



กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์



ผลงานวิจัย ประจำปี ๒๕๖๕

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช



เล่มที่ ๓

Plant Protection Research and Development office
เอกสารวิชาการเลขที่ ๑/๒๕๖๕



รายงาน
ผลงานวิจัยประจำปี 2565
เล่ม 3

เอกสารวิชาการลำดับที่ 1/2565

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์



วิสัยทัศน์

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

ค่านิยม

ซื่อสัตย์ โปร่งใส งานวิจัยมีคุณภาพ

วัฒนธรรมองค์กร

รักองค์กร ทำงานอย่างมีเป้าหมาย และมุ่งผลสัมฤทธิ์

พันธกิจ

1. สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากการวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลเกษตรสู่กลุ่มเป้าหมาย
2. กำหนดและกำกับดูแลมาตรฐานระบบการผลิตและผลิตพันธุ์พืชและปัจจัยการผลิตพัฒนาระบบการตรวจรับรองสินค้าเกษตรด้านพืชให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
3. อนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืชแมลงและจุลินทรีย์
4. กำกับ ดูแล และพัฒนากฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ



คำนำ

“รายงานผลงานวิจัย ประจำปี 2564” เป็นเอกสารวิชาการที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชจัดทำต่อเนื่องติดต่อกัน 17 ปี จากผลงานวิจัยของนักวิจัย กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช กลุ่มวิจัยการกักกันพืช และกลุ่มบริหารศัตรูพืช ที่ดำเนินงานด้วยงบประมาณ ภายใต้แผนงานวิจัยและพัฒนา กรมวิชาการเกษตร ปี 2559 - 2564 ประกอบด้วยแผนงานวิจัย 3 แผนงาน ได้แก่ **1. แผนบูรณาการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมเพื่อลดการใช้สารเคมี** ประกอบไปด้วย 4 โครงการวิจัยเดี่ยว 1) โครงการวิจัยการบริหารศัตรูพืชแบบบูรณาการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ 2) โครงการวิจัยและพัฒนาเทคนิคการพ่นสารและประมวลผลภาพถ่ายเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดและตรวจสอบการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชด้วยอากาศยานไร้คนขับ 3) โครงการวิจัยการพัฒนาระบบการจัดการศัตรูพืชที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช 4) โครงการวิจัยเทคนิคเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช **2. แผนบูรณาการวิจัยและพัฒนาชีวภัณฑ์เพื่อการผลิตพืชปลอดภัย** ประกอบไปด้วย 2 แผนงานวิจัยย่อย คือ 2.1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์ ประกอบด้วย 4 โครงการวิจัยคือ 1) โครงการวิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร 2) โครงการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ 3) โครงการวิจัยต้นแบบการผลิตชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ 4) โครงการวิจัยการผสมผสานเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมศัตรูพืช แผนงานวิจัยย่อย 2.2 การทดสอบเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชเพื่อการผลิตพืชปลอดภัย ประกอบด้วย 1 โครงการวิจัย วิจัยการทดสอบเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชเพื่อการผลิตพืชปลอดภัยโดยเกษตรกรมีส่วนร่วม **3. แผนงานวิจัยและพัฒนามาตรการสุขอนามัยพืชและการเฝ้าระวังศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร** ประกอบไปด้วย 1 แผนงานวิจัยย่อย 4 โครงการวิจัย คือ 1) โครงการวิจัยมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร 2) โครงการวิจัยการศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า 3) โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดศัตรูพืชกักกันของพืชส่งออก 4) โครงการวิจัยการศึกษาสถานภาพศัตรูพืชกักกันในประเทศไทย และ 2 โครงการวิจัยเดี่ยว 1) โครงการวิจัยอนุกรมวิธานชีววิทยาและการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย 2) โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรัมวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

สำหรับแผนงานวิจัยอื่น ๆ ได้แก่ อ้อย ปาล์ม น้ำมัน ข้าวโพด ถั่วลิสง มะม่วง กาแฟ พริก การผลิตเมล็ดพันธุ์ การผลิตพืชท้องถิ่นของประเทศไทย กล้าย การใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นคำแนะนำ เป็นการรวมการดำเนินงานจาก 15 แผนงานวิจัย 29 โครงการวิจัย 37 กิจกรรม ที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชต้องรับผิดชอบในฐานะหัวหน้าการทดลอง รวมจำนวนการทดลองทั้งสิ้น 176 การทดลอง เป็นการทดลองร่วม 32 การทดลอง

