



การแพร่ระบาดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานีและการ
ตอบสนองเชิงป้องกันของข้าว (*Oryza sativa* L.) ต่อไส้เดือนฝอยรากปม

Meloidogyne graminicola

**Distribution of Plant-Parasitic Nematodes in Pathum Thani's Rice Fields and
Defensive Response of Rice (*Oryza sativa* L.) Against *Meloidogyne graminicola***

ณัฐธิเดช บีสา

Natthidech Beesa

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Plant Pathology**

Prince of Songkla University

2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การแพร่ระบาดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานีและการ
ตอบสนองเชิงป้องกันของข้าว (*Oryza sativa* L.) ต่อไส้เดือนฝอยรากปม

Meloidogyne graminicola

**Distribution of Plant-Parasitic Nematodes in Pathum Thani's Rice Fields and
Defensive Response of Rice (*Oryza sativa* L.) Against *Meloidogyne graminicola***

ณัฐธิเดช บีสา

Natthidech Beesa

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Plant Pathology**

Prince of Songkla University

2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแพร่ระบาดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานีและการ
 ตอบสนองเชิงป้องกันของข้าว (*Oryza sativa* L.) ต่อไส้เดือนฝอยรากปม
Meloidogyne graminicola

ผู้เขียน นายณัฐธิเดช บีสาน

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนัญชนก ไชยรินทร์)ประธานกรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนินันท์ พรสุริยา)
กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ เรือนปานนท์)
กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัญชา ชินศิริ)
กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนัญชนก ไชยรินทร์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
 สำหรับการศึกษ ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

.....
 (ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ดี ฟ้างู๋สง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(3)

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนัญชนก ไชยรินทร์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(นายณัฐธิเดช บีสตา)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นายณัฐริเดช ปีสตา)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแพร่ระบาดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานีและการตอบสนองเชิงป้องกันของข้าว (<i>Oryza sativa</i> L.) ต่อไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne graminicola</i>
ผู้เขียน	นายณัฐริเดช บีสตา
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2564

บทคัดย่อ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยทั้งในแง่การส่งออกและการบริโภคภายในครัวเรือน จังหวัดปทุมธานีเป็นแหล่งการปลูกข้าวที่สำคัญแห่งหนึ่งเนื่องจากร้อยละ 55 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เป็นแหล่งเพาะปลูกข้าวและสามารถผลิตข้าวได้ถึง 0.2 ล้านตันต่อปี การพบประชากรไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในแปลงข้าวเป็นจำนวนมากสามารถนำไปสู่ความเสียหายผลผลิตข้าวได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อ 1. ศึกษาการแพร่ระบาดและระบุชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชหลักในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานี และ 2. ศึกษาการตอบสนองเชิงป้องกันของข้าวต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม ทำโดยเก็บตัวอย่างดินและรากข้าวจำนวน 42 ตัวอย่างจากอำเภอหนองเสือ ลำลูกกา รัษฎบุรี คลองหลวง เมือง สามโคก และลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี มาแยกไส้เดือนฝอยแล้วนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการระบุชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยาด้วยการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง (specific primers) ผลพบว่ามีการระบาดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช 2 ชนิดเป็นหลักในทุกอำเภอคือ *Hirschmanniella* sp. (96.54 เปอร์เซ็นต์) และ *Meloidogyne* sp. (3.22 เปอร์เซ็นต์)

การจัดจำแนกไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella* sp. พบว่ามีความยาวลำตัวประมาณ 1,639–2,329 ไมโครเมตร ความยาวของ stylet อยู่ในช่วง 24–27 ไมโครเมตร บริเวณส่วนหางพบดิ่งใสที่เรียกว่า mucron และจากการยืนยันด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาโดยการใช้ไพรเมอร์ D2A/D3B และ rDNA2/rDNA1.58s พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยมีความเหมือนกับไส้เดือนฝอย *H. mucronata* จากประเทศกัมพูชา มากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp. พบว่าตัวอ่อนระยะที่ 2 มีความยาวลำตัวเท่ากับ 427–501 ไมโครเมตร stylet มีความยาวเท่ากับ 13.1–15.7 ไมโครเมตร บริเวณหางเป็นรูปกรวย (conoid) ตัวโตเต็มวัยเพศผู้มีความยาวลำตัวเท่ากับ 1,060–1,734 ไมโครเมตร stylet ยาว 18–22 ไมโครเมตร บริเวณหางมีลักษณะโค้งมน (bluntly rounded) ลักษณะรอยหยักส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวโตเต็มวัยเพศเมียเป็นวงรี ผิวหนังเรียบ และไม่มี lateral lines ซึ่งเป็นลักษณะของ *M. graminicola* การใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์

จำนวน 3 คู่ ได้แก่ rDNA2/rDNA1.58s, C₂F₃/1108 และ SCAR-MgFW/SCAR-MgRev พบว่ามีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 490, 520 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S-ITS1-1.58S มีความเหมือนกับไส้เดือนฝอย *M. graminicola* มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบเป็นหลักในแปลงข้าวจัมปทุมธานีคือ *H. mucronata* และ *M. graminicola*

การศึกษาการตอบสนองของข้าวทั้ง 6 พันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105, ปทุมธานี 1, สันป่าตอง 1, กข6, กข43 และ กข57 ต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *M. graminicola* พบพบว่าข้าวพันธุ์ กข6 เป็นข้าวที่มีการตอบสนองมากที่สุดเนื่องจากมีดัชนีการเกิดปมตำที่สูงสุด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนปมไม่มีแตกต่างทางสถิติกับข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 และจำนวนไส้เดือนฝอยในรากไม่แตกต่างทางสถิติกับข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 อีกทั้งยังพบว่าข้าวพันธุ์ กข6 มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของพืช ได้แก่ phenylalanine ammonia lyase, peroxidase และ polyphenol oxidase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง 2 และ 3 วันหลังจากปลูกไส้เดือนฝอยรากปม ในขณะที่ข้าวพันธุ์ที่อ่อนแอมากที่สุด (ขาวดอกมะลิ 105) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในช่วง 1 ถึง 4 วันที่มีการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้ชี้ให้เห็นว่าข้าวพันธุ์ กข6 เป็นพันธุ์ข้าวที่มีตอบสนองต่อการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ถูกประเมินทั้งหมด

Thesis Title Distribution of Plant-Parasitic Nematodes in Pathum Thani's Rice Fields and Defensive Response of Rice (*Oryza sativa* L.) Against *Meloidogyne graminicola*

Author Mr. Natthidech Beesa

Major Program Plant Pathology

Academic Year 2021

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is a vital economic crop of Thailand; both for exportation and household consumption. In central plain of Thailand, Pathum Thani province has been recorded as one of the most important places for rice cultivation, with rice cultivation area about 55% of the total area and rice production up to 0.2 million tons per year. High population densities of the plant-parasitic nematodes appearance leading to yield loss of rice. Therefore, the objectives of this study were (1) to identify species of predominant plant-parasitic nematodes and their distribution in Pathum Thani's rice fields, and (2) to evaluate the defensive response of rice against *M. graminicola* infestation. Forty-two soil and rice root samples were collected from seven districts of Pathum Thani province including Nong Suea, Thanyaburi, Lam Luk Ka, Khong Luang, Meung, Sam Khok and Lat Lum kaeo. Consequently, plant-parasitic nematodes were extracted, counted and identified by morphological and molecular characters by using specific primers. The result showed that the predominant plant-parasitic nematodes highly found in all rice fields were *Hirschmanniella* sp. (96.54%) and *Meloidogyne* sp. (3.22%).

The morphological characters of *Hirschmanniella* sp., body length ranged from 1,639–2,329 μm , stylet length was 24–27 μm and an obvious mucron at the end of terminus. Likewise, molecular identification based on PCR technique by using D2A/D3B and rDNA2/rDNA1.58s were 98 % similarity with *H. mucronata* from Cambodia's population. For morphological identification of root-knot nematodes, body and stylet lengths of second stage juveniles were 427–501 μm and 13.1–15.7 μm , respectively and the tail character was conoid, male body length was 1,060–1,734 μm , stylet length was 18–22 μm , tail character was bluntly rounded, the perineal patterns of the root-knot nematodes were generally oval shaped without lateral lines and smoothly cuticular matched with *M. graminicola*. Molecular identification based on PCR technique with

three different primer sets including rDNA2/1.58s, C₂F₃/1108 and SCAR-MgFW/SCAR-MgRev showed DNA fragments with size of 490, 520 and 650 bp, respectively. Phylogenetic tree based on 18S-ITS1-5.8S genes illustrated that the root-knot nematodes found in this study were *M. graminicola* with 97% similarity to the population of root-knot nematodes from rice fields of Madagascar. Therefore, the predominant plant-parasitic nematodes found in Pathum's Thani rice fields were *H. mucronata* and *M. graminicola*.

Six rice cultivars including Khao Dawk Mali 105 (KDML105), Pathum Thani 1 (PT1), San-Pah-Tawng 1 (SPT1), Rice Department No. 6 (RD6), Rice Department No. 43 (RD43), and Rice Department No.57 (RD57) were evaluated for their resistance levels to *M. graminicola* (RKN). The result showed that RD6 proved to be the most response against root-knot nematodes among six rice cultivars, with lowest number of gall index. However, gall numbers and number of nematodes inside rice roots at 14 days were not significant difference with SPT1 and PT1 cultivars, respectively. Likewise, defense-related enzymes of RD6 cultivar including phenylalanine ammonia lyase, peroxidase and polyphenol oxidase significantly increased during 2 and 3 days after nematode inoculation (nematode infection periods). On the other hand, the enzyme activities in KDML105 (susceptible cultivar) were not significantly different between RKN inoculation and un-inoculation during 1–4 days after nematode inoculation. This study illustrated that RD6 was the most response against *M. graminicola* among evaluated six rice cultivars.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนัญชนก ไชยรินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บัญชา ชินศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา แก้ไขข้อบกพร่อง ชี้แนะแนวทาง ให้ความสะดวกในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณประธานกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนินันท์ พรสุริยา และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ เรือนปานันท์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ แก้ไขข้อบกพร่อง จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ โครงการ Participatory and Integrative Support for Agricultural Initiative (PISAI) Project ภายใต้การสนับสนุนจาก ERASMUS +Capacity Building in Higher Education Programme ในการสนับสนุนให้ข้าพเจ้าได้ร่วมเรียนรู้ในโครงการหลักสูตรปริญญาร่วมแบบสองปริญญา ระหว่าง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งมีความร่วมมือกับมหาวิทยาลัยในทวีปยุโรป ได้แก่ SupAgro ประเทศฝรั่งเศส Czech University of Life Science Prague สาธารณรัฐเช็ก University of Copenhagen ประเทศเดนมาร์ก University of Helsinki ประเทศฟินแลนด์ และเครือข่ายสถาบันการศึกษาด้านการเกษตรของยุโรป (Agrinatura)

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวแพร่และภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนเมล็ดพันธุ์ข้าวสำหรับการใช้ในการทดลอง และขอขอบคุณคุณคุณอานนท์ สิทธิโรจน์ที่ให้ความช่วยเหลือเกี่ยวกับการเก็บตัวอย่างในแปลงข้าวครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณปัทมาพร อินสุวรรณ คุณสิริพร ศรีเจริญ และบุคลากรภาควิชาการจัดการศัตรูพืชทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านงานธุรการ และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการจัดการศัตรูพืช ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ และความสะดวกในการทำวิจัย

ท้ายสุดนี้ผู้เขียนขอขอบพระคุณ พ่อ แม่ และครอบครัว ผู้เป็นแรงผลักดันและกำลังใจสำคัญในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงพี่ เพื่อน และน้อง ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ณัฐธิเดช ปี่สา

สารบัญ

	หน้าที่
บทคัดย่อ	(5)
ABSTRACT	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	18
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดสอบ	19
3. ผลและวิจารณ์ผล	28
4. สรุปผลการทดลอง	59
เอกสารอ้างอิง	60
ประวัติผู้เขียน	70

รายการตาราง

ตารางที่		หน้าที่
1.	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง	23
2.	โปรแกรมการทำพีซีอาร์ของแต่ละไพรเมอร์	23
3.	ข้อมูลของแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานีที่ทำการเก็บตัวอย่าง	29
4.	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย <i>Meloidogyne graminicola</i> ตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่พบในแปลงข้าวอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี	36
5.	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย <i>Meloidogyne graminicola</i> ตัวเต็มวัยเพศผู้ที่พบในแปลงข้าวอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี	38
6.	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย <i>Hirschmanniella mucronata</i> ที่แยกได้จากแปลงข้าวในจังหวัดปทุมธานี	42
7.	หมายเลขการเข้าถึงฐานข้อมูลยีนของไส้เดือนฝอย <i>Meloidogyne graminicola</i> ที่ได้ทำการบันทึกลงใน GenBank	45
8.	หมายเลขการเข้าถึงข้อมูลยีนของไส้เดือนฝอย <i>Hirschmanniella mucronata</i> ที่ได้ทำการบันทึกลงในฐานข้อมูล GenBank	47
9.	การประเมินความต้านทานของข้าวต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne graminicola</i>	51
10.	การตรวจสอบการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne graminicola</i> ภายในรากข้าวที่ระยะเวลา 2 วันและ 14 วัน	52

รายการภาพ

ภาพที่		หน้าที่
1.	ลักษณะของรากข้าวที่ถูกเข้าทำลายด้วยไส้เดือนฝอย <i>M. graminicola</i> ที่ระยะเวลา 2, 7, 15, 22 และ 31 วันหลังจากการเข้าทำลาย (DAI); n คือ ไส้เดือนฝอย; em คือกลุ่มไข่	6
2.	ลักษณะรอยหยักส่วนก้นของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne graminicola</i>	10
3.	การจัดเรียงของไมโทคอนเดรียจีโนมของไส้เดือนฝอย <i>Meloidogyne graminicola</i>	12
4.	แบบจำลองของ nuclear rRNA genes ในเซลล์โปรคาริโอต; SSU คือ 18S small subunit; LSU คือ 28S large subunit; ETS คือ external transcribed spacer region; ITS1 และ ITS2 คือ internal transcribed spacers; IGS1 และ IGS2 คือ intergenic spacer regions; ลูกศรชี้ให้เห็นบริเวณที่ไพรเมอร์มาจับ และสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้	12
5.	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับไส้เดือนฝอย <i>Meloidogyne</i> spp. ด้วยการใช้ SCAR-MgFW/Rev primers; M คือ 1Kb plus Ladder (Invitrogen); C คือชุดควบคุมที่ไม่มี DNA template; Min คือ <i>M. incognita</i> ; Mar คือ <i>M. arenaria</i> ; Mja คือ <i>M. javanica</i> ; Mex คือ <i>M. exigua</i> ; Mpa คือ <i>M. paranensis</i> ; B คือ <i>M. graminicola</i> จากประเทศบราซิล; P คือ <i>M. graminicola</i> จากประเทศฟิลิปปินส์; 6, 13, 17 และ 27 คือ <i>M. graminicola</i> จากประเทศเวียดนาม	14
6.	บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่าง (จุดสีแดง) ในจังหวัดปทุมธานี	19
7.	ลักษณะอาการรากปมข้าว (ลูกศรชี้) ที่พบในอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี	29
8.	เปอร์เซ็นต์ความหลากหลายของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่แยกได้จากดิน 150 กรัมและรากข้าว 10 กรัมในแปลงนาจังหวัดปทุมธานี	30
9.	การแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบในแปลงข้าวทั้ง 7 อำเภอในจังหวัดปทุมธานี	30

รายการภาพ

ภาพที่		หน้าที่
10.	จำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่แยกได้จากดิน 150 กรัม (A) และรากข้าว 10 กรัม (B) ในแปลงข้าวอำเภอหนองเสือ (PN 1,2) รัชบุรี (PT 1,2) ลำลูกกา (PL 1,2) คลองหลวง (PK 1,2) เมือง (PM 1,2), สามโคก (PS 1,2) และลาดหลุมแก้ว (PLA1,2) จังหวัดปทุมธานี	33
11.	ลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากปมตัวอ่อนระยะที่ 2 (<i>Meloidogyne graminicola</i>) ที่พบในแปลงข้าวอำเภอสสามโคกจังหวัดปทุมธานี; A คือภาพเต็มตัว (400x); B คือภาพส่วนหัว (1000x) และ C คือภาพส่วนหาง (1000x)	35
12.	ลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne graminicola</i> ตัวเต็มวัยเพศผู้ที่พบในแปลงข้าวอำเภอสสามโคกจังหวัดปทุมธานี; A คือภาพเต็มตัว (100x); B คือภาพส่วนหัว (400x) และ C คือภาพส่วนหาง (400x)	37
13.	ลักษณะรอยหยักส่วนก้นของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne graminicola</i> ตัวเต็มวัยเพศเมีย (A, B) ที่พบในแปลงข้าวอำเภอสสามโคกจังหวัดปทุมธานีเปรียบเทียบกับรอยหยักส่วนก้นของ <i>M. graminicola</i> (C) ที่รายงานโดย Hunt และ Handoo (2009)	39
14.	ภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย <i>Hirschmanniella mucronata</i> เพศเมียแยกได้จากแปลงข้าวในจังหวัดปทุมธานี; A: ภาพเต็มตัว (100×); B: ภาพส่วนหัว (1000×); C: ภาพแสดงอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (1000×); D: ภาพส่วนหาง (1000×)	40
15.	ภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย <i>Hirschmanniella mucronata</i> เพศผู้ที่แยกได้จากแปลงข้าวในจังหวัดปทุมธานี; A: ภาพเต็มตัว (100×); B: ภาพส่วนหัว (1000×); C: ภาพส่วนหาง (1000×)	41

รายการภาพ

ภาพที่		หน้าที่
16.	ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัย <i>Meloidogyne graminicola</i> โดยใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s (ช่อง 1-3), C2F3/1108 (ช่องที่ 4-10) และ SCAR-MgFW/ SCAR-MgRev (ช่องที่ 11-14) ทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างโดยใช้ gel electrophoresis ใน 1.5% (w/v) agarose gel; M : DNA marker (100 bp DNA ladder RTU); NC: Negative control (ไม่ได้ดีเอ็นเอต้นแบบ); PC : Positive control (ดีเอ็นเอต้นแบบของ <i>M. enterobii</i>)	44
17.	การศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยรากปมที่พบจากแปลงข้าวอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานีบนตำแหน่งยีน 18S-ITS1-5.8S เปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในข้าวที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยการ ใช้ Maximum likelihood method	45
18.	ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัย <i>Hirschmanniella</i> sp. โดยใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s และ D2A/D3B และตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างโดยใช้ gel electrophoresis ใน 1.5% (w/v) agarose gel; M : DNA marker (100 bp DNA ladder RTU); NC: Negative control (ไม่ได้ดีเอ็นเอต้นแบบ); ช่องที่ 1-6 : <i>Hirschmanniella</i> sp. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s; ช่องที่ 7-12 : <i>Hirschmanniella</i> sp. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ D2A/D3B	47
19.	การศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยรากข้าว <i>Hirschmanniella mucronata</i> ที่พบจากแปลงข้าวอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานีบนตำแหน่งยีน 28S rRNA (A) และ 18S-ITS1-5.8S (B) เปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในข้าวที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยการ ใช้ Maximum likelihood method	48

รายการภาพ

ภาพที่		หน้าที่
20.	ลักษณะอาการรากปมที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne graminicola</i> ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (A) ปทุมธานี 1 (B) สันป่าตอง 1 (C) กข6 (D) กข43 (E) และ กข 57 (F)	50
21.	ลักษณะอาการรากปมข้าวที่ถูกย้อมด้วยการใช้ acid fuchsin หลังจากปลูก ไส้เดือนฝอยรากปม <i>Meloidogyne graminicola</i> ที่ระยะเวลา 14 วัน; A คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105; B คือข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1; C คือข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1; D คือข้าวพันธุ์กข6; E คือข้าวพันธุ์ กข43; F คือข้าวพันธุ์ กข57; n คือ ไส้เดือนฝอยรากปม <i>M. graminicola</i> ; g คือ giant cell; e คือไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม	53
22.	กิจกรรมเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ของข้าวพันธุ์ กข6 (A) และขาวดอกมะลิ 105 (B) หลังจากปลูกไส้เดือนฝอยรากปมที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 7, 10 และ 14 วัน	56
23.	กิจกรรมเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) ของข้าวพันธุ์ กข6 (A) และขาวดอกมะลิ 105 (B) หลังจากปลูกไส้เดือนฝอยรากปมที่ 1, 2, 3, 4, 7, 10 และ 14 วัน	57
24.	กิจกรรมเอนไซม์ peroxidase (POD) ของข้าวพันธุ์ กข6 (A) และขาวดอกมะลิ 105 (B) หลังจากปลูกไส้เดือนฝอยรากปมที่ 1, 2, 3, 4, 7, 10 และ 14 วัน	58

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยทั้งในแง่การส่งออกและการบริโภคภายในครัวเรือน ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวประมาณ 69.41 ล้านไร่ (รวมทั้งนาปีและนาปรัง) และสามารถผลิตข้าวได้สูงถึง 30.7 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) การปลูกข้าวในปัจจุบันพบปัญหามากมายที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมโทรมของดิน ศัตรูพืชเข้าทำลายทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงอันเนื่องมาจากการเพาะปลูกข้าวติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน (Shelley *et al.*, 2016) ไร้เดือนฝอยศัตรูพืชเป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไร้เดือนฝอยรากปมที่หลายประเทศได้มีการรายงานตัวอย่างเช่น ในประเทศอินเดีย เนปาล บังกลาเทศ อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์รายงานว่าผลผลิตข้าวลดลงถึง 8-70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถูกไร้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola* เข้าทำลาย (Padgham, 2003; Jain *et al.*, 2007; Pokharel *et al.*, 2010) ในประเทศไทยได้มีการรายงานความเสียหายเช่นเดียวกันในจังหวัดนครนายกและจังหวัดปทุมธานี ซึ่ง บุญหงส์ จงกิต และวุฒิชัย แดงทอง (2557) รายงานว่าได้มีการระบาดของไร้เดือนฝอยรากปม (*M. graminicola*) เข้าทำลายรากของต้นข้าวในสภาพข้าวไร่ทำให้ผลผลิตของพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอลดลงถึง 25 เปอร์เซ็นต์ การป้องกันกำจัดไร้เดือนฝอยชนิดนี้ค่อนข้างทำได้ยากและการใช้สารเคมีนั้นเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก อีกทั้งตามนโยบายของรัฐบาลในปัจจุบันต้องการให้ลดการใช้สารเคมี ดังนั้นการป้องกันกำจัดไร้เดือนฝอยรากปมจึงทำยากยิ่งขึ้น (กิตติพงษ์ ศรีม่วง และพรทิพย์ เรือนปานันท์, 2562) Marla และคณะ (2008), Kankam และคณะ (2015) และ Patel และ Dhillon (2017) รายงานว่าการปลูกพืชหมุนเวียนเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถลดประชากรของไร้เดือนฝอยศัตรูพืชได้ เช่นการปลูกปอเทืองและโลกบลลงไปในดินสามารถลดประชากรของไร้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ได้ 56-98 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน นอกจากนี้การคัดเลือกข้าวพันธุ์ต้านทานก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความน่าสนใจเป็นอย่างมากไม่เพียงแต่ช่วยป้องกันการเข้าทำลายของศัตรูพืช แต่ยังเป็นวิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีประสิทธิภาพอีกด้วย (Duan *et al.*, 2014)

การตอบสนองเชิงป้องกันของพืชแบ่งออกเป็น 2 แบบคือ systemic acquired resistance (SAR) และ induced systemic resistance (ISR) สำหรับ SAR เป็นการตอบสนองแบบทั่วทั้งต้น ซึ่งจะถูกระตุ้นด้วยการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคหรือสารเคมี ตัวอย่างเช่น 2,6-dichloroisonicotinic acid เป็นต้น การตอบสนองในลักษณะนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้อย่างแพร่หลายและสามารถตรวจสอบได้จาก SA-dependent process (Duan *et al.*, 2014) เมื่อพืชสามารถรับรู้จดจำการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคจะมีการชักนำให้เกิดเมตาบอริซึมภายในเซลล์โดยเริ่มจากกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ โดยเฉพาะ phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO), lipoxygenase (LOX), superoxide dismutase (SOD) และ β -1,3-glucanase (Ngadze *et al.*, 2012) ทั้งนี้ PAL เป็นเอนไซม์ตัวแรกใน phenylpropanoid pathway ซึ่งนำไปสู่การสังเคราะห์ secondary compounds ยกตัวอย่างเช่น phenols และ lignin (Hemm *et al.*, 2004) สำหรับ POD และ PPO เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้าง lignin และสารประกอบ oxidative phenols อื่นๆ ที่นำไปสู่การสร้างสิ่งกีดขวางและการเสริมโครงสร้างของเซลล์ให้แข็งแรงขึ้น ระดับของเอนไซม์เหล่านี้จะมีการสังเคราะห์มากขึ้นเมื่อพืชเกิดบาดแผลหรือถูกบุกรุกโดยเชื้อก่อโรค (Ngadze *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2014) จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่าในประเทศไทยยังไม่มีงานวิจัยที่เกี่ยวกับการตอบสนองเชิงป้องกัน (defensive response) ของข้าวเมื่อถูกไส้เดือนฝอย *M. graminicola* เข้าทำลาย

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้ทำขึ้นเพื่อ 1. ตรวจสอบการแพร่ระบาดและระบุชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชหลักในเขตการเพาะปลูกข้าวของจังหวัดปทุมธานี และ 2. ศึกษาระดับความต้านทานและการตอบสนองเชิงป้องกันของข้าวที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ PAL, POD และ PPO เมื่อถูกไส้เดือนฝอย *M. graminicola* เข้าทำลาย

ตรวจเอกสาร

1. ข้าว

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยทั้งในแง่การส่งออกและการบริโภคภายในครัวเรือน ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวประมาณ 69.41 ล้านไร่ (รวมทั้งนาปีและนาปรัง) และสามารถผลิตข้าวได้สูงถึง 30.7 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) ในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยสามารถส่งออกข้าวได้ปริมาณ 11 ล้านตัน คิดเป็นเงินมูลค่า 280,270 ล้านบาท (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2562)

อนุกรมวิธานของข้าว (Taxonomic Tree)

Domain: Eukaryota (CABI, 2019)

Kingdom: Plantae

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Class: Monocotyledonae

Order: Cyperales

Family: Poaceae

Genus: *Oryza*

Species: *Oryza sativa*

พันธุ์ของข้าวที่นิยมปลูกและบริโภคทั่วโลกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ *Oryza glaberrima* เป็นข้าวที่นิยมปลูกเฉพาะในเขตร้อนของแอฟริกาเท่านั้นหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า African rice และ *Oryza sativa* เป็นข้าวที่นิยมปลูกทั่วไป ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยคือ Indica มีความนิยมปลูกมากในเขตร้อน Japonica มีความนิยมปลูกมากในเขตอบอุ่น และ Javanica เป็นข้าวที่นิยมปลูกในประเทศฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ใต้หวัน และญี่ปุ่น แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมนักเนื่องจากได้ผลผลิตต่ำ

ข้าวเหนียวและข้าวเจ้าที่นิยมปลูกกันในประเทศไทยถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Indica อีกทั้งยังพบว่าพันธุ์ข้าวของประเทศไทยในปัจจุบันมีความหลากหลายมากกว่า 116 สายพันธุ์ ข้าวที่มีชื่อเสียงระดับโลกของไทยคือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เนื่องจากมีกลิ่นหอม และเมล็ดมีความอ่อนนุ่มเมื่อนำมาหุงต้ม (ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวและหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว, 2562; กรมวิชาการเกษตร, 2563)

2. ไร้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบในแปลงข้าว

ปัจจุบันมีการรายงานความเสียหายของข้าวที่เกิดจากไร้เดือนฝอยศัตรูพืชสูงถึง 10-25 เปอร์เซ็นต์ โดยไร้เดือนฝอยศัตรูข้าวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมี 4 ชนิด ได้แก่ *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., *Pratylenchus* spp. และ *Aphelenchoides besseyi* (Jones *et al.*, 2013; Youssef and Eissa, 2014) นอกจากนี้ไร้เดือนฝอย *Hirschmanniella* spp. เป็นไร้เดือนฝอยอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถสร้างความเสียหายต่อผลผลิตข้าวมากถึง 20 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังพบในแปลงข้าวทั่วไปสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Youssef and Eissa, 2014)

ไร้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. เป็นไร้เดือนฝอยศัตรูพืชที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากทางเศรษฐกิจเนื่องจากสามารถเข้าทำลายและสร้างความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจหลายชนิด ได้แก่ พืชหัว พืชผัก ไม้ผล พืชเส้นใย ไม้ดอก ไม้ประดับ และ ัญพืช เป็นต้น อีกทั้งยังมีพืชอาศัยมากกว่า 2,000 ชนิด เช่น มะเขือเทศ จิง มันฝรั่ง พริก ยาสูบ ฝรั่ง ข้าว เหยอบีรา ผ้าย ฯลฯ จากการที่ไร้เดือนฝอยรากปมมีพืชอาศัยค่อนข้างกว้าง การป้องกันกำจัดจึงทำได้ค่อนข้างยากเช่นเดียวกัน ดังนั้นไร้เดือนฝอยรากปมจึงถูกจัดเป็นไร้เดือนฝอยที่มีความสำคัญเป็นอันดับหนึ่งทางเศรษฐกิจ (อนงค์นุช สาสนรักกิจ และคณะ, 2555; Jones *et al.*, 2013)

2.1 ไร้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp.

