อนุกรมวิธานและความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย migratory endoparasitic nematodes

Taxonomy and pathogenicity of migratory endoparasitic nematodes

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ มนตรี เอี่ยมวิมังสา
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การทดลองความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ต่อกาแฟพันธุ์อาราบิก้า โดยปลูกต้นกล้ากาแฟอายุ 5 เดือน ลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว บรรจุดินอบฆ่าเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี โดยใส่ไส้เดือนฝอยรากแผลจำนวน 3,000 6,000 9,000 12,000 ตัวตามลำดับเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย พบว่าไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ในรากกาแฟ โดยทุกกรรมวิธีมีจำนวนไส้เดือนฝอยเมื่อสิ้นสุดอยู่ในระดับต่ำ ทั้งนี้อาจเกิดจากไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ที่ใช้ในการทดลองเป็นไส้เดือนฝอยไอโซเลตที่แยกมาจากกล้วย อย่างไรก็ตามต้นกาแฟที่ใส่ไส้เดือนฝอยมีลักษณะสีใบซีด ขอบใบสีน้ำตาล และรากบางส่วนมีสีน้ำตาล เมื่อเทียบกับต้นกาแฟที่ไม่ได้ใส่ไส้เดือนฝอย

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-01-02-09-54

คำนำ

Migratory endoparasitic nematodes เป็นไส้เดือนฝอยชนิดที่เข้าสู่รากพืช ดูดกินอาหารและเคลื่อนที่ภายในรากพืช ไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ไม่ชักนำให้เซลรากพืชเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นแหล่งอาหาร (Feeding Site) เหมือนกับไส้เดือนฝอยรากปม (Root-knot Nematodes) หรือไส้เดือนฝอยซีสต์ (Cyst Nematodes) แต่จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อของรากในส่วน Cortex Parenchyma เป็นหลัก โดยดูดกินอาหารจากเซลและเคลื่อนที่ภายในรากพืช การเคลื่อนที่และดูดกินอาหารดังกล่าวทำให้รากเป็นโพรง เกิดแผลสีน้ำตาล ในบางกรณีรากอาจถูกเชื้อโรคอื่นๆ เข้าทำลายซ้ำเติม ต้นพืชที่ระบบรากถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายจะมีอาการแคระแกรน ต้นโทรม ใบเหลือง ผลผลิตลดลง *Pratylenchus* และ *Radopholus* เป็นไส้เดือนฝอยสกุลที่สำคัญของไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ ซึ่งโดยทั่วไปเป็นไส้เดือนฝอยที่มีพืชอาศัยกว้าง อย่างไรก็ตามไส้เดือนฝอยชนิดต่างๆ จะมีความสำคัญ และทำความเสียหายต่อพืชแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป เช่น *P. coffeae* และ *P. goodeyi* เป็นศัตรูที่สำคัญของกล้วย (Gowen *et al*., 2005) *P. coffeae*, *P. brachyurus*, *P. goodeyi*, *P. pratensis*, *P. loosi, P. panamaensis, P. zeae* และ *P. vulnus* เป็นศัตรูของกาแฟ (Campos and Villain, 2005) *P. penetrans* ทำลายพืชได้มากเกือบ 400 ชนิด (Evans *et al*., 1993) ไส้เดือนฝอยรากโพรง *Radopholus similis* สามารถทำลายพืชได้มากกว่า 250 ชนิด (O'Bannon, 1977) จำนวนไส้เดือนฝอย *R. similis* เริ่มต้นเพียง 10 ตัว สามารถสร้างความเสียหายแก่ต้นหน้าวัวได้ (Sipes and Lichty, 2002) การทดลองนี้เป็นการรวบรวมไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* เป็นหลัก ปัจจุบันไส้เดือนฝอยรากแผลได้ถูกจำแนกแล้วมากกว่า 60 ชนิด มีรายงานการพบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. brachyurus, P. coffeae, P. zeae, P. vulnus, P. minyus, P. delattrei*, *P. nongkiensis*, *P. sudanensis*, *P. thornei* และ *Pratylenchus* spp. ในแหล่งปลูกพืชของประเทศไทย (Chunram, 1972; Pliansinchai and Boonduang, 1978; Pliansinchai and Boonduang, 1986) ข้อมูลของไส้เดือนฝอยรากแผลในประเทศไทยค่อนข้างเก่า ซึ่งปัจจุบันการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลได้เปลี่ยนไป ทำให้ชนิดของไส้เดือนฝอยรากแผลในปัจจุบันแตกต่างจากข้อมูลในอดีต การศึกษาการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อปรับปรุงฐานข้อมูลให้มีความทันสมัย นอกจากนี้ข้อมูลด้านผลกระทบต่อพืชของไส้เดือนฝอยกลุ่มนี้ยังมีไม่มากนัก การศึกษาถึงความสามารถในการทำให้เกิดโรคต่อพืชของไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* ทำให้ทราบถึงข้อมูลในการเข้าทำลายพืช ความเสียหายที่ไส้เดือนฝอยกระทำต่อพืช ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการจัดการไส้เดือนฝอยในสกุลนี้ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และวิธีการ

