

การจำแนกไส้เดือนฝอยรากแผล (*Pratylenchus* spp.)
 ในแหล่งปลูกหอมแดงด้วยวิธีอณูชีววิทยา
 Molecular Identification of Lesion Nematode (*Pratylenchus* spp.)
 in Shallot Fields

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ วีรกรณ์ แสงไสย์ รุ่งนภา ทองเครื่อง
 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Soil samples were collected from onion fields in Si Sa Ket, Yasothon, Ubon Ratchathani, Buri Ram, Nakhon Ratchasima, Mae Hong Son, Chiang Rai, Chiang Mai, Lamphun, Uttaradit, Tak, Ratchaburi, Kanchanaburi, Suphan Buri and Nakhon Pathom provinces during October 2016 to March 2018. Nematodes were extracted from 128 soil sample to determine the presence of lesion nematodes. *Pratylenchus* spp. was detected in 12 samples and subsequently corn was grown in each soil sample to increase nematode number. Monoxenic culture of single *Pratylenchus* female was carried out using corn root tissue culture. *Pratylenchus* species were identified by comparing the D2D3 expansion region of 28S large subunit ribosomal RNA gene with database in the GenBank in combination with morphology study. *Pratylenchus dellatrei* were identified from 11 samples and *P. brachyurus* was identified from 1 sample. In this study lesion nematodes were found in onion fields in Kanchanaburi, Suphan Buri and Ratchaburi, provinces. However, the pathogenicity and damage potential to onion of both species is unknown and should be determined.

Key words : plant parasitic nematode, identification, quarantine, Alliaceae

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกหอม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนมีนาคม 2561 ในจังหวัดศรีสะเกษ โยโสธร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ นครราชสีมา แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน อุตรดิตถ์ ตาก ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม รวม 128 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผล พบไส้เดือนฝอยรากแผลในตัวอย่างดิน 12 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากแผลโดยการปลูกข้าวโพดลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบ และเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากแผลโดยเริ่มจากตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว ในรากข้าวโพดในสภาวะปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ประชากรที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยวิธีทางอนุชีววิทยา โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene กับฐานข้อมูล พบว่าคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Pratylenchus dellatrei* 11 ตัวอย่างและ *P. brachyurus* 1 ตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา การเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกหอมครั้งนี้ พบไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ จ. กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และราชบุรี ยังไม่มีข้อมูลการเข้าทำลาย และความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากแผลทั้ง 2 ชนิดต่อหอม ซึ่งควรศึกษาในลำดับต่อไป

คำหลัก : ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน การจัดจำแนก ระบาดวิทยา พืชตระกูลหอม

คำนำ

ไส้เดือนฝอยรากแผล (Lesion nematodes: *Pratylenchus* spp.) เป็นไส้เดือนฝอยอีกสกุลหนึ่งที่มีความสำคัญ และทำความเสียหายแก่พืชหลายชนิด นอกจากจะทำความเสียหายโดยตรงต่อผลผลิตทางการเกษตรแล้ว ไส้เดือนฝอยรากแผลบางชนิดยังเป็นศัตรูพืชกักกัน และมีความสำคัญด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ไส้เดือนฝอยรากแผลทำลายพืชโดยการเข้าทำลายรากโดยเฉพาะเนื้อเยื่อส่วน cortex parenchyma การเคลื่อนที่และดูดกินอาหารภายในราก ทำให้รากถูกทำลายเกิดแผลและเน่าตาย การเข้าทำลายรากนอกจากทำให้เกิดแผลแล้วยังส่งเสริมการเข้าทำลายรากของเชื้อราโรคพืชบางชนิดอีกด้วย ไส้เดือนฝอยรากแผลเป็นศัตรูของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น กลัวย ัญพืชต่าง ๆ กาแฟ ข้าวโพด พืชตระกูลถั่ว มันฝรั่ง พืชผัก และไม้ผลต่าง ๆ ปัจจุบันมีการจำแนกไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* มากกว่า 60 ชนิด (Castillo and Vovlas, 2007) ในประเทศไทยมีรายงานการพบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. alleni*, *P. brachyurus*, *P. breviobesus*, *P. coffeae*, *P. delatrei*, *P. neglectus*, *P. nongkiensis*, *P. penetrans*, *P. scribneri*, *P. sudanensis*, *P. tenuis*, *P. thilandicus*, *P. thomei*, *P. vulnus*, *P. zae* และ *Pratylenchus* sp. ที่ยังไม่สามารถระบุชนิดชนิด (สืบศักดิ์, 2538) การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากแผลได้มีการปรับปรุง ซึ่งปัจจุบันไม่มี *P. breviobesus*, *P. nongkiensis* และ *P. thilandicus* อยู่ในรายชื่อไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* แล้ว

หอมแดง (*Allium ascalonicum* L.) เป็นพืชที่มีการบริโภคสูงทั้งในประเทศและต่างประเทศ ในปี 2560 มีเนื้อที่เพาะปลูกประมาณ 57,800 ไร่ ผลผลิต 128,879 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) เป็นพืชส่งออกอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ ในปี พ.ศ. 2554 ประเทศไทยส่งออกหอมแดงไปต่างประเทศ ถึง 54,233.47 ตัน มูลค่า 585.01 ล้านบาท โดยมีตลาดส่งออกที่สำคัญคือ อินโดนีเซียและมาเลเซีย อุปสรรคของการส่งออกหอมแดงประการหนึ่งคือกฎระเบียบการนำเข้าของประเทศคู่ค้า เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของศัตรูพืชที่อาจติดไปกับหอมแดง ข้อมูลการสำรวจศัตรูพืชมี

