ติดสีใส่ใน Petri dish และเท lactophenol ให้ท่วมชิ้นส่วนของราก ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชม. เพื่อให้ lactophenol กัดสีย้อมที่ติดรากออก สีย้อมทำปฏิกิริยากับตัวไส้เดือนฝอยหรือไข่ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีน จะติดสีแดงของ acid fuchsin ส่วนเนื้อเยื่อรากไม่ติดสี (นุชนารถ, 2549) นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.5 การตรวจแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชโดยใช้คลื่นเสียง

ทำการตรวจรากพืชทุก 7 วัน โดยนำรากพืชแต่ละต้นที่ปลูกในบ่อซีเมนต์ ล้างผ่านน้ำไหล จากนั้นนำไปใส่ในภาชนะแก้วใสหรือบีกเกอร์ เติมน้ำท่วมราก นำไปวางในเครื่อง Ultrasonic ที่มีน้ำระดับเท่ากับในบีกเกอร์ เปิดคลื่นเสียงเป็นเวลา 20 นาที ได้ไส้เดือนฝอยในน้ำเทผ่านผ้ากรองละเอียดเพื่อได้ไส้เดือนฝอยในน้ำใส

2.6 บันทึกผล

- ตรวจไข่ไส้เดือนฝอยภายในรากย้อมสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- ตรวจระยะการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *R. similis* ทุก 7 วัน จนครบวงจรชีวิต

3. การศึกษาการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในรากหน้าวัว

ใช้ต้นหน้าวัวที่มีใบประมาณ 4-5 ใบ ซึ่งปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว ทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *R. similis* ที่เพาะเลี้ยงจากแครอท (ตามวิธีการในข้อ 1) จำนวน 200 ตัว/ต้น นำไปตั้งวางในกรงพรางแสงและดูแลต้นหน้าวัวตามปกติเป็นเวลา 3 เดือน จากนั้นนำรากหน้าวัวมาตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายในรากโดยวิธีการปั่นรากให้ละเอียด และนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายในราก

บันทึกผล จำนวนไส้เดือนฝอย *R. similis* แบ่งเป็นระยะไข่ ตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศผู้-เพศเมีย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope

เวลาสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2550 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2553

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนปลูกพืชทดลองกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *R. similis* ในชิ้นแครอท

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *R. similis* ในชิ้นแครอทที่วางบนวุ้น 1.5 % ตามเทคนิคดัดแปลง เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าไส้เดือนฝอย *R. similis* สามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีในชิ้นแครอท โดยวิธีการแยกล้างไส้เดือนฝอยออกจากชิ้นแครอทประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 ล้างบริเวณผิวของชิ้นแครอทและผิวหน้าวุ้น นับจำนวนไส้เดือนฝอยได้เท่ากับ 2,881 ตัว/แครอท 10 ชิ้น ขั้นตอนที่ 2 ย่อยแครอทให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปกวนในน้ำให้ไส้เดือนฝอยหลุดออกมา นับจำนวนได้ 4,528 ตัว/แครอท 10 ชิ้น และขั้นตอนที่ 3 นำชิ้นแครอทจากขั้นตอนที่ 2 ไปวางบนผ้ากรองละเอียดเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง นับจำนวนไส้เดือนฝอยได้ 1,645 และ 1,235 ตัว/แครอท 10 ชิ้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ในการแยกและตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยแต่ละขั้นตอนเท่ากับ 28 44 16 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รวมไส้เดือนฝอยทั้งหมดเท่ากับ 10,290 ตัว/แครอท 10 ชิ้น หรือเฉลี่ยเท่ากับ 1,029 ตัว/1 ชิ้น/จานเลี้ยง

2. การศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในรากไม้น้ำ

2.1 การศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษาวงจรชีวิตและความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในพืชอาศัย เมื่อนำไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงจากชิ้นแครอท ไปปลูกเชื้อในรากไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. ที่ปลูกในทรายหยาบ จำนวน 20 ตัว/ต้น เป็นเวลา 25 วัน พบตัวเต็มวัยเพศเมียของ *R. similis* เริ่มวางไข่ภายในราก โดยพบไข่ของไส้เดือนฝอยติดสีแดงของสีย้อม acid fuchsin