การดำเนินงานในปีงบประมาณ 2554 เป็นการเก็บตัวอย่างดิน จากแหล่งปลูกพืชชนิดต่างๆ ในประเทศไทย เพื่อตรวจหาไส้เดือนฝอย ทำการคงสภาพไส้เดือนฝอย และทำสไลด์ถาวร จำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย รวมทั้งเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยในพืชอาศัย เพื่อให้ได้จำนวนประชากรของไส้เดือนฝอยมากพอในการศึกษาด้านชีววิทยาต่อไป การดำเนินงานในปีงบประมาณ 2555 ทำการจำแนกไส้เดือนฝอยรากแผล *Pratylenchus* spp. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน เพื่อทราบชนิดของไส้เดือนฝอยที่ชัดเจน ในปีงบประมาณ 2556 ดำเนินงานต่อเนื่องจากปี 2555 และทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ต่อกาแฟพันธุ์อาราบิก้า

การเตรียม inoculums

เลี้ยงไส้เดือนฝอย *P. coffeae* บนรากข้าวโพดในสภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 3 เดือน แยกไส้เดือนฝอยออกจากรากข้าวโพดโดยการแช่รากข้าวโพดในน้ำ เทไส้เดือนฝอยลงในบีกเกอร์ ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอย

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ต่อกาแฟพันธุ์อาราบิก้า โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ปลูกต้นกล้ากาแฟอายุ 5 เดือน ลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว บรรจุดินอบฆ่าเชื้อ ใส่ไส้เดือนฝอยลงในกระถางตามกรรมวิธีทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย
กรรมวิธีที่ 2 ใส่ไส้เดือนฝอย (ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเพศเมีย) 3,000 ตัว/กระถาง
กรรมวิธีที่ 3 ใส่ไส้เดือนฝอย (ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเพศเมีย) 6,000 ตัว/กระถาง
กรรมวิธีที่ 4 ใส่ไส้เดือนฝอย (ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเพศเมีย) 9,000 ตัว/กระถาง
กรรมวิธีที่ 5 ใส่ไส้เดือนฝอย (ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเพศเมีย) 12,000 ตัว/กระถาง

ตรวจผลการทดลอง 6 เดือนหลังจากใส่ไส้เดือนฝอย โดยวัดความสูง น้ำหนักต้น น้ำหนักราก จำนวนไส้เดือนฝอยในดินและราก แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินโดยวิธีการกวนตัวอย่างดินในน้ำ และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร ที่วางบนตะแกรงขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร และแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่าง โดยนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรองที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) และแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชโดยใช้ Mistifier ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี Analysis of variance โดยแปลงข้อมูลจำนวนไส้เดือนฝอยให้อยู่ในรูป log (x+1) ก่อนวิเคราะห์ข้อมูล

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2558
กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในปี 2554 ทำการเก็บตัวอย่างดินจำนวนทั้งสิ้น 113 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* 34 ตัวอย่าง เลี้ยงไส้เดือนฝอยจากตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีไข่ 1 ตัวบนชิ้นแครอทได้สำเร็จ 6 ตัวอย่าง ซึ่งการเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนชิ้นแครอทประสบปัญหาในการเตรียมชิ้นแครอทที่ปลอดเชื้อ เนื่องจากแครอทที่ซื้อมาจากตลาดส่วนใหญ่มักมีแบคทีเรียอยู่ภายใน ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อขึ้นในภายหลัง นอกจากนี้การเลี้ยงไส้เดือนฝอยจากตัวเต็มวัยเพียง 1 ตัว ใช้เวลานาน สภาพของชิ้นแครอทที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้ออาจเปลี่ยนไป ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย ทำให้ไส้เดือนฝอยตายในที่สุด การเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนชิ้นแครอทตรวจสอบการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยได้ยาก ต้องรอจนกระทั่งไส้เดือนเดือนฝอยมีจำนวนมากพอที่จะสังเกตเห็นได้ ได้แก้ปัญหาโดยการ

เลี้ยงไส้เดือนฝอยบนรากข้าวโพด บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งประสบผลสำเร็จมากกว่า และสามารถตรวจดูการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยและ sub-culture ได้ง่าย

