การพัฒนาชุดตรวจสอบและเทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยในรากพืช
Development of Test Kit and Nematode Extraction Technique in Plant Root

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด[1/] วานิช คำพานิช[2/] ช่อทิพย์ ศัลยพงษ์[3/]
[1/]ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[3/]กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

บทคัดย่อ

การทดสอบวิธีการแยกไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ออกจากรากพืชส่งออก 4 ชนิด ได้แก่ พรรณไม้น้ำ กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดนดรอน ที่ทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยจำนวน 200 ตัว/ต้น บริเวณรากของพืชทดสอบเป็นเวลา 2-3 เดือน และนำรากพืชที่ถูกเข้าทำลายมาทดสอบแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากโดยวิธีซอยรากละเอียด นำไปแช่และเขย่าในแอลกอฮอล์ 5% คลอร็อกซ์ 0.5% อะบาเม็กติน 0.3% และฟิโปรนิล 0.3% พบว่าการเขย่ารากเป็นเวลา 3 นาที ด้วยแอลกอฮอล์ 5% สามารถแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชทดสอบได้ดีที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 73 62 48 และ 78 % ของรากพรรณไม้น้ำ กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดรนดอน ตามลำดับ รองลงมาคือ อะบาเม็กติน 0.5 % เท่ากับ 35 24 18 และ 42 % ของรากพรรณไม้น้ำ กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดรนดอน ตามลำดับ และมีความแตกต่างกับความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำวิธีการเขย่าราก พรรณไม้น้ำ (*Anubias nana*) ซอยละเอียดในแอลกอฮอล์ 5% เป็นเวลา 3 นาที เปรียบเทียบกับวิธีใช้ Ultrasonic 20 นาที วิธีพ่นหมอกบนรากพืช 48 ชั่วโมง และวิธีปั่นรากและหมุนเหวี่ยงด้วยสารละลายน้ำตาล พบว่า การใช้แอลกอฮอล์ 5% เขย่า 3 นาที สามารถแยกไส้เดือนฝอยออกจากราก ได้ 51.2 ตัวต่อราก 10 กรัม มากกว่าวิธีพ่นหมอก 4 เท่า และเป็นวิธีที่ใช้วัสดุ-อุปกรณ์ที่มีต้นทุนต่ำกว่าวิธีใช้ Ultrasonic และวิธีการหมุนเหวี่ยงด้วยสารละลายน้ำตาล แต่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการนำไปใช้ในการตรวจแยกไส้เดือนฝอยกักกันในภาคสนามได้อย่างเหมาะสม