ไร้เดือนฝอย *M. graminicola* เป็นสาเหตุของโรครากปมของข้าว ซึ่งการเข้าทำลายของไร้เดือนฝอยเป็นแบบ endo-parasites และสามารถดูดกินน้ำและธาตุอาหารได้ภายในรากของพืชอาศัย (Ravindra *et al.*, 2017) *M. graminicola* เข้าทำลายข้าวในระยะต้นกล้าและในระยะแตกกอ ทำให้รากข้าวมีอาการเป็นปมที่มีลักษณะคล้ายตะขอ (hook shaped) ทั้งนี้พบว่าถ้ามีการเข้าทำลายอย่างรุนแรงจะทำให้ระบบการขนส่งน้ำและธาตุอาหารของพืชถูกรบกวน ทำให้พืชเกิดอาการแคระแกร็น ใบสีเหลืองซีด และแตกกออ่อนๆ อีกทั้งยังพบว่าไร้เดือนฝอยชนิดนี้มีการแพร่ระบาดได้อย่างรุนแรงในบริเวณดินร่วนปนทรายที่ไม่มีน้ำขัง นอกจากนี้ยังพบว่ามีพืชอาศัยมากกว่า 100 ชนิด ยกตัวอย่างเช่น ัญพืช พืชตระกูลหญ้า และพืชใบเลี้ยงคู่ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามพืชอาศัยหลักของ *M. graminicola* คือข้าว (*Oryza sativa* L.) (ประพาส วีระแพทย์, 2555; Mantelin *et al.*, 2017) ในปัจจุบันพบการแพร่ระบาดของไร้เดือนฝอยดังกล่าวในแถบทวีปแอฟริกา เอเชีย อเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ โดยเฉพาะในเขตทวีปเอเชียพบการแพร่ระบาดมากกว่า 14 ประเทศ รวมถึงประเทศไทยด้วยเช่นกัน (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2017)

ความเสียหายของผลผลิตข้าวที่เกิดจากไร้เดือนฝอย *M. graminicola* ได้มีการรายงานอย่างแพร่หลายทั้งในนาข้าวที่มีการขังน้ำและไม่มีการขังน้ำ ยกตัวอย่างเช่น ในประเทศ

อินเดีย เนปาล บังกลาเทศ อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ผลผลิตข้าวลดลง 8-70 เปอร์เซ็นต์ (Padgham, 2003; Jain *et al.*, 2007; Pokharel *et al.*, 2010) ในประเทศไทยได้มีรายงานเสียหายเช่นเดียวกันใน จังหวัดนครนายกและจังหวัดปทุมธานี ซึ่ง บุญหงส์ จงคิด และวุฒิชัย แดงทอง (2557) รายงานว่าได้มีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม (*M. graminicola*) เข้าทำลายรากของต้นข้าวในสภาพข้าวไร่ทำให้ผลผลิตของพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอตกลงถึง 25 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบการแพร่ระบาดในจังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ และสุพรรณบุรี แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอยดังกล่าว (กนกทิพย์ ทะลือ และคณะ, 2562) โดยข้อมูลทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic information) ของ *M. graminicola* สามารถจัดจำแนกได้ดังนี้

Phylum Nematoda (CABI, 2020)

Class Secernentea

Order Tylenchida

Family Meloidogynidae

Genus *Meloidogyne*

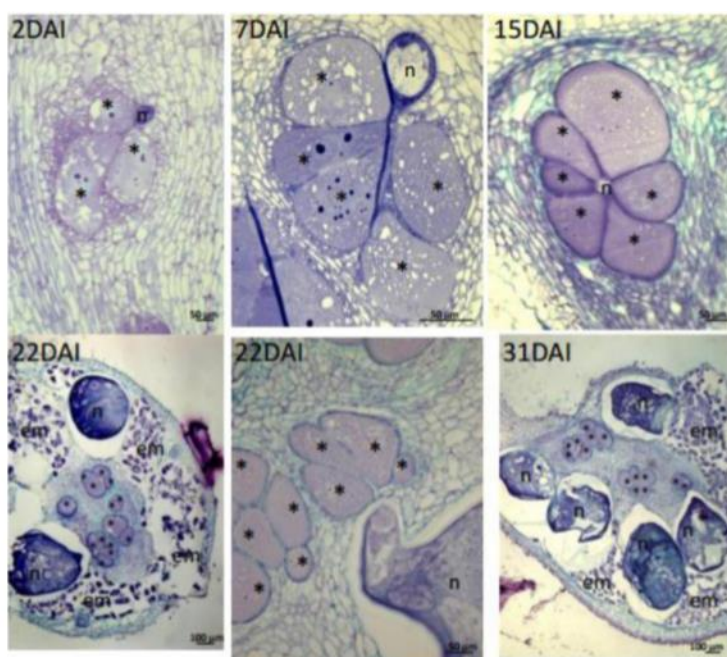
Species *graminicola*

ชีววิทยาและวงจรชีวิตของ *Meloidogyne graminicola*

ไส้เดือนฝอย *M. graminicola* สืบพันธุ์ทั้งแบบ amphimixis และ meiotic parthenogenesis สามารถวางไข่ได้มากถึง 200–500 ฟองต่อหนึ่งถุงไข่ สำหรับวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยรากปมข้าวเริ่มจากการวางไข่ในราก หลังจากนั้น 4–6 วันจะพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 1 ภายในไข่ และใช้เวลาอีก 2–3 วันในการลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่พร้อมจะออกจากไข่เพื่อไปเข้าทำลายรากพืช หลังจากตัวอ่อนระยะที่ 2 เข้าสู่รากจะทำให้พืชเกิดเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (giant cells) ซึ่งเป็นบริเวณที่ไส้เดือนฝอยรากปมใช้ในการดูดสารอาหารจากพืชอาศัย (feeding site) สำหรับตัวอ่อนระยะที่ 2 จะใช้เวลา 1–3 วันในการลอกคราบเป็นออ่อนระยะที่ 3 และอีก 1–3 วันในการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 สำหรับการพัฒนาเป็นตัวโตเต็มวัยใช้เวลาอีก 7–13 วัน และใช้เวลาอีก 1–3 วันในการวางไข่ วงจรชีวิตทั้งหมดของไส้เดือนฝอย *M. graminicola* ใช้เวลาทั้งหมด 15–28 วัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อมในแต่ละพื้นที่ (Bridge and Page, 1982; Fernandez *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2016; Ravindra *et al.*, 2017)

การสร้าง feeding site ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* เริ่มจากการแทงเข้ารากบริเวณ elongation zone จากนั้นเคลื่อนที่ผ่านเซลล์พืชในชั้น cortex ไปยังท่อลำเลียงอาหาร (vascular bundle) โดยรากพืชจะเริ่มมีอาการบวมหลังจากนั้น 2 วัน และจะเห็นอาการรากปมที่ 4 วัน สำหรับ feeding site สามารถมองเห็นได้หลังจากเชื้อเข้าทำลาย 2 วันตรงบริเวณรากข้าวที่มีอาการ

บวมพูน *M. graminicola* จะเริ่มจากการสร้าง 3–4 giant cells บริเวณภายในท่ออาหารและบริเวณรอบ ๆ ของ parenchymatic cell ลักษณะของ giant cells ประกอบไปด้วยไซโทพลาซึมที่เข้มข้นผนังเซลล์มีลักษณะหนาเมื่อเปรียบเทียบกับ parenchymatic cell แบบปกติ หลังจากนั้น 15 วัน ภายใน giant cells พบนิวเคลียสเป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปจะพบเพียงหนึ่ง feeding site ต่อหนึ่งปม ที่ 22 วัน ไข่เดือนฝอยตัวโตเต็มวัยจะทำการวางไข่ฝังอยู่ภายในราก และที่ระยะเวลา 31 วัน giant cells จะเต็มไปด้วยไซโทพลาซึมและนิวเคลียสรูปแบบต่าง ๆ ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 1) (Nguyen *et al.*, 2014)



ภาพที่ 1 ลักษณะของรากข้าวที่ถูกเข้าทำลายด้วยไข่เดือนฝอย *Meloidogyne graminicola* ที่ระยะเวลา 2, 7, 15, 22 และ 31 วันหลังจากการเข้าทำลาย (DAI); n คือ ไข่เดือนฝอย; em คือกลุ่มไข่ (Nguyen *et al.*, 2014)

2.2 ไร้เดือนฝอยชีสต์ *Heterodera* spp.

ไร้เดือนฝอยชีสต์ *Heterodera* spp. สามารถพบได้ทั้งในน่าน้ำขังและนาพื้นที่สูง ไร้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 2 จะแทงผ่านเข้ารากและเคลื่อนที่ไปสู่ท่อน้ำท่ออาหาร จากนั้นจะสร้าง feeding site ที่เรียกว่า syncytium ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของผนังเซลล์จึงทำให้เห็นว่าในหนึ่งเซลล์มีหลายนิวเคลียส วงจรชีวิตของไร้เดือนฝอยชนิดนี้ประมาณ 4 อาทิตย์ การสร้างไข่ของไร้เดือนฝอยเพศเมียจะเกิดขึ้นภายในตัวของไร้เดือนฝอยซึ่งโผล่ออกมาบริเวณผิวราก จากนั้นเมื่อไร้เดือนฝอยตายจะกลายเป็นถุงไข่ (cyst) ที่มีสีน้ำตาลและมีลักษณะแข็ง อาการของข้าวเมื่อถูกเข้าทำลาย บริเวณใบมีสีเหลืองหรือน้ำตาล จำนวนกอและความแข็งแรงของต้นข้าวลดลง ความเสียหายของข้าวพบสูงถึง 42–78 เปอร์เซ็นต์ (Kyndt *et al.*, 2014; Akpheokhai and Claudius-Cole, 2017) ชนิดของไร้เดือนฝอยชีสต์ที่มีการรายงานว่าพบในข้าวมี 4 ชนิด คือ *H. elachista*, *H. oryzicola*, *H. oryzae* และ *H. sacchari* (Kyndt *et al.*, 2014; Akpheokhai and Claudius-Cole, 2017)

2.3 ไร้เดือนฝอยรากแผล *Pratylenchus* spp.

ไร้เดือนฝอย *Pratylenchus* spp. เป็นไร้เดือนฝอยศัตรูพืชที่เข้าทำลายพืชได้หลายชนิด เป็นแบบ migratory endoparasite ที่มีวงจรชีวิตอยู่ในช่วง 3–8 อาทิตย์ขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพแวดล้อม ชนิดของไร้เดือนฝอยรากแผลที่มีความสำคัญ ได้แก่ *P. penetrans*, *P. thornei*, *P. neglectus*, *P. zaeae*, *P. vulnus* และ *P. coffeae* ไร้เดือนฝอยชนิดนี้สามารถสร้างความเสียหายมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ให้กับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ได้แก่ ัญพืช อ้อย กาแฟ ถั่ว ข้าวโพด พืชตระกูลถั่ว มันฝรั่ง พืชผักและไม้ผล (Jones *et al.*, 2013) อาการของข้าวเมื่อถูกไร้เดือนฝอยรากแผลเข้าทำลายจะมีลักษณะต้นแคระ ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเหี่ยว ไร้เดือนฝอยชนิดนี้มีรายงานการพบในพื้นที่เพาะปลูกข้าวในเขตทวีปแอฟริกา อเมริกาใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Kyndt *et al.*, 2014)

2.4 ไร้เดือนฝอยโรคใบขาวข้าว *Aphelenchoides besseyi*

ไร้เดือนฝอยชนิดนี้เป็นไร้เดือนฝอยที่ติดไปกับเมล็ดและก่อโรคใบขาวในข้าว ไร้เดือนฝอย *A. besseyi* สามารถอยู่รอดภายในเมล็ดหรือในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้สูงสุดถึง 3 ปี ในลักษณะเป็นแบบ dehydrated state ทั้งนี้ความเสียหายของระบบการเพาะปลูกข้าวอยู่ในช่วง 10–30 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับความอ่อนแอของพันธุ์ข้าวและความหนาแน่นของประชากรไร้เดือนฝอย (Giudici *et al.*, 2003) ในช่วงการแตกกอไร้เดือนฝอยจะดูดกินอาหารบริเวณตาดอกที่เกิดบริเวณซอกใบ (axillary buds) ของเนื้อเยื่อเจริญบริเวณลำต้น (shoot apical stem) และเมื่อพืชเจริญเติบโตไร้เดือนฝอยจะเคลื่อนที่ผ่านน้ำไปยังบริเวณปลายใบ การเข้าทำลายจะทำให้ต้นข้าวมี

ความแข็งแรงและขนาดลำต้นลดลง ใบธงเปลี่ยนสี เมล็ดเล็กและบิดเบี้ยว วงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยอยู่ในช่วง 8–12 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Kyndt *et al.*, 2014)

2.5 ไส้เดือนฝอยรากข้าว *Hirschmanniella* spp.

ไส้เดือนฝอยรากข้าวมีพืชอาศัยหลายชนิด ได้แก่ วัชพืช ข้าวโพด มะเขือเทศและอ้อย การเข้าทำลายเป็นแบบ migratory endoparasites ที่บริเวณ cortex ทำให้รากเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (Prot and Rahmann, 1994) ไส้เดือนฝอยชนิดนี้สามารถพบได้มากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ในระบบการเพาะปลูกข้าวทั้งหมดของประเทศอียิปต์และสามารถสร้างความเสียหายได้มากถึง 25 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตข้าวจำนวน 53,734 metric tons (Youssef and Eissa, 2014) ในปัจจุบันหลายประเทศในทวีปเอเชียได้รายงานชนิดของไส้เดือนฝอยรากข้าว ยกตัวอย่างเช่น Chen และคณะ (2006) และ Pascual และคณะ (2014) รายงานว่าพบ *H. oryzae* และ *H. mucronata* ในประเทศจีนและฟิลิปปินส์ ในขณะที่ Khun และคณะ (2015) รายงานว่าพบเพียง *H. mucronata* เท่านั้นในพื้นที่เพาะปลูกข้าวของประเทศกัมพูชา เป็นต้น ไส้เดือนฝอยรากข้าวสามารถพบได้ในนาทั่วไปโดยเฉพาะในน้ำขังสามารถพบได้สูงถึง 72 เปอร์เซ็นต์ (Regmi *et al.*, 2016) Maung และคณะ (2010) รายงานว่าไส้เดือนฝอย *H. oryzae* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินเหนียวมากกว่าดินทราย เช่นเดียวกับ Prot และ Rahman (1994) ที่รายงานว่าพบประชากรของไส้เดือนฝอย *H. oryzae* ในแปลงข้าวที่มีลักษณะเป็นดินเหนียวอย่างมาก (heavy clay soil) ในประเทศอินเดีย

3. การระบุชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืช

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเดือนฝอยรากปมข้าว *Meloidogyne graminicola*

ตัวอ่อนระยะที่ 2: การระบุชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำโดยการวัดขนาดของตัวอ่อนระยะที่ 2 ไส้เดือนฝอยรากปม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400x) ซึ่งการวัดขนาดนั้นสามารถทำได้ดังนี้ (Jindapunnapat, 2012)

1. ความยาวทั้งหมดของลำตัว
2. ความกว้างของลำตัว
3. ความยาวของ stylet
4. ความยาวของหลอดอาหาร
5. ความยาวของหาง
6. ความกว้างของหาง

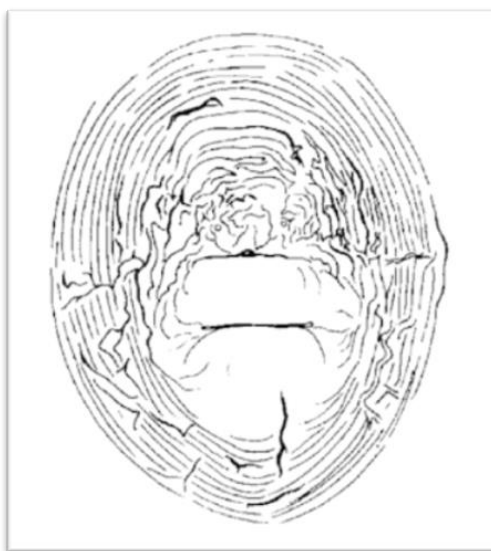
จากนั้นนำค่าเหล่านี้ไปคำนวณค่า morphometric character ตามระบบ de Man's ratios ดังนี้

1. $a = \frac{\text{ความยาวทั้งหมดของลำตัว}}{\text{ความกว้างของลำตัว}}$
2. $b = \frac{\text{ความยาวทั้งหมดของลำตัว}}{\text{ความยาวของหลอดอาหาร}}$
3. $c = \frac{\text{ความยาวทั้งหมดของลำตัว}}{\text{ความยาวของหาง}}$
4. $c' = \frac{\text{ความยาวของหาง}}{\text{ความกว้างของหาง}}$
5. $L = \text{ความยาวทั้งหมดของลำตัว}$
6. $s = \text{ความยาวของ stylet}$

ค่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอ่อนระยะที่ 2 ไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* มีดังนี้ $L = 427-509$ ไมโครเมตร $a = 26-36$, $c = 5-11$ ความกว้างลำตัว = $13-17$ ไมโครเมตร $stylet = 11-15$ ไมโครเมตร ความยาวหาง = $40-81$ ไมโครเมตร และความยาวของ hyaline = $16.5-22.6$ ไมโครเมตร (กนกทิพย์ ทะลือ และคณะ, 2562)

ลักษณะของหางและความยาวสามารถใช้ระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp. ได้หลายชนิด (Jepson, 1983; Bellafiore *et al.*, 2015) ในขณะที่ลักษณะความยาวของลำตัวและ stylet พบว่ามีความแปรปรวนอย่างมากจึงไม่สามารถใช้ในการจัดจำแนกได้ (Pokharel *et al.*, 2010; Bellafiore *et al.*, 2015) แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ได้นำความยาวของลำตัวและ stylet มาเปรียบเทียบกันเพื่อดูความแตกต่างของ intraspecific variations เช่น Bellafiore และคณะ (2015) ได้ระบุชนิดตัวอ่อนระยะที่ 2 ไส้เดือนฝอยรากปมในระบบการปลูกข้าวที่แตกต่างกันของประเทศเวียดนาม

ลักษณะรอยหยักส่วนก้น (perineal pattern) ของตัวเต็มวัยเพศเมียไส้เดือนฝอยรากปมเป็นลักษณะที่สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp. ได้ (Eisenback *et al.*, 1981) ลักษณะรอยหยักส่วนก้นตั้งอยู่บริเวณท้ายของลำตัวเพศเมีย (posterior) ซึ่งบริเวณนี้ประกอบไปด้วยบริเวณของ vulva-หาง (perineum), tail terminus, phasmids, lateral lines และ surrounding cuticular (Hunt and Handoo, 2009) ลักษณะรอยหยักส่วนก้นที่สำคัญของไส้เดือนฝอยรากปมข้าว *M. graminicola* จะมีลักษณะกลมเป็นรูปไข่ ไม่มี lateral line (ภาพที่ 2) บริเวณของ cuticular striae มีลักษณะเรียบ (Yiw and Birchfield, 1978) ในปี 2007 Pokharel และคณะรายงานลักษณะรอยหยักส่วนก้นของไส้เดือนฝอยรากปมข้าวที่พบในประเทศเนปาลมีลักษณะกลมเป็นรูปไข่ arch สูงปานกลาง ไม่มี lateral line ซึ่งเป็นลักษณะของไส้เดือนฝอย *M. graminicola* และมีความแตกต่างเล็กน้อยกับไส้เดือนฝอย *M. oryzae* และ *M. trifoliophila*



ภาพที่ 2 ลักษณะรอยหยักส่วนก้นของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola* (Hunt and Handoo, 2009)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยรากข้าว *Hirschmanniella* sp.

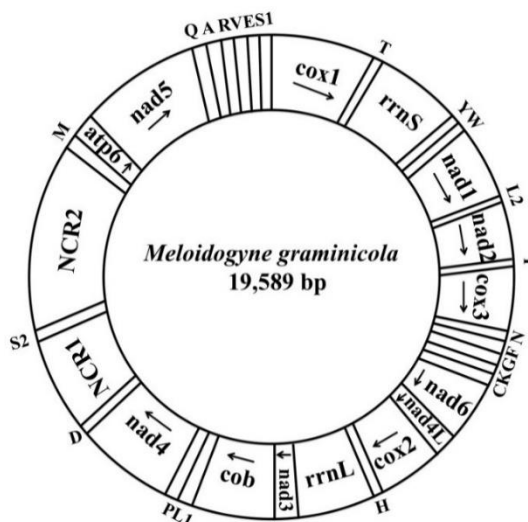
ลักษณะของไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella mucronata* มีความยาวลำตัวประมาณ 1,670–2,210 ไมโครเมตร ความกว้างของลำตัว 30.7 ไมโครเมตร stylet ยาว 26–29 ไมโครเมตร ความยาวหาง 75 ไมโครเมตร อยัวะสี่พันธุ้ของเพศเมียตั้งอยู่บริเวณกึ่งกลางของลำตัว เพศผู้พบ spicule และ bursa ชัดเจนบริเวณปลายหาง ค่าลักษณะทางสัณฐานวิทยามีดังนี้ $a=50.8-62.2$, $b'=4.6-5.2$, $c=18-26$ และ $c'=3.0-5.1$ ส่วน *H. oryzae* พบว่ามีความยาวของลำตัวเท่ากับ 780–1,345 ไมโครเมตร ความกว้างลำตัวเท่ากับ 17.1–22.4 ไมโครเมตร stylet ยาว 14.8–28.9 ไมโครเมตร ความยาวหางเท่ากับ 59.0–88.5 ไมโครเมตร เพศผู้ spicule ยาว 23.6–27.7 ไมโครเมตร อยัวะสี่พันธุ้เพศเมียตั้งอยู่บริเวณกึ่งกลางของลำตัวและมีค่า $a=37.8-61.5$, $b'=4.2-7.3$, $c=13.2-17.3$ และ $c'=4.4-6.0$ (Pascual *et al.*, 2014)

การระบุชนิดโดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยา

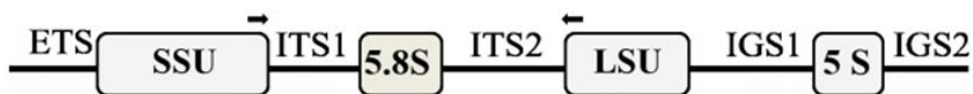
การระบุชนิดโดยใช้วิธีทางสัณฐานวิทยาเป็นวิธีที่นิยมใช้ แต่จำเป็นต้องใช้คนในการแยกไส้เดือนฝอย ตรวจสอบและนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งอาจเกิดข้อผิดพลาดในระหว่างดำเนินการได้ อีกทั้งยังมีความแม่นยำน้อยเมื่อเทียบกับการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา ซึ่งในปัจจุบันการระบุชนิดโดยใช้เทคนิคนี้มีการยอมรับกันมากขึ้นเนื่องจากมีความแม่นยำ และสามารถระบุได้ถึงระดับสปีชีส์ของไส้เดือนฝอย (Blok and Powers, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการใช้ real time PCR สามารถระบุชนิดไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. ได้หลายสปีชีส์ ได้แก่ *M. chitwoodi*, *M. fallax*, *M. incognita* และ *M. javanica* (Ciancio *et al.*, 2005; Zijlstra and Hoof, 2006; Berry *et al.*, 2008; Toyota *et al.*, 2008)

Sun และคณะ (2014) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียทั้งหมดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางชนิด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียของ *M. graminicola* มีทั้งหมด 19,589 คู่เบส (ภาพที่ 3) ในขณะที่ไส้เดือนฝอย *Pratylenchus vulmus* มี 21,656 คู่เบส

บริเวณของ Internal Transcribed Spacer (ITS) ที่อยู่บริเวณระหว่างยีน 18S, 5.8S และ 28S ribosomal DNA เป็นบริเวณที่มีความหลากหลายของเครื่องหมายทางพันธุกรรม (ภาพที่ 4) ซึ่ง Pokharel และคณะ (2007) ได้อธิบายว่าบริเวณ ITS สามารถใช้ระบุชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืชได้ถึงระดับสปีชีส์และยังสามารถวิเคราะห์ได้ง่ายด้วยการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)



ภาพที่ 3 การจัดเรียงของจีโนมไมโทคอนเดรียของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola* (Sun *et al.*, 2014) ลูกศรชี้ทิศทางของการลอกรหัสพันธุกรรม (Transcription)



ภาพที่ 4 แบบจำลองของ nuclear rRNA genes ในเซลล์โปรคาริโอต; SSU คือ 18S small subunit; LSU คือ 28S large subunit; ETS คือ external transcribed spacer region; ITS1 และ ITS2 คือ internal transcribed spacers; IGS1 และ IGS2 คือ intergenic spacer regions; ลูกศรชี้ให้เห็นบริเวณที่ไพรเมอร์มาจับและสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ (Carneiro *et al.*, 2017)