การจัดทำรายงานผลงานวิจัยเล่มนี้ เสร็จสมบูรณ์ เพราะนักวิจัยจากกลุ่มวิจัย ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช มุ่งหวังจะเผยแพร่ผลงานด้านอารักขาพืชที่ตนได้วิจัยด้วยความพากเพียร และมุ่งมั่น ให้ผู้สนใจได้นำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ ทั้งการอ้างอิง การประยุกต์ เพื่อขยายผล ตลอดจนการต่อยอดผลงานวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จึงขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านไว้อีกครั้ง



(นายศรุต สุทธิอารมณ์)

ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สิงหาคม 2565



สารบัญ

| | |
|---|-----------|
| รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2564 เล่มที่ 1..... | 1-905 |
| รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2564 เล่มที่ 2..... | 906-1797 |
| รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2564 เล่มที่ 3..... | 1798-2789 |

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อย

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อย

กิจกรรมที่

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3. ศึกษาช่วงระยะเวลาการใช้สารเพื่อกำจัดวัชพืช..... 1
Glyphosate และ Glufosinate-ammonium ในอ้อย เพื่อ
ควบคุมวัชพืชอย่างมีประสิทธิภาพ
01-02-63-04-00-00-03-63
❖ อุษณีย์ จินดากุล และคณะ
- 4. ศึกษาประสิทธิภาพของสารกำจัดวัชพืช..... 21
ประเภทพ่นหลังออกในอ้อย
01-02-63-04-00-00-04-63
❖ เทอดพงษ์ มหาวงศ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปาล์มน้ำมัน (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปาล์มน้ำมัน

กิจกรรมที่ 4. ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชในปาล์มน้ำมันพื้นที่ปลูกใหม่

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 4.1 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชใน..... 46
ปาล์มน้ำมันพื้นที่ปลูกใหม่เขตภาคเหนือ
01-118-60-01-04-00-01-63
❖ จริญญา ปิ่นสุภา และคณะ
- 4.2 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชในปาล์มน้ำมัน..... 72
พื้นที่ดินเปรี้ยว
01-118-60-01-04-00-02-63
❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย และคณะ



- 4.3 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชในปาล์มน้ำมัน..... 103
เขตพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนัง
01-118-60-01-04-00-03-63

❖ ยุรวรรณ อนันตมณี และคณะ

- 4.4 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชในปาล์มน้ำมัน..... 126
เขตพื้นที่พรุ
01-118-60-01-04-00-04-63

❖ เทอดพงษ์ มหาวงศ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตข้าวโพดฝักสด (โครงการวิจัยเดี่ยว)

กิจกรรมที่ 3. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการอารักขาค้าวโพดฝักสด

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3.6 การศึกษาประสิทธิภาพของสารกำจัดวัชพืช..... 165
แบบผสม (tank mixture) ในข้าวโพดหวาน
01-13-59-02-03-00-06-63

❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาถั่วลิสงเพื่อเสริมสร้างระบบการผลิตที่ยั่งยืน และความมั่นคง
ทางอาหาร

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตถั่วลิสง

กิจกรรมที่ 3. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตถั่วลิสงเฉพาะพื้นที่

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3.9 ผลของสารกำจัดวัชพืชต่อการควบคุมวัชพืชใน..... 190
ถั่วลิสงและผลกระทบต่อข้าว ☺
01-17-59-01-03-00-09-63

❖ เทอดพงษ์ มหาวงศ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตมะม่วงเพื่อเพิ่มมูลค่าทาง
เศรษฐกิจ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตมะม่วงเพื่อเพิ่มศักยภาพการแข่งขันใน
ตลาดส่งออก

กิจกรรมที่ 3.