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-04-01-54

คำนำ

การตรวจสอบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีหลายวิธี แต่ละวิธีตรวจสอบมีขั้นตอนในการปฏิบัติที่แตกต่างกัน ได้แก่ การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชออกจากดินนิยมใช้วิธี Cobb's sieving & Baermann funnel method และ Cobb's sieving & Centrifugal flotation การแยกไส้เดือนฝอยออกจากชิ้นส่วนของพืช ได้แก่ ส่วนหัว ราก ใบ ดอก และเมล็ด ใช้วิธีย้อมชิ้นส่วนพืชด้วยสีย้อม หรือใช้วิธี Centrifugal flotation (Barker, 1985) สำหรับในกรณีตรวจแยกไส้เดือนฝอยที่อยู่ในเนื้อเยื่อรากลึก เช่น ไส้เดือนฝอยในกลุ่ม migratory endoparasite (*Hirschmanniella, Radopholus* และ *Pratylenchus*) ใช้วิธีพ่นหมอกหรือ Mist chamber (Hooper, 1970) ซึ่งแต่ละวิธีการตรวจแยกยังมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของไส้เดือนฝอย ชนิดพืชที่ตรวจแยก ตัวอย่างพืชหรือวัสดุที่ใช้ตรวจ จำนวนตัวอย่าง ค่าใช้จ่าย ความยากง่ายในการปฏิบัติหรือตรวจวิเคราะห์ มาตรฐานของเครื่องมือ และผู้ปฏิบัติงาน จึงต้องมีการพิจารณากระบวนการตรวจให้เหมาะสมเพื่อเกิดความแม่นยำ และ/หรือคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด โดยกรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานรับผิดชอบในการตรวจสอบศัตรูพืชและออกใบรับรองพืชนำเข้าและส่งออก ซึ่ง ณ ปัจจุบันการปนเปื้อนของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกันติดไปกับพืชส่งออกของไทย กำลังประสบปัญหาไส้เดือนฝอยศัตรูพืชติดไปกับรากพรรณไม้น้ำส่งออกไปประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป โดยตรวจพบไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ติดไปกับรากไม้น้ำสกุล *Anubias* spp. ที่ส่งไปยังประเทศเนเธอร์แลนด์ และไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella* sp. ติดไปกับไม้น้ำสกุล *Vallisneria* sp. ที่ส่งไปประเทศโปแลนด์ รวมการแจ้งเตือนตลอดปี 2550 จำนวน 5 ครั้ง และในปี 2551 สถานการณ์การส่งออกพรรณไม้น้ำไป EU ยังคงประสบปัญหาการปนเปื้อนไส้เดือนฝอย *R. similis* อย่างต่อเนื่อง มีการแจ้งเตือนและเผาทำลายพรรณไม้น้ำที่มีการปนเปื้อนไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ณ ประเทศปลายทาง จำนวน 11 ครั้ง เรื่องดังกล่าวจึงเป็นผลกระทบต่อการส่งออกพรรณไม้น้ำ รวมไปถึงไม้ดอกไม้ประดับของไทยอีกด้วย โดยทางกลุ่มสหภาพยุโรปได้มีข้อกำหนดให้ประเทศไทยต้องตรวจรับรองพืชปลอดไส้เดือนฝอย *R. similis* ในพรรณไม้น้ำ-ไม้ประดับทุกชนิดในวงศ์ Araceae, Marantaceae, Musaceae และ Strelitziaceae (นุชนารถ, 2553)

ปี 2551 กรมวิชาการเกษตร ได้ออกแบบเครื่อง Mist chamber ที่ประกอบจากวัสดุในประเทศ มีราคาถูก โดยใช้หลักการพ่นน้ำให้เป็นฝอยตกกระทบไปบนรากพืชที่ตั้งอยู่บนกรวย ความชื้นจากการพ่นน้ำตลอด 48 ชม. จะทำให้ไส้เดือนฝอยที่อาศัยอยู่ภายในราก (endoparasite) โดยเฉพาะไส้เดือนฝอย *R. similis* และ *Hirschmanniella* sp. เคลื่อนที่ออกจากเนื้อเยื่อพืชและลงสู่ปลายกรวย จากนั้นทำการไขน้ำจากปลายกรวยนำไปตรวจไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการใช้เทคนิค Mist chamber จะสามารถแยกได้ไส้เดือนฝอยที่มีชีวิต ทำให้มองเห็นรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยได้อย่างชัดเจน จึงจำแนกชนิดได้ง่ายและแม่นยำกว่าวิธีย้อมสีราก ซึ่งสีย้อมจะติดทั้งลำตัวไส้เดือนฝอยทำให้ยากต่อการจำแนกชนิด หรือวิธีเขย่ารากในน้ำบนเครื่องเขย่าอาจต้องใช้เวลานานมากกว่า 3-5 วัน จึงจะทำให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกมาจากรากหรือไส้เดือนฝอยอยู่ในรากลึกอาจไม่เคลื่อนที่ออกมา ทำให้การตรวจแยกผิดพลาดขาดความแม่นยำ (นุชนารถ และ วานิช, 2551)

ปี 2552 นุชนารถ และวราภรณ์ ได้ทดสอบการใช้คลื่นเหนือเสียง (Ultrasonic) ที่ความถี่ 50/60 kHz. เป็นเวลา 10 นาที สามารถแยกไส้เดือนฝอย *R. similis* ออกจากรากไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. โดยผ่านน้ำเป็นตัวกลางได้จำนวนเฉลี่ย 26.4 ตัว ในขณะที่ใช้วิธีพ่นหมอกด้วยเครื่องพ่นหมอก เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกได้เท่ากับ 8.2 ตัว เมื่อทำการทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่