ความสำคัญต่อการเจรจาการส่งออกหอมแดง ทำให้ประเทศคู่ค้ามีความมั่นใจว่าสินค้าจะไม่มี การปนเปื้อนจากศัตรูพืชกักกัน อินโดนีเซียได้ประกาศการยอมรับเขตพื้นที่ปลอดศัตรูพืชสำหรับหอมแดงที่ ผลิตในประเทศไทย (Pest Free Area; PFA) โดยประกาศให้หอมแดงจาก จ. ศรีสะเกษ เป็นแหล่ง ปลอดศัตรูพืชกักกันของอินโดนีเซีย 2 ชนิด คือ ไร้เดือนฝอย *Ditylenchus destructor* และเชื้อรา *Urocystis cepulae* ตั้งแต่วันที่ 16 กันยายน 2558 (กรมวิชาการเกษตร, 2558) ซึ่งเป็นผลจากข้อมูล การสำรวจพื้นที่ปลูกหอมแดงของประเทศไทย อย่างไรก็ตามประเทศอินโดนีเซียได้แจ้งเตือนการตรวจ พบไร้เดือนฝอย *P. penetrans* ในหอมแดงจากประเทศไทย ทำให้ต้องมีการสุ่มตรวจตัวอย่างหอมแดง ก่อนส่งออกไปยังอินโดนีเซีย ซึ่งเป็นการเพิ่มขึ้นขั้นตอนและต้นทุนต่อการส่งออกหอมแดงของไทย จาก การสุ่มตรวจหอมแดงส่งออกที่ผ่านมา ยังไม่เคยมีรายงานการตรวจพบไร้เดือนฝอยรากแผล *P. penetrans*

ไร้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่มีรายงานการพบในพื้นที่ปลูกหอมในประเทศต่าง ๆ ได้แก่ *P. brachyurus* *P. coffeae* *P. neglectus* *P. penetrans* *P. scribneri* *P. thomei* และ *P. zae* (Hodda et al., 2012) รายงานเกี่ยวกับความเสียหายของหอมหรือหอมแดงที่เกิดจากไร้เดือนฝอยรากแผลมีค่อนข้างน้อย *P. penetrans* เป็นไร้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่สำคัญมีพืชอาศัยกว้าง มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับ ไร้เดือนฝอยรากแผลชนิดนี้ค่อนข้างมาก *P. penetrans* สามารถเข้าทำลายและทำความเสียหายแก่ หอม (*Allium cepa*) โดยทำให้หอมมีการเจริญเติบโต ขนาดและน้ำหนักหัวลดลง (Pang et al., 2009) ในประเทศไทยมีรายงานการพบ *P. penetrans* ในตัวอย่างดินจากแปลงอู้นพันธ์ไว้ห่มละกา จ. สมุทรสาคร (สืบศักดิ์, 2538) ถึงแม้ว่าหอมแดงอาจไม่ใช่พืชอาศัยหลักของไร้เดือนฝอยรากแผลชนิด ต่าง ๆ แต่ก็มีความสำคัญเนื่องจากไร้เดือนฝอยสกุลนี้สามารถติดไปกับหัวหอม และอาจไปแพร่ระบาด ทำความเสียหายต่อพืชในพื้นที่ต่าง ๆ ได้ ข้อมูลการแพร่กระจายของชนิดไร้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ ปลูกหอมจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ทราบถึงสถานการณ์ปัจจุบัน เพื่อใช้ประโยชน์ในการบริหารจัดการ และสร้างความเชื่อมั่นต่อประเทศคู่ค้าในการส่งออกสินค้าเกษตร

การจำแนกชนิดไร้เดือนฝอยรากแผลทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างยาก จำเป็นต้องใช้นักไร้เดือน ฝอยที่มีความชำนาญ ไร้เดือนฝอยรากแผลมีลักษณะทางสัณฐานน้อยประการที่สามารถนำไปใช้ในการ จำแนกชนิด อีกทั้งยังมีความแปรปรวนของลักษณะภายในประชากร (Intraspecific variation) ด้วย การนำเทคนิคด้านอนุชีววิทยามาประกอบกับสัณฐานวิทยา สามารถเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการ ตรวจวินิจฉัย สำหรับไร้เดือนฝอยรากแผลสกุล *Pratylenchus* นั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene สามารถนำมาใช้ประกอบการ จำแนกชนิดได้ และมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้ในฐานข้อมูลค่อนข้างมาก Al-Banna et al. (1997) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA genes ศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของ *Pratylenchus* Carta et al. (2001) และ De Luca et al. (2004) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA genes ศึกษาความแตกต่างของไร้เดือนฝอยรากแผลชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม พบว่าไร้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่มี ลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกัน อาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน Al-Banna et al. (2004) ใช้ลำดับ นิวคลีโอไทด์ส่วน D3 expansion region ในการออกแบบคู่ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตรวจสอบไร้เดือน ฝอยรากแผล 6 ชนิด ต่อมามีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2 เพิ่มเข้ามาในการศึกษาความสัมพันธ์ เชิงพันธุกรรมของไร้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* เพื่อเพิ่มความชัดเจนในการศึกษา เนื่องจากข้อมูล

ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D3 อาจไม่เพียงพอในการการศึกษาความสัมพันธ์ในระดับชนิด (species) จึงทำให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของไส้เดือนฝอยสกุล *Pratylenchus* ในฐานข้อมูลค่อนข้างมาก และในการรายงานการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดใหม่ๆ จึงมักจะมีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้ร่วมอยู่ด้วย การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนี้ร่วมกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยาจะทำให้การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ปลูกหอมมีความถูกต้องแม่นยำเพิ่มขึ้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ปลูกหอมของประเทศไทย โดยการนำเทคนิคด้านอนุชีววิทยามาใช้ในการจำแนกเพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นปัจจุบันสำหรับใช้ประโยชน์ในการบริหารจัดการและเป็นข้อมูลประกอบการส่งออกหอมแดงต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างดินและแยกไส้เดือนฝอย

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงหอมและกระเทียม ในพื้นที่ จ. ศรีสะเกษ จ. ยโสธร จ. อุบลราชธานี จ. บุรีรัมย์ จ. นครราชสีมา จ. แม่ฮ่องสอน จ. เชียงราย จ. เชียงใหม่ จ. ลำพูน จ. อุดรธานี จ. ตาก จ. ราชบุรี จ. กาญจนบุรี จ. สุพรรณบุรี และ จ. นครปฐม โดยสุ่มเก็บตัวอย่างดินที่ความลึก 15 – 20 เซนติเมตร สุ่มเก็บให้ทั่วแปลง หรือพื้นที่อย่างน้อย 1,600 ตารางเมตร ให้ได้ตัวอย่างดินประมาณ 4 กิโลกรัม คลุกเคล้าตัวอย่างดินเข้าด้วยกัน แบ่งบรรจุลงในถุงพลาสติก ประมาณ 1 กิโลกรัม บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินหนัก 250 กรัม โดยวิธี Decanting and sieving with Baermann trays โดยกวนตัวอย่างดินในน้ำ 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที กรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร ที่วางอยู่บนตะแกรงโลหะ ขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างที่ติดอยู่บนตะแกรงอันล่างใส่ลงบนกระดาษทิชชูที่วางอยู่บนตะแกรงในถาดพลาสติกกลมที่มีน้ำสะอาด ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยในน้ำไปตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากแผล

เพาะเมล็ดข้าวโพดลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากแผล เมื่อครบ 60 วันนำรากข้าวโพดมาล้างให้สะอาด แยกไส้เดือนฝอยรากแผลจากรากข้าวโพดโดยการนำรากข้าวโพดมาล้างให้สะอาด ตัดเป็นท่อนสั้นๆ ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร แช่ในน้ำสะอาด เลี้ยงไส้เดือนฝอยรากแผลในรากข้าวโพดในสภาพปลอดเชื้อ โดยเริ่มจากตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ สำหรับนำไปจำแนกชนิด โดยเตรียมรากข้าวโพดในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช Gamborg's B5 ในจานเลี้ยงเชื้อ ข่าเชื้อที่ผิวไส้เดือนฝอยรากแผลโดยการตัดตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากแผลใส่ลงในสาร streptomycin sulfate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยที่ข่าเชื้อแล้วตัดไส้เดือนฝอยใส่ลงบนรากข้าวโพดที่เตรียมไว้ จำนวน 1 ตัวต่อจานเลี้ยงเชื้อ เมื่อได้ประชากรไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงจากตัวเต็มวัย 1 ตัวแล้วนำไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผล

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยาและสัณฐานวิทยา ตรวจสอบทางอณูชีววิทยาโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene กับฐานข้อมูล สกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอย 1 ตัวด้วย GeneReleaser® (BioVentures) ตามคำแนะนำที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ ร่วมกับวิธีการตาม Schizas *et al.* (1997) ใช้เข็มเขี่ยตัดตัวไส้เดือนฝอยรากแผลใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร บดใน PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ด้วยส่วนปลายของ pipette tip นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C บ่มนาน 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟชนิด 1000 วัตต์ นาน 6 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนใสใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่ -20°C ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ forward primer D2A (5'- ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3) และ reverse primer D3B (5'- TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3) (Baldwin *et al.*, 1997) โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR ที่เริ่มจาก hot start 94°C นาน 7 นาที amplification cycle 35 รอบ ประกอบด้วย denature ที่ 94°C นาน 1 นาที annealing ที่ 50°C นาน 1 นาที และ extension ที่ 72°C นาน 1 นาที เมื่อจบ amplification cycle แล้ว ตามด้วย final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (ชุด Gotaq Flexi DNA Polymerase) ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ได้แก่ 5x buffer 1.5 ไมโครลิตร MgCl₂ (25 mM) 1.5 ไมโครลิตร dNTP (10 mM) 1.2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10 pmol/μL) อย่างละ 0.3 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (0.1 unit/μL) 0.3 ไมโครลิตร nuclease free water 7.1 ไมโครลิตรและดีเอ็นเอต้นแบบ 3 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยนำหลอดใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรุ่น T-Advanced (Biometra)

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ที่สังเคราะห์ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 10 ไมโครลิตรผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร ใช้ 100 bp DNA Ladder 1 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบ นำ agarose gel ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์นาน 30 นาที แล้วนำแผ่น agarose gel มาย้อมด้วย ethidium bromide นาน 10 นาที และแช่น้ำเปล่าอีก 5 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) และบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation ทำปฏิกิริยา PCR อีกครั้งในปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ direct sequencing ทั้ง 2 ทิศทางโดยใช้ทั้ง forward และ reverse primers นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ จัดเรียงในโปรแกรม ClustalW เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank สร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA4 โดยวิธี neighbor-joining หลังจากเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว หากพบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากแผลชนิดที่มีคู่ไพรเมอร์จำเพาะในการตรวจสอบ จะตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยนั้น ๆ ด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะอีกครั้งหนึ่ง เพื่อเป็นการยืนยัน