Power และ Harris (1993) ใช้วิธีพีซีอาร์ในการบ่งบอกความแตกต่างของไส้เดือนฝอยรากปม 5 ชนิด ได้แก่ *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla* และ *M. chitwoodi* ด้วยการใส่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม C₂F₃/1108 ที่บริเวณยีน cytochrome oxidase subunit II และ 16S rRNA ของไมโทคอนเดรียผลพบว่า *M. incognita* และ *M. javanica* มีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 1,700 คู่เบส *M. arenaria* มีขนาดเท่ากับ 1,100 คู่เบส ส่วน *M. hapla* และ *M. chitwoodi* มีขนาดเท่ากับ 520 คู่เบส

Pokharel และคณะ (2007) ได้ระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปมในแปลงข้าวและข้าวสาลีในประเทศเนปาล ด้วยการใส่ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s ผลพบว่าขนาดดีเอ็นเอที่ได้มีค่า

เท่ากับ 450 คู่เบส ซึ่งเป็นลักษณะของไส้เดือนฝอย *M. graminicola* นอกจากนี้ผลของการศึกษาลักษณะแผนภูมิทางวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่พบอยู่ในกลุ่มเดียวกับไส้เดือนฝอย *M. graminicola* จากประเทศสหรัฐอเมริกา

Douda และคณะ (2010) ได้ทำการระบุชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่สร้างซิสต์ในมันฝรั่งของประเทศสาธารณรัฐเช็กด้วยการใช้ไพรเมอร์ D2A และ D3B บริเวณ 28S rRNA ผลพบว่ามีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 700 คู่เบส ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบมีความเหมือนกับไส้เดือนฝอย *Globodera rostochiensis* และ *G. pallida* มากกว่า 98–99 เปอร์เซ็นต์

Wang และคณะ (2013) ได้ระบุชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในพืชสมุนไพร *Angelica dahurica* ของประเทศจีนด้วยการใช้ไพรเมอร์ D2A/D3B ผลพบว่าไส้เดือนฝอยรากปมมีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 758 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ผลพบว่ามีความเหมือนกับไส้เดือนฝอย *M. arenaria* มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์

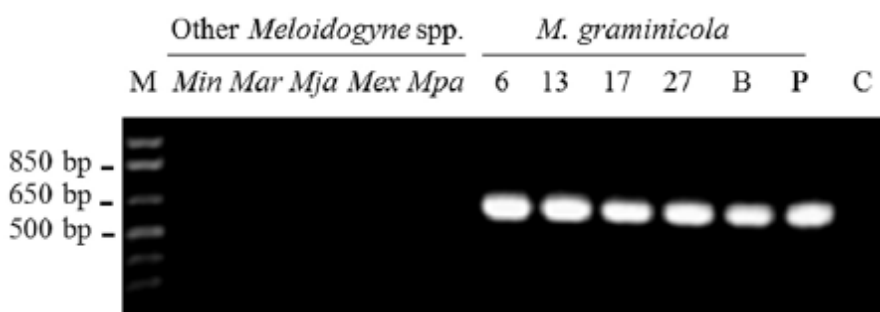
Onkendi และ Moleleki (2013) ได้ทำการระบุชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในมันฝรั่งของประเทศแอฟริกาใต้ ด้วยการใช้ไพรเมอร์ D2A/D3B ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณ 28 rRNA และไพรเมอร์ C₂F₃/1108 ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน COII regions ในไมโทคอนเดรีย ผลพบว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในแปลงปลูกมันฝรั่งของประเทศแอฟริกาใต้คือ *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. chitwoodi* และ *M. enterolobii*

Bellafore และคณะ (2015) ได้มีการพัฒนา SCAR marker ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไส้เดือนฝอย *M. graminicola* เท่านั้น ไม่สามารถจับกับยีนของ *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. exigua* และ *M. paranensis* ได้ (ภาพที่ 5) ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าไส้เดือนฝอย *M. graminicola* จากประเทศเวียดนาม ฟิลิปปินส์และบราซิลมีขนาดของดีเอ็นเอคือ 640 คู่เบส หลังจากมีการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์นี้ เช่นเดียวกับ Fanelli และคณะ (2017) ที่รายงานว่า *M. graminicola* ที่พบในประเทศอิตาลีมีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 644 คู่เบส

Long และคณะ (2017) ศึกษาการระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* ในถั่วเหลืองของประเทศจีนด้วยการใช้ไพรเมอร์จำเพาะ C₂F₃/1108 ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน COII และ the tRNA genes และไพรเมอร์ V5367/26S ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1, 5.8S gene และ ITS2 ผลพบว่าไส้เดือนฝอยรากปมมีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 531 และ 790 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับไส้เดือนฝอย *M. graminicola* จากประเทศสหรัฐอเมริกา 99-100 เปอร์เซ็นต์

Mirsam และ Kurniawati (2018) ได้ทำการระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในแปลงข้าวของ South Sulawesi ประเทศอินโดนีเซียด้วยการใช้เทคนิคการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s ผลพบว่ามียีนขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 500 คู่เบส ซึ่งเหมือนกับไส้เดือนฝอย *M. graminicola* จากประเทศสหรัฐอเมริกา เนปาล จีน และอินเดีย 98.1-100 เปอร์เซ็นต์

Indarti และคณะ (2020) รายงานว่าไส้เดือนฝอยรากข้าว *Hirschmanniella mucronata* ที่พบในแปลงข้าวประเทศอินโดนีเซีย มีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 766 คู่เบส เมื่อมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ D2A/D3B อีกทั้งยังพบว่ามีความเหมือนกับไส้เดือนฝอย *H. mucronata* จากประเทศเบลเยียม 97.5 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. ด้วยการ ใช้ SCAR-MgFW/Rev primers; M คือ 1Kb plus Ladder (Invitrogen); C คือชุดควบคุมที่ไม่มี DNA template; Min คือ *M. incognita*; Mar คือ *M. arenaria*; Mja คือ *M. javanica*; Mex คือ *M. exigua*; Mpa คือ *M. paranensis*; B คือ *M. graminicola* จากประเทศบราซิล; P คือ *M. graminicola* จากประเทศฟิลิปปินส์; 6, 13, 17 และ 27 คือ *M. graminicola* จากประเทศเวียดนาม (Bellafiore *et al.*, 2015)

4. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างไส้เดือนฝอยกับพืชอาศัย

ตัวอ่อนระยะที่ 2 ไส้เดือนฝอยรากปม เข้าทำลายพืชโดยใช้ stylet และสารที่ปลดปล่อยจาก pharyngeal glands สำหรับสารโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาจากไส้เดือนฝอยส่วนใหญ่จะเป็น effectors ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลาย ได้แก่ β -1,4- endoglucanase (cellulase), pectate lyase, polygalacturonase (pectinase), xylanases (hemicellulase) และ expansin ซึ่ง effectors ถูกสร้างโดย subventral glands ทั้งสองต่อมที่มีการทำงาน (active) ในช่วงระยะการเข้าทำลาย หลังจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ไส้เดือนฝอยรากปมแทงผ่านรากและปล่อย effectors ต่าง ๆ เพื่อเอาชนะกลไกของพืช แต่อย่างไรก็ตามพืชก็ยังมีกลไกในการยับยั้งการเข้าทำลายไส้เดือนฝอย ได้แก่ การสร้างอุปสรรคทาง

กายภาพ เช่น cuticle wax และ suberin และสารเคมี เช่น reactive oxygen species (ROS) สาร phenolic compound และ superoxide เป็นต้น การตอบสนองของพืชขึ้นอยู่กับ การจดจำกันได้ของตัวรับสัญญาณ (receptor) บนพื้นผิวของพืช ถ้าจดจำกันได้พืชก็จะมี ความต้านทานขึ้นเรียกว่า incompatible interaction แต่ถ้าหากพืชไม่สามารถจดจำ effectors นั้นได้ พืชก็จะอ่อนแอและเกิดอาการรากปมขึ้นเรียกว่า compatible interaction ในกรณีที่พืชมีความต้านทาน คือการที่พืชจดจำ effectors ได้ทันทีหลังจากการเข้าทำลายและจากนั้นทำการส่งสัญญาณ (signal transduction) ไปที่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นกลไกต่าง ๆ เพื่อมายับยั้งการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย สำหรับกลไกของพืชจะเกิดขึ้นในรูปแบบของการสร้าง callose ที่เนื้อเยื่อพืชบริเวณท่อน้ำท่ออาหาร หรือการพัฒนาให้เกิดเซลล์ตายเฉียบพลัน (hypersensitivity reaction: HR) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของนิวเคลียสในบริเวณที่มีไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย การสะสมของสารพิษ (toxic substance) ในไซโทพลาสซึม การสลายตัวของนิวเคลียสและในที่สุดเกิดเซลล์ตายเพื่อจำกัดขอบเขตและกีดกันการดูดกินธาตุอาหารของไส้เดือนฝอย นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการสร้างสารเคมีที่ช่วยในการจำกัดการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยในเซลล์พืช เช่น phytoalexin compounds หรือ pathogenesis-related proteins แต่ถ้าในกรณีที่พืชอ่อนแอ พืชจะเกิดอาการรากปมขึ้น โดยหลังจากไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 2 เข้าทำลายก็จะสามารถเจริญเติบโตอยู่ภายในรากพืชได้ ในระหว่างการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยจะสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการดูดสารอาหารจากพืชและการสืบพันธุ์ สำหรับการสร้าง feeding site ไส้เดือนฝอยจะปล่อยสารที่สร้างโดย dorsal gland ที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิด feeding site ได้แก่ Chorismate mutase, CLAVATA3-like peptides, Ubiquitin pathway proteins, Cytokinins และ Nodulation factors เป็นต้น การสร้าง feeding site เกิดจากไส้เดือนฝอยปล่อยสารและทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ mitosis ซ้ำ ๆ กันและสั้นขึ้นในวงจรการแบ่งเซลล์ ดังนั้นใน feeding site จะมีหลายนิวเคลียสใน 1 เซลล์ ความแตกต่างระหว่าง syncytia (cyst nematodes) และ giant cell (root-knot nematode) คือ S phase หรือการสังเคราะห์ซ้ำ ๆ กันภายในเซลล์เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอมากขึ้นในแต่ละนิวเคลียส จากนั้นเกิดการสลายตัวของเซลล์ข้างๆ ทำให้ feeding site ของไส้เดือนฝอยซิสต์เหมือนกับ feeding site ของไส้เดือนฝอยรากปม (Jindapunnapat, 2012)

5. ความต้านทานโรคของพืช

ความต้านทานต่อโรคของพืชสามารถจำแนกตามการเหนี่ยวนำ และกลไกของความต้านทานได้ 2 ประเภท ได้แก่

1. ความต้านทานที่มีอยู่แล้วในพืช (pre-formed resistance หรือ constitutive resistance)

การต้านทานในลักษณะนี้เป็นความต้านทานที่พืชมีอยู่แล้วหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งคือลักษณะประจำพันธุ์ ยกตัวอย่างเช่น ความหนาและความแข็งแรงของผนังเซลล์ การ

สร้างแว็กซ์ (wax) และคิวติเคิล (cuticle) ที่ปกคลุมบริเวณลำต้นและผิวใบเพื่อช่วยขัดขวางการแทงเข้าสู่พืชของเชื้อโรค การสร้างขนเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของแมลง ลักษณะการเกิดเปิด-ปิดของปากใบ และการสร้างสารไฟโตแอนติซิปีน (phytoanticipin) ที่มีผลในการยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (นงลักษณ์ เกรินทวงศ์, 2556)

2. ความต้านทานที่พืชถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้น (induced resistance)

เป็นความต้านทานของพืชที่เกิดขึ้นหลังจากเชื้อก่อโรคเข้าทำลาย เกิดขึ้นจากการที่ตัวตอบสนองการกระตุ้น (pattern recognition receptor: PRR) สามารถตรวจจับ โมเลกุลของเชื้อก่อโรค (pathogen-associated molecular pattern: PAMP) ได้ ความต้านทานลักษณะนี้เรียกว่า PAMP-triggered immunity (PTI) การรับรู้ของพืชจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดความต้านทานขึ้นเช่น การสังเคราะห์สารบางชนิดให้มีปริมาณมากขึ้นและเพียงพอที่จะกำจัดเชื้อก่อโรคได้ทันเวลา ภายหลังจากถูกเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลาย เช่นการสังเคราะห์ callose พอกที่ผนังเซลล์ของพืชที่อวัยวะของเชื้อรา (papillae) แทะผ่านเข้าสู่เซลล์ เพื่อยับยั้งการบุกรุกของเชื้อรภายในเซลล์ การสังเคราะห์สาร phytoalexin จำพวก ฟีนอลิก เทอร์ปีนอยด์ และอาลิฟาติกส์ ที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์โดยทั่วไป การสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค หรือ PR protein (pathogenesis-related protein) ที่มีคุณสมบัติในการต้านทานโรคอย่างไม่จำเพาะ โดยในปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกไว้ทั้งหมด 17 กลุ่ม ซึ่งพบว่ามีบางกลุ่มมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์แบคทีเรียและเชื้อราได้โดยตรง การเกิดการตายอย่างเนียบพลันของเซลล์ที่ถูกบุกรุกและเซลล์ข้างเคียง หรือที่เรียกว่า hypersensitive reaction (HR) ซึ่งเกิดจากสะสมสารอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species) ทั้งในรูปซูเปอร์ออกไซด์ (super oxide: O_2^-) และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide: H_2O_2) ในบางครั้งความต้านทานในลักษณะ PTI พบว่าไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะทำให้พืชรอดพ้นจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้ เนื่องจากเชื้อก่อโรคมีโปรตีนที่เรียกว่า effector ซึ่ง effector เหล่านี้จะถูกส่งเข้าไปในพืชเพื่อยับยั้งกลไกการต้านทานของพืช ทำให้พืชแสดงอาการของโรคขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพืชบางชนิดที่มีความต้านทานอย่างสมบูรณ์หรือมีภูมิคุ้มกัน (immune) พืชจะกระตุ้นความต้านทานในอีกรูปแบบหนึ่งเพื่อยับยั้งการทำงานของ effector การต้านทานในลักษณะนี้เรียกว่า effector-triggered immunity หรือ ETI ซึ่งความต้านทานในลักษณะนี้จะมีลักษณะแตกต่างกันออกไปตามชนิดและความสัมพันธ์ของพืชและเชื้อสาเหตุโรค ยกตัวอย่างเช่น มะเขือเทศพันธุ์ต้านทานจะสังเคราะห์โปรตีน Cf4 ไว้เพื่อไปยับยั้งการทำงานของ effector Avr4 ที่ถูกสร้างโดยเชื้อรา *Cladosporium fulvum* เป็นต้น (นงลักษณ์ เกรินทวงศ์, 2556)

การป้องกันตัวเองของพืชเมื่อถูกเชื้อก่อโรคหรือแมลงเข้าทำลายสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบคือ systemic acquired resistance (SAR) และ induced systemic resistance

(ISR) สำหรับ SAR เป็นการตอบสนองเชิงป้องกันแบบทั่วทั้งต้นซึ่งจะถูกกระตุ้นด้วยการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคหรือสารเคมี ตัวอย่างเช่น 2,6-dichloroisonicotinic acid เป็นต้น ความต้านทานในลักษณะนี้เป็นความต้านทานที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้อย่างแพร่หลายและสามารถตรวจสอบได้จาก SA-dependent process ซึ่งมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาการป้องกันมากมาย (Duan *et al.*, 2014) ได้แก่

1. phenylalanine ammonia lyase (PAL) เป็นเอนไซม์ของ phenylpropanoid pathway และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ฟีนอลิก ไฟโตเอเล็กซิน และลิกนิน ซึ่งช่วยเพิ่มระดับความต้านทานให้กับพืช

2. oxidative enzyme ได้แก่ peroxidase (POD) และ polyphenol oxidase (PPO) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการสร้างลิกนินและสารประกอบ oxidative phenols อื่นๆที่นำไปสู่การสร้างสิ่งกีดขวางและการเสริมโครงสร้างของเซลล์ให้แข็งแรงขึ้น

Anita และคณะ (2004) รายงานว่าต้นมะเขือเทศที่ถูกปลูกเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* มีการสร้างเอนไซม์ใน phenylpropanoid pathway ได้แก่ POD และ PAL เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังช่วยลดจำนวนปมที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *M. incognita* ได้อีกด้วย

Aryal และคณะ (2011) ได้ศึกษาการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *Rotylenchulus reniformis* และ *M. incognita* ในต้นฝ้ายพันธุ์อ่อนแอ (DP 0935 B2RF) เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทาน (LONREN-1) ด้วยการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ P-peroxidase, G-peroxidase และ catalase ที่ระยะเวลา 2, 4, 6, 10 และ 14 หลังจากการปลูกเชื้อ ผลพบว่าฝ้ายพันธุ์ที่มีความต้านทานพบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในใบฝ้ายสูงกว่าฝ้ายพันธุ์อ่อนแออย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ ยกเว้นเอนไซม์ catalase ของกรรมวิธีการปลูกไส้เดือนฝอย *M. incognita* ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *R. reniformis* และ *M. incognita* เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการการชักนำให้เกิดความต้านทานแบบ SAR

Anita และ Samiyappan (2012) ได้ศึกษาการชักนำข้าวพันธุ์ CO47 ให้เกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* ด้วยการใส่ *Pseudomonas fluorescens* ผลพบว่ากรรมวิธีที่มีการปลูกไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับ *P. fluorescens* มีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL, PPO และ POD เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 7, 14 และ 21 วันหลังจากการปลูกเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีปลูกไส้เดือนฝอยรากปมหรือ *P. fluorescens* เพียงอย่างเดียว และกรรมวิธี

ควบคุม อีกทั้งยังพบว่ากรรมวิธีที่มีการปลูกไส้เดือนฝอยรากปมร่วมกับ *P. fluorescens* สามารถลดจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยในรากได้ 24.9 เปอร์เซ็นต์ หลังจากปลูกเชื้อ 21 วัน

Ngadze และคณะ (2012) ได้ศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานของมันฝรั่ง (18 พันธุ์) ได้แก่ PAL, PPO และ POD ต่อโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อ *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *Brasiliensis* ผลพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ PAL ของมันฝรั่งพันธุ์ *anderplank*, *Pentland Dell*, *M69/11*, *Romano*, *M59/20* และ *Mondial_{zw}* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ 8 ชั่วโมงหลังจากการตัด (ทำให้เกิดแผล) จะพบเอนไซม์ PAL สูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าในกรรมวิธีที่ทำให้เกิดแผลและกรรมวิธีที่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรียก่อโรคพบเอนไซม์ PPO, POD และ PAL มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญด้วยเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า PAL, PPO และ POD มีบทบาทสำคัญในการต้านทานโรคเน่าและของมันฝรั่ง

Bhau และคณะ (2016) กล่าวว่า การเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* นำไปสู่การชักนำต้น *pachouli* ให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ POD เพิ่มขึ้นในใบ ดังนั้นจึงทำให้พบปริมาณสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้นและทำให้ต้น *pachouli* สามารถยับยั้งการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อทราบการแพร่ระบาดและชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชหลักที่พบในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานี
2. เพื่ออธิบายการตอบสนองของข้าวไทยบางสายพันธุ์ต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ฐานข้อมูลการแพร่กระจายและชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบในแปลงข้าวทั้ง 6 อำเภอในจังหวัดปทุมธานี
2. ฐานข้อมูลพันธุ์ข้าวของไทยที่มีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายและมีความต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola*
3. ได้แนวทางการป้องกันการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมโดยการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานมากที่สุดไปแนะนำแก่เกษตรกร อีกทั้งยังนำข้อมูลที่ได้ออกเผยแพร่ในวารสารวิชาการเพื่อเป็นฐานข้อมูลแก่ผู้ที่สนใจ

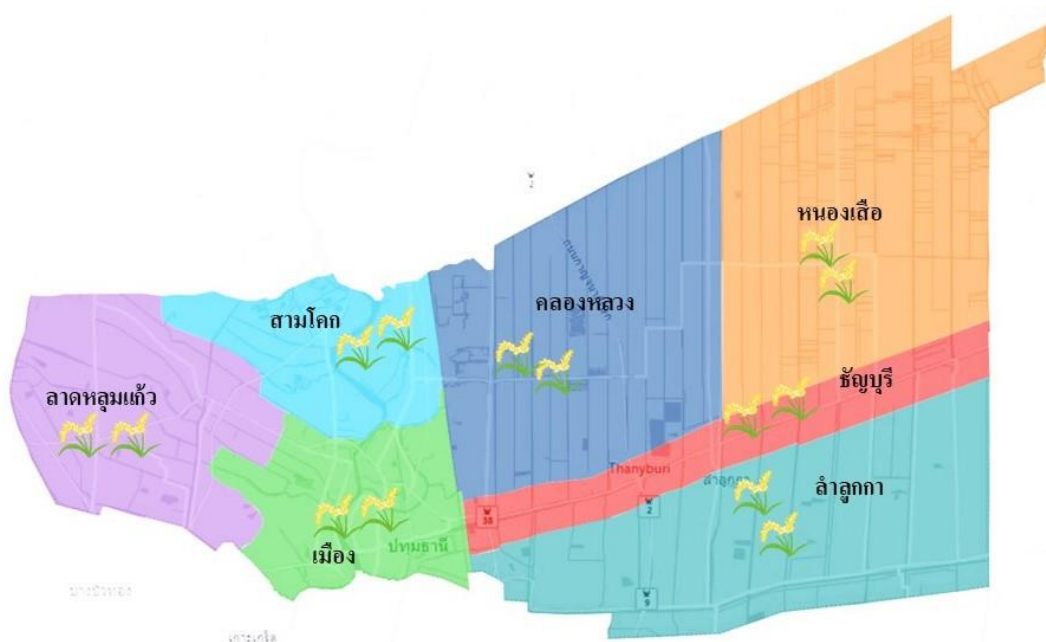
บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดสอบ

1. การเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอย การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย และการเตรียมไส้เดือนฝอยรากปมให้บริสุทธิ์

1.1 การสุ่มตัวอย่างรากข้าวและดิน

ทำการสุ่มตัวอย่างรากข้าวและดินบริเวณรอบรากที่ความลึก 0-20 เซนติเมตร ในแปลงข้าวทั้งหมด 14 แปลงจาก 7 อำเภอในจังหวัดปทุมธานี (ภาพที่ 6) ได้แก่ หนองเสือ ัญบุรี ลำลูกกา คลองหลวง อำเภอเมือง สามโคกและลาดหลุมแก้ว (อำเภอละ 2 แปลง) โดยแต่ละแปลงเก็บจำนวน 3 ตัวอย่าง (บริเวณหัวแปลง กลางแปลง และท้ายแปลง) ใส่ในถุงพลาสติกซิปล็อคขนาด 15×23 เซนติเมตร ทำการจดบันทึกหมายเลขแปลง ตำแหน่งจีพีเอส (ใช้โปรแกรม The IOS 7 Compass app) ชนิดของพันธุ์ข้าว อายุของพันธุ์ข้าวที่ทำการเก็บ และค่า pH ของดิน (ใช้เครื่อง Soil pH and moisture tester Takemura, Japan) นำตัวอย่างรากข้าวและดินไปยังห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์เพื่อทำการแยกไส้เดือนฝอยต่อไป



ภาพที่ 6 บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างในจังหวัดปทุมธานี

1.2 การแยกไส้เดือนฝอย

แยกไส้เดือนฝอยจากดิน โดยใช้วิธี Cobb's Sieving and Decantation and the Modified Baermann's Funnel techniques (สมชาย สุขะกุล, 2549) โดยชั่งดินจำนวน 150 กรัมแช่ในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร บดดินให้ละเอียดแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารแขวนลอยดินไปกรองผ่านตะแกรงขนาด 250, 105 และ 37 ไมโครเมตร ตามลำดับ แล้วทำการเก็บสารแขวนลอยไส้เดือนฝอยที่ติดอยู่บนตะแกรงขนาด 37 ไมโครเมตร ลงในบีกเกอร์ นำสารแขวนลอยไส้เดือนฝอยเทลงบนกระดาษทิชชูที่มีตะแกรงเหล็กวางอยู่ข้างใต้บนปากกรวยโดยบริเวณปลายท่อของกรวยใช้คัลิปหนีบอย่างแน่น ต่อมาเติมน้ำลงบนกรวยจนกระทั่งน้ำท่วมกระดาษทิชชู แล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไซสารแขวนลอยไส้เดือนฝอยปริมาตร 40 ไมโครลิตรลงในบีกเกอร์ แล้วทำการนับจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Olympus SZ, Japan)

สำหรับการแยกไส้เดือนฝอยจากรากข้าวทำโดยใช้วิธี Extraction tray method (Coyne *et al.*, 2007) ทำโดยชั่งรากข้าวที่ล้างจนสะอาดจำนวน 10 กรัม แล้วใช้กรรไกรตัดรากข้าวให้เป็นชิ้นขนาด 0.5-1 เซนติเมตร จากนั้นนำรากข้าวดังกล่าวไปวางบนกระดาษทิชชูที่วางอยู่บนตะกร้าพลาสติก โดยตะกร้าพลาสติกวางอยู่ในภาชนะพลาสติกขนาด 20x20x7.5 เซนติเมตร อีกชั้นหนึ่ง ต่อมาทำการเติมน้ำจนท่วมรากพืชแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยไส้เดือนฝอยในภาชนะพลาสติกไปกรองผ่านตะแกรงขนาด 37 ไมโครเมตร ทำการเก็บไส้เดือนฝอยบนตะแกรงลงในบีกเกอร์แล้วทำการนับจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

1.3 การทำไส้เดือนฝอยรากปมให้บริสุทธิ์ (pure culture)

นำตัวอย่างรากข้าวที่มีลักษณะอาการรากปมจำนวน 20 กอที่เก็บได้จากอำเภอสสามโคก จังหวัดปทุมธานี (14°06'47.9"N 100°33'45.9"E) มาล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด จากนั้นทำการตัดรากข้าวที่มีอาการเป็นปมลักษณะคล้ายตะขอมাত্রตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ทำการแยกกลุ่มไข่เพียง 1 กลุ่ม (single egg mass) ด้วยการใช้มีดผ่าตัดผ่านบริเวณรากปมแล้วใช้เข็มเย็บกลุ่มไข่ไปปักเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 จากนั้นนำไปปลูกเชื้อ (inoculation) ลงในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อีกครั้ง เพื่อเพิ่มปริมาณประชากรของไส้เดือนฝอยรากปมและใช้ในการทดลองถัดไป (กนกทิพย์ ทะลือ และคณะ, 2562)

2 การระบุชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบในนาข้าวโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคทางอณูชีววิทยา

2.1 การจัดจำแนกไส้เดือนฝอยโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.1.1 ลักษณะรอยหยักส่วนก้น (perineal pattern) สำหรับไส้เดือนฝอยรากปม

