

การพัฒนาเครื่องหมายชีวโมเลกุลในการจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางสกุล

Development of Molecular Markers for Identification of Some Plant-Parasitic Nematodes

กานต์สิริ จินดาปณณพัฒน์¹ และ บัญชา ชินศรี^{1*}

Kansiree Jindapunnapat and Buncha Chinnasri

Abstract

Two root-knot nematode species, *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*, were identified by the isozyme analysis. The esterase pattern of *M. incognita* exhibited I1 phenotype but that of *M. javanica* was J3. Both *M. incognita* and *M. javanica* were also compared with *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus*, and *Aphelenchus* collected from agricultural fields and the entomopathogenic nematode, *Steinernema*. The 16s ribosomal RNA (16s rRNA) gene and Cytochrome Oxidase Subunit II (COII) gene were used to develop molecular markers. These genes were aligned and characterized for inter-specific variations within *Meloidogyne*. The primers UNI_16sM and UNI_COIIM generated a DNA fragment of 400 bp and 150 bp, respectively. The primer UNI_16sM and UNI_COIIM were designed to detect specifically the genus *Meloidogyne* using a portion of the conserved region in the mitochondria. The primer Nema_18s was designed to be specific to all nematodes in the Phylum Nematoda and amplified a 1 kb fragment. Primer Nema_18s was compared with Primer UNI_16sM and UNI_COIIM, and generated similar results in detecting *Meloidogyne*. Nema_18s could be used to detect other nematode genera whereas UNI_16sM and UNI_COIIM could not. Therefore, UNI_16sM and UNI_COIIM are only specific to *Meloidogyne*. UNI_16sM and UNI_COIIM were able to prime DNA that was damaged, incomplete, or in low concentrations.

Keywords : esterase isozyme, Molecular Marker, Plant-Parasitic nematodes

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok Campus

รับเรื่อง : เมษายน 2555

* Corresponding auditor: agrbcc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากมีพืชอาศัยอย่างกว้างขวาง มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วโลก และสามารถสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตพืชได้เป็นอย่างมาก การพัฒนาเครื่องหมายชีวโมเลกุล จะทำให้เกิดความรวดเร็วและแม่นยำในการตรวจสอบการปนเปื้อนของไส้เดือนฝอยตั้งแต่ระยะต้นกล้าก่อนที่จะมีการแพร่กระจายไปยังแปลงปลูกพืช ชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมที่นำมาทดสอบมีทั้งหมด 2 ชนิดคือ *M. incognita* และ *M. javanica* โดยทำการยืนยันชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธีการวิเคราะห์โปรตีน (esterase isozyme) และผลการทดลองพบว่า *M. incognita* มีลักษณะ esterase phenotype แบบ I1 phenotype และ *M. javanica* มีลักษณะ esterase phenotype แบบ J3 นำไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 2 ชนิดเปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่นๆ คือ *Pratylenchus*, *Rotylenchulus*, *Helicotylenchus*, และ *Aphelenchus* ที่ได้จากแปลงเกษตรกร และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงคือ *Steinernema* ทำการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ส่วนของยีนไมโทคอนเดรียคือ Cytochrome Oxidase Subunit II และ 16s Ribosomal rRNA ได้ไพรเมอร์ 2 คู่คือ UNI_COIIM และ UNI_16sM ซึ่งให้ขนาดผลผลิต (PCR product) เท่ากับ 150 bp และ 400 bp ตามลำดับ ทั้งนี้ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ถูกออกแบบให้เฉพาะเจาะจงกับสกุลของไส้เดือนฝอยรากปมเท่านั้น สำหรับไพรเมอร์ Nema_18s สามารถให้ผลผลิต (PCR product) ขนาดประมาณ 1 kb กับไส้เดือนฝอยทุกสกุลที่นำมาทดสอบ