รากไม้น้ำในเครื่อง Ultrasonic ที่ 5 10 20 40 และ 60 นาที พบว่าการแช่รากเป็นเวลา 20 นาที สามารถแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากได้เฉลี่ย 38.3 ตัว ซึ่งเป็นระยะเวลาที่คลื่นเสียงไม่ทำความเสียหายให้กับรากไม้น้ำสามารถนำกลับไปปลูกต่อได้ จากผลการทดสอบเปรียบเทียบ วิธีการต่างๆ ในการแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืช พบว่าการใช้คลื่นเสียงมีประสิทธิภาพในการแยกไส้เดือนฝอยได้ดีกว่าวิธีพ่นหมอก และวิธี Sucrose Centrifuge Method โดยวิธีแยกด้วยคลื่นเสียงใช้เวลาเพียง 20 นาที ในขณะที่วิธีพ่นหมอกใช้เวลานานกว่า 48 ชั่วโมง ตลอดจนการเตรียมตัวอย่างรากพืชไม่ยุ่งยาก ประหยัดเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายกว่าวิธี Centrifuge floating method รวมทั้งการใช้คลื่นเสียงแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืช ยังสามารถรองรับการตรวจพืชส่งออกในปริมาณมากกว่า 100 ตัวอย่าง/วัน

ปี 2554 กรมวิชาการเกษตร ได้พัฒนาชุดตรวจสอบภาคสนามโดยการใช้คลื่นเสียงชนิด Ultrasonic เป็นเครื่องมือในการแยกไส้เดือนฝอยออกจากราก ใช้เวลา 20 นาที พร้อมติดตั้งกล้องจุลทรรศน์ขนาดเล็ก (mini microscope) กำลังขยาย 50 เท่า ใช้ส่องตรวจไส้เดือนฝอยที่แยกได้ทันที ซึ่งเป็นชุดสำเร็จรูปที่เจ้าหน้าที่ตรวจพืช และเกษตรกร สามารถพกพาไปใช้ในภาคสนามได้ด้วยตนเอง (Tangchitsomkid, 2012)

อย่างไรก็ตามเครื่อง Ultrasonic ยังมีราคาค่อนข้างสูง จึงควรพัฒนาเทคนิคอื่นๆ ในการแยกไส้เดือนฝอย เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรหรือเจ้าหน้าที่ตรวจรับรองพืชนำเข้า-ส่งออกภาคสนาม สามารถนำไปใช้ปฏิบัติในแปลงปลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสม

ดังนั้น การตรวจสอบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่อาจติดมากับพืชที่นำเข้าหรือส่งออกไปยังประเทศคู่ค้า จึงเป็นเรื่องที่มีความสำคัญและมีผลกระทบต่อการส่งออกของประเทศไทยในขณะนี้เป็นอย่างยิ่ง การพัฒนาเครื่องมือและเทคนิคการตรวจแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ให้ได้เครื่องมือและเทคนิคที่สามารถรองรับการทำงานกับตัวอย่างพืชจำนวนมากในคราวเดียวกัน เพื่อประหยัดเวลาและแรงงาน มุ่งเน้นการใช้วัสดุ-อุปกรณ์ในการสร้างเครื่องมือที่มีราคาถูก หาได้ง่ายในประเทศ สะดวกในการใช้งาน และมีประสิทธิภาพ รวมถึงผู้ปฏิบัติหรือเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชสามารถตรวจสอบได้ด้วยตนเอง ซึ่งถือเป็นเรื่องเร่งด่วนและสอดคล้องกับความต้องการในการใช้ตรวจพืชที่นำเข้าและส่งออกของประเทศไทยเป็นอย่างยิ่ง

วัตถุประสงค์ของการทดลอง เพื่อพัฒนาเครื่องมือและเทคนิคการตรวจแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่เข้าทำลายราก ให้เป็นวิธีการตรวจอย่างง่าย มีความแม่นยำ ได้เป็นชุดตรวจสอบมีราคาถูก และมีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารเคมีชนิดต่างๆ ได้แก่ แอลกอฮอล์ 5% คลอร็อกซ์ 0.5% อะบาเม็กติน 0.3% และฟิโปรนิล 0.3%
2. ไส้เดือนฝอย *R. similis* ที่ใช้ในการทดสอบ เพาะเลี้ยงจากชิ้นแครอทในสภาพปลอดเชื้อ
3. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (Stereo microscope) และกำลังขยายสูง (Compound microscope) พร้อมกล้องถ่ายภาพดิจิตอล
4. รากพืชทดสอบ ได้แก่ พรรณไม้น้ำ (*Anubias nana*) กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดนดรอน

5. วัสดุ-อุปกรณ์ และเครื่องแก้วสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย

วิธีการ

1. การเพิ่มไส้เดือนฝอย *R. similis* ในชิ้นแครอท

- เตรียมหัวเชื้อไส้เดือนฝอย *R. similis* ทำการล้างฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในสาร 0.1% hyamine เป็นเวลา 15 นาที และแช่ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำ 2 ครั้ง

- เตรียมวุ้น 1.5 % (วุ้นผง 15 กรัม + น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) นึ่งฆ่าเชื้อ นำไปเทลงในจานเพาะเลี้ยง (Petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ปริมาตรวุ้นเท่ากับ 1 ใน 4 ของความสูงจานเพาะ ในสภาพปลอดเชื้อ

- เตรียมชิ้นส่วนพืช (แครอท) โดยนำหัวแครอทปอกเปลือกให้สะอาด และหั่นตามขวางของหัวให้เป็นชิ้นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ทำการล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 % โดยวิธีการจุ่ม และจุ่มล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำ 2 ครั้ง วางผึ่งชิ้นแครอทให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อประมาณ 30 นาที จากนั้นใช้ปากคีบฆ่าเชื้อ คีบชิ้นแครอทวางลงบนอาหารวุ้นบริเวณกลางจาน ได้เป็นจานอาหารเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย

- การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในชิ้นแครอท นำหัวเชื้อไส้เดือนฝอยจำนวน 100+10 ตัว/น้ำกลั่น 50 ไมโครลิตร หยดลงบนชิ้นแครอทในจานอาหารเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ โดยปฏิบัติในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นหุ้มจานเพาะเลี้ยงด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟรอยด์ เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมรากพืชทดสอบที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย

นำต้นพืชทดสอบ ได้แก่ พรรณไม้น้ำ (*Anubias nana*) กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดนดรอน ปลูกลงในภาชนะบรรจุดิน/ทรายหยาบ จำนวน 20 ต้น เป็นเวลา 7 วัน และนำไส้เดือนฝอย *R. similis* ที่เพาะเลี้ยงได้จากชิ้นแครอท จำนวน 200 ตัว/ต้น หยดลงบริเวณโคนต้น จากนั้นปลูกเลี้ยงพืชเป็นเวลา 2 เดือน ได้รากพืชทดสอบที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายสำหรับใช้ในการทดลอง

3. การทดสอบแยกไส้เดือนฝอยออกจากราก

นำรากพืชทดสอบแต่ละชนิดที่ถูกไส้เดือนฝอย *R. similis* เข้าทำลาย จำนวน 5 กรัม/ซ้ำ ซอยให้ละเอียด ใส่ในขวด flask ขนาด 250 มล. เติมสารต่างๆ 4 ชนิด ได้แก่ แอลกอฮอล์ 5 % คลอร็อกซ์ 0.5% อะบาเม็กติน 0.3% และฟิโปรนิล 0.3% ปริมาตรสาร 100 มล. และทำการเขย่าด้วยมือเป็นเวลา 3 นาที โดยมีการแช่รากและเขย่าในน้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นเทน้ำผ่านตะแกรงหยาบ 20 mesh เพื่อแยกชิ้นส่วนรากบนตะแกรงหยาบ ได้น้ำผ่านตะแกรงหยาบลงบนตะแกรงละเอียดขนาด 400 mesh แยกได้ไส้เดือนฝอยบนตะแกรงละเอียด เก็บน้ำและไส้เดือนฝอยบนตะแกรงละเอียดนำไปตรวจนับจำนวน สำหรับชิ้นส่วนรากที่อยู่บนตะแกรงหยาบนำไปปั่นละเอียดเพื่อแยกไส้เดือนฝอยที่เหลืออยู่ในรากเพื่อตรวจนับ โดยการกรองแยกเศษเนื้อเยื่อรากผ่านตะแกรงหยาบและตะแกรงละเอียดตามลำดับ