ทำการเขี่ยตัวโตเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมข้าวจากกลุ่มตัวอย่างที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว วางลงบนหยคน้ำบนสไลด์แก้ว จากนั้นตัดบริเวณก้นของไส้เดือนฝอยโดยใช้ใบมีดโกน 2 มม (ยี่ห้อ Gillette) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และหยดกรดแลคติกเพื่อล้างบริเวณรอยหยักส่วนก้นให้สะอาด จากนั้นย้ายส่วนก้นของไส้เดือนฝอยมาวางไว้บนสไลด์แก้วแล้วหยดด้วย glycerin ทำการปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ แล้วนำไปตรวจสอบและถ่ายรูปด้วยการใช้กล้องถ่ายภาพแบบดิจิทัล (Camera Canon EOS 750D) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบกำลังขยายสูง (Olympus BX50) (กนกทิพย์ ทะลือ และคณะ, 2562) จากนั้นนำภาพรอยหยักส่วนก้นของไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้ไปเปรียบเทียบกับรายงานของ Hunt และ Handoo (2009)

2.1.2 การวัดขนาดไส้เดือนฝอยศัตรูพืช (morphometric character)

ทำการเขี่ยตัวไส้เดือนฝอยศัตรูพืชแต่ละชนิดจำนวน 20 ตัว ที่ผ่านการฆ่าด้วยน้ำร้อนแล้ว ลงในหยคน้ำบนสไลด์แก้วที่มีวงเวียนล้อมรอบ จากนั้นปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์และนำไปถ่ายรูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ด้วยการใช้อุปกรณ์ถ่ายภาพแบบดิจิทัลที่เชื่อมต่อกับโปรแกรม EOS Utility program จากนั้นนำภาพที่ได้ไปวัดขนาดของไส้เดือนฝอยด้วยการใช้โปรแกรม Axio Vision SE64 Rel. 4.9.1 program โดยค่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphometric character) ถูกคำนวณตามระบบของ De Man Formula (Thorne, 1949)

n = จำนวนตัวไส้เดือนฝอยที่ทำการวัดขนาด

L = ความยาวทั้งหมดของลำตัว

a = ความยาวทั้งหมดของลำตัว / ความยาวของลำตัวส่วนที่กว้างที่สุด

b = ความยาวทั้งหมดของลำตัว / ความยาวจากหัวถึง pharyngo-intestinal junction (PIJ)

b' = ความยาวทั้งหมดของลำตัว / ความยาวของ esophageal gland

c = ความยาวทั้งหมดของลำตัว / ความยาวหาง

c' = ความยาวหาง / ความกว้างของหางตรงตำแหน่ง anus

s = ความยาวของ stylet

2.2 การระบุชนิดไส้เดือนฝอยโดยใช้ลักษณะทางอนุชีววิทยา

2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเจียไส้เดือนฝอยศัตรูพืชลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (1 ตัวต่อหลอด) ที่มีน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติม lysis buffer [200 mM NaCl (A&D Technology, Japan), 200 mM Tris-HCl pH 8.0 (A&D Technology, Japan), 1% (v/v) β -mercaptoethanol (Sigma, Japan) และ 800 μ g/ml proteinase K (Worthington Biochemical, USA)] ปริมาตร 25 ไมโครลิตรลงไปหลอดทดลองและนำไปบ่มในเครื่อง Thermocycler (Biometra Tgradient Thermoblock PCR Thermocycler, UK) โดยตั้งโปรแกรมที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที และตามด้วยอุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำพีซีอาร์ (Holterman *et al.*, 2006)

2.2.2 การทำพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction: PCR)

สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ได้แก่ rDNA2/rDNA1.58s และ D2A/D3B ส่วนไส้เดือนฝอยรากปมใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ rDNA2/rDNA1.58s, C₂F₃/1108 (ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *Meloidogyne* spp.) และ SCAR-MgFW/SCAR-MgRev (ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *M. graminicola*) ทำโดยการผสม reaction mixture ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ดังนี้ 1) 2x PCR master mix with dye solution i-taq (Intron biotechnology, Korea) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร 2) Forward primer (10 p mol) และ Reverse primer (10 p mol) ดังตารางที่ 1 ปริมาตรอย่างละ 1.5 ไมโครลิตร 3) ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ 4) Water nuclease-free ปริมาตร 9 ไมโครลิตร จากนั้นนำ reaction mixture เขย่าให้เข้ากันก่อนนำไปใส่เครื่อง Thermocycler (Biometra Tgradient Thermoblock PCR Thermocycler, UK) โดยตั้งโปรแกรมตามตารางที่ 2 จากนั้นนำ PCR products ไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ที่มีความเข้มข้น 1.5% โดยเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100+bp DNA marker (Biotech rabbit, Germany) ขนาดของดีเอ็นเอถูกแยกโดยใช้วิธี gel electrophoresis ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และนำแผ่นเจลไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้เครื่อง gel document (Bio RAD, United Kingdom) ถ่ายภาพและบันทึกผลการทดลอง PCR products ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยการใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s และ D2A/D3B ถูกส่งไปยังบริษัท SOLGEN Inc. ประเทศเกาหลี เพื่อทำ DNA sequencing และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อ้างอิง
rDNA2	5'-TTGATTACGTCCCTGCCCTTT-3'	Bellafiore และคณะ (2015)
rDNA1.58s	5'-ACGAGCCCGAGTGATCCACCG-3'	
D2A	5' ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT 3'	Berg และคณะ (2009)
D3B	5' TGCGAAGGAACCAGCTACTA 3'	
C ₂ F ₃	5'-GTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG-3'	Long และคณะ (2017)
1108	5'-TACCTTTGACCAATCACGCT-3'	
SCAR-MgFW	5'GGGGAAGACATTTAATTGATGATCAAC-3'	Bellafiore และคณะ (2015)
SCAR-MgRev	5'-GGTACCGAAACTTAGGGAAAG-3'	

ตารางที่ 2 โปรแกรมการทำพีซีอาร์ของแต่ละไพรเมอร์

ขั้นตอน	โปรแกรม	ไพรเมอร์	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1	Initial denaturation	–	94	5
2*	Denaturing	–	94	1
3	Annealing	rDNA2/rDNA1.58s	56	0.5
		และ D2A/D3B		
		C ₂ F ₃ ,1108	48	0.5
		SCAR-MgFW/ SCAR-MgRev	48	1
4	Extension	–	72	1
5	Final extension	–	72	7
6	Hold	–	4	∞

* ขั้นตอนที่ 2-4 ทำซ้ำทั้งหมด 34 รอบ

2.2.3 การศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยการใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 โดยทำการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นศัตรูพืชของข้าวบริเวณยีน 18S-ITS1-5.8S และ 28S rRNA (ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์ที่ใช้) ในฐานข้อมูล GenBank แล้วนำมาจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีด้วยการใช้โปรแกรม ClustalW แผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการถูกสร้างด้วยการใช้วิธี Maximum Likelihood (ML) ภายใต้ Gamma distribution (GTR + G) model การทดสอบ phylogeny ดำเนินการโดยใช้ค่า bootstrap เท่ากับ 1000 ครั้ง (Besnard *et al.*, 2019)

3. การประเมินความต้านทานของข้าวต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมข้าว

ทำการทดสอบความต้านทานของพันธุ์ข้าว ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 สันป่าตอง 1 กข6 กข43 และ กข57 ต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *M. graminicola* (ดัดแปลงวิธีการจาก Nguyen *et al.*, 2014 และ Zhan *et al.*, 2018) โดยนำเมล็ดพันธุ์ข้าวจำนวนทั้ง 6 พันธุ์ไปฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวโดยการจุ่มใน Clorox 0.6% เป็นเวลา 10 วินาที และทำการล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ 2 ครั้ง ต่อมานำเมล็ดข้าวไปเพาะในถาดเพาะเป็นเวลา 7 วัน จนกระทั่งมีการงอกของรากข้าว ทำการคัดเลือกเมล็ดข้าวที่มีความยาวของรากใกล้เคียงกันไปปลูกในหลอดทดลอง (เจาะรูบริเวณปลายหลอด) ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50 กรัม จำนวน 1 ต้นต่อ 1 หลอด และรดน้ำด้วยการใช้ปิ๊ปไฮโดรโปนิคส์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 3 วันทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยรากปมข้าวตัวอ่อนระยะที่ 2 จำนวน 100 ตัวลงในแต่ละหลอด รอเป็นระยะเวลา 2 วัน และล้างรากข้าวด้วยน้ำปริมาตร 20 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้งเพื่อทำการชะล้างไส้เดือนฝอยรากปมที่มีการเข้าทำลายลำข้าว จากนั้นรดน้ำต้นข้าวด้วยน้ำประปาปริมาตร 10 มิลลิลิตรแบบวันเว้นวัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCBD) ข้าวแต่ละพันธุ์ทำจำนวนทั้งหมด 10 ซ้ำ การตรวจสอบผลการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมถูกดำเนินการที่ระยะเวลา 15 วันหลังจากการปลูกเชื้อ โดยทำการตรวจนับจำนวนรากปม (gall number) แล้วให้คะแนนดังนี้ (0) ไม่มีอาการรากปม (1) มีอาการรากปม 1-2 ปม (2) มีอาการรากปม 3-10 ปม (3) มีอาการรากปม 11-20 ปม (4) มีอาการรากปม 21-30 ปม (5) มากกว่า 30 ปมขึ้นไป จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณ Gall index (GI) ด้วยสูตรดังนี้

$$GI = \frac{\sum (S_i \times N_i)}{(N \times 5)} \times 100$$

S_i คือ คะแนนของการเกิดรากปม (0-5)

N_i คือ จำนวนต้นพืชในแต่ละการให้คะแนน

N คือ จำนวนทั้งหมดของพืชที่ถูกประเมินของข้าวแต่ละพันธุ์

สำหรับค่า GI สามารถใช้ในการประเมินระดับความต้านทานของข้าวแต่ละพันธุ์นี้ (Zhan *et al.*, 2018)

GI = 0 หมายถึงข้าวไม่เป็นพืชอาศัย หรือ immune (I)

GI = $0.1 \leq GI \leq 5.0$ หมายถึงมีความต้านทานสูง หรือ highly resistance (HR)

GI = $5.1 \leq GI \leq 25.0$ หมายถึงมีความต้านทาน หรือ resistance (R)

GI = $25.1 \leq GI \leq 50.0$ หมายถึงพืชอ่อนแ่ปานกลาง หรือ moderately susceptible (MS)

GI = $50.1 \leq GI \leq 75.0$ หมายถึงพืชอ่อนแอ หรือ susceptible (S)

GI = >75 หมายถึงพืชอ่อนแ่มาก หรือ highly susceptible (HS)

นอกจากนี้ยังมีการนับจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยรากปมที่พบ (final population) คือนับจำนวนไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 2 และจำนวนไข่ที่พบหลังจากการปลูกเชื้อ 15 วัน เพื่อนำไปคำนวณค่า reproduction factor (Rf) ตามสูตรดังนี้ (Phan *et al.*, 2018)

$$Rf = Pf / (Pi \times \text{น้ำหนักราก})$$

Pf คือ จำนวนไส้เดือนฝอยที่พบ (final nematode population)

Pi คือ จำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (initial nematode population)

นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบทางสถิติด้วยการใช้โปรแกรม SPSS software ค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีถูกเปรียบเทียบกันด้วยการใช้ Duncan adjustment for multiple comparisons ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4. การตรวจสอบการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยรากปมภายในรากข้าว

ทำการศึกษการพัฒนาการของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola* ในการเข้าทำลายข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 สันป่าตอง 1 กข6 กข43 และ กข57 ด้วยการย้อมเนื้อเยื่อพืชและสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลา โดยนำเมล็ดพันธุ์ข้าวทั้ง 6 พันธุ์ไปฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวโดยการจุ่มใน Clorox 0.6% เป็นเวลา 10 วินาที และล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ต่อมานำเมล็ดข้าวไปเพาะในถาดเพาะเป็นเวลา 7 วัน จนกระทั่งมีการงอกของรากข้าว ทำการคัดเลือกเมล็ดข้าวที่มีความยาวของรากใกล้เคียงกัน ปลูกในหลอดทดลอง (เจาะรูบริเวณปลายหลอด) ขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีทรายที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50 กรัม จำนวน 1 ต้นต่อ 1 หลอด และทำการรดน้ำด้วยการใช้ปั๊มไฮโดรโปนิกส์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 3 วันทำการปลูกไส้เดือนฝอยรากปมข้าวตัวอ่อนระยะที่ 2 จำนวน 100 ตัวลงไปในแต่ละหลอด รอเป็นระยะเวลา 2 วัน และทำการล้างรากข้าวด้วยน้ำประปาปริมาตร 20 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้งเพื่อทำการชะล้างไส้เดือนฝอยรากปมที่มีการเข้าทำลายลำต้น จากนั้นรดน้ำต้นข้าวด้วยน้ำประปาปริมาตร 10 มิลลิลิตรแบบวันเว้นวัน แต่ละกรรมวิธีทำ 5 ซ้ำ ทำซ้ำ 2 รอบ ทำการตรวจสอบการพัฒนาการของ

ไส้เดือนฝอย *M. graminicola* ด้วยการนำรากข้าวที่ถูกเข้าทำลาย (infected) จากไส้เดือนฝอยรากปม หลังจากปลูกเชื้อ 2 และ 14 วัน (Zhan *et al.*, 2018) ไปล้างให้สะอาดด้วยน้ำแล้วซับให้แห้งด้วยการใช้กระดาษทิชชู จากนั้นนำรากที่ได้ไปย้อมสีด้วยการใช้ acid fuchsin โดยด้อมที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที บน hotplate จากนั้นนำตัวอย่างรากพืชขึ้นจากสารละลาย และผ่านน้ำไหลเพื่อล้างสีส่วนเกินออกแล้วนำตัวอย่างนี้ไปดูดซับน้ำออกด้วยกระดาษทิชชู นำตัวอย่างมาใส่ในจานแก้วหรือบีกเกอร์ และเท lactic acid กับ glycerine อัตราส่วน 1:5 ให้ท่วมตัวอย่างทิ้งไว้อย่างน้อยประมาณ 72 ชั่วโมง เพื่อให้ lactic acid กัดสีย้อมที่ติดตัวอย่างออก (ดัดแปลงวิธีการจาก นุชนารถ, 2549) จากนั้นนำไปตรวจสอบและนับจำนวนภายใต้กล้อง stereo microscope (Olympus szx7) แล้วทำการบันทึกภาพ นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบทางสถิติด้วยการใช้โปรแกรม SPSS software ค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีถูกเปรียบเทียบกันด้วยการใช้ Duncan adjustment for multiple comparisons ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

5. การศึกษาการตอบสนองเชิงป้องกันของข้าวต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมในสภาพห้องปฏิบัติการ

ทำการตรวจสอบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานเมื่อถูกเชื้อก่อโรคเข้าทำลาย ได้แก่ phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POD) และ polyphenol oxidase (PPO) โดยใช้ดัดแปลงวิธีการของ Duan *et al.* (2014) ทำโดยปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยรากปมตัวอ่อนระยะที่ 2 ลงไปในข้าวพันธุ์ กข6 (ต้านทาน) และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (อ่อนแอ) จำนวน 100 ตัว/ต้น ที่อายุ 10 วัน ในหลอดทดลองที่มีทรายผ่านการฆ่าเชื้อ 50 กรัม วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ หลังจากการปลูกเชื้อ 1, 2, 3, 4, 7, 10 และ 14 วัน โดยปฏิบัติตามดังนี้

ทำการบดรากข้าว 0.03 กรัมด้วยการใช้ 50 mM potassium phosphate buffer (pH 8.8) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ในเครื่อง polytron tissue grinder ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บส่วนใสด้านบน (supernatant) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

PAL: ทำการเตรียม reaction mixture โดยทำการดูดส่วนใสปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในควอร์ตคิวเวท (quartz cuvette) จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาณ 900 ไมโครลิตร และ 2 มิลลิลิตร ของ 3 mmol L-phenylalanine ที่ละลายใน 150 mM Tris-HCl buffer pH 8.58 ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วและตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ทันทีโดยใช้เครื่อง UV-

spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 270 นาโนเมตร ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงที่ 0 และ 3 นาที นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PAL (Havir *et al.*, 1970)

PPO: ทำการเตรียม reaction mixture โดยทำการดูดส่วนใสปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในคิวเวท จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาณ 100 ไมโครลิตร 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และ 0.3 M catechol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ถูกบันทึกที่ 0 และ 3 นาที ด้วยการใช้ UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 495 นาโนเมตร นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ PPO (Mayer *et al.*, 1966)

POD: ทำการเตรียม reaction mixture โดยทำการดูดส่วนใสปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในคิวเวทแก้ว จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาณ 20 ไมโครลิตร 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) ปริมาตร 2660 ไมโครลิตร 4%(v/v) guaiacol ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ 1% H₂O₂ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ POD ถูกบันทึกที่ 0 และ 2 นาที ด้วยการใช้ UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 470 นาโนเมตร นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ POD (Diaz *et al.*, 2001)

นำผลของกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ไปเปรียบเทียบทางสถิติด้วยการใช้โปรแกรม SPSS software ค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีถูกเปรียบเทียบกันด้วยการใช้ Student's paired-plot design test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การแพร่ระบาดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบในจังหวัดปทุมธานี

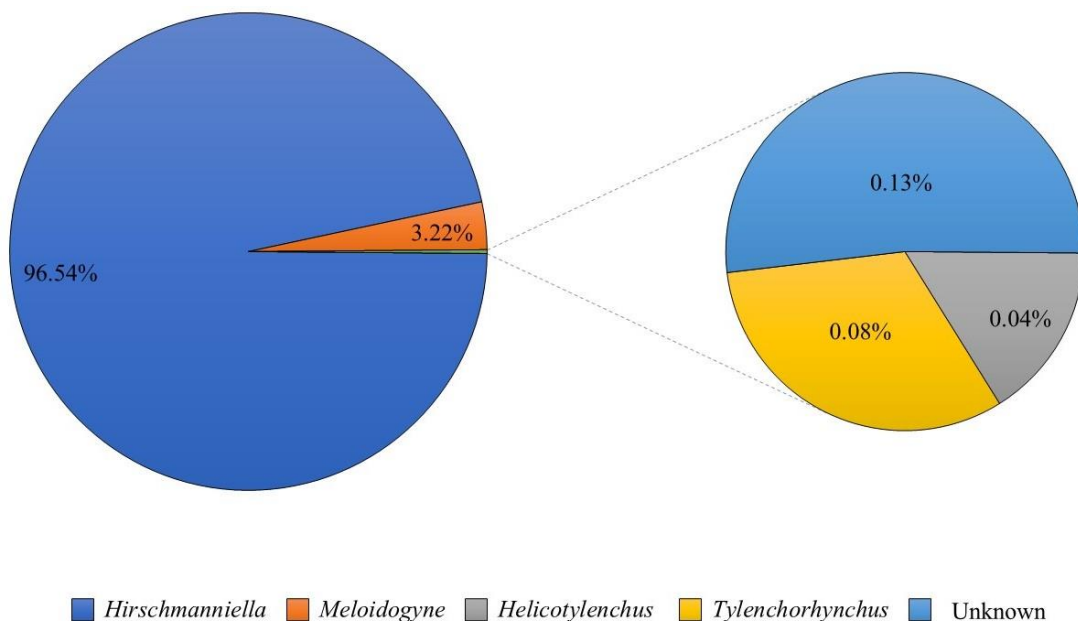
บริเวณนาข้าวของ 7 อำเภอในจังหวัดปทุมธานีมีลักษณะของดินเป็นดินเหนียวมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ในช่วง 5.3-6.7 บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างมีการเพาะปลูกข้าวหลายพันธุ์ ได้แก่ ปทุมธานี 1 พิษณุโลก 2 กข31 กข41 กข47 กข49 และ กข61 (ตารางที่ 3) ลักษณะอาการรากปมที่พบในแปลงข้าวมีลักษณะเป็นปมคล้ายตะขอ ไม่พบถุงไข่บริเวณผิวของรากข้าว โดยพบเกือบทุกแปลงที่ได้ทำการเก็บตัวอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตอซังข้าว อาการรากปมส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 7) จากการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจากดิน 150 กรัมและราก 10 กรัมพบไส้เดือนฝอยศัตรูพืช 4 ชนิด ได้แก่ *Hirschmanniella* sp. (96.54%), *Meloidogyne* sp. (3.22%), *Tylenchorhynchus* sp. (0.08%) และ *Helicotylenchus* sp. (0.04%) (ภาพที่ 8) โดยพบว่าการแพร่ระบาดของไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella* sp. และ *Meloidogyne* sp. ในเขตการเพาะปลูกข้าวของทั้ง 7 อำเภอที่ได้ทำการเก็บตัวอย่าง ในขณะที่ไส้เดือนฝอย *Tylenchorhynchus* sp. พบในแปลงข้าวของ 2 อำเภอคือสามโคกและอำเภอเมือง ส่วนไส้เดือนฝอย *Helicotylenchus* sp. พบในแปลงข้าวอำเภอธัญบุรีเท่านั้น (ภาพที่ 9) จากการศึกษาพบประชากรของไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella* sp. มากกว่าไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* sp. เป็นจำนวนมากอาจเป็นเพราะในการศึกษาครั้งนี้ นับเพียงแค่ว่าตัวของไส้เดือนฝอยเท่านั้น ไม่รวมถึงกลุ่มไข่ที่พบในราก ในการทดลองถัดไปจะใช้ไส้เดือนฝอยรากปมในการทดลอง เนื่องจากเป็นไส้เดือนฝอยที่มีการสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis (วางไข่ได้โดยไม่ต้องอาศัยเพศผู้) และสามารถวางไข่เป็นกลุ่มจำนวน 200-500 ฟอง อีกทั้งยังเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่มีความสำคัญเป็นอันดับหนึ่งทางเศรษฐกิจอีกด้วย (Jones *et al.*, 2013; Ravindra *et al.*, 2017) ในขณะที่ไส้เดือนฝอยรากข้าว *Hirschmanniella* sp. แม้ว่าจะพบมากในแปลงข้าวแต่ก็ยังมีข้อจำกัดในการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณในสภาพห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella* sp. จะถูกระบุชนิดด้วยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยาเนื่องจากเป็นชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชหลักที่พบในแปลงข้าว

ตารางที่ 3 ข้อมูลของแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานีที่ทำการเก็บตัวอย่าง

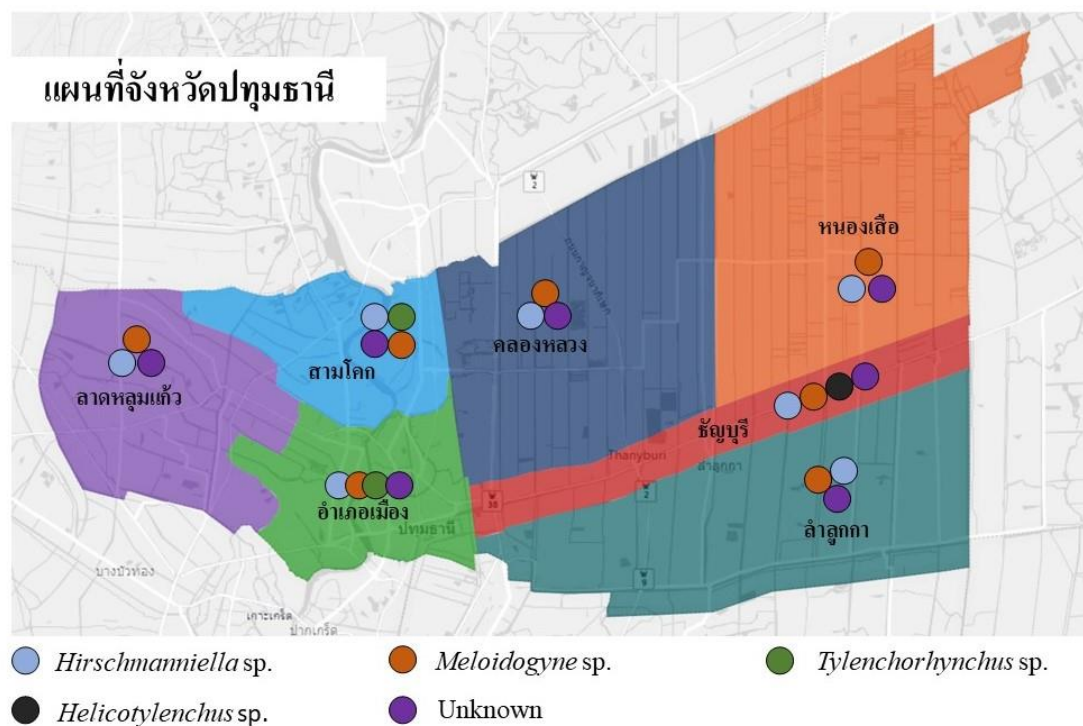
อำเภอ	รหัสแปลง	ตำแหน่ง GPS	พันธุ์ข้าว	อายุพืช (วัน)	pH
หนองเสือ 1	PN1	14°6'39"N 100°50'45"E	กข47	110	5.9
หนองเสือ 2	PN2	14°6'46"N 100°50'31"E	กข49	110	5.8
ธัญบุรี 1	PT1	14°2'28"N 100°49'27"E	พิษณุโลก 2	เก็บเกี่ยวแล้ว	5.4
ธัญบุรี 2	PT2	14°2'29"N 100°49'28"E	พิษณุโลก 2	เก็บเกี่ยวแล้ว	5.3
ลำลูกกา 1	PL1	14°1'42"N 100°49'28"E	ปทุมธานี 1	เก็บเกี่ยวแล้ว	5.3
ลำลูกกา 2	PL2	14°1'41"N 100°49'32"E	ปทุมธานี 1	เก็บเกี่ยวแล้ว	5.3
คลองหลวง 1	PK1	14°5'35"N 100°38'31"E	กข41	เก็บเกี่ยวแล้ว	5.6
คลองหลวง 2	PK2	14°5'38"N 100°38'28"E	กข41	เก็บเกี่ยวแล้ว	5.5
อำเภอเมือง 1	PM1	14°2'8"N 100°30'19"E	กข47	เก็บเกี่ยวแล้ว	5.9
อำเภอเมือง 2	PM2	14°2'1"N 100°30'55"E	กข14	เก็บเกี่ยวแล้ว	6
สามโคก 1	PS1	14°6'41"N 100°33'53"E	กข31	60	6.4
สามโคก 2	PS2	14°6'40"N 100°33'38"E	ปทุมธานี 1	เก็บเกี่ยวแล้ว	6.7
ลาดหลุมแก้ว 1	PLA1	14°3'29"N 100°26'39"E	กข61	90	5.3
ลาดหลุมแก้ว 2	PLA2	14°4'41"N 100°25'54"E	กข41	เก็บเกี่ยวแล้ว	6.1



ภาพที่ 7 ลักษณะอาการรากปมข้าว (ลูกสรชี) ที่พบในอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี



ภาพที่ 8 ร้อยละของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่แยกได้จากดิน 150 กรัมและรากข้าว 10 กรัมในแปลงนา จังหวัดปทุมธานี