คำนำ

ไส้เดือนฝอยรากปม (root knot nematode) หรือชื่อวิทยาศาสตร์ *Meloidogyne* spp. เป็นศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ และก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจในทุกกลุ่ม เช่น พืชหัว พืชผัก ไม้ผล พืชเส้นใย ไม้ดอก ไม้ประดับ และ ธัญพืช เป็นต้น ไส้เดือนฝอยรากปมทำความเสียหายให้กับพืชทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนและเขตอบอุ่น รวมทั้งประเทศไทย โดยมีพืชอาศัยมากกว่า 2,000 ชนิด (Sasser and Carter, 1985) จากการประเมินความเสียหายทั่วโลกพบว่า ไส้เดือนฝอยรากปมก่อให้เกิดการสูญเสียกับผลผลิตพืชในปริมาณ 5-12 % (Sasser and Freckman, 1987) ในสหพันธรัฐเยอรมันพบมะเขือเทศสูญเสียผลผลิตอันเนื่องมาจากไส้เดือนฝอยรากปม 55% ในประเทศไนจีเรียพบถั่วพุ่มสูญเสียผลผลิต 75% (Sasser et al., 1983) และในทางตอนเหนือของประเทศอินเดียพบว่า ถั่วเขียวสูญเสียผลผลิตอันเนื่องมาจากไส้เดือนฝอยรากปมในปริมาณ 22-84% (Ali, 1997)

ในการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมพบว่ามีเอกสารวิชาการจำนวนหนึ่งรายงานตรงกันว่าช่องว่างระหว่างยีน

Cytochrome Oxidase Subunit II (COII) และ 16s Ribosomal RNA (16s rRNA) ในจีโนมของไมโทคอนเดรีย รวมทั้งรูปแบบของ esterase isozyme สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ จึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 2 ชนิดและการวิเคราะห์ทางโปรตีนมาใช้ในการพัฒนาเครื่องบ่งชี้ทางด้านชีวโมเลกุล เพื่อสามารถระบุชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่แพร่กระจายอยู่ในประเทศไทยได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในแหล่งปลูกที่สำคัญและพบการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม เช่น จังหวัดสมุทรสาคร และนครปฐม สำหรับวิธีการจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมในอดีตนั้น นิยมใช้วิธีการตัดกันไส้เดือนฝอยตัวเมีย (perineal pattern) ซึ่งผลการจำแนกขึ้นอยู่กับความชำนาญของนักวิจัย เนื่องจาก perineal pattern มีความแปรปรวนในประชากรค่อนข้างมากและบางครั้งยากที่จะชี้ชัดถึงชนิด (species) ของไส้เดือนฝอยได้อย่างถูกต้อง การใช้เทคนิคชีวโมเลกุลสามารถตรวจสอบและวินิจฉัยไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปมได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ทั้งในส่วนของพืชที่จะนำไปขยายพันธุ์หรือในแปลงปลูก เพื่อควบคุมการแพร่ระบาด

และลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นแก่เกษตรกรได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกและจำแนกสกุลไส้เดือนฝอย

ทำการแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินที่เก็บจากแปลงเกษตรกรบนเกาะ Oahu รัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกาโดยใช้เครื่อง semi automatic elutriator machine เก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยและจำแนกไส้เดือนฝอยในสกุล *Aphelenchus* spp., *Helicotylenchus* spp., *Pratylenchus* spp. และ *Rotylenchulus* spp. โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ทำการเก็บไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (*Steinernema* sp.) ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการของ University of Hawaii ประเทศสหรัฐอเมริกา

สำหรับการเพิ่มปริมาณของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ปฏิบัติโดยการปลูกเชื้อด้วยตัวอ่อนระยะที่สอง (J2) ของไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้จาก single egg mass บนรากมะเขือเทศพันธุ์ Orange Pixie เป็นระยะเวลา 75 วัน ไส้เดือนฝอยรากปมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *Meloidogyne incognita* และ *M. javanica*

2. การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมโดยการวิเคราะห์โปรตีน esterase isozyme