ผลการทดลองดังกล่าว เป็นรายงานข้อมูลการตรวจผลครั้งที่ 1 เนื่องจากวิธีการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *R. similis* ในชิ้นส่วนของพืชหรือในชิ้นแครอทนั้น ได้ดัดแปลงวิธีการเพาะเลี้ยงของ INIBAP (1997) ให้สามารถปฏิบัติได้ง่าย รวดเร็วขึ้น และมีต้นทุนต่ำ ตลอดจนยังดัดแปลงวิธีการวางชิ้นแครอทบนอาหารวุ้น 1.5 % เพื่อเพิ่มความชื้นและพื้นที่เคลื่อนตัวให้กับไส้เดือนฝอยในขณะบ่มเพาะอีกด้วย นอกจากนั้นวิธีการปลูกพรรณไม้น้ำในกระบะทรายและการดูแลให้พืชน้ำรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ ต้องใช้เวลาในการศึกษาเพื่อได้ประสบการณ์และความชำนาญในการปลูก อย่างไรก็ตามผลของงานวิจัยในครั้งนี้เป็นงานแรกของประเทศไทยในการเพาะเลี้ยง *R. similis* ในชิ้นแครอทที่ประสบผลสำเร็จในระดับหนึ่ง ซึ่งในอนาคตจะสามารถพัฒนาวิธีการให้ก้าวหน้าต่อไป โดยการศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในพืชอาศัยทุกชนิด มีความจำเป็นต้องใช้ inoculum ในปริมาณที่เพียงพอต่อการทดลอง โดยเฉพาะงานวิจัยด้านชีวและนิเวศวิทยาของเชื้อสาเหตุ ความรู้และ

ความเข้าใจชีววิทยาของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช จะสามารถตอบโจทย์งานวิจัยที่ครอบคลุมไปถึงการป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอย *R. similis* ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญต่อการส่งออกพืชน้ำ (aquatic plant) และไม้ประดับอื่นๆ ต่อไป

2.2 การศึกษาในระดับโรงเรือนปลูกพืช

เมื่อปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *R. similis* ในต้นไม้น้ำที่ปลูกในบ่อซีเมนต์จำนวน 100±10 ตัว/ต้น และทำการตรวจรากทุก 7 วันๆ ละ 5 ต้น โดยใช้เทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากด้วยคลื่นเสียง พบไส้เดือนฝอยเข้าสู่ระบบรากพืชทดสอบที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ และเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน พบไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตในราก โดยพบเพศเมียและเพศผู้จำนวน 22 และ 8 ตัว ตามลำดับ ในวันที่ 21 และ 28 วัน พบไข่ของไส้เดือนฝอยอยู่ภายในรากพืช และเริ่มพบตัวอ่อนระยะที่ 2 และ 3 รวมวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในไม้น้ำเท่ากับ 28 วัน ซึ่งใช้เวลานานกว่าในรากกล้วย ที่ใช้เวลาเพียง 21 วันเท่านั้น (Sarah *et al.,* 2004) โดยกล้วยจัดเป็นพืชอาศัยที่ดีของไส้เดือนฝอย *R. similis* และยังเป็นศัตรูสำคัญที่ทำความเสียหายในแหล่งผลิตกล้วยทั่วโลก อย่างไรก็ตาม วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *R. similis* ยังขึ้นกับระดับของอุณหภูมิอีกด้วย โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลต่อวงจรชีวิตของ *R. similis* สั้นลง ดังนั้น ควรมีการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อวงจรชีวิตและการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในรากพืชเพื่อได้ข้อมูลที่สามารถบ่งชี้การขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณในแต่ละชนิดพืชอาศัยที่แตกต่างกัน เพื่อทราบความรุนแรงในการแพร่ระบาดในพืชนั้นๆ และหาแนวทางป้องกันกำจัดต่อไป

3. การศึกษาการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในรากหน้าวัว

ผลจากการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *R. similis* ในรากหน้าวัว เป็นเวลา 3 เดือน เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในรากหน้าวัว ผลการตรวจรากโดยวิธีปั่นรากละเอียดและนับจำนวนไส้เดือนฝอยแบ่งเป็นระยะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope สามารถตรวจพบทุกระยะการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยภายในราก ได้แก่ ระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย สามารถนับจำนวนไส้เดือนฝอยได้เท่ากับ 118 ฟอง 65 ตัว 45 ตัว และ 394 ตัว/ต้น ตามลำดับ (ค่าเฉลี่ยจาก 10 ต้น)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ไส้เดือนฝอย *R. similis* สามารถเจริญเติบโตในชิ้นแครอทตามวิธีการเพาะเลี้ยงที่ดัดแปลงจาก INIBAP (1997) โดยเลี้ยงไส้เดือนฝอยเริ่มต้นจำนวน 50 ตัว เพิ่มเป็น 321 ตัว/จานเพาะเลี้ยง หรือเพิ่มขึ้น 6.42 เท่า ภายในเวลา 2 เดือน และเมื่อนำมาปลูกเชื้อในพืชอาศัย (ไม้น้ำสกุล *Anubias* sp.) ในระดับห้องปฏิบัติการ พบตัวเมียเต็มวัยและไข่ภายในรากพืชที่เวลา 25 วันหลังใส่ไส้เดือนฝอย เมื่อทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยจำนวน 100 ±10 ตัว/ต้น ในไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. ที่ปลูกในบ่อซีเมนต์ โดยทำการตรวจแยกโดยใช้คลื่นเสียง ทุก 7 วัน พบว่าไส้เดือนฝอยเริ่มเคลื่อนที่เข้ารากพืช และเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้เพศเมียในสัปดาห์ที่ 2 และในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบระยะไข่และ

ตัวอ่อน รวมวงจรชีวิตเท่ากับ 28 วัน และจากการศึกษาการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในหน้าวัว เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าไส้เดือนฝอยสามารถเพิ่มปริมาณในรากเป็น 2 เท่า

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2549. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 42 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2551. Burrowing Nematode ศัตรูพืชกักกันของไม้น้ำส่งออก. ข่าวอารักขาพืช 3(3) : 3.

Duncan, L. W., and E. Cohn. 1990. Nematode parasites of citrus. Pp. 321-346 in M. Luc, R.A. Sikora, and J. Bridge, eds. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, Wallingford, U.K.

Evans, K., D.L. Trudgill, and J.M. Webster. 1993. Chapter 1. Extraction, Identification and Control of Plant Parasitic Nematodes. in Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. CAB International, UK. 648 pages.

Fogain, R. 2000. Effect of *Radopholus similis* on plant growth and yield of plantains (*Musa*, AAB). Nematology 32 : 129-133.

J.L. Sarah, J. Pinochet and J. Stanton. The Burrowing nematode of bananas, *Radopholus similis* Cobb, 1913. Musa Pest Fact Sheet n°. 1.

Sipes, B.S., D.P. Schmitt, and S.C. Nelson. 2001. Burrowing nematode, a major pest in the tropics. University of Hawaii, CTAHR Plant Disease Publication PD-21.

INIBAP. 1997. INIBAP Technical Guidelines. 1. Screening of *Musa* Germplasm for resistance and tolerance to nematodes. Speijer, P.R. and De Waele, D. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. 47 p.

Timm. R.W. 1965. A preliminary survey of plant parasitic nematodes of Thailand and the Philippines. Thai Sambhand Printing Press. Bangkok. 71 p.

Uchida, J.Y., B.S. Sipes, and C.Y. Kadooka. 2003. Burrowing nematode on anthurium: Recognizing symptoms, understanding the pathogen, and preventing disease. University of Hawaii, CTAHR Plant Disease Publication PD-24.