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยตรวจสอบลักษณะของไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างสด และตัวอย่างที่ทำการ

คงสภาพและทำสไลด์ถาวรตามวิธีของ Ryss (2003) จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลโดยใช้คู่มือการ
จัดจำแนกของ Castillo and Vovlas (2007) บันทึกภาพ

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2561

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างดินและตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผล

จากการเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมจังหวัดศรีสะเกษ โยโสธร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ นครราชสีมา แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน อุตรดิตถ์ ตาก ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนมีนาคม 2561 รวม 128 ตัวอย่าง เมื่อแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินตรวจหาไส้เดือนฝอยรากแผล พบไส้เดือนฝอยรากแผลในตัวอย่างดิน 12 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณโดยปลูกข้าวโพดลงในตัวอย่างดินและเลี้ยงบนรากข้าวโพดในสภาวะปลอดเชื้อได้ครบทุกตัวอย่าง สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่นที่ตรวจพบในตัวอย่างดิน ได้แก่ *Meloidogyne Rotylenchulus Tylenchorhynchus Hirschmanniella Helicotylenchus Aphelenchoides* และ *Hoplolaimus*

การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

การตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากแผลด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยาโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน D2D3 expansion region ของ 28S large subunit ribosomal RNA gene เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยคู่ไพรเมอร์ D2A/D3B ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 760 คู่เบส (ภาพที่ 1) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับไส้เดือนฝอยรากแผล *P. dellatrei* จำนวน 11 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างที่แยกได้จากตัวอย่างดิน อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี 7 ตัวอย่าง อ. เลาชวีญ จ. กาญจนบุรี 1 ตัวอย่าง อ. อุทอง จ. สุพรรณบุรี 1 ตัวอย่าง อ. จอมบึง จ. ราชบุรี 1 ตัวอย่าง และ อ. บ้านคา จ. ราชบุรี 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ และคล้ายกับ *P. brachyurus* จำนวน 1 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่แยกได้จากตัวอย่างดินจาก อ. ท่ามะกา จ. กาญจนบุรี ตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. brachyurus* ด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะ forward primer 18S (5'- TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT -3) และ reverse primer ACM7R (5'- GCW CCA TCC AAA CAA YGA G -3) โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR เริ่มจาก hot start ที่ 94°C นาน 2 นาที 45 วินาที amplification cycle จำนวน 40 รอบ ประกอบด้วย denature ที่ 94°C นาน 1 นาที annealing ที่ 57°C นาน 45 วินาที และ extension ที่ 72°C นาน 2 นาที เมื่อจบ amplification cycle แล้ว ตามด้วย final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที ผลการตรวจได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 267 คู่เบส (Figure 2)

การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

P. dellatrei

สามารถจำแนกด้วยลักษณะดังนี้ จำนวนรอยย่นบริเวณโครงหัว (Lip annuli) 3 วง เส้นข้างลำตัว 4 เส้น หางของตัวเต็มวัยเพศเมียมีลักษณะ subcylindrical ปลายหางมนมีผิวเรียบ ไม่พบตัว

เต็มวัยเพศผู้ matrix code สำหรับ tabular key คือ A2, B1, C3, D1, E2, F3, G3, H1, I1, J1, K1 (ตารางที่ 2)

ลักษณะโดยทั่วไปของตัวเต็มวัยเพศเมีย *P. dellatrei* ส่วนโครงหัวเชื่อมต่อนื่องกับลำตัวมีลักษณะ off set เล็กน้อย มีรอยย่น (annuli) 3 วง stylet แข็งแรง stylet knob มีลักษณะแบนทางด้านบน ขนาดประมาณ 1.6 x 4.0 ไมโครเมตร ส่วน dorsal oesophageal gland orifice อยู่ห่างจากฐานของ stylet ประมาณ 1.6-2.4 ไมโครเมตร oesophageal gland ซ้อนทับลำไส้ด้าน ventral ส่วน median bulb กลมหรือรี มีระบบวาล์วเห็นชัดเจน ส่วน nerve ring อยู่เหนือ excretory pore ตำแหน่งของ excretory pore ห่างจากส่วนปลายหัว 66.4-76.8 ไมโครเมตร ส่วน hemizonid อยู่เหนือ excretory pore ขนาดประมาณ 3 annuli มี lateral field ขนาดประมาณ 1/3 ของความกว้างลำตัว มีเส้นข้างลำตัว (lateral line) 4 เส้น ovary แบบเดี่ยว prodelphic เหยียดตรงไปทางด้านหัว oocyte เรียงเป็นแถวเดี่ยว spermatheca กลม ไม่มี sperm ส่วน post-vulval uterine sac ยาวกว่าความกว้างลำตัวช่วง vulva ทางมีลักษณะ subcylindrical ปลายมนผิวเรียบ ไข่เดือนฝอยรากแผล *P. dellatrei* ไม่พบตัวเต็มวัยเพศผู้