บันทึกผล นับจำนวนของไส้เดือนฝอย *R. similis* ที่แยกได้จากการแช่และเขย่า 3 นาที ในสารและพืชแต่ละชนิด และนับจำนวนไส้เดือนฝอยในรากปั่นละเอียด ตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ออกจากรากหลังการเขย่า

4. เปรียบเทียบวิธีการแช่สารกับวิธีการอื่นๆ เพื่อแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืช

วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ (ต้น) ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 แยกโดยวิธีแช่รากพืชในเครื่อง Ultrasonic ความถี่ 50 KHz. เป็นเวลา 20 นาที

กรรมวิธีที่ 2 แยกโดยเครื่องพ่นหมอกบนรากพืช เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 3 แยกโดยวิธีปั่นรากและหมุนเหวี่ยงด้วยสารละลายน้ำตาล

กรรมวิธีที่ 4 แยกโดยวิธีแช่รากซอยละเอียดในแอลกอฮอล์ 5% เขย่าเป็นเวลา 3 นาที

นำรากพืชทดสอบที่ปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *R. similis* จำนวน 200 ตัว/ต้น นำหนักราก 10 กรัม และปลูกเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ปฏิบัติตามกรรมวิธีกำหนด

บันทึกผล จำนวนของไส้เดือนฝอย *R. similis* แต่ละกรรมวิธี ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา 3 ปี เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2556

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการแช่และเขย่ารากพืชที่ซอยละเอียดด้วยมือจำนวน 4 ชนิด เป็นเวลา 3 นาที ในสารชนิดต่างๆ พบว่า แอลกอฮอล์ 5 % สามารถแยกไส้เดือนฝอย *R. similis* ออกจากรากได้ดีที่สุด โดยพบจำนวนไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกมาจากรากเท่ากับ 73 62 48 และ 78 % ของรากพรรณไม้น้ำ กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดนดรอน ตามลำดับ รองลงมาคืออะบาเม็กติน และฟิโปรนิล 0.3 % โดยอะบาเม็กติน 0.3% พบไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกจากรากเท่ากับ 35 24 18 และ 42% ของรากพรรณไม้น้ำ กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดนดรอน ตามลำดับ และฟิโปรนิลเท่ากับ 30 16 19 และ 38 % ของรากพรรณไม้น้ำ กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดนดรอน ตามลำดับ ในขณะที่การแช่และเขย่ารากในคลอร็อกซ์ 0.5% พบไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกจากรากน้อยที่สุดเท่ากับ 22 14 10 และ 26 % ของรากพรรณไม้น้ำ กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดนดรอน ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารที่ใช้ทดสอบชนิดต่างๆ มีผลต่อการเคลื่อนที่ออกจากรากพืชของไส้เดือนฝอย *R. similis* โดยเฉพาะแอลกอฮอล์ซึ่งสามารถซึมเข้าเนื้อเยื่อรากและขับไล่ไส้เดือนฝอยให้เคลื่อนตัวออกมาได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับสารอื่นๆ โดยการแช่เขย่ารากซอยละเอียดในแอลกอฮอล์ 5 % แยกไส้เดือนฝอยได้ตั้งแต่ 48-78 % ในรากพืชทดสอบ 4 ชนิด เมื่อนำวิธีแช่รากซอยละเอียด 10 กรัม ในแอลกอฮอล์ 5% และเขย่าเป็นเวลา 3 นาที ไปเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ได้แก่ วิธีแช่รากพืชในเครื่อง Ultrasonic ความถี่ 50 KHz. เป็นเวลา 20 นาที วิธีใช้เครื่องพ่นหมอก (Mist chamber) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวิธีหมุนเหวี่ยงด้วยสารละลายน้ำตาล น้ำหนักราก 10 กรัม เท่ากัน พบว่าการแยกโดยวิธีหมุนเหวี่ยงด้วยสารละลายน้ำตาล สามารถแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชทดสอบ (*A. nana*) ได้มากที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 86.6 ตัว รองลงมาคือการใช้คลื่นเสียงด้วยเครื่อง Ultrasonic แยกได้เฉลี่ยเท่ากับ 65.8 ตัว สำหรับวิธีแช่และเขย่ารากในแอลกอฮอล์ 5% สามารถแยกไส้เดือนฝอยได้เฉลี่ยเท่ากับ 51.2 ตัว และวิธีพ่นหมอกแยกไส้เดือนฝอยออกได้น้อยที่สุดเพียง 13.0 ตัว โดยมีความแตกต่างกันในทางสถิติ (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่า เทคนิคหรือเครื่องมือมีผลต่อการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอย ความคาดเคลื่อนมีความเป็นไปได้สูงถ้าเลือกใช้วิธีการที่ไม่ได้มาตรฐาน เช่น วิธีใช้เครื่องพ่นหมอก มีจำนวนไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกมาปริมาณน้อย โอกาสตรวจไม่พบไส้เดือนฝอยสูง จึงไม่ควรนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์พืชเพื่อการส่งออก เนื่องจากการตรวจไม่พบในตัวอย่างที่สุ่มมีผลต่อการตรวจพบที่ประเทศปลายทาง ซึ่งจะถูกระงับการนำเข้าและ/หรือเผาทำลายทันที อย่างไรก็ตาม นอกเหนือจากวิธีการตรวจที่ได้มาตรฐานแล้ว การเลือกใช้วิธีการใดยังต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย ได้แก่ ระยะเวลาในการตรวจ การเตรียมตัวอย่าง วัสดุ-อุปกรณ์ที่ใช้