กิจกรรมย่อยที่ -



- การทดลอง ➤ 4. ศึกษาประสิทธิภาพและระบบของการใช้สารฆ่าแมลง.....
แบบสลักกลุ่มเพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟในมะม่วง
01-202-63-02-00-00-04-63

❖ อูราพร หนูนารถ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมเพื่อลดการใช้สารเคมี
แผนงานวิจัยย่อย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมเทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัด
ศัตรูพืชและภาพถ่ายทางอากาศ

โครงการวิจัย วิจัยเทคนิคเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช(03-33-60-01)

กิจกรรมที่ 1. วิจัยและพัฒนาเทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.6 เทคนิคการใช้ไส้เดือนฝอย..... 229
Steinernema carpocapsae Weiser ควบคุมด้วงหมัดผักใน
คะน้าด้วยระบบการให้น้ำแบบสปริงเกอร์
03-33-60-01-01-00-06-62

❖ สุภางคณา ธีรวัช และคณะ

- 1.7 เทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อควบคุม..... 252
หนอนกออ้อยด้วยระบบการให้น้ำแบบน้ำหยด
03-33-60-01-01-00-07-62

❖ สุภางคณา ธีรวัช และคณะ

- 1.8 การฉีดสารเข้าต้นเพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ 2775
เพลี้ยไก่แจ้ และหนอนขอนใบส้มเขียวหวาน
03-33-60-01-01-00-08-62

❖ สุภางคณา ธีรวัช และคณะ

กิจกรรมที่ 2. การศึกษาผลของการใช้สารแบบผสม สารเสริมประสิทธิภาพและ
คุณภาพน้ำที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.6 ศึกษาผลของสารเสริมประสิทธิภาพที่มีต่อประสิทธิภาพ.... 259
ในการป้องกันกำจัดและความคงทนของสารฆ่าแมลงที่ใช้ในการ
ป้องกันกำจัดหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.)^๑
03-33-60-01-02-00-06-62

❖ นลินา ไชยสิงห์ และคณะ



➤ 2.7 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภท..... 272

พ่นก่อนวัชพืชงอก (pre-emergence herbicide) ผสมร่วมกับ
ประเภทพ่นหลังวัชพืชงอก (post-emergence herbicide)
ในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

03-33-60-01-02-00-09-63

❖ จรรย์ญา ปิ่นสุภา และคณะ

➤ 2.8 การศึกษาคู่ผสมระหว่างสารกำจัดวัชพืชประเภท..... 293

ใช้ก่อนและหลังวัชพืชงอกในสับปะรด

03-33-60-01-02-00-10-63

❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงษ์ชัย และคณะ

➤ 2.9 ศึกษาช่วงระยะเวลาการใช้สารกำจัดวัชพืชประเภท..... 314

พ่นหลังวัชพืชงอก (diquat, glyphosate และ glufosinate-
ammonium) ในมันสำปะหลัง

03-33-60-01-02-00-11-63

❖ ปรัชญา เอกฐิน และคณะ

➤ 2.11 การสังเคราะห์และทดสอบประสิทธิภาพ.....

อนุภาคนาโนคอปเปอร์ในการควบคุม โรคใบจุดพริกที่เกิดจาก
แบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*

03-33-60-01-02-00-08-62

❖ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ และคณะ

โครงการวิจัย และพัฒนาเทคนิคการพ่นสารและประมวลผลภาพถ่ายเพื่อใช้ในการป้องกัน
กำจัด และตรวจสอบการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชด้วยอากาศยานไร้คนขับ

กิจกรรมที่ 1. วิจัยและพัฒนาเทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 1.1 ประสิทธิภาพการพ่นด้วยอากาศยานไร้คนขับ..... 361

(Unmanned Aerial Vehicle (UAV)) ในการป้องกันกำจัด
ศัตรูค่น้ำ

03-60-63-01-01-00-01-63

❖ อนุสรณ์ พงษ์มี และคณะ



- 1.2 ประสิทธิภาพการพ่นด้วยอากาศยานไร้คนขับ..... 375
(Unmanned Aerial Vehicle (UAV)) ในการป้องกันกำจัด
ศัตรูหอมแบ่ง

03-60-63-01-01-00-02-63

❖ นลินา ไชยสิงห์ และคณะ

- 1.3 ประสิทธิภาพการพ่นด้วยอากาศยาน..... 389
ไร้คนขับ (Unmanned Aerial Vehicle (UAV)) ในการป้องกัน
กำจัดแมลงและไรศัตรูมันสำปะหลัง