P. brachyurus

สามารถจำแนกด้วยลักษณะดังนี้ จำนวนรอยย่นบริเวณโครงหัว (Lip annuli) 2 วง วงบนสุดมีลักษณะเป็นมุมแหลม ส่วน stylet แข็งแรง basal knob กลม vulva 82-89% ของความยาวลำตัว ส่วน post-vulval uterine sac สั้นกว่าความกว้างลำตัว ส่วน spermatheca ไม่เด่นชัด และใช้งานไม่ได้ ทางมีลักษณะกว้างรูปโคน (broadly conoid) ปลายหางเรียบ มีลักษณะกลม (rounded) ปลายตัด (truncated) หรือ คล้ายใบพาย (spatulated) พบตัวเต็มวัยเพศผู้ แต่ค่อนข้างพบได้น้อย matrix code สำหรับ tabular key คือ A1, B2, C4, D1, E4, F3, G3, H1, I4, J2-3, K1 (Table 2)

ลักษณะโดยทั่วไปของ *P. brachyurus* ตัวเต็มวัยเพศเมียมีส่วนโครงหัว off set จากส่วนลำตัว มีรอยย่น (annuli) 2 วง โดยวงด้านบนมีลักษณะเป็นมุมแหลม โครงหัวแข็งแรง ส่วน lateral field มี lateral line 4 เส้น บริเวณกลางลำตัว และอาจแบ่งเป็น 5-6 เส้นบริเวณ vulva และสองเส้นบริเวณปลายหาง ส่วน stylet แข็งแรง basal knob กลม excretory pore อยู่หลัง hemizonid และห่างจากปลายหัวประมาณ 57-108 ไมโครเมตร oesophageal gland ซ้อนทับลำไส้ด้าน ventral และ lateral ovary มีลักษณะเหยียดตรง หรือบางครั้งมีลักษณะพับงอ หรือบางครั้งอาจเหยียดยาวจนถึง pharyngeal lobe ซึ่งพบค่อนข้างน้อย oocyte อาจเป็นแถวเดี่ยวหรือบางครั้งอาจเป็นแถวคู่ ตำแหน่ง vulva 82-89% ของความยาวลำตัว post-vulval uterine sac สั้นกว่าความกว้างลำตัว บริเวณ vulva ส่วน spermatheca ไม่ชัดเจน และไม่ทำงาน ทางมีลักษณะเป็นรูปโคน ผิวเรียบ ปลายหางมีลักษณะ กลมมน (round) truncate หรือ spatulate มี ventral annuli 13-24 วง phasmid อยู่ที่กึ่งกลางหาง

การศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยรากแผลในพื้นที่ปลูกหอมครั้งนี้ พบไส้เดือนฝอยรากแผล 2 ชนิด คือ *P. dellatrei* และ *P. brachyurus* ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดมีรายงานการพบในประเทศไทย ข้อมูลเกี่ยวกับ *P. dellatrei* มีไม่มากนัก มีรายงานว่าพบในตัวอย่างดินจาก ถั่วลิสง ส้มแมนดาริน ฝ้าย มันเทศ หม่อน มะเขือเทศ แตงกวา และ อ้อย (สืบศักดิ์, 2538) ส่วน *P. brachyurus* มีรายงานการพบในตัวอย่างดิน สับปะรด ตะไคร้ ทุเรียน ยูคาลิปตัส ฝ้าย มันสำปะหลัง มะละกอมะม่วง อ้อย หม่อน ข้าวฟ่าง ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วลิสง พริก พริกไทย ยาสูบ มะเขือเทศ (สืบศักดิ์, 2538)

และ กล้วย (ไตรเดช และคณะ, 2558) จากการตรวจสอบข้อมูลไม่พบข้อมูลการเข้าทำลายหอมของ *P. dellatrei* แต่สำหรับ *P. brachyurus* มีรายงานการพบในพื้นที่ปลูกหอมและสามารถเข้าทำลายหอมได้ อย่างไรก็ตามหอมอาจไม่ใช่พืชอาศัยหลักของ *P. brachyurus* Machado and Inomoto (2001) ทดสอบความเป็นพืชอาศัยของพืชผัก 18 ชนิดต่อ *P. brachyurus* พบว่า onion cv. Baia Periforme (*Allium cepa* L.) และ green onion cv. Todo ano (*Allium fistulosum* L.) เป็นพืชอาศัยที่ไม่ดี (poor host) ของ *P. brachyurus* พืชอาศัยที่มีการศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายและระดับความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *P. brachyurus* ได้แก่ ถั่วเหลือง และกาแฟ ส่วน พืชอาศัยที่มีการศึกษาการเข้าทำลายและระดับความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *P. dellatrei* ได้แก่ *Crossandra undulaefolia* (Castillo and Vovlas, 2007) การสำรวจเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมครั้งนี้ไม่พบไส้เดือนฝอยรากแผล *P. penetrans* อย่างไรก็ตามควรมีการสำรวจเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกหอมอย่างต่อเนื่อง ครอบคลุมทุกพื้นที่ และช่วงเวลาและฤดูต่าง ๆ รวมทั้งการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชชนิดอื่นที่อยู่ใกล้เคียงแปลงปลูกหอม เพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติม และควรศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายหอมของไส้เดือนฝอยรากแผล *P. dellatrei* และ *P. brachyurus* เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ปลูกหอม ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนมีนาคม 2561 ในจังหวัดศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี บุรีรัมย์ นครราชสีมา แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน อุดรดิตถ์ ตาก ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม รวม 128 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากแผลในตัวอย่างดิน จ. กาญจนบุรี สุพรรณบุรี และราชบุรี รวม 12 ตัวอย่าง จำแนกชนิดด้วยวิธีทางอนุชีววิทยาและสัณฐานวิทยาได้เป็น *Pratylenchus dellatrei* 11 ตัวอย่าง และ *P. brachyurus* 1 ตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2558. กองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/psco/index.php?option=com_content&view=article&id=25:2015-10-01-08-20-01&catid=42:2010-08-06-04-08-08&Itemid=71, 18 กรกฎาคม 2561
- ไตรเดช ช่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ และมนตรี เอี่ยมวิมิงสา. 2558. อนุกรมวิธานและความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย migratory endoparasitic nematodes. หน้า 2375-2387. ใน: รายงานผลการวิจัยประจำปี 2558. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร, ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/production/หอมแดง60.pdf>, 18 กรกฎาคม 2561.
- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2538. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 275 หน้า.