ต้นทุนการตรวจ/ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างที่สามารถตรวจได้ต่อวัน ความยาก-ง่ายของการตรวจวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และความเสียหายของพืชที่สุ่มตรวจอีกด้วย ซึ่งจากการพิจารณาวิธีการตรวจ 3 วิธีคือ การใช้วิธีปั่นรากและหมุนเหวี่ยงด้วยสารละลายน้ำตาล วิธีแยกด้วยคลื่นเสียงโดยใช้เครื่อง Ultrasonic การแช่ราก และวิธีเขย่าด้วยแอลกอฮอล์ 5% ซึ่งจากการทดสอบเปรียบเทียบพบว่าการใช้แอลกอฮอล์เขย่าไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชเป็นวิธีการที่สะดวก ปฏิบัติได้ง่าย และค่าใช้จ่ายต่ำ สามารถแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชใช้เวลาน้อยที่สุดเพียง 3 นาที ก็สามารถตรวจพบไส้เดือนฝอยสูงกว่าวิธีพ่นหมอก 4 เท่า แต่มีจำนวนตรวจพบน้อยกว่าวิธีใช้ Ultrasonic และวิธีปั่นรากและหมั่นเหวี่ยง แต่ทั้งสองวิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง ไม่สะดวกในการเคลื่อนย้ายไปใช้ในภาคสนาม ตลอดจนการเตรียมตัวอย่างรากพืชในการแยกโดยวิธีแช่แอลกอฮอล์ไม่ยุ่งยาก นอกจากนั้นยังใช้พื้นที่ในการปฏิบัติงานน้อย สามารถประกอบเป็นชุดตรวจแยกไส้เดือนฝอยที่นำไปใช้ได้ง่ายในภาคสนามได้ และแต่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการนำไปใช้ในการตรวจแยกไส้เดือนฝอยกักกันได้อย่างเหมาะสม

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ของไส้เดือนฝอย *Raopholus similis* ที่เคลื่อนที่ออกจากรากพืชทดสอบจำนวน 4 ชนิด ที่ซอยละเอียด นำไปแช่ด้วยสารชนิดต่างๆ และเขย่าด้วยมือ เป็น เวลา 3 นาที (ค่าเฉลี่ย 5 ซ้ำ)