เก็บตัวอย่างตัวเต็มวัยไส้เดือนฝอยเพศเมียที่เลี้ยงไว้บนรากมะเขือเทศพันธุ์ Orange Pixie เป็นระยะเวลา 75 วัน ตรวจสอบลักษณะรากปมที่เกิดขึ้น หลังจากนั้นแยกไส้เดือนฝอยเพศเมียออกจากรากเก็บใส่สารละลาย saline แยกเก็บแต่ละตัวใน watch glass นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ทำการวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้เครื่อง Phast System โดยนำตัวเมียที่แช่แข็งแล้วหยอดในหลุมของ PhastGel sample stamps และหยด 0.9 ไมโครลิตรของ extraction solution (20% sucrose, 2% Triton X-100, 0.01% bromophenol blue) ทำการบดตัวเมียด้วยแท่ง

เหล็กเล็กๆ หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง PhastSystem (Amersham Pharmacia Biotech) ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ native polyacrylamide gels (Gradient 10-15) และ native buffer agarose strips ระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำเจลที่ผ่านเครื่อง PhastSystem เรียบร้อยแล้ว ตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วย esterase stain (0.1 M Phosphate buffer, 0.0075 g EDTA, Fast Blue RR salt 0.015 g, 0.10 g α -naphthyl acetate in 0.5 ml acetone/gel) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ระยะเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำเจลใสในน้ำยา fixative (10% acetic acid, 10% glycerol) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Esbenshade and Triantaphyllou, 1985) ตรวจสอบแถบที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับ marker คือไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne javanica*

3. การออกแบบไพรเมอร์

ทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ในส่วนของยีน Cytochrome Oxidase Subunit II และ 16s Ribosomal RNA ในไมโทคอนเดรีย เปรียบเทียบกับ *Meloidogyne hapla* และ *Radopholus similis* mitochondria complete cds. ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Oligo หรือ Vector NTi และทำการตรวจสอบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo analyze 3.1 program คือ Analyze, Hairpin, Self Dimer, Hetero-Dimer, NCBI Blast, and TM Mismatch

4. การจำแนกสกุลไส้เดือนฝอยด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำตัวอย่างตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ของไส้เดือนฝอยรากปม ซึ่งพักจากไข่ในสภาพหลุมมอด โดยใช้ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม 20 ตัว สำหรับไส้เดือนฝอยสกุลอื่นๆ (*Aphelenchus* spp., *Helicotylenchus* spp., *Pratylenchus* spp. *Rotylenchulus* spp. และ *Steinernema* spp.) ใช้ 15 ตัว ในน้ำ 200 ไมโครลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48

ข้าวโม่ง หลังจากนั้นทำการบดโดยใช้ glass beads และ Vortex ตรวจสอบภายใต้กล้อง stereomicroscope อีกครั้ง หลังจากนั้นดูดตัวอย่างเฉพาะส่วนใสด้านบนเก็บใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัดของ Promega, สหรัฐอเมริกา (Genomic DNA) นำ DNA ที่สกัดได้แล้วนำมาทำ PCR โดยใช้ DNA template 1.5 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร (UNI_COIIM, UNI_16sM, Nema_18s ตามตารางที่ 1) Taq 1x master mix (PCR Master Mix, Promega) 10 ไมโครลิตร และ sterile H₂O 7.5 ไมโครลิตร ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยตั้ง cycling conditions ตามตารางที่ 2 ทำการตรวจสอบคุณภาพของ

ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการ agarose electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ gel 1.5% สำหรับการวิเคราะห์ไพรเมอร์ Nema_18s และ 2.5% สำหรับไพรเมอร์ UNI_COIIM และ UNI_16sM หยอดผลผลิตปฏิกิริยา PCR ของแต่ละตัวอย่างลงในช่องบนเจล เปรียบเทียบกับ marker (Hyper Ladder IV) ตลอดจน Negative และ Positive Control ทำ electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 70 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบเจลภายใต้แสง ultraviolet ดูขนาดแถบที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับ marker