- Al-Banna, L., V. Williamson and S.L. Gardner. 1997. Phylogenetic analysis of nematodes of the genus *Pratylenchus* using nuclear 26S rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7:94-102.
- Al-Banna, L., A.T. Ploeg, V.M. Williamson and I. Kaloshian. 2004. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *Journal of Nematology* 36:142-146.
- Carta, L. K., A. M., Skantar and Z.A. Handoo. 2001. Molecular, morphological and thermal characters of 19 *Pratylenchus* spp. and relatives using the D3 segment of the nuclear LSU rRNA gene. *Nematropica* 31: 193-207.
- Castillo, P., and N. Vovlas. 2007. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): Diagnosis, Biology, Pathogenicity and Management. *Nematology Monographs and Perspectives*, vol. 6. Leiden, NL: Koninklijke Brill NV.
- De Luca, F., E. Fanelli, M. di Vito, A. Reyes, C. de Giorgi. 2004. Comparison of the sequences of the D3 expansion of the 26S ribosomal genes reveals different degrees of heterogeneity in different populations and species of *Pratylenchus* from the Mediterranean region. *European Journal of Plant Pathology* 110: 949-957.
- Hodda, M., N. Banks and S. Singh. 2012. *Nematode threats in the NAQS region*. CSIRO Canberra, Australia. 82 p.
- Machado, A.C.Z. and M.M. Inomoto. 2001. Host status of eighteen vegetable crops for *Pratylenchus brachyurus*. *Nematropica*. 31:259-265.
- Pang, W., S.L. Hafez, P. Sundararaj, B. Shafii and E. Fallah. 2009. Pathogenicity of *Pratylenchus penetrans* on onion. *Nematropica* 39:35-46.
- Ryss, A. Y. 2003. Express technique to prepare permanent collection slides of nematodes. *Zoosystematica Rossica* 11: 257-260.
- Schizas, N.V., G.T. Street, B.C. Coull, G.T. Chandler and J.M. Quattro. 1997. An efficient DNA extraction method for small metazoans. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 6: 381-383.

Table 1 Location and numbers of soil samples collected from onion and shallot fields during October 2016 - June 2018 showing number of soil samples which lesion nematodes were detected and species identified

| Province | District | Sub-district | Number of Soil Samples | Number of positive samples | Type of Lesion Nematode |
|--------------|-----------------|---------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Chiang Rai | Wiang Pa Pao | Mae Chedi | 3 | 0 | |
| | Mae Suai | Mae Phrik | 1 | 0 | |
| | Phan | Pa Hung | 2 | 0 | |
| Chiang Mai | Chiang Dao | Mae Na | 1 | 0 | |
| | | Si Dong Yen | 7 | 0 | |
| | | Nong Bua | 2 | 0 | |
| | | Pong Tam | 1 | 0 | |
| | | Fang | Mae Ngon | 1 | 0 |
| | | Mae Sun | 1 | 0 | |
| | | Pong Nam Ron | 1 | 0 | |
| | | Mon Pin | 1 | 0 | |
| | | San Sai | 2 | 0 | |
| | | Mae Kha | 2 | 0 | |
| | San Sai | Mae Faek | 1 | 0 | |
| Hot | | Bo Sali | 2 | 0 | |
| Mae Hong Son | Pai | Mae Na Toeng | 2 | 0 | |
| | | Tham Lot | 1 | 0 | |
| | Pang Mapha | Pang Mapha | 1 | 0 | |
| | | Mueang | Huai Pong | 3 | 0 |
| | Khun Yuam | Mueang Pon | 3 | 0 | |
| | Mae La Noi | Mae La Luang | 1 | 0 | |
| Mae La Noi | | 1 | 0 | | |
| Lamphun | Pa Sang | Muang Noi | 1 | 0 | |
| | | Mae Raeng | 2 | 0 | |
| | | Ban Ruean | 1 | 0 | |
| | Thung Hua Chang | Thung Hua Chang | 1 | 0 | |
| | | Takhian Pom | 1 | 0 | |
| | Ban Hong | Lao Yao | 2 | 0 | |
| | | Pa Phlu | 1 | 0 | |
| Uttaradit | Laplae | Chai Chumphon | 2 | 0 | |
| | | Fai Luang | 1 | 0 | |
| Tak | Phop Phra | Phop Phra | 1 | 0 | |
| | | Chong Khaep | 2 | 0 | |
| | | Ruam Thai Phatthana | 1 | 0 | |