ในปี 2555 ได้เลี้ยงไส้เดือนฝอย *Pratylenchus* บนรากข้าวโพด แยกไส้เดือนฝอยจากรากข้าวโพด ทำการคงสภาพไส้เดือนฝอยและทำสไลด์ถาวร จำแนกไส้เดือนฝอยโดยใช้คู่มือการจัดจำแนกของ Castillo, P., and N. Vovlas (2007) โดยจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลจากตัวอย่างดิน 23 แห่ง (38 ตัวอย่าง) จำแนกได้ไส้เดือนฝอย *P. coffeae* จากตัวอย่างดิน 20 แห่ง *P. brachyurus* จากตัวอย่างดิน 1 แห่ง และยังจำแนกชนิดที่ชัดเจนไม่ได้จากตัวอย่างดิน 2 แห่ง

ในปี 2556 ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ต่อกาแฟพันธุ์อาราบิก้า พบว่าไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ไอโซเลตที่ใช้ทดสอบ ไม่สามารถขยายพันธุ์ในกาแฟพันธุ์อาราบิกาได้ โดยไม่พบประชากรไส้เดือนฝอยในดินในทุกกรรมวิธี และพบประชากรไส้เดือนฝอยในรากหนัก 5 กรัมเฉลี่ย 8 5 17 และ 12 ตัว ในกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเมื่อเริ่มทดลอง 3,000 6,000 9,000 และ 12,000 ตัวตามลำดับ ไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักต้นในทุกกรรมวิธี (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามพบว่าต้นกาแฟที่ใส่ไส้เดือนฝอยรากแผล มีสีใบซีด ขอบใบไหม้ และรากมีสีน้ำตาล เมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้ใส่ไส้เดือนฝอย (ภาพที่ 1) ซึ่งอาจเกิดจากการเข้าทำลายรากของไส้เดือนฝอยเมื่อเริ่มทดลอง ไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ที่ใช้ในการทดลองเป็นไอโซเลตที่แยกได้จากกล้วย จึงอาจทำให้ไม่สามารถขยายพันธุ์และทำให้เกิดโรคได้ในกาแฟ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ต่อกาแฟพันธุ์อาราบิก้า โดยการใส่ไส้เดือนฝอย 3,000 6,000 9,000 และ 12,000 ตัวตามลำดับ ลงในต้นกล้ากาแฟในกระถางทดลองพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว พบว่าไส้เดือนฝอย *P. coffeae* ไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ในรากกาแฟ โดยทุกกรรมวิธีมีจำนวนไส้เดือนฝอยเมื่อสิ้นสุดการทดลองน้อยมาก ทั้งนี้อาจเนื่องจากไส้เดือนฝอยที่ใช้ในการทดลองเป็นไอโซเลตที่แยกได้จากกล้วย จึงไม่สามารถทำให้เกิดโรคในกาแฟ อย่างไรก็ตามพบว่าต้นกาแฟที่ใส่ไส้เดือนฝอยมีลักษณะใบซีด ขอบใบไหม้ และบางส่วนของรากมีสีน้ำตาล เมื่อเทียบกับต้นกาแฟที่ไม่ได้ใส่ไส้เดือนฝอย

เอกสารอ้างอิง

Campos, V.P., and L. Villain. 2005. Nematode parasites of coffee and cocoa. Pp. 529-579. in Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, 2nd edition. M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge, eds. CAB International.

Castillo, P., and N. Vovlas. 2007. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylechidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. Brill Leiden, Boston.

Chunram, C. 1972. A list of plant parasitic nematodes in Thailand. Plant Protection Service Technical Bulletin No.1 Pp. 23-26. The Plant Industry Division. Ministry of Agriculture, Thailand.

Evans, K., D.L. Trudgill, and J.M.Webster.1993. Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. Pp. 648. CAB International. Wallingford, UK.

Gowen, R.S., P. Quénéhervé, and R. Fogain. 2005. Nematode parasites of bananas and plantains. Pp. 611-643. in Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture, 2nd edition. M. Luc, R.A. Sikora and J. Bridge, eds. CAB International.

O'Bannon, J.H. 1977. Worldwide dissemination of *Radopholus similis* and its importance in crop production. Journal of Nematology 9:16-25.

Pliansinchai, U., and A. Boonduang. 1978. A systematic study of plant parasitic nematodes of Black pepper in Thailand. Nematology Section Technical Bulletin No.2 Pp. 22-30. Plant Pathology Division, Department of Agriculture, Thailand.