ชนิดของรากพืช	ไส้เดือนฝอยที่แยกได้หลังการเขย่า (%)[1/]			
(นน. 10 กรัม)	แอลกอฮอล์ 5%	คลอร็อกซ์ 0.5%	อะบาเม็กติน 0.3%	ฟิโปรนิล 0.3 %
พรรณไม้น้ำ	73	22	35	30
กล้วยประดับ	62	14	24	16
หน้าวัว	48	10	18	19
ฟิโลเดนดรอน	78	26	42	38

[1/] % ไส้เดือนฝอยหลังการเขย่า = จำนวนไส้เดือนฝอยหลังการเขย่า / ผลรวมของไส้เดือนฝอย x 100

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบจำนวนไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ในรากพืชพรรณไม้น้ำ (*Anubias nana*) โดยใช้วิธีการแยก 4 วิธี

กรรมวิธี	จำนวนไส้เดือนฝอย (ตัว)
1. วิธีแช่รากพืชในเครื่อง Ultrasonic เป็นเวลา 20 นาที	65.8 b[1/]
2. วิธีพ่นหมอกบนรากพืช เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	13.0 d
3. วิธีปั่นรากและหมุนเหวี่ยงด้วยสารละลายน้ำตาล	86.6 a
4. วิธีแช่รากซอยละเอียดในแอลกอฮอล์ 5% เขย่าเป็นเวลา 3 นาที	51.2 c
CV. (%)	10.27

[1/]ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

ดังนั้น การซอยรากให้ละเอียดช่วยให้สารชนิดต่างๆ ซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้ทั่วถึงกว่าการตัดรากเป็นชิ้นเล็กๆ และช่วยให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกมาได้จำนวนมากเพียงพอที่จะตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ สามารถนำวิธีการดังกล่าวมาปรับใช้ตรวจรับรองพืชเพื่อ

การปลูกต่อในแหล่งผลิตได้ทันที โดยการตรวจพบไส้เดือนฝอยเพียง 1 ตัวของการสุ่มตรวจพืชในบ่อปลูกหรือโรงเรือนปลูก จะไม่สามารถส่งออกได้ และบ่อปลูกหรือโรงเรือนนั้นๆ ต้องมีมาตรการป้องกันกำจัดให้หมดไป แล้วทำการตรวจสอบรากใหม่ จึงจะผ่านการตรวจออกใบรับรองเพื่อการส่งออกต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การย่อยรากให้ละเอียดและนำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 5 % เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 3 นาที สามารถแยกไส้เดือนฝอย *R. similis* ออกจากรากพืชทดสอบได้ดีที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 73 62 48 และ 78 % ของรากพรรณไม้น้ำ กล้วยประดับ หน้าวัว และฟิโลเดรนดอน ตามลำดับ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับวิธีการแยกอื่นๆ พบว่าสามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน *R. similis* ได้ดีกว่าวิธีการพ่นหมอกบนรากมากกว่า 4 เท่า มีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่รวดเร็ว ใช้วัสดุ-อุปกรณ์ที่ไม่ยุ่งยากในการเตรียม สามารถเคลื่อนย้ายไปใช้ในภาคสนามได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2553. การจัดการศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก. *ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรมโครงการพัฒนาการผลิตสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำส่งออก. วันที่ 17-18 มิถุนายน 2553. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรุงเทพฯ. 29 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ วราภรณ์ ประกอบ. 2552. การใช้คลื่นเสียงตรวจแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจากรากพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก. *ใน* การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 จ. อุบลราชธานี.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ วานิช คำพานิช 2551. การพัฒนาเครื่องมือและเทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้าและส่งออก. ผลงานวิจัยฉบับเต็ม กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 26 หน้า.

Barker, K.R. 1985. Nematode extraction and bioassays, Pages 19-35. *In* : K.R. Barker, C.C. Carter, and J.N. Sasser, eds. An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Vol. II Methodology. North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC.

Hooper, D.J. 1970. Extraction of nematodes from plant material, Pages 34-38. In : J.F. Southey, ed. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fishery, and Food Technology Bulletin 2, Her Majesty's Stationery Office, London.

Tangchitsomkid, N. 2012. A new technology of nematode extraction kit for field work. Pages. 109. *In* The International Conference on Tropical and Sub-tropical Plant Diseases 2012. February 7-10, 2012 The Empress Hotel, Chiang Mai.