Table 1 Location and numbers of soil samples collected from onion and shallot fields during October 2016 - June 2018 showing number of soil samples which lesion nematodes were detected and species identified (Continue)

| Province | District | Sub-district | Number of Soil Samples | Number of positive samples | Type of Lesion Nematode |
|-------------------|---------------|-------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Kanchanaburi | Tha Muang | Tha Muang | 7 | 6 | <i>P. delattrei</i> |
| | | Wang Sala | 1 | 0 | |
| | | Wang Khanai | 1 | 1 | <i>P. delattrei</i> |
| | Tha Maka | Tha Ruea | 1 | 1 | <i>P. brachyurus</i> |
| | Bo Phloi | Lum Rang | 1 | 0 | |
| | | Nong Krang | 1 | 0 | |
| | Lao Khwan | Nong Nok Kaeo | 2 | 1 | <i>P. delattrei</i> |
| Suphan Buri | U Thong | Chorakhe Sam Phan | 1 | 1 | <i>P. delattrei</i> |
| Nakhon Pathom | Mueang | Nong Ngu Luam | 1 | 0 | |
| Ratchaburi | Chom Bueng | Kaem On | 3 | 0 | |
| | | Dan Thap Tako | 1 | 1 | <i>P. delattrei</i> |
| | Ban Kha | Ban Kha | 1 | 1 | <i>P. delattrei</i> |
| | | Nong Pan Chan | 1 | 0 | |
| Nakhon Ratchasima | Mueang | Si Mum | 1 | 0 | |
| | | Phon Krung | 1 | 0 | |
| Yasothon | Kho Wang | Fa Huan | 4 | 0 | |
| Buri Ram | Mueang | Thalung Lek | 1 | 0 | |
| | | Phra Khru | 1 | 0 | |
| | Nong Hong | Thai Samakkhi | 2 | 0 | |
| | | Sa Kaeo | 1 | 0 | |
| Si Sa Ket | Yang Chum Noi | Yang Chum Noi | 6 | 0 | |
| | | Non Khun | 1 | 0 | |
| | | Khon Kam | 2 | 0 | |
| | Mueang | Mueang Tai | 1 | 0 | |
| | | Mak Khiap | 2 | 0 | |
| | Kanthararom | Mueang Noi | 1 | 0 | |
| | | Lathai | 1 | 0 | |
| | Wang Hin | Bu Sung | 2 | 0 | |
| | | Duan Yai | 1 | 0 | |
| | Rasi Salai | Mueang Khong | 1 | 0 | |
| | | Mueang Khaen | 1 | 0 | |
| | | Som Poi | 4 | 0 | |
| | | Nong Mi | 12 | 0 | |
| | | Sang Pi | 2 | 0 | |
| Ubon Ratchathani | Khueang Nai | Sang Tho | 1 | 0 | |
| | | That Noi | 1 | 0 | |
| Total | | | 128 | 12 | |

Table 2 Morphological characteristics used for *Pratylenchus* identification with Tabular key (Castillo and Vovlas, 2007)

| | | |
|---|---|---|
| A. จำนวนรอยย่นบริเวณโครงหัว (Lip annuli) | E. ตำแหน่งและอัตราส่วนของ vulva (Valva position, ratio V) | I. ความยาวของการซ้อนทับของ pharynge กับ ลำไส้ (Pharyngeal overlapping length) |
| กลุ่มที่ 1: 2 วง | กลุ่มที่ 1: < 75% | กลุ่มที่ 1: < 30 ไมโครเมตร |
| กลุ่มที่ 2: 3 วง | กลุ่มที่ 2: 75 - 79.9% | กลุ่มที่ 2: 30 - 39.9 ไมโครเมตร |
| กลุ่มที่ 3: 4 วง | กลุ่มที่ 3: 80 - 85% | กลุ่มที่ 3: 40 - 50 ไมโครเมตร |
| | กลุ่มที่ 4: > 85% | กลุ่มที่ 4: > 50 ไมโครเมตร |
| B. การปรากฏของตัวเต็มวัยเพศผู้ (Male) | F. ความยาวของ Post-vulval uterine sac (PUS) | J. จำนวนเส้นข้างลำตัวบริเวณตำแหน่ง vulva (Lateral field lines at vulval region) |
| กลุ่มที่ 1: ไม่พบ | กลุ่มที่ 1: < 16 ไมโครเมตร | กลุ่มที่ 1: 4 เส้น |
| กลุ่มที่ 2: พบ | กลุ่มที่ 2: 16 - 19.9 ไมโครเมตร | กลุ่มที่ 2: 5 เส้น |
| | กลุ่มที่ 3: 20 - 24.9 ไมโครเมตร | กลุ่มที่ 3: 6 - 8 เส้น |
| | กลุ่มที่ 4: 25 - 29.9 ไมโครเมตร | |
| | กลุ่มที่ 5: 30 - 35 ไมโครเมตร | |
| | กลุ่มที่ 6: > 35 ไมโครเมตร | |
| C. ความยาว Stylet (Stylet Length) | G. ลักษณะหางของตัวเต็มวัยเพศเมีย (Female tail shape) | K. ลักษณะของ Lateral field บริเวณตำแหน่ง vulva (Lateral field structure at vulval region) |
| กลุ่มที่ 1: < 13 ไมโครเมตร | กลุ่มที่ 1: cylindrical | กลุ่มที่ 1: smooth bands |
| กลุ่มที่ 2: 13 - 15.9 ไมโครเมตร | กลุ่มที่ 2: subcylindrical | กลุ่มที่ 2: partially or completely areolated bands |
| กลุ่มที่ 3: 16 - 17.9 ไมโครเมตร | กลุ่มที่ 3: conoid | |
| กลุ่มที่ 4: 18 - 20 ไมโครเมตร | | |
| กลุ่มที่ 5: > 20 ไมโครเมตร | | |
| D. ลักษณะของ Spermatheca (Shape of spermatheca) | H. ลักษณะปลายหางของตัวเต็มวัยเพศเมีย (Female tail tip) | |
| กลุ่มที่ 1: absent or reduced | กลุ่มที่ 1: smooth | |
| กลุ่มที่ 2: rounded to spherical | กลุ่มที่ 2: striated | |
| กลุ่มที่ 3: oval | กลุ่มที่ 3: pointed | |
| กลุ่มที่ 4: rectangular | กลุ่มที่ 4: with ventral projection | |