03-60-63-01-01-00-03-63

❖ พฤทธิชาติ ปุญวัฒน์โท และคณะ

**กิจกรรมที่ 2 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการประเมินสถานการณ์การระบาดและ
ประเมินความเสี่ยงจากศัตรูพืช**

กิจกรรมย่อยที่ –

- การทดลอง ➤ 2.1 การศึกษาเทคนิคประมวลผลภาพถ่ายเพื่อ..... 401
ใช้ในการตรวจสอบการเข้าทำลายของไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง

03-60-63-01-02-00-01-63

❖ วีระชัย สมศรี และคณะ

- 2.2 การศึกษาลักษณะอาการการเข้าทำลายของ..... 420
หนอนหัวดำมะพร้าวและแมลงตำหนามมะพร้าวจากภาพถ่าย

03-60-63-01-02-00-02-63

❖ พัชรวิวรรณ จงจิตต์เมตต์ และคณะ

**โครงการวิจัย วิจัยการพัฒนาระบบการจัดการศัตรูพืชที่ด้านทานต่อสารป้องกันกำจัด
ศัตรูพืช (03-29-60-01)**

**กิจกรรมที่ 1. การศึกษาความต้านทานและการจัดการความต้านทานศัตรูพืชในพืช
บริโภคและพืชอาหารสัตว์**

กิจกรรมย่อยที่ –

- การทดลอง ➤ 1.2 การจัดการสลับใช้สารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆในการ..... 443
ป้องกันกำจัด เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* Hood ในพริก

03-29-60-01-01-00-15-63

❖ สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ



- 1.4 การจัดการสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 457
หนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* (Hubber) ในพื้นที่
ปลูกมะเขือเทศที่สำคัญ
03-29-60-01-01-00-10-62

❖ ชีราทัย บุญญาประภา และคณะ

- 1.6 การเปลี่ยนแปลงความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง..... 480
spinetoram ในหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. ในพืช
ตระกูลกะหล่ำ
03-29-60-01-01-00-16-63

❖ สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ

- 1.7 ความต้านทานและการจัดการสารกำจัดไร ไนโร..... 488
สองจุด *Tetranychus urticae* Koch ในสตรอว์เบอร์รี
03-29-60-01-01-00-11-62

❖ ณพชกร ธัญชัย และคณะ

- 1.15 การจัดการสารฆ่าแมลงแบบหมุนเวียน..... 521
ตามกลุ่มกลไกการออกฤทธิ์เพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟในมะม่วง
03-29-60-01-01-00-12-62

❖ ศรีจันทร์ ศรีจันทร์ และคณะ

- 1.17 สถานการณ์หญ้าตีนกา (*Eleusine indica*) 544
ต้านทานสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Aryloxyphenoxypropionate
ในแหล่งปลูกผักและการจัดการ
03-29-60-01-01-00-14-62

❖ จริญญา ปิ่นสุภา และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยการบริหารศัตรูพืชแบบบูรณาการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต
ของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ (03-34-60-01)

กิจกรรมที่ 2. การบริหารศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM) ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.11 การจัดการศัตรูหอมแดงแบบผสมผสาน..... 2766
03-34-60-01-02-00-11-63

❖ วิภาดา ปลอดครบุรี และคณะ



แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์
สู่เชิงพาณิชย์

โครงการวิจัย วิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร
กิจกรรมที่ 1.สำรวจและศึกษาศักยภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมแมลงไรและสัตรพ์
ศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.15 ชนิดและศักยภาพของบัวต้วทำในการ..... 590
ควบคุมเพลี้ยแป้ง
03-05-59-01-01-00-15-62
- ❖ ประภัสสร เขยคำแหง และคณะ
- 1.20 การคัดเลือกชนิดและศักยภาพของ..... 597
ไส้เดือนฝอยในวงศ์ Rhabditidae ในการกำจัดหอยศัตรูพืช
03-05-59-01-01-00-20-63
- ❖ อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข และคณะ
- 1.21 การคัดเลือกชนิดและศักยภาพของสาหร่าย..... 614
สีเขียวแกมน้ำเงินวงศ์ Oscillatoriaceae ที่มีประสิทธิภาพใน
การกำจัดหอยศัตรูพืช
03-05-59-01-01-00-21-63
- ❖ ศุภกร วงษ์เรืองพิบูล และคณะ