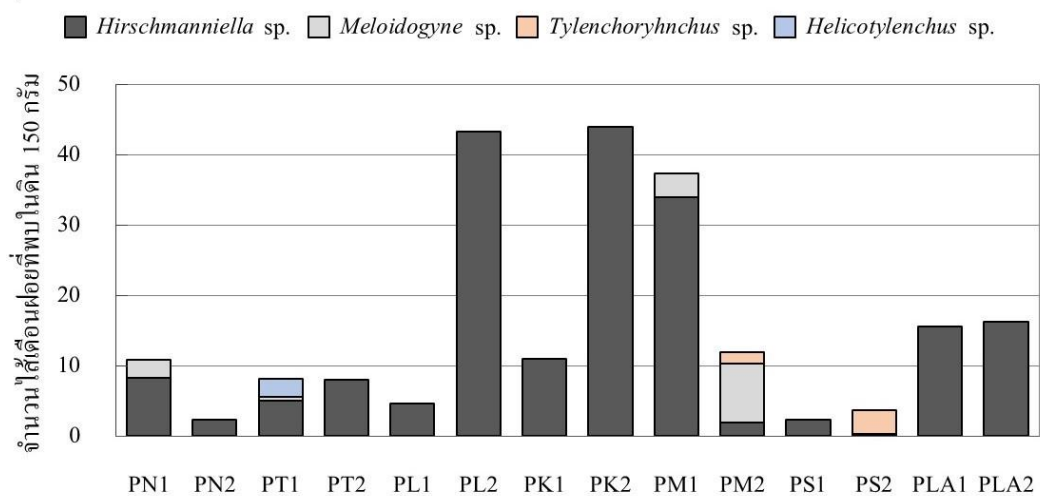


ภาพที่ 9 การแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบในแปลงข้าวทั้ง 7 อำเภอในจังหวัดปทุมธานี

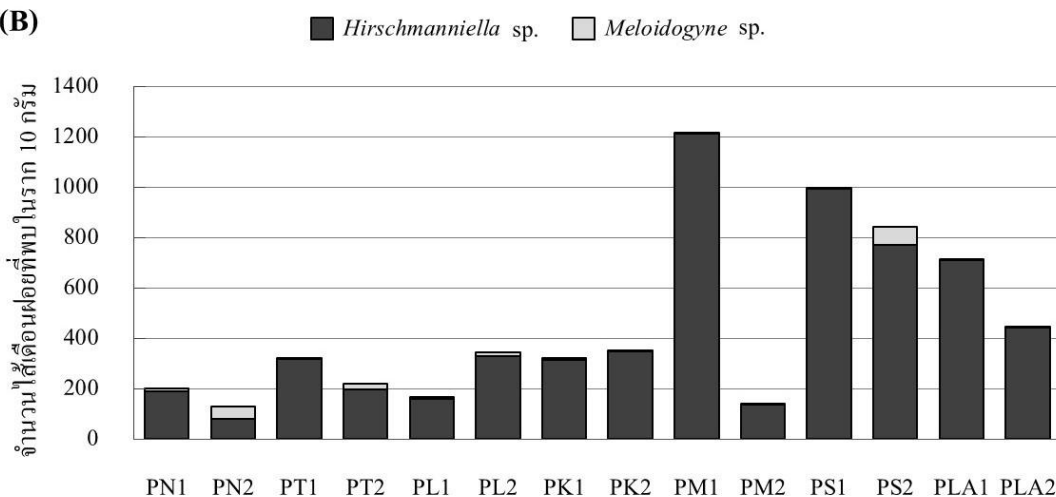
จำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่แยกได้จากดิน 150 กรัมพบว่า *Hirschmanniella* sp. เป็นไส้เดือนฝอยที่พบในแปลงข้าวทุกแปลงที่ได้ทำการเก็บตัวอย่าง (ภาพที่ 10A) โดยในแปลงข้าวอำเภอคลองหลวงแปลงที่ 2 (PK2) พบมากที่สุด 44.0 ตัวต่อดิน 150 กรัม รองลงมาคือแปลงข้าวอำเภอลำลูกกาแปลงที่ 2 (PL2) จำนวน 43.3 ตัวต่อดิน 150 กรัม ในขณะที่แปลงข้าวอำเภอสามโคกแปลงที่ 2 (PS2) พบน้อยที่สุดจำนวน 0.3 ตัวต่อดิน 150 กรัม สำหรับไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* sp. พบเพียง 4 แปลง ได้แก่ หนองเสือแปลงที่ 1 (PN1) ัญบุรีแปลงที่ 1 (PT1) อำเภอเมืองแปลงที่ 1 และ 2 (PM1 และ PM2) จำนวน 2.6, 0.6, 3.3 และ 8.3 ตัวต่อดิน 150 กรัม ตามลำดับ ส่วนไส้เดือนฝอย *Tylenchorynchus* sp. พบเพียง 2 แปลงคืออำเภอเมืองแปลงที่ 2 (PM2) และสามโคกแปลงที่ 2 (PS2) จำนวน 1.6 และ 3.3 ตัวต่อดิน 150 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่ไส้เดือนฝอย *Helicotylenchus* sp. พบเพียงแปลงข้าวของอำเภอัญบุรีแปลงที่ 1 (PT1) เท่านั้น จำนวน 2.6 ตัวต่อดิน 150 กรัม ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจำนวนไส้เดือนฝอยในราก 10 กรัม พบว่ามีความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสูงกว่าในดิน 150 กรัม แต่พบเพียง 2 ชนิดเท่านั้นคือ *Hirschmanniella* sp. และ *Meloidogyne* sp. โดยพบการระบาดในแปลงข้าวทุกแปลง (ภาพที่ 10B) สำหรับการแยกไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella* sp. ในรากพบปริมาณสูงที่สุดในแปลงข้าวอำเภอเมืองแปลงที่ 1 (PM1) และสามโคกแปลงที่ 1 (PS1) จำนวน 1,214.0 และ 992.0 ตัวต่อราก 10 กรัมตามลำดับ ส่วนแปลงข้าวอำเภอหนองเสือแปลงที่ 2 (PN2) พบน้อยที่สุดจำนวน 79.3 ตัวต่อราก 10 กรัม ในขณะที่ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* sp. พบมากที่สุดในการแปลงข้าวอำเภอสามโคกแปลงที่ 2 (PS2) และอำเภอหนองเสือแปลงที่ 2 (PN2) จำนวน 70.6 และ 50.6 ตัวต่อราก 10 กรัม ตามลำดับ ส่วนในแปลงอำเภอลาดหลุมแก้วแปลงที่ 2 (PLA2) พบน้อยที่สุด 0.3 ตัวต่อราก 10 กรัม จากการรายงานของ Fortuner and Memy (1979) พบว่ามีไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่สามารถเข้าทำลายข้าวได้มากกว่า 100 ชนิดทั้งในนาพื้นที่สูงและน่าน้ำขัง แต่ในการศึกษานี้พบไส้เดือนฝอยในดินเพียงแค่ 4 ชนิดเท่านั้นอาจเป็นเพราะช่วงระยะเวลาที่ไปเก็บดินเป็นช่วงที่เกษตรกรเพิ่งไถนํ้าออกแปลง และก่อนหน้านั้นมีการปล่อยนํ้าท่วมแปลงนานประมาณ 120 วัน Trivedi and Barker (1986) กล่าวว่า การไถนํ้าท่วมแปลงข้าวเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถลดจำนวนประชากรของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชได้เนื่องจากความชื้น อุณหภูมิ pH และอากาศในดินไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยจึงทำให้การศึกษาครั้งนี้พบจำนวนไส้เดือนฝอยในดินไม่มากอีกทั้งไม่มีความหลากหลาย แต่อย่างไรก็ตาม Goswami et al. (2015) รายงานว่าไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella* sp. และ *Meloidogyne* sp. เป็น endoparasite ที่สามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนภายในรากข้าวได้เมื่อสภาพแวดล้อมภายนอกไม่เหมาะสมต่อการ

เจริญเติบโต ดังนั้นวงจรชีวิตส่วนใหญ่จึงอยู่ภายในรากข้าวมากกว่าในดินซึ่งสอดคล้องกับจำนวนไส้เดือนฝอยที่พบในการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น ความชื้น อุณหภูมิ โครงสร้างของดิน pH พันธุ์พืช และอายุพืช เป็นต้น มีผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของไส้เดือนฝอยด้วยเช่นกัน (Burns, 1970; Hussaini *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2017) ซึ่ง Peacock (1957), Burns (1970) และ Davide (1980) รายงานว่าไส้เดือนฝอย *M. javanica*, *M. incognita*, *Pratylenchus alleni*, *Hoplolaimus galeatus* และ *Radopholus similis* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ pH 5.0–7.0 นอกจากนี้ Suong และคณะ (2019) รายงานว่าอายุข้าวมีผลต่อปริมาณประชากรของไส้เดือนฝอย *M. graminicola* และ *Hirschmanniella mucronata* โดยในช่วงต้นกล้าของข้าวจะพบมากที่สุดและต่อมาจะพบปริมาณน้อยลงจนกระทั่งเกี่ยวเกี่ยว จากข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองคือพบไส้เดือนฝอยรากปมเป็นจำนวนมากในข้าวอายุประมาณ 90–120 วันและดิน pH 5.3–6.7 ในแปลงข้าวจังหวัดปทุมธานี ส่วนเรื่องพันธุ์ข้าวต่อจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูพืช *Hirschmanniella* sp. และ *Meloidogyne* sp. พบว่ายังไม่มียางงานวิจัยรายงานเกี่ยวกับการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยในข้าวแต่ละพันธุ์ที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดปทุมธานี

(A)



(B)



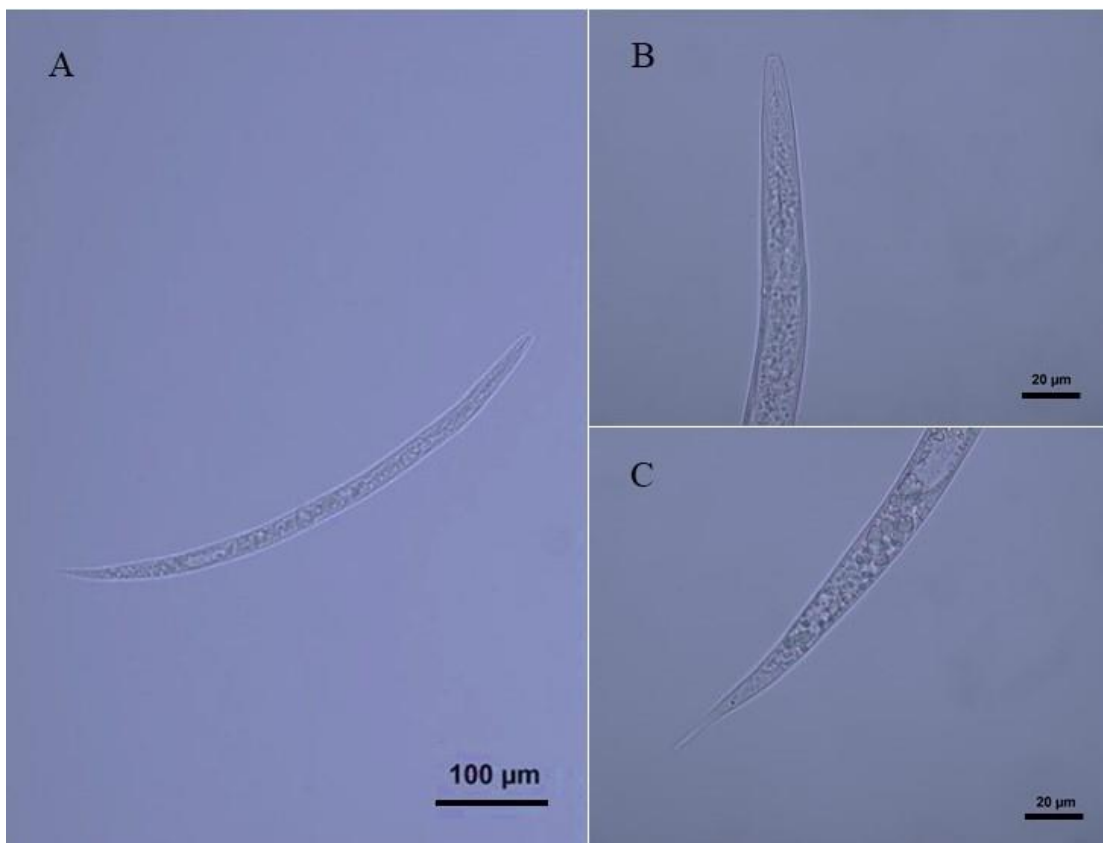
ภาพที่ 10 จำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่แยกได้จากดิน 150 กรัม (A) และรากข้าว 10 กรัม (B) ในแปลงข้าวอำเภอหนองเสือ (PN 1,2) ัญบุรี (PT 1,2) ลำลูกกา (PL 1,2) คลองหลวง (PK 1,2) เมือง (PM 1,2), สามโคก (PS 1,2) และลาดหลุมแก้ว (PLA1,2) จังหวัดปทุมธานี

2. การระบุชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชหลักในนาข้าวโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.1 ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp.

จากการวัดขนาดของไส้เดือนฝอยรากปมตัวอ่อนระยะที่ 2 พบว่าความยาวของลำตัวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 427.0–501.0 ไมโครเมตร stylet มีความยาวเท่ากับ 13.1–15.7 ไมโครเมตร ความกว้างของลำตัวเท่ากับ 13.0–17.3 ไมโครเมตร ความยาวหางเท่ากับ 65.0–98.0 ไมโครเมตร ความกว้างบริเวณหางเท่ากับ 8.0–12.0 ไมโครเมตร บริเวณหางมีลักษณะมน เป็นรูปกรวย (conoid) และเป็นติ่งใส (ภาพที่ 11) ส่วนค่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีดังนี้ $a = 26.7\text{--}35.3$, $b = 5.0\text{--}6.4$, $c = 4.8\text{--}7.1$ และ $c' = 6.1\text{--}9.2$ (ตารางที่ 4) ส่วนไส้เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัยเพศผู้มีความยาวลำตัวเท่ากับ 1,060.0–1,734.0 ไมโครเมตร stylet ยาวเท่ากับ 18.0–22.0 ไมโครเมตร ความยาวของหลอดอาหาร 167.0–274.0 ไมโครเมตร ความกว้างลำตัว 26.0–31.0 ไมโครเมตร หางมีลักษณะโค้งมน (bluntly rounded) ที่มีความยาวเท่ากับ 9.0–13.0 ไมโครเมตร ความกว้างหาง 19.0–23.0 ไมโครเมตร ความยาว spicule 21.0–23.0 ไมโครเมตร (ภาพที่ 12) ส่วนค่าลักษณะทางสัณฐานวิทยามีดังนี้ $a = 40.8\text{--}62.0$, $b = 7.5\text{--}16.8$, $b' = 3.9\text{--}8.1$, $c = 117.8\text{--}155.3$ และ $c' = 0.45\text{--}0.57$ (ตารางที่ 5) ซึ่งผลการทดลองการวัดขนาดของไส้เดือนฝอยรากปมตัวอ่อนระยะที่ 2 และตัวเต็มวัยเพศผู้สอดคล้องกับรายงานของกนกทิพย์ ทะสือ และคณะ (2562) และ Salatia และคณะ (2017) ที่รายงานว่าลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะของไส้เดือนฝอย *M. graminicola*

ลักษณะรอยหยักส่วนก้นของไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานีพบว่ามีความกลมเป็นรูปไข่ (oval shaped) ไม่พบ lateral line (ภาพที่ 13) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเหมือนกับลักษณะรอยหยักส่วนก้นของ *M. graminicola* ที่รายงานโดย Hunt และ Handoo (2009) แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองการระบุชนิดจะถูกยืนยันอีกครั้งด้วยการใช้วิธีทางอนุชีววิทยา

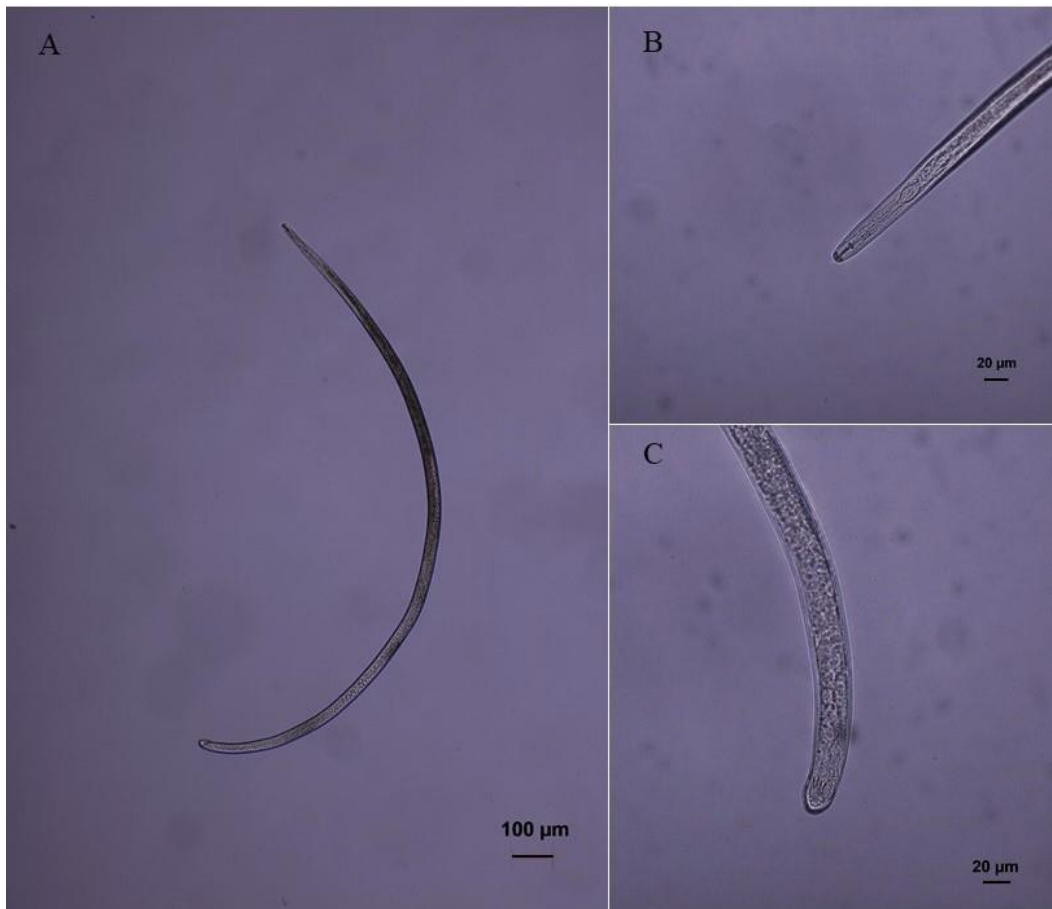


ภาพที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากปมตัวอ่อนระยะที่ 2 (*Meloidogyne graminicola*) ที่พบในแปลงข้าวอำเภอสามโคกจังหวัดปทุมธานี; A คือภาพเต็มตัว (400x); B คือภาพส่วนหัว (1000x) และ C คือภาพส่วนหาง (1000x)

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne graminicola* ตัวอ่อนระยะที่ 2 ที่พบในแปลงข้าวอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี

Character	<i>Meloidogyne graminicola</i> (This study)	<i>Meloidogyne graminicola</i> (Salalia <i>et al.</i> , 2017)
n	20	15
L	477.6±20.4 ¹ μm (427–501)	484.6 μm (408.3–568.3)
a	31.9±2.2 (26.7–35.3)	32.4 (27.1–37.4)
b	5.8±0.4 (5.0–6.4)	5.9 (5.2–6.3)
c	5.7±0.7 (4.8–7.1)	6.4 (6.1–6.8)
c'	7.8±0.8 (6.1–9.2)	7.1 (5.4–8.5)
Stylet length	14.1±0.6 μm (13.1–15.7)	11.4 μm (11.0–12.0)
Maximum body width	15.1±1.2 μm (13.0–17.3)	14.9 μm (14.0–16.0)
Pharynx length	82.6±7.8 μm (69.0–97.0)	82.0 μm (71.0–92.0)
Maximum tail width	10.9±1.0 μm (8.0–12.0)	10.7 μm (10.0–12.0)
Tail length	84.6±9.8 μm (65.0–98.0)	75.3 μm (64.0–92.0)

¹ค่าเฉลี่ย±SD (ค่าต่ำสุด–ค่าสูงสุด)

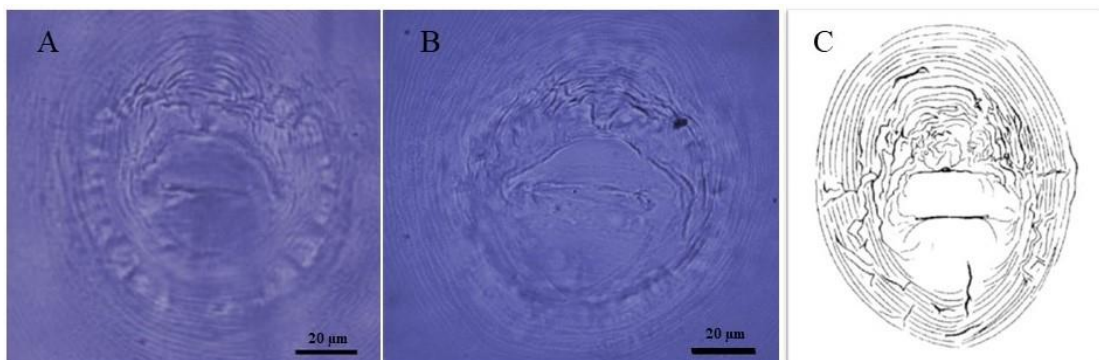


ภาพที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola* ตัวเต็มวัยเพศผู้ที่พบในแปลงข้าวอำเภอสามโคกจังหวัดปทุมธานี; A คือภาพเต็มตัว (100x); B คือภาพส่วนหัว (400x) และ C คือภาพส่วนหาง (400x)

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne graminicola* ตัวเต็มวัยเพศผู้ที่พบในแปลงข้าวอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี

Character	<i>Meloidogyne graminicola</i> (This study)	<i>Meloidogyne graminicola</i> (Salalia <i>et al.</i> , 2017)
n	4	10
L	1,393.0±289.3 ¹ µm (1,060.0–1,734.0)	1,261.0 µm (1,116.0–1,445.7)
a	48.8±9.3 (40.8–62.0)	41.7 (36.8–51.6)
b	13.5±4.1 (7.5–16.8)	–
b'	6.9±2.0 (3.9–8.1)	6.1 (5.7–6.6)
c	135.4±15.4 (117.8–155.3)	126.5 (108.8–150.7)
c'	0.49±0.10 (0.45–0.57)	0.58 (0.5–0.6)
Stylet length	20.0±1.7 µm (18.0–22.0)	18.1 µm (17.0–19.0)
Maximum body width	29.0±2.1 µm (26.0–31.0)	30.4 µm (28.0–33.0)
Pharynx length	211.0±46.7 µm (167.0–274.0)	218.8 µm (187.0–248.0)
Anterior end to PIJ	108±25.3 µm (87.0–141.0)	–
Maximum tail width	21.0±1.6 µm (19.0–23.0)	17.8 µm (17.0–19.0)
Tail length	10.0±1.7 µm (9.0–13.0)	10.0 µm (9.0–11.0)
Spicule length	22.0±1.2 µm (21.0–23.0)	28.2 µm (26.0–30.0)

¹ค่าเฉลี่ย±SD (ค่าต่ำสุด–ค่าสูงสุด)

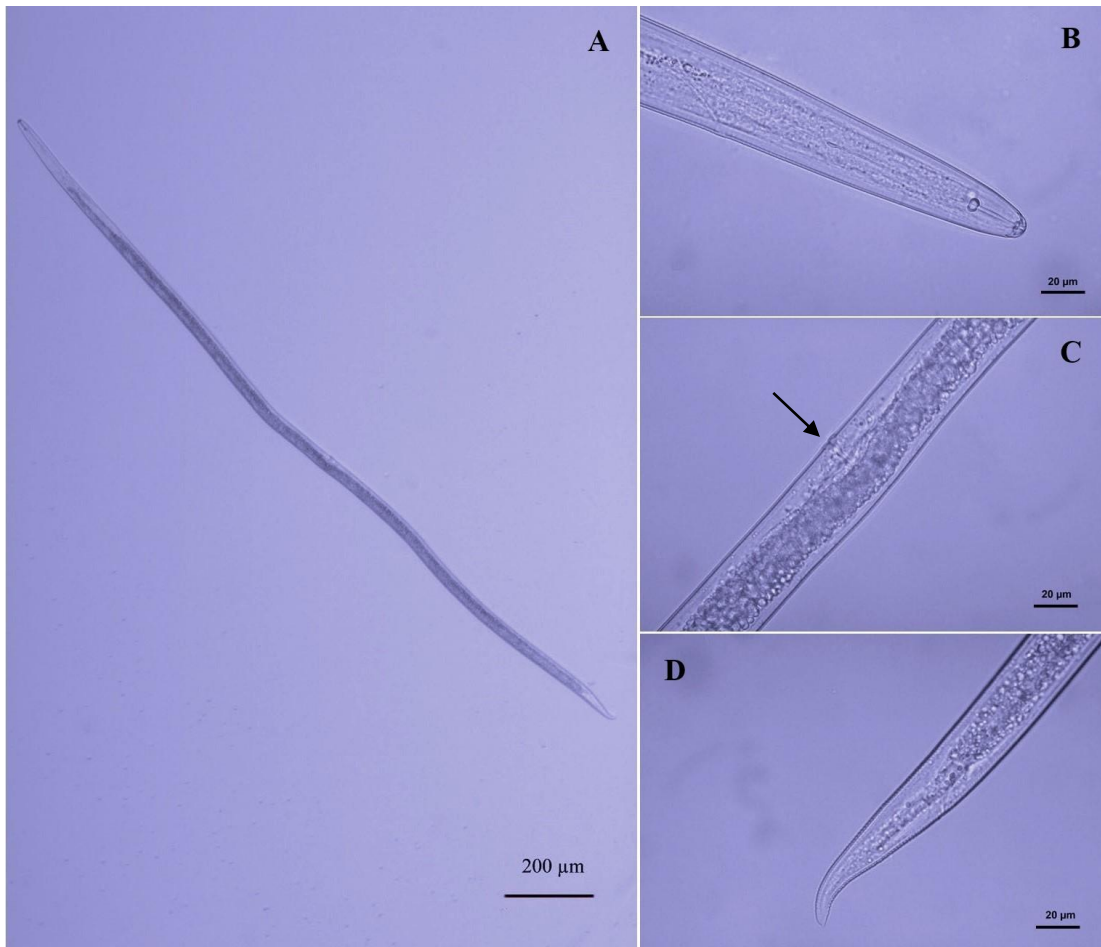


ภาพที่ 13 ลักษณะรอยหยักส่วนกันของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola* ตัวเต็มวัย เพศเมีย (A, B) ที่พบในแปลงข้าวอำเภอสามโคกจังหวัดปทุมธานีเปรียบเทียบกับรอยหยักส่วนกันของ *M. graminicola* (C) ที่รายงาน โคน Hunt และ Handoo (2009)