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Nema_18sF	5'-GGGCGGTATCTGATCGCC-3'
Nema_18sR	5'-CGCGAATRGCTCATTACAACAGC-3'
UNI_COIIFM	5'-CTGATGTAATTCATGCTTGGG-3'
UNI_COIIRM	5'-TCCACAAAT TCGGAACATTG-3
UNI_16sFM	5'-CGTGATTAGTCAAAGGTAGCAAGG-3'
UNI_16sRM	5'-GATAAAGAACTCTATTTTACAACG-3'

ตารางที่ 2 รอบการทำงานของ Polymerase Chain Reaction แต่ละไพรเมอร์

PCR cycle	Temperature (°C)	Time (min)
Initial denaturation	94	5
Denaturing	94	1
Annealing	53 (UNI_COIIM)	1 (35 cycle)
	49(UNI_16sM)	
	55(Nema_18s)	
Extension	72	1
Final extension	72	10
Hold	4	∞

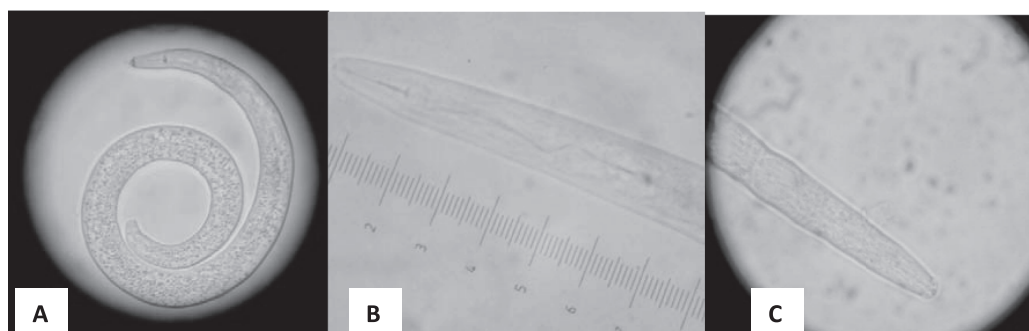
ผลและวิจารณ์

1. การแยกและการจำแนกสกุลไส้เดือนฝอย

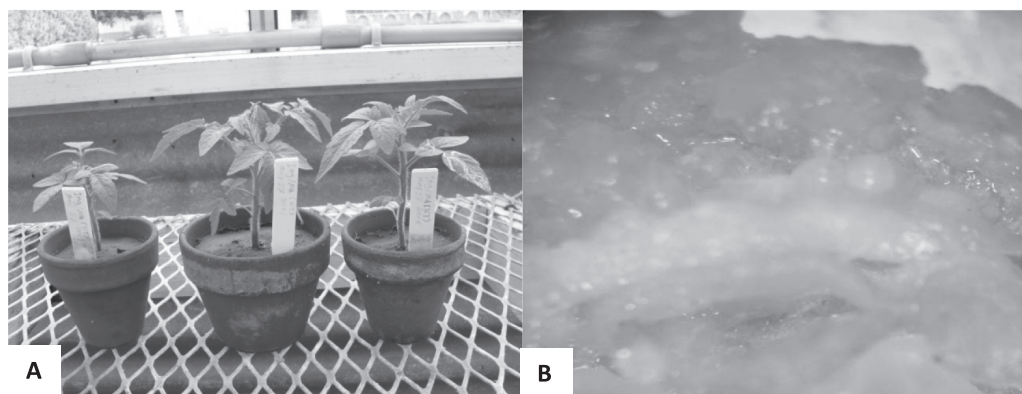
พบไส้เดือนฝอยในแปลงเกษตรกรรมทั้งหมด 4 สกุล คือ *Aphelenchus* spp., *Helicotylenchus* spp., *Pratylenchus* spp., *Rotylenchulus* spp. ซึ่งไส้เดือนฝอยทั้ง 4 สกุลเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่สำคัญและพบได้ทั่วไป จัดอยู่ใน Order Tylenchida ซึ่งเป็น Order เดียวกับไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. ส่วนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงคือ *Steinernema* spp. อยู่ใน Class เดียวกันแต่แตกต่าง Order กับไส้เดือนฝอยรากปม จึงนำมาใช้เป็นตัวอย่างในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำงานของไพรเมอร์ที่ออกแบบ

2. การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้การวิเคราะห์ esterase isozyme

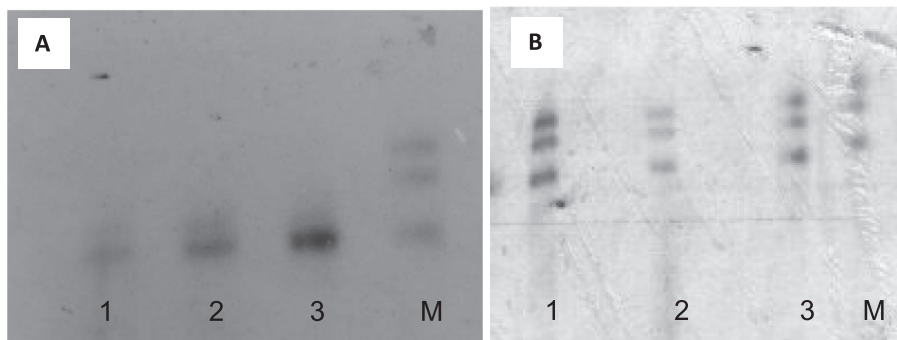
จากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเครื่อง PhastSystem โดยใช้เทคนิค electrophoresis เพื่อวิเคราะห์ esterase isozyme ที่มีอยู่ในไส้เดือนฝอยรากปมตัวเต็มวัยเพศเมีย พบว่ามีลักษณะ esterase phenotype แบบ J3 คือ *Meloidogyne javanica* ซึ่งพบลักษณะ 3 แบนด์ที่เกิดขึ้นเหมือนกับ marker และแบบ I1 คือ *M. incognita* มีลักษณะ 1 แบนด์ อยู่ในระนาบเดียวกับแบนด์สุดท้ายของ marker ซึ่งผลการทดลองเป็นไปตามผลมาตรฐาน (Esbenshade and Triantaphyllou, 1985; Eisenback et al., 1994) และผลการทดลองที่ทำในประเทศไทย (Toida et al., 1996)



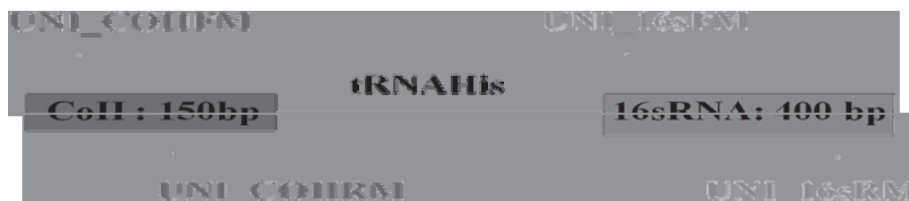
ภาพที่ 1 ไส้เดือนฝอยบางสกุลใน Order Tylenchida, A: ไส้เดือนฝอย *Helicotylenchus* spp., B: ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp., C: ไส้เดือนฝอย *Aphelenchus* spp.



ภาพที่ 2 ต้นมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อและลักษณะอาการรากปมของมะเขือเทศพันธุ์ Orange Pixie, A: ต้นมะเขือเทศอายุ 14 วันที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยรากปม, B: อาการรากปมซึ่งภายในมีตัวเต็มวัยไส้เดือนฝอยรากปมเพศเมีย