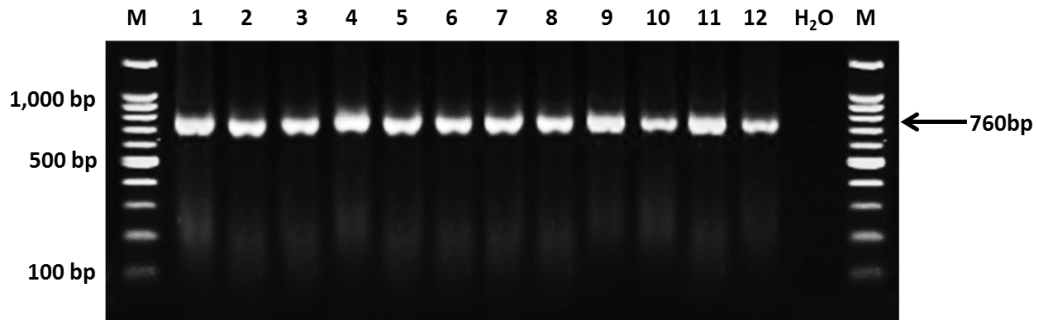


Figure 1 Amplicons of D2D3 expansion segments of 12 *Pratylenchus* amplified with the universal primer D2A/D3B yielded approximately 760 bp products

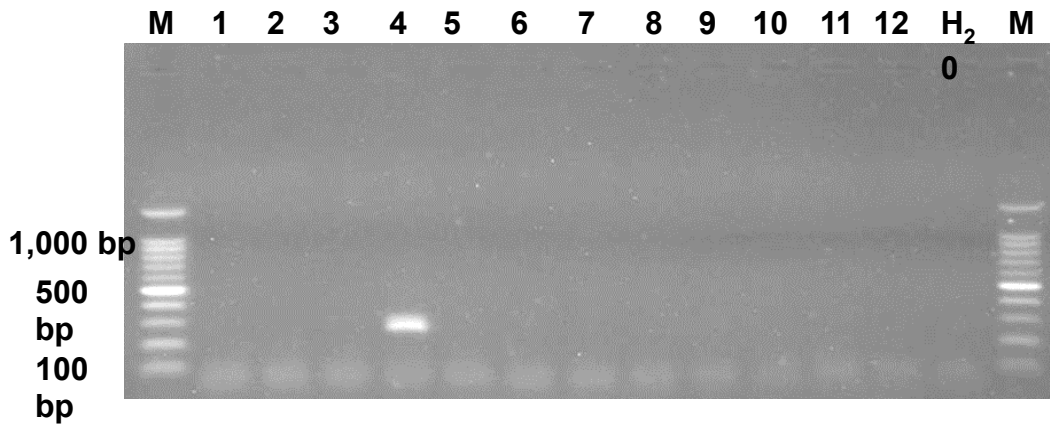


Figure 2 Detection of *P. brachyurus* using specific primers 18S/ACM7R, approximately 267 bp DNA fragment was obtained

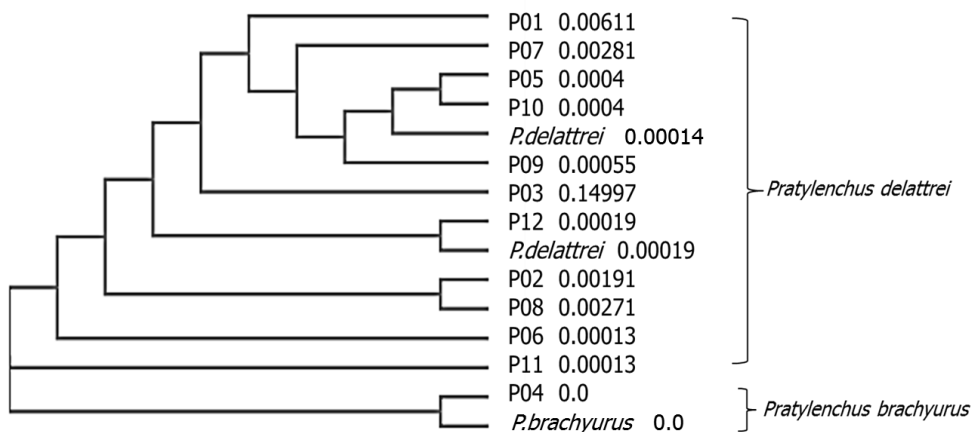


Figure 3 Phylogenetic tree of the *Pratylenchus* species constructed using D2D3 expansion segments of the 28S rDNA



Figure 4 *P. dellatrei* is characterised by three lip annuli, stylet 16-17.9 μm , spermatheca absent or reduced, vulva position 75-79.9%, post-vulval uterine sac 20-24.9 μm , female tail shape conoid, female tail tip smooth, pharyngeal overlapping length <30 μm , lateral field smooth



Figure 5 *P. brachyurus* is characterised by two lip annuli, stylet 18-20 µm, spermatheca absent or reduced, vulva position > 85%, post-vulval uterine sac 20-24.9 µm, female tail shape conoid, female tail tip smooth, pharyngeal overlapping length >50 µm, lateral field smooth with 5-8 lines