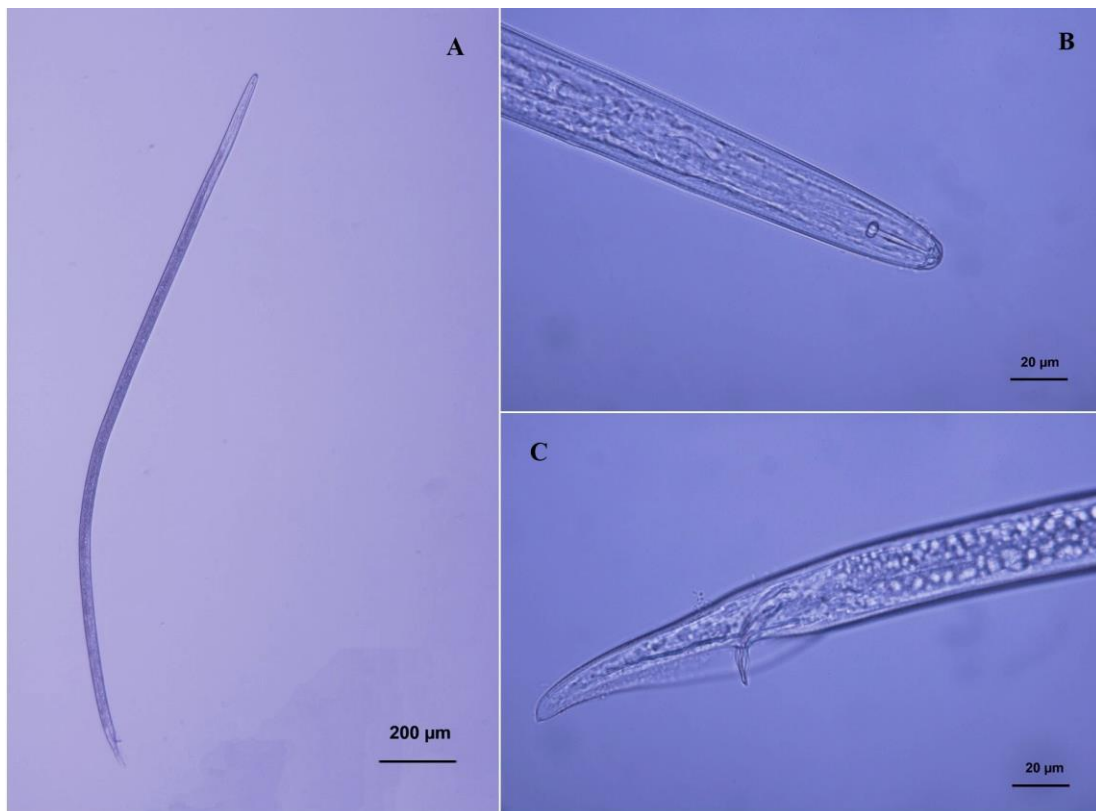
2.2 ไส้เดือนฝอยรากข้าว *Hirschmanniella* sp.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella* sp. เพศผู้และเพศเมีย พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 14 และ 15) ความยาวของลำตัวอยู่ในช่วง 1,639.0–2,329.0 ไมโครเมตร stylet ยาว 24.0–27.0 ไมโครเมตร basal knob มีลักษณะกลม ริมฝีปากดำเห็นชัด ค่า PIU อยู่ในช่วง 105.0–147.0 ไมโครเมตร ส่วนบริเวณซอ้นทับของลำไส้และ pharyngeal มีลักษณะยาว ความยาวของหลอดอาหารเท่ากับ 217.0–431.0 ไมโครเมตร ส่วนหางพบที่มีความยาวเท่ากับ 65.0–108.0 ไมโครเมตร และความกว้างหางเท่ากับ 15.0–25.0 ไมโครเมตร บริเวณปลายหางมีลักษณะเป็นดิ่งที่เรียกว่า mucron สำหรับไส้เดือนฝอยรากข้าวเพศผู้จะเห็น bursa และ spicule ชัดเจน ในขณะที่เพศเมียมีอวัยวะสืบพันธุ์อยู่บริเวณกึ่งกลางของลำตัว (ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของลำตัว) และมีรังไข่ทั้งหมด 2 อัน

ค่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบดังนี้ $L = 1,639.0\text{--}2,329.0$ ไมโครเมตร $V = 49.2\text{--}57.3\%$ $a = 52.4\text{--}72.8$ $b = 12.4\text{--}19.0$ $b' = 4.2\text{--}8.7$ $c = 17.5\text{--}30.0$ และ $c' = 3.1\text{--}6.0$ (ตารางที่ 6) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องรายงานของ Khun และคณะ (2015) ที่รายงานว่าลักษณะดังกล่าวที่พบเป็นลักษณะของไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella mucronata* ในแปลงข้าวจังหวัดตะกั่วป่า ประเทศกัมพูชา ในปี พ.ศ. 2005 Bridge และคณะรายงานว่าพบไส้เดือนฝอยรากข้าว *H. oryzae* ในประเทศไทย ซึ่งพบว่าความแตกต่างระหว่าง *H. mucronata* และ *H. oryzae* คือไส้เดือนฝอย *H. oryzae* มีขนาดตัว (1,090.0–1,330.0 ไมโครเมตร) และ stylet (15.0–17.0 ไมโครเมตร) สั้นกว่าไส้เดือนฝอย *H. mucronata* (Chen et al., 2006) แต่อย่างไรก็ตามผลการระบุชนิดดังกล่าวถูกยืนยันด้วยการใช้วิธีทางอนุชีววิทยาอีกครั้งเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความแม่นยำมากกว่าวิธีทางสัณฐานวิทยา



ภาพที่ 14 ภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella mucronata* เพศเมียแยกได้จากแปลงข้าวในจังหวัดปทุมธานี; A: ภาพเต็มตัว (100×); B: ภาพส่วนหัว (1000×); C: ภาพแสดงอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (1000×); D: ภาพส่วนหาง (1000×)



ภาพที่ 15 ภาพลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella mucronata* เพศผู้ที่แยกได้จากแปลงข้าวในจังหวัดปทุมธานี; A: ภาพเต็มตัว (100×); B: ภาพส่วนหัว (1000×); C: ภาพส่วนหาง (1000×).

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella mucronata* ที่แยกได้จากแปลงข้าวในจังหวัดปทุมธานี

Character	<i>Hirschmanniella mucronata</i> (This study)		<i>H. mucronata</i> Takeo, Cambodia (Khun <i>et al.</i> , 2015)	
	Female	Male	Female	Male
n	24	24	30	21
L	2,023.0±140 ¹ μm (1,779.0–2,329.0)	1,864.0±131 μm (1,639.0–2,221.0)	1,775.0±188 μm (1,260.0–2,160.0)	1,734.0±186 μm (1,421.0–2,109.0)
V (%)	53.0±1.7 (49.2–57.3)	–	52.0±2.3 (49.0–59.0)	–
a	63.7±4.2 (55.8–72.8)	63.8±6 (52.4–75.5)	58.0±5.2 (47.0–67.0)	59.0±7.6 (45.0–81.0)
b	16.0±1.2 (19.0–14.0)	14.5±1.4 (12.4–18.5)	14.0±1.1 (12.0–16.0)	13.9±1.7 (11.0–16.7)
b'	6.1±1.1 (4.8–8.7)	5.5±0.6 (4.2–7.0)	5.9±0.7 (4.4–7.4)	5.8±0.7 (4.5–7.0)
c	23.6±3 (18.0–30.0)	22.3±2.3 (17.5–26.7)	22.0±2.7 (16.0–28.0)	21.0±2.2 (17.0–25.0)
c'	4.0±0.4 (3.1–4.6)	4.5±0.6 (3.6–6.0)	3.7±0.4 (2.8–5.0)	4.4±0.4 (3.5–5.1)
Stylet length	25.8±1.0 μm (24.0–27.0)	25.7±1.1 μm (24.0–27.0)	22.2±0.6 μm (21.0–23.0)	23.0±1.2 μm (21.0–26.0)
Maximum body width	31.8±2.2 μm (27.0–35.0)	29.4±2.5 μm (23.0–34.0)	30.5±2.3 μm (25.0–35.0)	30.0±3.6 μm (22.0–35.0)
Pharynx length	338.4±51.2 μm (217.0–417.0)	341.4±39.1 μm (263.0–431.0)	300.0±40 μm (229.0–399.0)	299.0±38.0 μm (215.0–371.0)
Anterior end to PIJ	127.7±5.5 μm (117.0–140.0)	128.9±10.5 μm (105.0–147.0)	124.0±12.0 μm (147–184)	125.0±10.9 μm (108.0–144.0)
Anterior to vulva length	1,077.3±65.5 μm (958.0–1,188.0)	–	936.0±104 μm (630.0–1,160.0)	–
Spicules length	–	31.9±1.9 μm (29.0–36.0)	–	34.0±1.6 μm (31.0–37.0)
Maximum tail width	21.8±1.8 μm (19.0–25.0)	18.9±2.1 μm (15.0–22.0)	22.0±2.3 μm (18.0–27.0)	18.5±1 μm (16.0–20.0)
Tail length	86.5±7.9 μm (74.0–102.0)	84.3±9 μm (65.0–108.0)	81.0±8.2 μm (60.0–99.0)	82.6±9.9 μm (63.0–98.0)

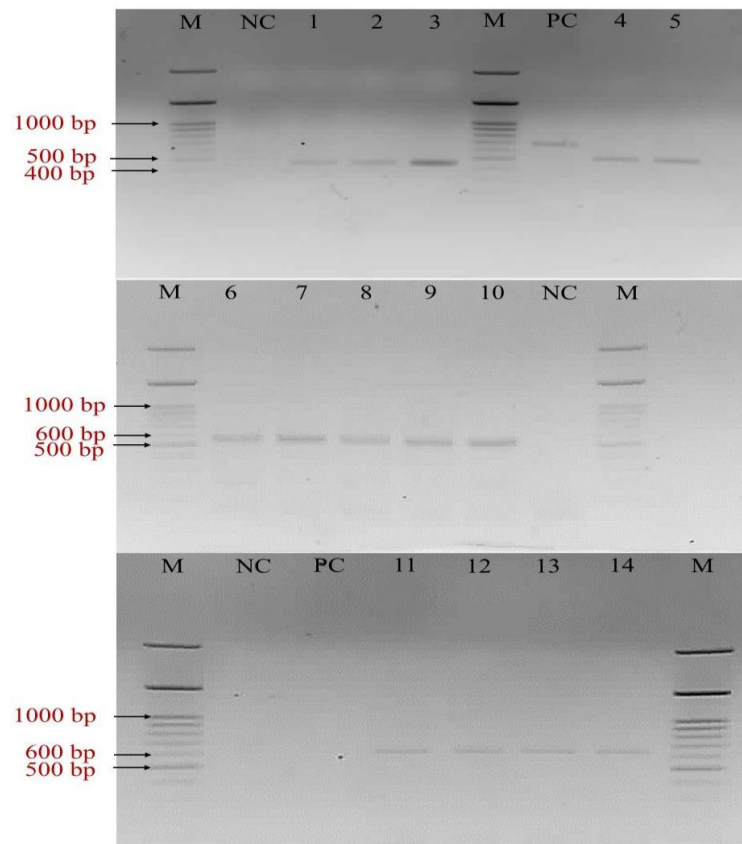
¹ค่าเฉลี่ย±SD (ค่าต่ำสุด–ค่าสูงสุด)

3. การระบุชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชหลักในนาข้าวโดยใช้วิธีอณูชีววิทยา

3.1 ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* sp.

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s พบว่าดีเอ็นเอมีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 450 คู่เบส (ภาพที่ 16) สอดคล้องกับรายงานของ Bellé และคณะ (2019) ที่รายงานขนาดดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปมเท่ากับ 439 คู่เบสเมื่อใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s จากนั้นนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่ามีความเหมือนกับไส้เดือนฝอย *M. graminicola* เท่ากับ 98–99 เปอร์เซ็นต์ และทำการบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ได้เลขการเข้าถึงฐานข้อมูล GenBank คือ MT271019–MT271021 (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ผลของการศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยรากปมบริเวณ 18S-ITS1-5.8S แสดงให้เห็นว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกได้จากอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานีอยู่ในกลุ่มเดียวกับไส้เดือนฝอย *M. graminicola* ที่แยกได้จากประเทศเวียดนามที่มีค่า bootstrap values มากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 17)

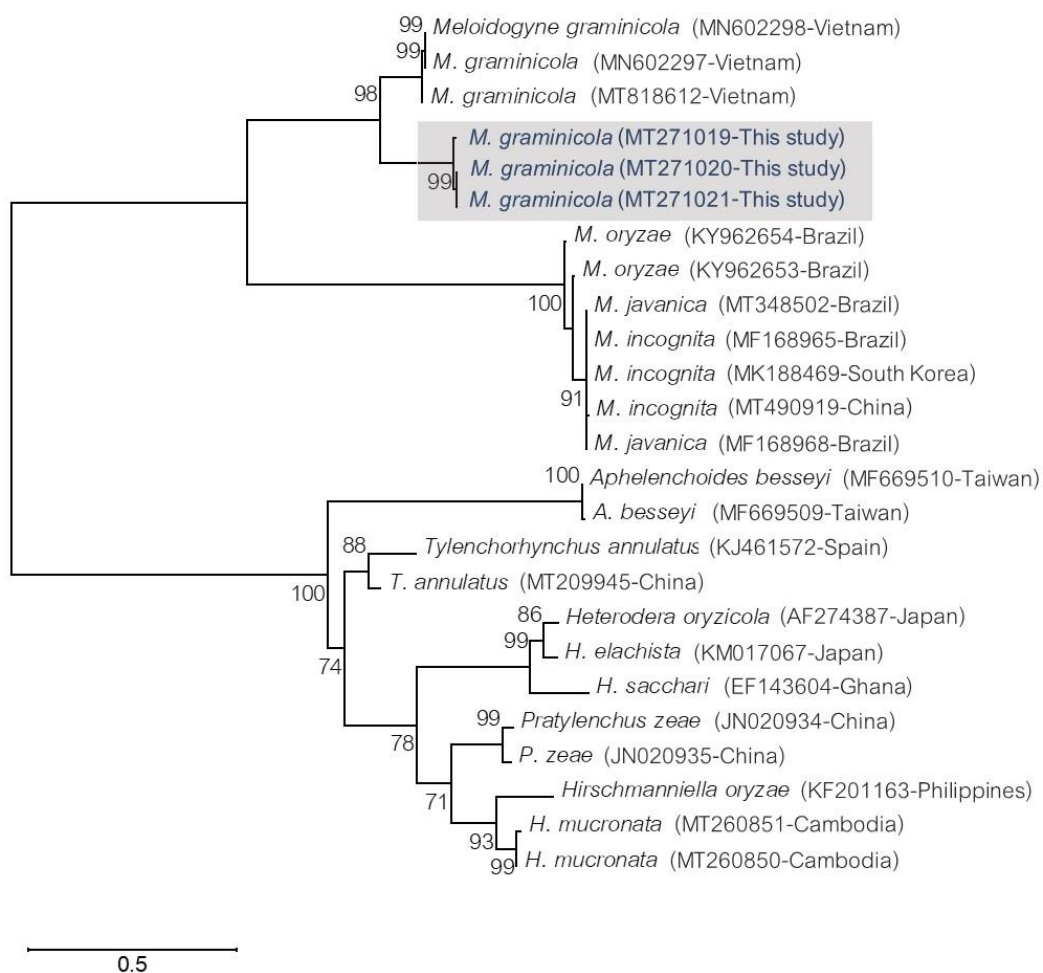
นอกจากนี้ยังได้ทำการยืนยันสกุลของไส้เดือนฝอยรากปมด้วยการใช้ไพรเมอร์จำเพาะ C₂F₃/1108 ซึ่งพบว่าไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิดจะมีขนาดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน การศึกษานี้พบขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 520 คู่เบส (ภาพที่ 16) ซึ่งเป็นลักษณะของไส้เดือนฝอย *M. graminicola* ที่ถูกรายงาน โดย Long และคณะ (2017) ในประเทศจีน ในปัจจุบันพบว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่เข้าทำลายข้าวมีอยู่ 2 ชนิดในเขตประเทศแถบทวีปเอเชียคือ *M. graminicola* และ *M. incognita* (Ruanpanun and Khun-In, 2015) ซึ่งพบว่าหากใช้ไพรเมอร์ C₂F₃/1108 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไส้เดือนฝอย *M. incognita* จะมีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 1,500–1,600 คู่เบส (Powers and Harris, 1993) ส่วนการใช้ SCAR-MgFW/ SCAR-MgRev พบว่ามีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 650 คู่เบส (ภาพที่ 16) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bellafiore และคณะ (2015) ที่รายงานว่าไส้เดือนฝอยดังกล่าวเป็นไส้เดือนฝอย *M. graminicola* ดังนั้นจากการระบุชนิดด้วยการใช้ 3 ไพรเมอร์จึงยืนยันได้ว่าไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในแปลงข้าวนาอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี คือไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola*



ภาพที่ 16 ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัย *Meloidogyne graminicola* โดยใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s (ช่อง 1-3), C₂F₃/1108 (ช่องที่ 4-10) และ SCAR-MgFW/ SCAR-MgRev (ช่องที่ 11-14) ทำการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างโดยใช้ gel electrophoresis ใน 1.5% (w/v) agarose gel; M : DNA marker (100 bp DNA ladder RTU); NC: Negative control (ไม่ได้ดีเอ็นเอต้นแบบ); PC : Positive control (ดีเอ็นเอต้นแบบของ *Meloidogyne enterolobii*)

ตารางที่ 7 หมายเลขการเข้าถึงฐานข้อมูลยีนของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne graminicola* ที่ได้ทำการบันทึกลงใน GenBank

ชนิดของไส้เดือนฝอย	สายพันธุ์ (isolate)	ตำแหน่ง (Location)	บริเวณยีน (Sequenced region)	GenBank accession number
<i>Meloidogyne graminicola</i>	PS1	สามโลก	18S-ITS1-5.8S	MT271019
<i>M. graminicola</i>	PS2	สามโลก	18S-ITS1-5.8S	MT271020
<i>M. graminicola</i>	PS3	สามโลก	18S-ITS1-5.8S	MT271021

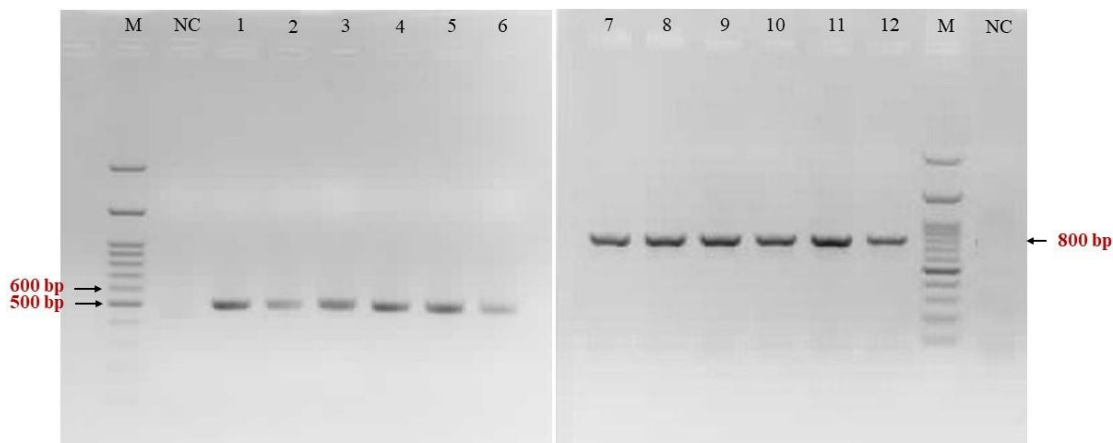


ภาพที่ 17 การศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยรากปมที่พบในแปลงข้าวอำเภอสามโลก จังหวัดปทุมธานีบนตำแหน่ง 18S-ITS1-5.8S เปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในข้าวที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยการใช Maximum likelihood method

3.2 ไล้เดือนฝอยรากข้าว *Hirschmanniella* sp.

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณ 18S-ITS1-5.8S และ 28S rRNA ด้วยการใส่ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s และ D2A/D3B พบว่าดีเอ็นเอมีขนาดเท่ากับ 470 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 18) สอดคล้องกับรายงานของ Beesa (2020) และ Berg และคณะ (2009) ที่รายงานขนาดดีเอ็นเอของไล้เดือนฝอย *Hirschmanniella* sp. ที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s และ D2A/D3B มีขนาดเท่ากับ 470 และ 750 คู่เบส ตามลำดับ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ผลพบว่ามี ความเหมือนกับไล้เดือนฝอย *H. mucronata* มากกว่า 98-99 เปอร์เซ็นต์ ทั้งบริเวณยีน 18S-ITS1-5.8S และ 28S rRNA จากนั้นทำการบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ลงในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ได้เลขการเข้าถึงฐานข้อมูล GenBank คือ MT597911–MT597916 สำหรับยีน 28S rRNA และ MT602628–MT602633 สำหรับ 18S-ITS1-5.8S (ตารางที่ 8)

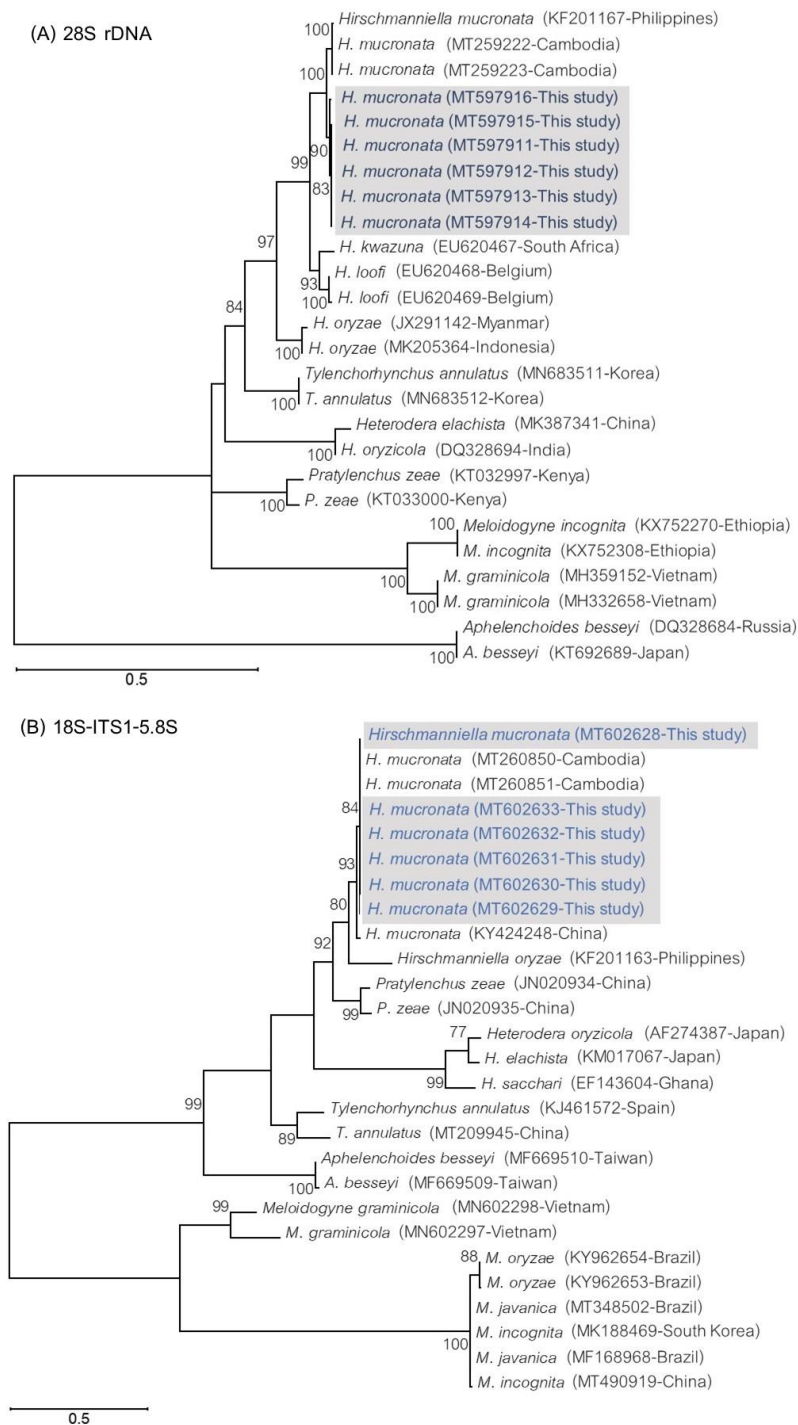
การศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไล้เดือนฝอยรากข้าวที่พบเปรียบเทียบกับไล้เดือนฝอยศัตรูพืชที่เข้าทำลายข้าวที่ได้จาก GenBank ผลพบว่าไล้เดือนฝอยรากข้าวถูกจัดอยู่ในกลุ่มของไล้เดือนฝอย *H. mucronata* ที่มีค่า bootstrap values มากกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ ทั้งตำแหน่ง 18S-ITS1-5.8S และ 28S rRNA และมีความเกี่ยวข้องเป็นพี่น้อง (sister group) กับกลุ่มของไล้เดือนฝอย *H. kwazuma* และ *H. loofi* นอกจากนี้ยังพบว่าไล้เดือนฝอย *H. oryzae* อยู่ต่างกลุ่มกับไล้เดือนฝอย *H. mucronata* (ภาพที่ 19) สอดคล้องกับรายงานของ Pascual และคณะ (2014) และ Khun และคณะ (2015) ที่รายงานว่าชิ้นส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ (single nucleotide polymorphisms) ของ *H. mucronata* ที่บริเวณ 28S rRNA ต่างจากไล้เดือนฝอย *H. kwazuma* และ *H. loofi* ประมาณ 7.7–8.3 เปอร์เซ็นต์ และ 8.1–8.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 มีความต่างกันประมาณ 22.8–23.4 เปอร์เซ็นต์ และ 22.7–23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไล้เดือนฝอย *H. oryzae* อยู่ต่างกลุ่มกับไล้เดือนฝอย *H. mucronata*



ภาพที่ 18 ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัย *Hirschmanniella* sp. โดยใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s และ D2A/D3B และตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างโดยใช้ gel electrophoresis ใน 1.5% (w/v) agarose gel; M : DNA marker (100 bp DNA ladder RTU); NC: Negative control (ไม่ได้ดีเอ็นเอต้นแบบ); ช่องที่ 1-6 : *Hirschmanniella* sp. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ rDNA2/rDNA1.58s; ช่องที่ 7-12 : *Hirschmanniella* sp. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ D2A/D3B

ตารางที่ 8 หมายเลขการเข้าถึงข้อมูลยีนของไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella mucronata* ที่ได้ทำการบันทึกลงในฐานข้อมูล GenBank