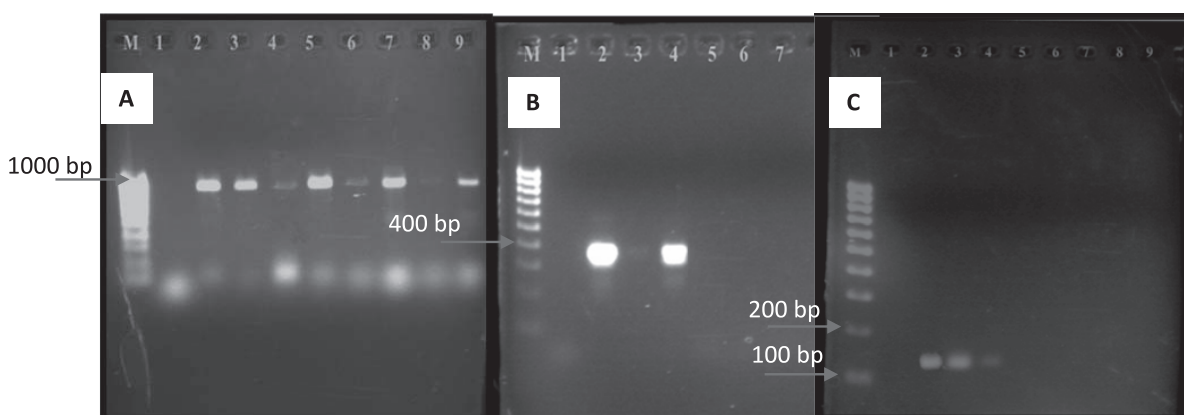


ภาพที่ 3 ลักษณะของ esterase phenotype ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp., A: ลักษณะของ esterase phenotype แบบ I1 ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* (Lane 1, 2, และ 3; M = marker), B: ลักษณะของ esterase phenotype แบบ J3 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. javanica* (Lane 1, 2, และ 3; M = marker)



ภาพที่ 4 ตำแหน่งการวางไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับ genus *Meloidogyne* บนยีน Cytochrome Oxidase Subunit II และ 16s Ribosomal RNA ในไมโทคอนเดรีย

4. การจำแนกสกุลไส้เดือนฝอยด้วย Polymerase Chain Reaction (PCR)



ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบผลการจำแนกสกุลไส้เดือนฝอยรากปม (genus *Meloidogyne*) กับไส้เดือนฝอยสกุลอื่นโดยการ ใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับสกุลไส้เดือนฝอยรากปม A) Nema_18s, 1kb; B) UNI_16sM, 400 bp; C) UNI_COIIM, 150 bp; Lane 1) negative control 2) Positive control 3) *Meloidogyne incognita* 4) *Meloidogyne* sp. (NT) 5) *Aphelenchus* sp. 6) *Helicotylenchus* sp. 7) *Pratylenchus* sp. 8) *Rotylenchulus* sp. 9) *Steinernema* sp.

3. การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์ UNI_COIIM จากยีน Cytochrome Oxydase Subunit II และไพรเมอร์ UNI_16sM จากยีน 16s Ribosomal RNA ในไมโทคอนเดรีย ดังภาพที่ 4 ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ขนาดของผลผลิตปฏิกิริยา PCR (product) ที่ได้คือ 150 bp และ 400 bp เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ Nema_18s ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบมาเพื่อตรวจสอบ Phylum Nematoda (Floyd *et al.*, 2005) ขนาดของผลผลิตปฏิกิริยา PCR ประมาณ 1 kb ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 1

จากผลการทดลองภาพที่ 5 พบว่าไพรเมอร์ Nema_18s สามารถตรวจสอบไส้เดือนฝอยได้ทุกสกุลที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ *Meloidogyne* sp. *Aphelenchus* sp. *Helicotylenchus* sp. *Pratylenchus* sp. *Rotylenchulus* sp. และ *Steinernema* sp.) ดังนั้น จึงจัดว่าเป็นไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับ Phylum Nematoda ขนาดผลผลิตปฏิกิริยาประมาณ 1 kb ส่วนไพรเมอร์ UNI_COIIM และ UNI_16sM พบว่ามีแถบเกิดขึ้นที่ช่อง 2-4 เท่านั้น ขนาดผลผลิตปฏิกิริยา PCR มีค่าประมาณ 150 bp และ 400 bp ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างที่ใส่ลงไปในห้องนี้คือ genus *Meloidogyne* เท่านั้น ส่วนตัวอย่างในห้องอื่นไพรเมอร์ทั้งสองไม่สามารถตรวจสอบได้ แสดงว่าไพรเมอร์ทั้งสองคือ UNI_COIIM และ UNI_16sM เป็นไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับ genus *Meloidogyne* ดังนั้น การออกแบบไพรเมอร์ทั้งสองตัวนี้ขึ้นมาเพื่อเป็นการตรวจสอบและวินิจฉัยโรครากปมเบื้องต้นว่าโรคที่เกิดขึ้นนั้นมีสาเหตุมาจากไส้เดือนฝอยรากปมหรือไส้เดือนฝอยสกุลอื่น