กิจกรรมที่ 2. สำรวจและศึกษาศักยภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.8 การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการ..... 642
ควบคุมเชื้อรา *F.oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริก
03-05-59-01-02-00-07-62
- ❖ มะโนรัตน์ สุดสงวน และคณะ
- 2.11 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพ..... 666
เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคราแป้ง (Powdery
mildew) พืชตระกูลแตง
03-05-59-01-02-00-10-62
- ❖ ทศนาพร ทศคร และคณะ



- 2.12 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มี..... 695
ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาว
03-05-59-01-02-00-11-62

❖ กาญจนา ศรีไม้ และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุม
ศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ (03-05-59-02)

กิจกรรมที่ 1. การผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมแมลง ไร และสัตว์
ศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.26 ศึกษาวิธีการผลิตขยายด้วงเต่าสตีธอร์ส..... 713
Stethorus pauperculus (Weise)(Coleoptera:
Coccinellidae) และประสิทธิภาพในการควบคุมไรศัตรูพืช
03-05-59-02-01-00-26-61

❖ วีระชัย สมศรี และคณะ

- 1.37 การผลิตและการใช้แมลงช้างปีกใส..... 734
Chrysoperla carnea (stephens) ควบคุมเพลี้ยอ่อน Aphisp.
ในสตรอเบอร์รี่
03-05-59-02-01-00-37-62

❖ ประภัสสร เขยคำแหง และคณะ

- 1.38 การผลิตขยายและการใช้มวนตาโต.....
Geocorisochropterus Fieber เพื่อควบคุมเพลี้ยอ่อน
03-05-59-02-01-00-38-62

❖ ภัทรพร สรรพนุเคราะห์และคณะ

- 1.40 ทดสอบประสิทธิภาพในการใช้แบคทีเรียบีที..... 743
ร่วมกับการใช้กับดักฟีโรโมนหนอนใยฝักในการควบคุมหนอนใย
ฝักในคะน้า
03-05-59-02-01-00-40-63

❖ อนุสรณ์ พงษ์มี และคณะ

- 1.41 ศึกษากระบวนการทำแห้งเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม..... 753
ในรูปแบบเชื้อสดอัดเม็ด
03-05-59-02-01-00-41-63

❖ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และคณะ



- 1.44 การเพาะเลี้ยงหอยน้ำตัวห้ำสกุล *Clea* 777
เพื่อกำจัดหอยศัตรูพืช

03-05-59-02-01-00-44-63

❖ ดาราพร รินทะรักษ์ และคณะ

- 1.45 การใช้มวนตัวห้ำ *Cardiastethus exiguus* Poppius.... 795
(Hemiptera: Anthocoridae) ไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii*
Athias-Henriot (Arachnida: Phytoseiidae) และไรตัวห้ำ
Amblyseius longispinosus (Evans) (Acari: Phytoseiidae)

ในการควบคุมศัตรูเพลื่อนในสภาพโรงเรือน

03-05-59-02-01-00-44-63

❖ อทิตติยา แก้วประดิษฐ์ และคณะ

กิจกรรมที่ 2. การผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.8 การพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* 807
และวิธีการใช้เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากแบคทีเรีย

03-05-59-02-02-00-08-61

❖ รุ่งนภา ทองเคิ่ง และคณะ

- 2.9 การพัฒนากระบวนการผลิตสารชีวภัณฑ์..... 830
Bacillus subtilis ไอโซเลท 20W16 และ/หรือ 20W33 เพื่อใช้
ควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรค
แอนแทรคโนสพริก

03-05-59-02-02-00-09-62

❖ บุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ

- 2.10 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* แบบผง..... 844
เพื่อควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อ
แบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae*

03-05-59-02-02-00-10-62

❖ กาญจนา ศรีไม้ และคณะ



➤ 2.11 การพัฒนารูปแบบการผลิตและการใช้..... 865

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดเรืองแสงสีรีนร์คมี
Neonothopanus nambi (Speg.) R.H. Petersen & Krisai
ต่อการควบคุมโรคเน่าดำในกล้วยไม้