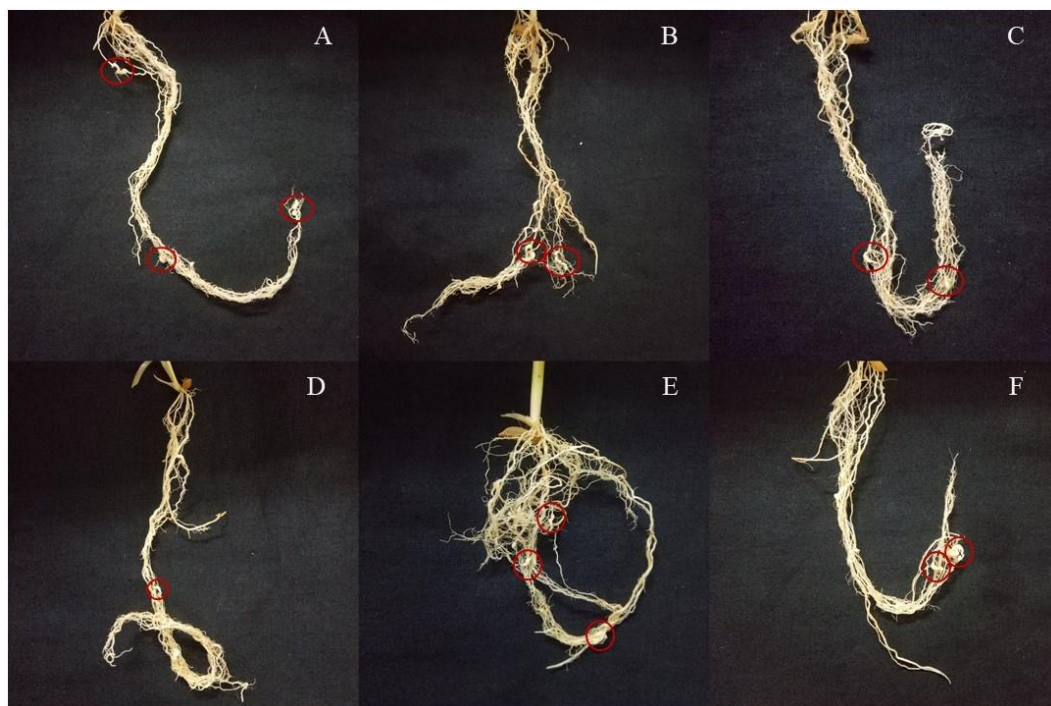
ชนิดไส้เดือนฝอย	สายพันธุ์ (isolate)	ตำแหน่ง (Location)	บริเวณยีน (Sequenced region)	GenBank accession number
<i>H. mucronata</i>	PN	หนองเสือ	28S	MT597911
<i>H. mucronata</i>	PT	ชัยบุรี	28S	MT597912
<i>H. mucronata</i>	PL	ลำลูกกา	28S	MT597913
<i>H. mucronata</i>	PK	คลองหลวง	28S	MT597914
<i>H. mucronata</i>	PM	อำเภอเมือง	28S	MT597915
<i>H. mucronata</i>	PS	สามโคก	28S	MT597916
<i>H. mucronata</i>	PN	หนองเสือ	18S-ITS1-5.8S	MT602628
<i>H. mucronata</i>	PT	ชัยบุรี	18S-ITS1-5.8S	MT602629
<i>H. mucronata</i>	PL	ลำลูกกา	18S-ITS1-5.8S	MT602630
<i>H. mucronata</i>	PK	คลองหลวง	18S-ITS1-5.8S	MT602631
<i>H. mucronata</i>	PM	อำเภอเมือง	18S-ITS1-5.8S	MT602632
<i>H. mucronata</i>	PS	สามโคก	18S-ITS1-5.8S	MT602633



ภาพที่ 19 การศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไส้เดือนฝอยรากข้าว *Hirschmanniella mucronata* ที่พบจากแปลงข้าวอำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานีบนตำแหน่งยีน (A) 28S rDNA และ (B) 18S-ITS1-5.8S เปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในข้าวที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยการใช Maximum likelihood method

4. การศึกษาการตอบสนองของข้าวต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมข้าว

หลังจากปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยรากปมในข้าวเป็นเวลา 15 วัน พบว่าไส้เดือนฝอยรากปมสามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกสายพันธุ์โดยมีลักษณะปมเป็นตะขอดังภาพที่ 20 การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าข้าวทุกพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบมีความอ่อนแอต่อไส้เดือนฝอยรากปมโดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่พบจำนวนปมและดัชนีการเกิดปมสูงที่สุด แม้ว่าค่า Reproduction factor (Rf) ไม่มีแตกต่างทางสถิติกับข้าวพันธุ์ กข43 และ กข57 แต่ก็อยู่ในกลุ่ม Rf สูง (ตารางที่ 9) ในขณะที่ข้าวพันธุ์ กข6 เป็นข้าวที่มีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมมากที่สุดเนื่องจากมีค่าดัชนีการเกิดปมต่ำที่สุด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนปมไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 และค่า Rf ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 และปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นข้าวที่มีความอ่อนแอปานกลางต่อไส้เดือนฝอยรากปม (ตารางที่ 9) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ ลือชัย อารยะรังสฤษฎ์ (2528) ที่รายงานว่าข้าวพันธุ์ กข6 เป็นข้าวพันธุ์ที่ค่อนข้างมีความต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปมโดยพบจำนวนตัวและไข่ น้อยกว่าพันธุ์ข้าวที่มีความอ่อนแอ อีกทั้งยังพบว่าตัวเต็มวัยเพศเมียและขนาดของไข่มีขนาดเล็กกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์อ่อนแอ บุญหงษ์ จงคิดและวุฒิชัย แดงทอง (2558) รายงานว่าไส้เดือนฝอย *M. graminicola* สามารถเข้าทำลายข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้ มีอัตราการเกิดปมเฉลี่ยเท่ากับ 2.4 ปม ในพื้นที่การเพาะปลูกข้าวอำเภอคลองหลวง อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานีและอำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก นอกจากนี้ กิตติพงษ์ ศรีม่วง และพรทิพย์ เรือนปานันท์ (2562) รายงานว่าพบประชากรไส้เดือนฝอย *M. graminicola* จำนวน 60 ตัวต่อดิน 40 กรัม ในแปลงข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 อำเภอเมือง จังหวัดนครนายก แต่อย่างไรก็ตามไม่พบการรายงานการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมในข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 กข43 และ กข57



ภาพที่ 20 ลักษณะอาการรากปมที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (A) ปทุมธานี 1 (B) สันป่าตอง 1 (C) กข6 (D) กข43 (E) และ กข 57 (F)

ตารางที่ 9 การประเมินความต้านทานของข้าวต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola*

พันธุ์ข้าว	จำนวนปม (Gall no.)	ดัชนีการเกิดปม (Gall index)	การตอบสนอง (Reaction)	Reproduction factor (Rf)
ขาวดอกมะลิ 105	11.9±1.9a ¹	54.0	S ²	33.92±3.2a
ปทุมธานี 1	6.3±0.9c	42.0	MS	11.93±3.1b
สันป่าตอง 1	5.4±0.6cd	40.0	MS	15.1±2.2b
กข 6	3.2±0.5d	30.0	MS	10.02±3.5b
กข 43	6.3±0.6c	40.0	MS	27.35±3.6a
กข 57	9.2±0.9b	48.0	MS	25.92±4.8a

¹ ค่าเฉลี่ย ± SE (n=10) ถูกเปรียบเทียบกันด้วยการใช้ Duncan adjustment for multiple comparisons ตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

² MS หมายถึงข้าวมีความอ่อนแอปานกลางต่อไส้เดือนฝอยรากปม; S หมายถึงข้าวมีความอ่อนแอต่อไส้เดือนฝอยรากปม

5. การตรวจสอบการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยรากปมภายในรากข้าว

จากการข้อมเนื้อเยื่อรากข้าวที่ระยะเวลา 2 วันหลังจากการปลูกไส้เดือนฝอยรากปมผล พบว่ามีการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยในข้าวทุกพันธุ์ค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 5.1–9.8 ตัว (ตารางที่ 10 และภาพที่ 21) โดยพบว่าข้าวพันธุ์ กข6 ปทุมธานี 1 และสันป่าตอง 1 มีการเข้าทำลายน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ จำนวน 5.1, 5.2 และ 6.5 ตัว ตามลำดับ และเมื่อข้อมรากที่ 14 วันพบว่ามีการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมเท่ากับ 6.4–11.5 ตัว โดยพันธุ์ข้าวที่มีการตอบสนองการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมมากที่สุดคือข้าวพันธุ์ กข6 และปทุมธานี 1 เนื่องจากมีการเข้าทำลายน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวพันธุ์ กข 6 ที่พบว่า 70.4 เปอร์เซ็นต์เป็นไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 3+4 และมีอัตราการสร้างกลุ่มไข่เพียง 0.8 กลุ่มเท่านั้น ส่วนข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ถึงแม้จะพบจำนวนการเข้าทำลายไม่แตกต่างทางสถิติกับข้าวพันธุ์ กข6 แต่อย่างไรก็ตามพบว่าประชากรส่วนใหญ่ที่พบเป็นเพศเมียตัวเต็มวัยมากกว่า 64.5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการสร้างกลุ่มไข่จำนวน 1.8 กลุ่ม หลังจากการปลูกไส้เดือนฝอยรากปม 14 วัน ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ ลือชัย อารยะรังสฤษฎ์ (2528) ที่รายงานว่าข้าวพันธุ์ กข6 เป็นข้าวที่ค่อนข้างมีความต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* โดยพบว่าการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยรากปมในรากข้าวมีขนาดของตัวเมีย ไข่และตัวอ่อนเล็กกว่าข้าวพันธุ์ที่มีความอ่อนแอ อีกทั้งผนังเซลล์ของ giant cell มีความบางและ

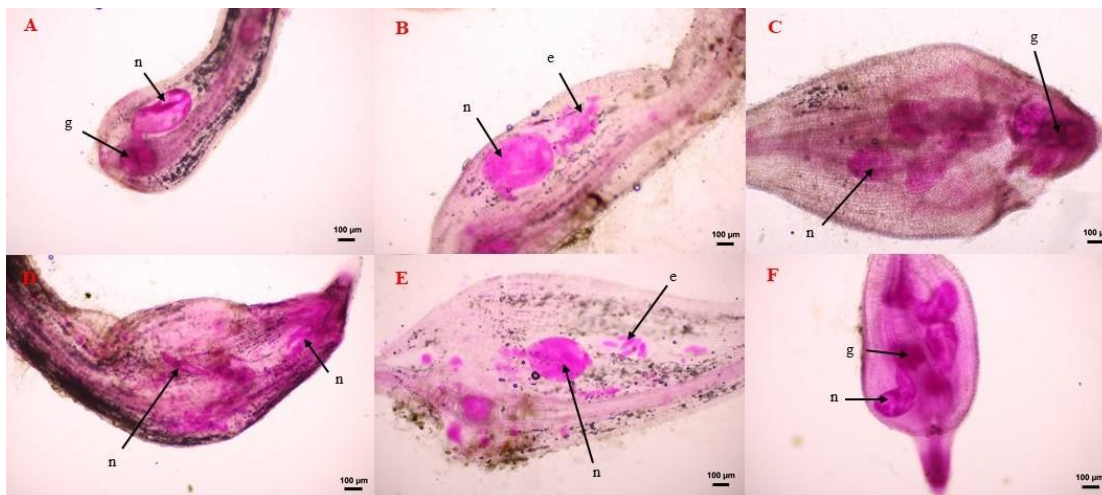
เล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวที่มีความอ่อนแอ ดังนั้นจึงได้เลือกข้าวพันธุ์ กข6 และข้าวดอกมะลิ 105 เพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษาการตอบสนองเชิงป้องกันต่อไป

ตารางที่ 10 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola* ภายในรากข้าวที่ระยะเวลา 2 วันและ 14 วัน

พันธุ์ข้าว	2 DAI ¹		14DAI		
	จำนวนไส้เดือนฝอยรากปมในราก	จำนวนไส้เดือนฝอยรากปมในราก	J3+J4 (%)	ตัวเต็มวัย (%)	กลุ่มไข่/ราก
ข้าวดอกมะลิ 105	9.8±1.1a ²	9.7±0.8ab	21.0±2.8c	79.0±2.8a	4.8±0.4a
ปทุมธานี 1	5.2±0.6c	6.4±0.4d	35.5±5.2b	64.5±5.2b	1.8±0.4cd
สันป่าตอง 1	6.5±1.0bc	8.5±0.8bc	58.6±2.7a	41.4±2.7c	1.3±0.3d
กข 6	5.1±0.6c	6.9±0.6cd	70.4±2.9a	29.6±2.9c	0.8±0.2d
กข 43	9.0±0.8a	8.7±1.1bc	36.5±5.4b	63.5±5.4b	2.7±0.4bc
กข 57	8.7±0.7ab	11.5±0.7a	30.4±5.6bc	69.6±5.6ab	3.6±0.6b

¹ DAI คือจำนวนวันหลังจากการปลูกไส้เดือนฝอยลงไปในพื้นที่บริเวณรากข้าว

² ค่าเฉลี่ย ± SE (n=10) ถูกเปรียบเทียบกันด้วยการใช้ Duncan adjustment for multiple comparisons ตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)



ภาพที่ 21 ลักษณะอาการรากปมข้าวที่ถูกย้อมด้วยการใช้ acid fuchsin หลังจากปลูกใส่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola* ที่ระยะเวลา 14 วัน; A คือข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105; B คือข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1; C คือข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1; D คือข้าวพันธุ์กข6; E คือข้าวพันธุ์กข43; F คือข้าวพันธุ์ กข57; n คือไข่เดือนฝอยรากปม *M. graminicola*; g คือ giant cell; e คือไข่ของไข่เดือนฝอยรากปม

6. การศึกษาการตอบสนองเชิงป้องกันของข้าวต่อการเข้าทำลายของไข่เดือนฝอยรากปมในสภาพห้องปฏิบัติการ

กิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในข้าวพันธุ์ กข6 ที่มีการปลูกใส่เดือนฝอยรากปม ที่ระยะเวลา 2 และ 3 วันพบปริมาณของเอนไซม์สูงกว่าในกรรมวิธีควบคุม (ไม่มีการปลูกใส่เดือนฝอยรากปม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในวันที่ 3 พบกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด 2.66×10^{-2} ยูนิตต่อรากสด 1 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบเพียง 0.66×10^{-2} ยูนิตต่อรากสด 1 กรัม เท่านั้น หลังจากนั้นที่ 4, 7, 10 และ 14 วันไม่พบความแตกต่างกันสถิติของทั้งสองกรรมวิธี ส่วนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติของทั้งสองกรรมวิธีในทุกช่วงเวลา (ภาพที่ 22)

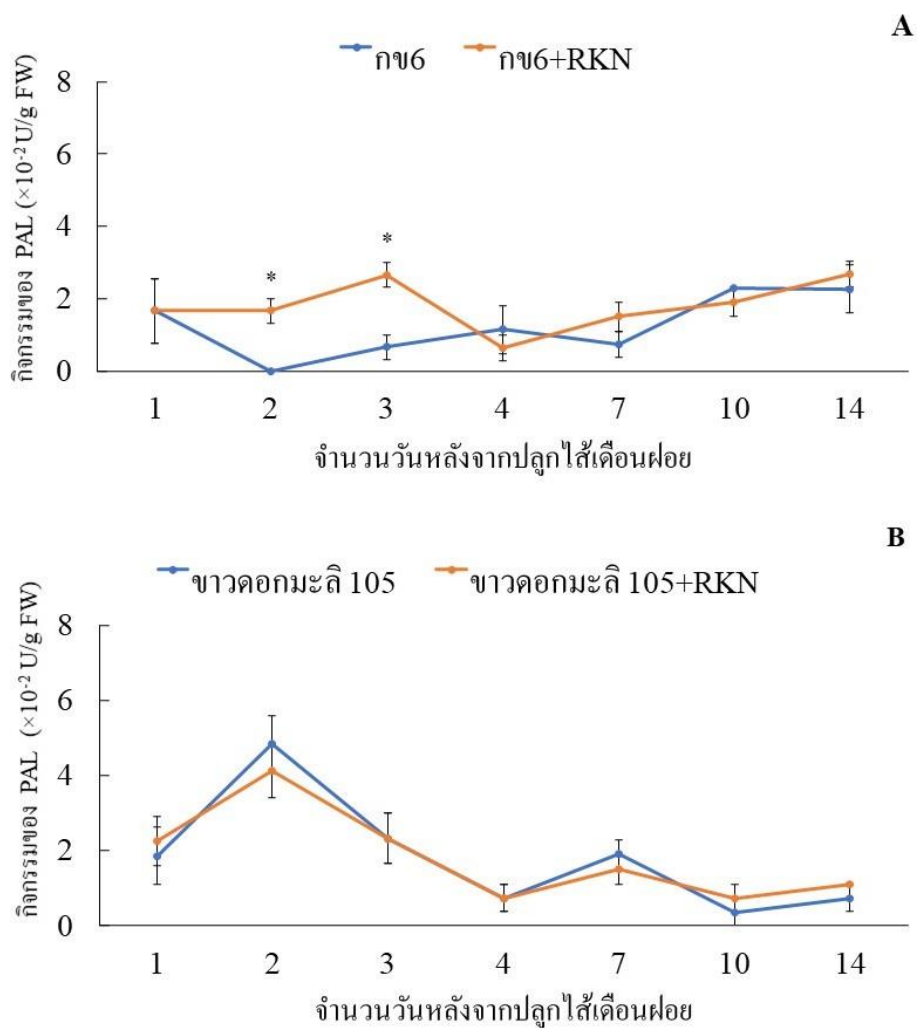
กิจกรรมของเอนไซม์ PPO พบว่าหลังจากการปลูกใส่เดือนฝอยรากปมในข้าวพันธุ์ กข6 ที่ระยะเวลา 1 และ 2 วันพบปริมาณเอนไซม์ (1.18 และ 2.37 ยูนิตต่อรากสด 1 กรัม) สูงกว่าในกรรมวิธีควบคุม (0 และ 0.59 ยูนิตต่อรากสด 1 กรัม ตามลำดับ) หลังจากนั้นพบว่าทั้งสองกรรมวิธีไม่มีแตกต่างกันทางสถิติยกเว้นที่ระยะเวลา 10 วันที่พบว่ากรรมวิธีควบคุมมีปริมาณเอนไซม์ PPO สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติของทั้งสองกรรมวิธีในทุกช่วงเวลา ยกเว้นที่ 4 และ 10 วันที่พบว่ากรรมวิธีควบคุมพบปริมาณเอนไซม์

PPO (2.96 และ 2.37 ยูนิตต่อรากสด 1 กรัม ตามลำดับ) สูงกว่าในกรรมวิธีที่มีการปลูกใส่เดือนฝอยรากปม (1.48 และ 0.59 ยูนิตต่อรากสด 1 กรัม ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 23)

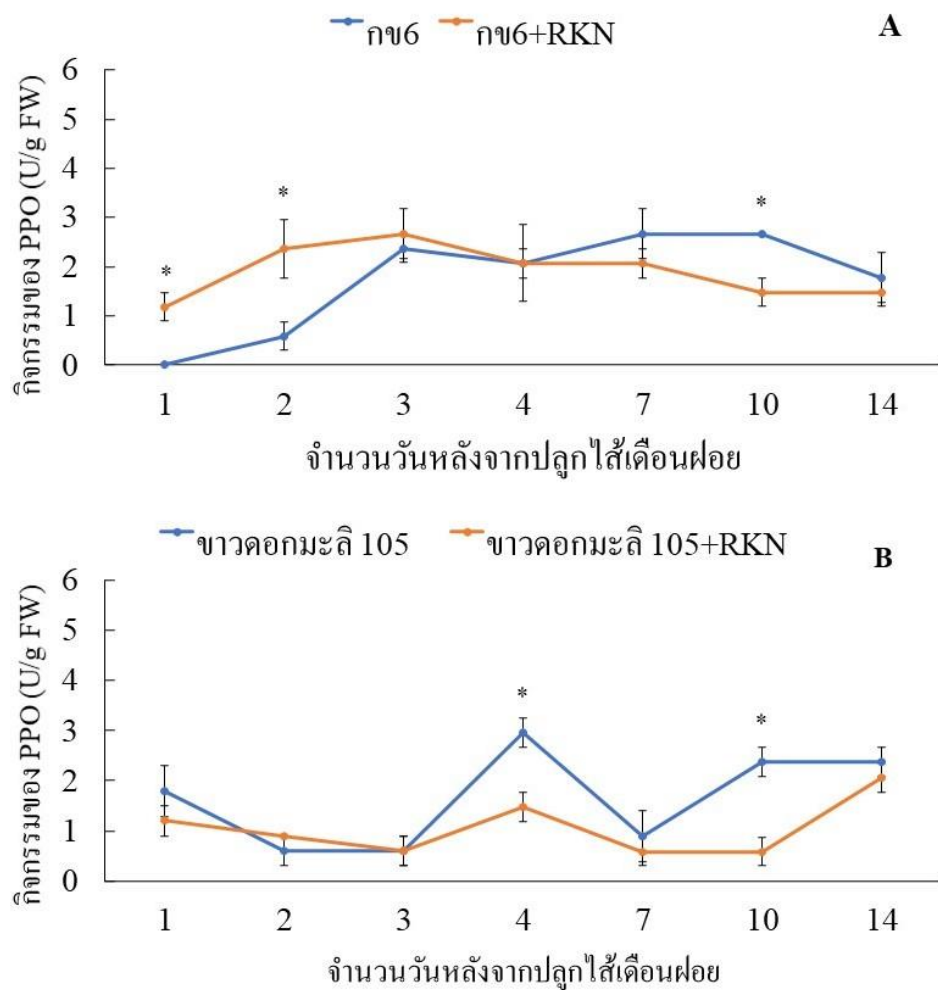
กิจกรรมของเอนไซม์ POD พบว่ากรรมวิธีที่มีปลูกใส่เดือนฝอยรากปมในข้าวพันธุ์ กข6 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระยะเวลา 2, 3, 7 และ 14 วัน โดยที่ 3 วันพบปริมาณเอนไซม์ POD สูงที่สุดเท่ากับ 395 ยูนิตต่อรากสด 1 กรัม ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมพบเพียง 238.3 ยูนิตต่อรากสด 1 กรัมเท่านั้น ที่ระยะเวลา 4 วันปริมาณเอนไซม์ในกรรมวิธีควบคุมสูงกว่ากรรมวิธีที่มีการปลูกใส่เดือนฝอยรากปมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนที่ระยะเวลา 1 และ 10 วัน ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติของทั้งสองกรรมวิธี ในขณะที่ข้าวพันธุ์อ่อนแอ (ข้าวดอกมะลิ 105) พบว่าปริมาณของเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของทั้งสองกรรมวิธีในช่วง 1, 2, 3 และ 4 วันหลังจากปลูกใส่เดือนฝอยรากปม และหลังจากนั้นที่ 7, 10 และ 14 วันผลพบว่าเป็นกรรมวิธีที่มีการปลูกใส่เดือนฝอยรากปมพบปริมาณเอนไซม์ POD สูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 24)

จากการศึกษาพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PAL, PPO และ POD ในข้าวพันธุ์ กข6 (ต้านทาน) เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ 1, 2 และ 3 วันหลังจากปลูกใส่เดือนฝอยรากปม ในขณะที่ข้าวพันธุ์อ่อนแอ (ข้าวดอกมะลิ 105) พบว่าส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกรรมวิธีที่มีการปลูกและไม่มีการปลูกใส่เดือนฝอยรากปม ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Duan และคณะ (2014) ที่ได้ทำการทดสอบความต้านทานของข้าวต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา *โคคสิ่น้ำตาล* พบว่าในข้าวพันธุ์ที่มีความต้านทาน (Kasalath) มีการสร้างกิจกรรมของเอนไซม์ PAL, PPO และ POD สูงกว่าในข้าวพันธุ์อ่อนแอ (Wuyujing 3) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระยะเวลา 2 และ 3 วันหลังจากถูกเชื้อรา *โคคสิ่น้ำตาล* เข้าทำลาย โดย PAL เป็นเอนไซม์ตัวแรกของ phenylpropanoid pathway ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ phenolics, phytoalexins และ lignins นอกจากนี้เอนไซม์ PPO และ POD สามารถออกซิไดซ์ phenolics กลายเป็นสารประกอบ phenolics เชิงซ้อน เช่น quinines และ tannins เป็นต้น Scott-Craig และคณะ (1995) รายงานว่า POD เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนิน โดยจะมีการสะสมเพิ่มมากขึ้นในพันธุ์พืชต้านทาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่มีการเข้าทำลายของเชื้อรา *Anita* และคณะ (2004) รายงานว่าในมะเขือเทศที่มีการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานแบบกระจายทั่วทั้งต้นด้วยการใช้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ร่วมกับใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* จะมีการสร้างกิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POD เพิ่มมากขึ้นและสามารถยับยั้งใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้โดยพบจำนวนปมและกลุ่มไข่น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่มีการปลูกเชื้อ *P. fluorescens* การศึกษานี้ข้าวพันธุ์ กข6 มีการสะสมกิจกรรมของเอนไซม์ PAL, PPO และ POD เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง

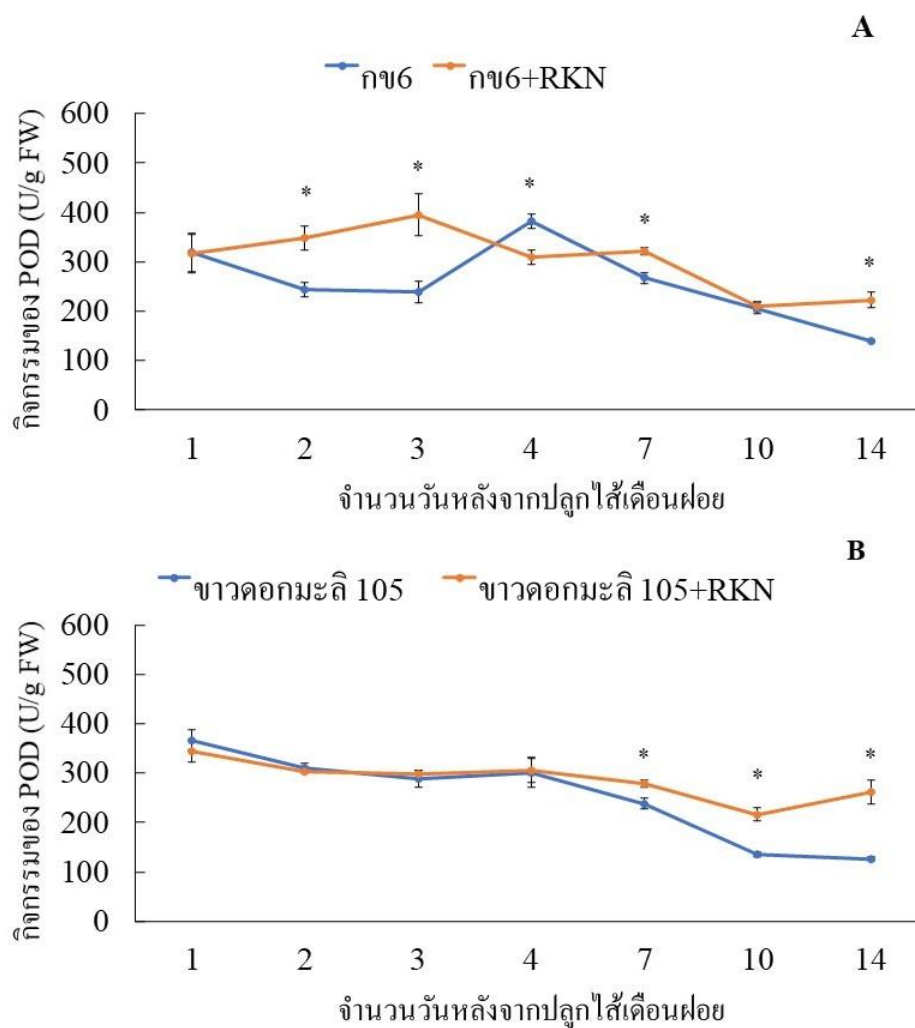
2 และ 3 วันหลังจากปลูกไผ่เดือนฝอยรากปม ซึ่ง ลือชัย อารยะรังสฤษฏ์ (2528) รายงานว่าที่ระยะเวลา 2-3 วันเป็นช่วงที่ไผ่เดือนฝอย *M. graminicola* เข้าทำลายรากข้าวมากที่สุด อีกทั้งยังพบว่าจำนวนปม คำนวณการเกิดปม ค่า reproduction factor พบน้อยกว่าข้าวพันธุ์อื่นอย่างนัยสำคัญ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พบมีความสอดคล้องกับผลการทดลองที่ 5 กล่าวคือข้าวพันธุ์ กข6 มีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL, PPO และ POD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง 1-3 วันหลังจากการปลูกไผ่เดือนฝอย การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่าพืชมีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของไผ่เดือนฝอยรากปมโดยอาจจะสังเคราะห์ สารฟีนอลิก ไฟโตอิเล็กซิน และลิกนิน เพื่อมายับยั้งการเข้าทำลายหรือการแพร่กระจายของไผ่เดือนฝอยภายในราก (Duan *et al.*, 2014) และจากการสังเคราะห์สารเหล่านั้นอาจจะเป็นผลให้การพัฒนารากของไผ่เดือนฝอยรากปมในรากข้าวพันธุ์ กข6 ช้ากว่าพันธุ์ข้าวที่ไม่มีการตอบสนอง (พันธุ์อ่อนแอ) โดยที่ 14 วันหลังจากการปลูกเชื้อ พบไผ่เดือนฝอย J3+J4 มากกว่าตัวโตเต็มวัย (30 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ข้าวพันธุ์อ่อนแอ (ขาวดอกมะลิ 105) พบระยะตัวโตเต็มวัยมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังสร้างกลุ่มไผ่เป็นจำนวนมาก (ตารางที่ 10) ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า PAL, PPO และ POD มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นพืชให้เกิดความต้านทานเพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของไผ่เดือนฝอยรากปมในข้าว



ภาพที่ 22 กิจกรรมเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ของข้าวพันธุ์ กข6 (A) และขาวดอกมะลิ 105 (B) หลังจากปลุกไ้เดือนฝอยรากปม (RKN) ที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4, 7, 10 และ 14 วัน



ภาพที่ 23 กิจกรรมเอนไซม์ polyphenol oxidase (PPO) ของข้าวพันธุ์ กข6 (A) และขาวดอกมะลิ 105 (B) หลังจากปลูกใส่เดือนฝอยรากปม (RKN) ที่ 1, 2, 3, 4, 7, 10 และ 14 วัน



ภาพที่ 24 กิจกรรมเอนไซม์ peroxidase (POD) ของข้าวพันธุ์ กข6 (A) และขาวดอกมะลิ 105 (B) หลังจากปลูกใส่เดือนฝอยรากปม (RKN) ที่ 1, 2, 3, 4, 7, 10 และ 14 วัน

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่าการแพร่ระบาดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเป็นจำนวนมากในแปลงข้าวของทั้ง 7 อำเภอได้แก่ หนองเสือ ลำลูกกา รัชบุรี คลองหลวง เมือง ลาดหลุมแก้วและสามโคก ในจังหวัดปทุมธานี โดยพบประชากรของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช 4 ไส้ ได้แก่ *Hirschmanniella* sp. (95.82 เปอร์เซ็นต์), *Meloidogyne* sp. (3.89 เปอร์เซ็นต์), *Tylenchorhynchus* sp. (0.09 เปอร์เซ็นต์) และ *Helicotylenchus* sp. (0.05 เปอร์เซ็นต์) และจากการระบุชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคอนุชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *Hirschmanniella* sp. และ *Meloidogyne* sp. ซึ่งให้เห็นว่าชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่มีการแพร่ระบาดเป็นจำนวนมากในเขตเพาะปลูกข้าวของ 7 อำเภอในจังหวัดปทุมธานี คือ *H. mucronata* และ *M. graminicola*

ข้าวพันธุ์ กข6 มีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมสูงที่สุดในการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากมีดัชนีการเกิดปมและจำนวนปมต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามจำนวนปมไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 อีกทั้งข้าวพันธุ์ กข6 ยังพบว่าการพัฒนาการของไส้เดือนฝอยรากปมในรากข้าวช้ากว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (อ่อนแอที่สุด) โดยในช่วงแรกที่มีการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยในข้าวพันธุ์ กข6 มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทาน ได้แก่ phenylalanine ammonia lyase, peroxidase และ polyphenol oxidase เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในข้าวพันธุ์ กข6 เพื่อเป็นการยืนยันอีกครั้ง

เอกสารอ้างอิง

- กนกทิพย์ ทะลือ, บัญชา ชินศรี, อนงค์นุช สาสนรักกิจ และธานี ศรีวงศ์ชัย. 2562. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจำแนกชนิด และความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของ *Meloidogyne graminicola* ที่พบในพื้นที่ต่าง ๆ. ใน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติครั้งที่ 20 วันที่ 15 มีนาคม 2562 มหาวิทยาลัยขอนแก่น, หน้า 723–730.
- กรมวิชาการเกษตร. 2563. องค์ความรู้เรื่องข้าว. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <http://www.ricethailand.go.th/Rkb/varieties/index.php.htm>. (10 เมษายน 2563)
- กิตติพงษ์ ศรีม่วง และ พรทิพย์ เรือนปานนท์. 2562. ไล่เดือนฝอยศัตรูข้าวที่ต้องเฝ้าระวังในจังหวัดนครนายก. งานประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ครั้งที่ 36 วันที่ 12–15 พฤษภาคม 2562 โรงแรมแกรนด์ฟอร์จูน จังหวัดนครศรีธรรมราช, หน้า 137–145.
- นงลักษณ์ เกรินทวงศ์. 2556. กลไกการต้านทานโรคของพืช. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 31(3): 76–82.
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2549. ไล่เดือนฝอยศัตรูพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ, 42 หน้า.
- บุญหงษ์ จงคิด และวุฒิชัย แดงทอง. 2557. ผลการทำลายของไล่เดือนฝอยรากปมต่อผลผลิตของข้าวสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 พันธุ์กลาย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(2): 222–226.
- ประพาส วีระแพทย์. 2555. ความรู้เบื้องต้นเรื่องข้าว. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, กรมการข้าว, กรุงเทพฯ, 106 หน้า.
- ลือชัย อารยะรังสฤษฎ์. 2528. ความต้านทานของข้าวบางพันธุ์ต่อไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne graminicola* Golden&Birchfield. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 76 หน้า.
- ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวและหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว. 2562. ข้าว. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <https://dna.kps.ku.ac.th/index.php/article-rice-rsc-rgdu/45-rice>. (9 มกราคม 2563)
- สมชาย สุขะกุล. 2549. เทคนิคศึกษาทดลองไล่เดือนฝอยศัตรูพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 114 หน้า.

- สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2562. รายงานสถานการณ์ส่งออกข้าว แนวโน้มและทิศทางการส่งออกข้าวไทย ปี 2562. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <http://www.thairiceexporters.or.th/Press%20release/2019/TREA%20Press%20Release%20Thai%20Rice%20Situation%20&%20Trend%20Year%202019-30012019.pdf>. (9 มกราคม 2563)
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <http://www.oae.go.th>. (9 มกราคม 2563)
- อนงค์นุช สาสนรักกิจ, มนตรี เขี่ยมวิม้งสา และปัญญา ชินศิริ. 2552. ความสำคัญของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชต่อผลผลิตทางการเกษตรและการส่งออกนำเข้า ของประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 3 หน้า.
- Akpheokhai, L.I. and Claudius-Cole A.O. 2017. Effect of *Heterodera sacchari* on growth and yield of selected upland NERICA rice in Nigeria. *Tropical Plant Pathology* 42: 431–442.
- Anita, B. and Samiyappan, R. 2012. Induction of systemic resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* against rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Biopesticides* 5(supplement): 53–59.
- Anita, B., Rajendran, G. and Samiyappan, R. 2004. Induction of systemic resistance in tomato against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* by *Pseudomonas fluorescens*. *Nematologia Mediterranea* 32: 47–51.
- Aryal, S., Davis, R.F., Stevenson, K.L., Timper, P. and Ji, P. 2011. Influence of infection of cotton by *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne incognita* on the production of enzymes involved in systemic acquired resistance. *Journal of Nematology* 43(3–4): 152–159.
- Beesa, N. 2020. Utilization of conservation agriculture (CA) based on leguminous cover crop in the rice production system and their effect on plant-parasitic nematodes and soil Properties. M.S. Dissertation. Kasetsart University.
- Bellafiore, S., Jouglu, C., Chapuis, E., Besnard, G., Suong, M., Vu, P.N., Waele, D.D., Gantet, P.I. and Thi, X.N. 2015. Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. *Comptes Rendus Biologies* 338: 471–483.

- Bellé, C., Kaspary, T.E., Balardin, R.R. and Antonioli, Z.I. 2019. Detection of *Meloidogyne graminicola* parasitising *Cyperus rotundus* in Rio Grande do Sul, Brazil. Australasian Plant Disease Notes 14: 2.
- Berg, E.V.D., Subbotin, S.A., Handoo, Z.A. and Tiedt, L.R. 2009. *Hirschmanniella kwazuna* sp. n. from South Africa with notes on a new record of *H. spinicaudata* (Schuurmans Stekhoven, 1944) Luc and Goodey, 1964 (Nematoda: Pratylenchidae) and on the molecular phylogeny of *Hirschmanniella* Luc and Goodey, 1964. Nematology 11(4): 523–540.
- Berry, S.D., Fargette, M., Spaul, V.W., Morand, S. and Cadet, P. 2008. Detection and quantification of root knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zae*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real time PCR. Molecular and Cellular Probes 22: 168–176.
- Besnard, G., Thi-Phan, M., Ho-Bich, H., Dereeper, A., Nguyen, H.T., Queneherve, P., Aribi, J., and Bellafiore, S. 2019. On the close relatedness of two rice-parasitic root-knot nematode species and the recent expansion of *Meloidogyne graminicola* in Southeast Asia. Gene 10: 175.
- Bhau, B.S., Bitupon, B., Reshma, A., Phukon, P., Barbi, G., Sarmah, D.K., Lal, M. and Wann, S.B. 2016. Influence of root-knot nematode infestation on antioxidant enzymes, chlorophyll content and growth in *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. Indian Journal of Experimental Biology 54: 254–261.
- Blok, V.C. and Powers, T.O. 2009. Biochemical and molecular identification. In: Perry R.N., Moens M. and Starr J.L. (eds). Root-Knot Nematodes. CAB International, Wallingford, UK. 98–118.
- Bridge, J., Plowright, R.A. and Peng, D. 2005. Nematode parasites of rice. In: Luc, M., Sikora, R.A. and Bridge, J. (eds.). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford UK, CAB International. 87–130.
- Bridge, J. and Page, S.L.J. 1982. The rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*, on deep water rice (*Oryza sativa* subsp. *indica*). Revue Nématol. 5 (2): 225–232.
- Burns, N.C. 1970. Soil pH effects on nematode populations associated with soybeans. Journal of Nematology 3(3): 238–245.

- CABI. 2019. *Oryza sativa* (rice). available from: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/37964> [accessed on July 2, 2020].
- CABI. 2020. *Meloidogyne graminicola* (rice root knot nematode). available from: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/33243> [accessed on July 2, 2020].
- Carneiro, R.M.D.G., Lima, F.S.O. and Correia, V.R. 2017. Methods and tools currently used for the identification of plant parasitic nematodes. Available from: <https://www.intechopen.com/books/nematology-concepts-diagnosis-and-control/methods-and-tools-currently-used-for-the-identification-of-plant-parasitic-nematodes> [accessed on July 2, 2020].
- Chapuis, E., Besnard, G., Andrianasetra, S., Rakotomalala, M., Nguyen, H.T. and Bellafiore, S. 2016. First report of the root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) in Madagascar rice fields. Australasian Plant Disease Notes 11: 32.
- Chen, D.Y., Ni, H.F., Yen, J.H., Chen, R.S. and Tsay, T.T. 2006. Distribution of rice root nematode *Hirschmanniella oryzae* and a new recorded *H. mucronata* (Nematoda: Pratylenchidae) in Taiwan. Plant Pathology Bulletin 15: 197–210.
- Ciancio, A., Loffredo, A., Paradies, F., Turturo, C. and Sialer, M.F. 2005. Detection of *Meloidogyne incognita* and *Pochonia chlamydosporia* by fluorogenic molecular probes. EPPO Bulletin 35: 157–164.
- Coyne, D.L., Nicol, J.M. and Claudius-Cole, B. 2007. Practical plant nematology: a field and laboratory guide. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin.
- Davide, R.G. 1980. Influence of cultivar, age, soil texture, and pH on *Meloidogyne incognita* and *Radopholus similis* on Banana. College of Agriculture, University of Philippines at Los Banos College.
- Diaz, J., Bernal, A., Pomar, F. and Merino, F. 2001. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. Plant Science 161(1): 179–188.
- Douda, O., Zouhar, M., Nováková, E., Mazáková, J. and Ryšánek, P. 2010. Variability of D2/D3 segment sequences of several populations and pathotypes of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*). Plant Protection Science 46: 171–180.

- Duan, C., Yu, J., Bai, J., Zhu, Z. and Wang, X. 2014. Induced defense responses in rice plants against small brown planthopper infestation. *Crop Journal* 2: 55–62.
- Eisenback, J., Hirschmann, H., Sasser, J. and Triantaphyllou, A. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key. Departments of Plant Pathology and Genetic, North Carolina State University.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2017. *Meloidogyne graminicola* Rice root-knot nematode [online] available from: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/alert_list_nematodes/meloidogyne_graminicola [accessed on July 2, 2020].
- Fanelli, E., Cotroneo, A., Carisio, L., Troccoli, A., Grosso, S., Boero, C., Capriglia, F. and Luca, F.D. 2017. Detection and molecular characterization of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* in Italy. *European Journal of Plant Pathology* 149: 467–476.
- Fernandez, L., Cabasan, M.T.N. and Waele, D. 2013. Life cycle of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* at different temperatures under non-flooded and flooded conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47(9): 1042–1049.
- Fortuner, R. and Merny, G. 1979. Root-parasitic nematodes of rice. *Revue de Nématologie* 2: 79–102.
- Giudici, M.L., Villa, B., Callegarin, A.M. and Tamborini, L. 2013. White tip disease in Italian rice, pp. 1–7. *In* Proceedings of the 3rd International Temperate Rice Conference. 10–13 March 2013, Punta de l’Este, Uruguay.
- Goswami, B.K., A. Singh, Singh and N. Singh. 2015. Infestation of an endoparasitic migratory rice root nematode, *Hirschmanniella oryzae* - a serious threat to the paddy growers of western U.P.- a first report. *Plant Archives* 15: 1195–1196.
- Havir, E.A. and Hanson, K.R. 1970. *Methods in enzymology* XVIIIA, 575–581.
- Hemm, M. R., Rider, S. D., Ogas, J., Murry, D. J. and Chapple, C. 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant Journal* 38: 765–778.
- Holterman, M., Wurff, A., Elsen, S., Megan, H., Bongor, T., Holovachov, O., Bakker, J. and Helder, J. 2006. Phylum-wide analysis of SSU rDNA reveals deep Phylogenetic relationships among nematodes and accelerated evolution toward crown clades. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1792–1880.

- Hunt, D.J. and Handoo, Z.A. 2009. Taxonomy identification and principal species. *In* Perry R.N., Moens M., Starr J.L. (eds). Root-knot nematodes. CABI, Massachusetts. 55–88.
- Hussaini S.S, Shakeela, V. and Dar, M.H. 2005. Influence of temperature on infectivity of entomopathogenic nematodes against black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel and greater wax moth, *Galleria mellonella* (Linnaeus) larvae. *Journal of Biological Control* 19: 51–57.
- Indarti, S., Soffan, A., Andrasmara, M.M.F. 2020. First record of *Hirschmanniella mucronata* (Nematoda: Pratylenchidae) in Yogyakarta, Indonesia. *Biodiversitas* 21(5): 2068–2073.
- Jain, R.K., Mathur, K.N. and Singh, R.V. 2007. Estimation of losses due to plant parasitic nematodes on different crops in India. *Indian Journal of Nematology* 37: 219–220.
- 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. *Review of Plant Nematology* 6: 291–309.
- Jindapunnapat, K. 2012. Development of the molecular markers for species identification of root-knot nematode infesting guava in Thailand. Ph.D. Dissertation. Kasetsart University.
- Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-Lopez, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L. and Perry, R.N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14(9): 946–961.
- Kankam, F., Suen, F.A. and Adomako, J. 2015. Nematicidal effect of sunn hemp *Crotalaria juncea* leaf residues on *Meloidogyne incognita* attacking tomato *Solanum lycopersicum* roots. *Journal of Crop Protection* 4: 241–246.
- Karssen, G. and Moens, M. 2006. Root-knot Nematode. *In*: Perry R.N. and Moens M. (eds). *Plant Nematology*. CABI, Massachusetts. 59–90.
- Khun, K., Decraemer, W., Couvreur, M., Karssen, G., Steel, H. and Bert, W. 2015. Deceptive morphological variation in *Hirschmanniella mucronata* (Nematoda: Pratylenchidae) and a polytomous key to the genus. *Nematology* 17: 377–400.
- Kim, E., Seo Y., Kim, Y.S., Park, Y. and Kim, Y.H. 2017. Effects of soil textures on infectivity of root-knot nematodes on carrot. *The Plant Pathology Journal* 33(1): 66–74.

- Kumari, C., Dutta, T.K., Banakar, P. and Rao, U. 2016. Comparing the defence-related gene expression changes upon root-knot nematode attack in susceptible versus resistant cultivars of rice. *Scientific Reports* 6: 22846.
- Kyndt, T., Fernandez, D. and Gheysen, G. 2014. Plant-parasitic nematode infections in rice: molecular and cellular insights. *Annual Review of Phytopathology* 52: 135–153.
- Long, H.B., Sun, Y.F., Feng, T.Z., Pei, Y.L. and Peng, D.L. 2017. First report of *Meloidogyne graminicola* on soybean (*Glycine max*) in China. *Plant Disease* 101(8): 1554.
- Mantelin, S., Bellafiore, S. and Kyndt, T. 2017. *Meloidogyne graminicola*: a major threat to rice agriculture. *Molecular Plant Pathology* 18(1): 3–15.
- Marla, S.R., Huettel, R.N. and Mosjidis, J.A. 2008. Evaluation of *Crotalaria juncea* populations as hosts and antagonistic crops to manage *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. *Nematropica* 38: 155–161.
- Maung, Z.T.Z., Kyi, P.P., Myint, Y.Y., Lwin, T. and Waele, D. 2010. Occurrence of the rice root nematode *Hirschmanniella oryzae* on monsoon rice in Myanmar. *Tropical Plant Pathology* 35: 3–10.
- Mayer, A.M., Harel, E. and Ben-Shaul, R. 1966. Assay of catechol oxidase—a critical comparison of methods. *Phytochemistry* 5(4): 783–789.
- Mirsam, H. and Kurniawati, F. 2018. First report in South Sulawesi: morphological and molecular characters of root knot nematodes associated with rice root in Wajo, South Sulawesi. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 22(1): 58–65.
- Ngadze, E., Icishahayo, D., Coutinho, T.A. and Waals, J.E. 2012. Role of polyphenol oxidase, peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, chlorogenic acid, and total soluble phenols in resistance of potatoes to soft rot. *Plant Disease* 96(2): 186–192.
- Nguyen, P.V., Bellafiore, S., Petitot, A., Haidar, R., Bak, A., Abed, A., Gantet, P., Mezzalana, I., Almeida, J. and Fernandez, D. 2014. *Meloidogyne incognita* - rice (*Oryza sativa*) interaction: a new model system to study plant–root-knot nematode interactions in monocotyledons. *Rice* 7: 23.
- Onkendi, E.M. and Moleleki, L.N. 2013. Distribution and genetic diversity of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in potatoes from South Africa. *Plant Pathology* 62(5): 1184–1192.

- Padgham, J.L. 2003. Impact of the rice root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) on lowland rainfed rice in Northern Western Bangladesh. PhD Thesis, Cornell University, Ithaca, New York.
- Pascual, M.L.D., Decraemer, W., Tandingan De Ley, I., Vierstraete, A., Steel, H. and Bert, W. 2014. Prevalence and characterization of plant-parasitic nematodes in lowland and upland rice agro-ecosystems in Luzon, Philippines. *Nematropica* 44: 166–180.
- Patel, S. and Dhillon, N.K. 2017. Evaluation of sunnhemp (*Crotalaria juncea*) as green manure /amendment and its biomass content on root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in successive crop brinja. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5: 716–720.
- Peacock, F.C. 1957. Studies on root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* in the Gold Coast. *Nematologica* 2: 114–122.
- Phan, N.T., Waele, D.D., Lorieux, M., Xiong, L. and Bellafiore, S. 2018. A hypersensitivity-like response to *Meloidogyne graminicola* in rice (*Oryza sativa*). *Phytopathology* 108: 521–528.
- Pokharel, R.R., Abawi, G.S., Duxbury, J.M., Smat, C.D., Wang, X. and Brito, J.A. 2010. Variability and the recognition of two races in *Meloidogyne graminicola*. *Australasian Plant Pathology* 39: 326–333.
- Pokharel, R.R., Abawi, G.S., Zhang, N., Duxbury, J.M. and Smart, C.D. 2007. Characterization of isolates of *Meloidogyne* from rice-wheat production fields in Nepal. *Journal of Nematology* 39(3): 221–230.
- Power, T.O. and Harris, T.S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology* 25(1): 1–6.
- Prot, J.C. and Rahman, M.L. 1994. Nematode ecology, economic importance, and management in rice ecosystems in South and Southeast Asia. International Rice Research Institute, Philippines.
- Ravindra, H., Sehgal, M., Narasimhamurthy, H.B., Jayalakshmi, K. and Khan, H.S.I. 2017. Rice Root-Knot Nematode (*Meloidogyne graminicola*) an Emerging Problem. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(8): 3143–3171.
- Regmi, H., Nongmaithem, B.D. and Ngangbam, A.K. 2016. Biotic constraints in rice productivity with special reference to rice root nematode: *Hirschmanniella* spp. a review. *Journal of Global Agriculture and Ecology* 5(3): 127–133.

- Ruanpanun, P. and Khun-In, A. 2015. First report of *Meloidogyne incognita* caused root knot disease of upland rice in Thailand. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 21(1): 68–77.
- Salalia, R., Walia, R.K., Somvanshi, V.S., Kumar, P. and Kumar, A. 2017. Morphological, morphometric, and molecular characterization of intraspecific variations within Indian populations of *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Nematology* 49(3): 254–267.
- Scott-Craig, J.S., Kerby, K.B., Stein, B.D. and Somerville, S.C. 1995. Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 407–418.
- Shelley, I.J., Takahashi-Nosaka, M., Kano-Nakata, M., Haque, M.S. and Inukai, Y. 2016. Rice cultivation in Bangladesh: present scenario, problems, and prospects. *Journal of International Cooperation for Agricultural Development* 14: 20–29.
- Sun, L., Zhuo, K., Lin, B. and Wang, H.H. 2014. The complete mitochondrial genome of *Meloidogyne graminicola* (Tylenchina): A unique gene arrangement and its phylogenetic implications. *Plos One* 9(6): 1–11.
- Suong, M., Chapuis, E., Leng, V., Tivet, F., Waele, D., Thi, H.N. and Bellafiore, S. 2019. Impact of a conservation agriculture system on soil characteristics, rice yield, and root-parasitic nematodes in a Cambodian lowland rice field. *Journal of Nematology* 51: 1–15.
- Thorne, G. 1949. On the classification of the Tylenchida, new order (Nematode, Phasmidia). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 16: 37–73.
- Toyota, K., Shirakashi, T., Sato, E. and Wada, S. 2008. Development of a real-time PCR method for the potato-cyst nematode *Globodera rostochiensis* and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Soil Science and Plant Nutrition* 54: 72–76.
- Trivedi, P.C. and Barker, K.R. 1968. Nematological reviews-resenas nematologicas management of nematodes by cultural practices. *Nematropica* 16: 213-236.
- Wang, X., Wang, L.F., Piao, C., Ma, J., Shang, Y., Li, Y. and Guo, M. 2013. First Report of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne arenaria*) on *Angelica dahurica* in China. *Journal of Phytopathology* 161: 426–429.

- Yiw, C.P. and Birchfield, W. 1978. Scanning Electron Microscopy of Perineal Patterns of Three species of *Meloidogyne*. *Journal of Nematology* 10 (2): 119–122.
- Youssef, M.M.A. and Eissa, M.F.M. 2014. The rice root nematode, *Hirschmanniella oryzae*, its identification, economic importance and control measures in Egypt: a review. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47(19): 2340–2351.
- Zhan, L.P., Zhong, D., De-liang, P., Huan, P., Ling-an, K., Shi-ming, L., Ying, L., Zhong-cai, L. and Wen-kun, H. 2018. Evaluation of Chinese rice varieties resistant to the root-knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Integrative Agriculture* 17 (3): 621–630.
- Zijlstra, C. and Hoof, R.H. 2006. A multiplex real-time polymerase chain reaction (TaqMan) assay for the simultaneous detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Journal of Phytopathology* 96: 1255–1262.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายณัฐเดช บีสา

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6210620039

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ ทหารลาดกระบัง	2559
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	2563

ทุนการศึกษา

- ทุน โครงการ Participatory and Integrative Support for Agricultural Initiative (PISAI) Project ภายใต้การสนับสนุนจาก ERASMUS +-Capacity Building in Higher Education Programme

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ณัฐเดช บีสา, สุริยสิทธิ์ สมนึก และณิมนันต์ เจนอักษร. 2561. ประสิทธิภาพของน้ำคั้นและสารสกัดหายาจากดอกดาวเรือง (*Tagetes erecta*) ในการควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของคะน้าในสภาพห้องปฏิบัติการ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 36 (ฉบับพิเศษ): 64-75.

ณัฐเดช บีสา, บัญชา ชินศรี และอนงค์นุช สาสนรักกิจ. ผลของระบบเกษตรเชิงอนุรักษ์ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชและไส้เดือนฝอยตัวห้ำในแปลงข้าว, น. 731-740. ในการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 20 วันที่ 15 มีนาคม 2562 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.