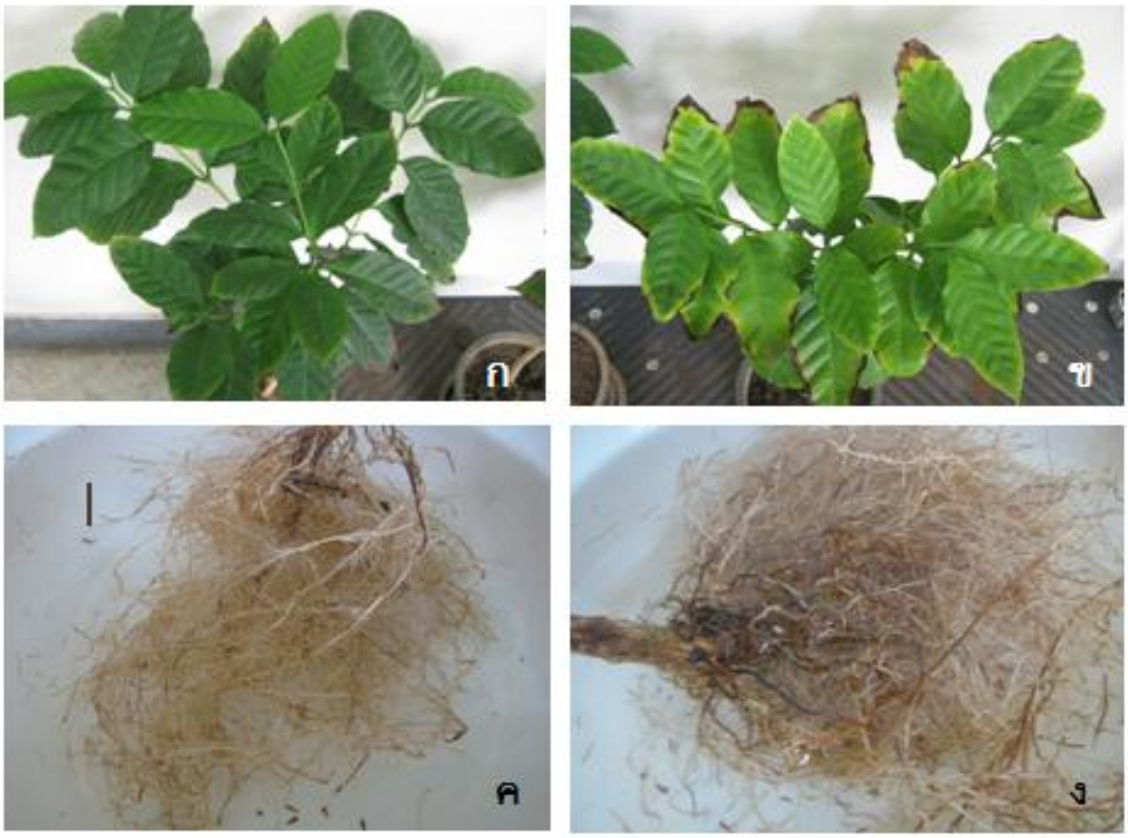
Pliansinchai, U., and A. Boonduang. 1986. A systematic study of plant parasitic nematodes of Sugarcane in Thailand. Nematology Section Technical Bulletin No.5 Pp. 48-61. Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Thailand.

Ryss A.Y. 2003. Express technique to prepare permanent collection slides of nematodes. Zoosystematica Rossica 11(2): 257–260.

Sipes, B.S., and J.S. Lichty. 2002. *Radopholus similis* damage to *Anthurium andraeanum*. Nematropica 32:77-81.

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักต้น น้ำหนักราก จำนวนไส้เดือนฝอยทั้งหมดในดิน และจำนวนไส้เดือนฝอยต่อราก 5 กรัม

กรรมวิธี	น้ำหนักต้น	น้ำหนักราก	จำนวนไส้เดือนฝอยในดิน	จำนวนไส้เดือนฝอยในราก 5 กรัม
ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย	40.23	33.41	0	0
3000 ตัว	40.74	27.33	0	8
6000 ตัว	40.37	28.71	0	5
9000 ตัว	36.50	30.81	0	17
12000 ตัว	42.14	31.04	0	12
F - test	ns	ns	-	ns
CV (%)	13.15	30.55	-	90.32



ภาพที่ 1 ลักษณะใบของต้นกาแฟพันธุ์อาราบิก้า กระถางที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย (ก) และใส่ไส้เดือนฝอย (ข) กระถางที่ใส่ไส้เดือนฝอยใบมีสีซีด และขอบใบไหม้ และลักษณะรากของกาแฟกระถางที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย (ค) และใส่ไส้เดือนฝอย (ง) ในกระถางที่ใส่ไส้เดือนฝอยรากบางส่วนมีสีน้ำตาล