03-05-59-02-02-00-11-62

❖ สุรียพร บัวอาจ และคณะ

➤ 2.12 ศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ด..... 878

เรืองแสง *Neonothopanus nambi* (Speg.) R.H. Petersen &
Krisai ในการควบคุมโรครากเน่า และโคนเน่าของทุเรียนที่มี
สาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler[⊕]

03-05-59-02-02-00-12-62

❖ สุรียพร บัวอาจ และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยต้นแบบการผลิตชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์
(03-05-62-04)

กิจกรรมที่ -

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 1. ต้นแบบผลิตมวลเพาะผสมธาตุอย่างเป็นระบบเพื่อ..... 2699

การควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน

03-05-62-04-00-00-01-62

❖ สาทิพย์ มาลี และคณะ

➤ 2. ต้นแบบผลิตแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* 897

อย่างเป็นระบบเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน

03-05-62-04-00-00-02-62

❖ ประภัสสร เขยคำแหง และคณะ

➤ 3. ต้นแบบการผลิตแมลงหางหนีบขาวแหวนและ..... 906

แมลงหางหนีบน้ำตาลเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน

03-05-62-04-00-00-03-62

❖ นันทนัช พินศรี และคณะ

➤ 4. ต้นแบบการผลิตขยายมวลพิษมาตเพื่อการควบคุม..... 2712

แมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน[⊕]

03-05-62-04-00-00-04-63

❖ สาทิพย์ มาลี และคณะ



โครงการวิจัย วิจัยการผสมผสานเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมศัตรูพืช

(03-05-59-03)

กิจกรรมที่ -

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 3. เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.....

ในกระเจียบเขียวแบบผสมผสาน

03-05-59-03-00-00-03-62

❖ ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ และคณะ

➤ 4 ทดสอบเทคโนโลยีการใช้ก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสงสิรินรัมย์มี..... 939

Neonothopanus nambi (Speg.) R.H. Petersen & Krisai

ควบคุมโรครากปมในพริก

03-05-59-03-00-00-04-62

❖ สุรียพร บัวอาจ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยการทดสอบเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชเพื่อการผลิตพืช
ปลอดภัยโดยเกษตรกรมีส่วนร่วม (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยการทดสอบเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชเพื่อการผลิตพืช
ปลอดภัยโดยเกษตรกรมีส่วนร่วม

กิจกรรมที่ 4. การทดสอบการใช้ชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชเพื่อการผลิตพืชปลอดภัยโดย
เกษตรกรมีส่วนร่วมในพื้นที่ภาคกลาง

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 4.1 ทดสอบการใช้ชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมในการควบคุม..... 953

ศัตรูพืชในการผลิตหอมแบ่งในจังหวัดราชบุรี

03-65-63-01-04-00-01-63

❖ อิศเรศ เทียนทัต และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตพืชเศรษฐกิจเฉพาะพื้นที่ภาคตะวันออก
เฉิงเหนือดอนล่าง (02-08-59-02)

โครงการวิจัย วิจัยการเพิ่มศักยภาพการผลิตน้อยหน้าคุณภาพ

กิจกรรมที่ 1. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้อยหน้า

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 1.6 ศึกษาสาเหตุการแพร่ระบาดของโรคกิ่งแห้งของน้อยหน้า..... 961

และวิธีการจัดการโรคที่มีประสิทธิภาพ

02-08-59-02-01-00-06-63

❖ พจนา ตระกูลสุวรรณ์ และคณะ



แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อใช้เป็นคำแนะนำในการผลิตพืชบริโภคภายในประเทศและส่งออก (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อใช้เป็นคำแนะนำในการผลิตพืชบริโภคภายในประเทศและส่งออก (03-32-60-01)

กิจกรรมที่ 1. ศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อเป็นคำแนะนำสำหรับพืชผักที่มีปัญหาการส่งออกไปสหภาพยุโรป

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 1.15 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดหนอนเจาะ..... 989
ผลมะเขือ *Leucinodes orbonalis* Guenee ในมะเขือเปราะ
03-32-60-01-01-00-13-63

❖ สุชาดา สุพรศิลป์ และคณะ

➤ 1.16 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืช..... 1007
ในข้าวโพดฝักอ่อนเพื่อการส่งออก
03-32-60-01-01-00-14-63