สรุป

ไพรเมอร์ UNI_16sM และ UNI_COIIM ซึ่งออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ในไมโทคอนเดรีย ของไส้เดือนฝอยรากปม มีความจำเพาะเจาะจงกับสกุลของไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* sp.) เท่านั้น โดยมีขนาดผลผลิต (PCR product) เท่ากับ 400 bp และ 150 bp ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ Nema_18s นั้น

ถูกออกแบบให้เฉพาะเจาะจงกับไส้เดือนฝอยทุกสกุล ใน Phylum Nematoda ทั้งนี้ผลผลิตของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นมีค่าประมาณ 1 kb ดังนั้น ในการแบ่งแยกไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ออกจากไส้เดือนฝอยชนิดอื่น ๆ สามารถปฏิบัติ โดยการนำวิธีการทางด้านชีวโมเลกุล โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไพรเมอร์ UNI_16sM และ UNI_COIIM ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อไส้เดือนฝอยรากปมเท่านั้นมาใช้ ซึ่งให้ผลในการตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว และสามารถปฏิบัติได้ โดยเจ้าหน้าที่ทั่วไปซึ่งไม่มีความรู้หรือไม่สามารถแบ่งแยกไส้เดือนฝอยรากปม ออกจากไส้เดือนฝอยชนิดอื่น ๆ ได้โดยใช้ลักษณะทางด้านรูปร่างหรือสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย

เอกสารอ้างอิง

- Ali, S. S. 1997. Status of nematode problem and research in India, pp. 74–82. In S. B. Sharma, ed. **Diagnosis of Key Nematode Pests of Chickpea and Pigeonpea and their Management. Proceeding of a Regional Training Course.** ICRISAT Center, Patancheru, Andhra Pradesh 502324, India
- Eisenback, J. D., E. C. Bernard and D. P. Schmitt. 1994. **Description of the Kona coffee root-knot nematode, *Meloidogyne konaensis* n.sp.** Journal of Nematology 26:363-374.
- Esbenshade, P. R. and A. C. Triantaphyllou. 1985. **Use of enzyme phenotypes for identification of *Meloidogyne* species.** Journal of Nematology 17: 6-20.
- Floyd, R. M., A. D. Rogers, P. J. D. Lambshhead and C. R. Smith. 2005. **Nematode-specific PCR primers for the 18S small subunit rRNA gene.** Molecular Ecology Notes 5: 611-612.
- Sasser, J. N. and C. C. Carter. 1985. Overview of the International *Meloidogyne* Project 1975-1984. pp. 19-24. In J. N. Sasser and C. C. Carter, eds.

- An Advanced Treatise on *Meloidogyne*.** Raleigh: North Carolina State University Graphics
- Sasser, J. N. and D. W. Freckman. 1987. A world perspective on nematode : The role of the society. pp. 7-14 *In* J. A. Veech and D. W. Dickson eds. **Vistas on nematology : A Commemoration of the Twenty-Fifth Anniversary of the Society of Nematologist.** Hyattsville, Maryland.
- Sasser J. N., J. D. Eisenback and C. C. Carter. 1983. **The International *Meloidogyne* Project- ITS Goals and Accomplishments.** Annual Review of Phytopathology. 21: 271-288.
- Toida, Y., Yaegashi, N. Tangjitsomkid and Keereewan, 1996. Identification of species of root-knot nematodes in Thailand though esterase bands by electrophoresis. DOA, Thailand and JIRCAS, Japan.