❖ เอกรัตน์ ฐนทอง และคณะ

กิจกรรมที่ 2. ศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อเป็นคำแนะนำสำหรับพืชผักไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับ และพืชไร่ สำหรับบริโภคภายในประเทศและการส่งออก

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 2.42 การทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคราสนิม..... 1039
ในถั่วฝักยาวสาเหตุจากเชื้อ *Uromyze phaseoli* var. *vignae*
03-32-60-01-02-00-46-63

❖ นพพล สัตยาสัย และคณะ

➤ 2.43 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1054
เพลี้ยไฟฝ้ายในแตงกวา
03-32-60-01-02-00-47-63

❖ สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ

➤ 2.44 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1062
หนอนชอนใบ *Liriomyza* sp. ในมะเขือเทศ
03-32-60-01-02-00-48-63

❖ นลินา ไชยสิงห์ และคณะ



- 2.46 ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืช..... 1078
ในการป้องกันกำจัดโรคราแป้งองุ่นที่มีสาเหตุจากเชื้อรา
Erysiphe necator [⊕]
03-32-60-01-02-00-49-63
❖ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ
- 2.47 ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1087
โรคราน้ำค้างขององุ่นสาเหตุจากเชื้อรา *Plasmopara viticola*
(Berk & Curt) Berl & de Toni [⊕]
03-32-60-01-02-00-50-63
❖ สุรียพร บัวอาจ และคณะ
- 2.48 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1095
โรครากปมของฝรั่งที่มีสาเหตุจากไส้เดือนฝอยรากปม
03-32-60-01-02-00-51-63
❖ อติยา ชยาภักพัฒนา และคณะ
- 2.49 ทดลองประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกัน..... 1119
กำจัดหนอนเจาะดอกมะลิในมะลิ
03-32-60-01-02-00-52-63
❖ สมรวย รวมชัยอภิกุล และคณะ
- 2.50 การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1132
โรคพืชบางชนิดในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Phytophthora*
palmivora สาเหตุโรคเน่าดำในกล้วยไม้ [⊕]
03-32-60-01-02-00-53-63
❖ บุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ
- 2.51 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคเน่าดำ..... 1142
ของหน้าวัว สาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica*
03-32-60-01-02-00-54-63
❖ สุณิรัตน์ สิมะเต็อ และคณะ
- 2.57 ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 1155
หนอนแมลงวันเจาะลำต้นในถั่วเหลือง
03-32-60-01-02-00-55-63
❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ



- 2.58 ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 1168
เพลี้ยไฟในถั่วเขียว
03-32-60-01-02-00-56-63
❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ
- 2.59 ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1180
หนอนแดงในฝรั่ง
03-32-60-01-02-00-57-63
❖ กรกต ดำรักษ์ และคณะ
- 2.60 การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1193
หนอนซอนใบส้ม; *Phyllocnistis citrella* Stainton ในส้มโอ
03-32-60-01-02-00-58-63
❖ บุษบง มั่นมั่นคง และคณะ
- 2.61 ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 1202
เพลี้ยจักจั่นในมะม่วง
03-32-60-01-02-00-59-63
❖ ศรีจันทรรจ ศรีจันทรา และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยมาตรการสุขอนามัยพืช

โครงการวิจัย วิจัยมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

(03-04-59-01)

กิจกรรมที่ 1. ศึกษาศัตรูพืชในประเทศเพื่อการค้าระหว่างประเทศ

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.1 การศึกษาชนิดของแมลงศัตรูพืชของพืชส่งออก..... 1217
ได้แก่ กล้วย มะยงชิด ขนุน กล้วยาสนาม แก้วมังกร และสับปะรด
พืชนำเข้า ได้แก่ เมล่อน มะนาว พริก มะเขือ ถั่วเหลือง และ
แตงกวา^๕
03-04-59-01-01-00-01-59
❖ เกศสุดา สนศิริ และคณะ
- 1.2 การศึกษาชนิดของไรศัตรูพืชของพืชส่งออก ได้แก่..... 1251
กล้วย มะยงชิด ขนุน กล้วยาสนาม แก้วมังกร สับปะรด พืชนำเข้า ได้แก่
เมล่อน มะนาว พริก มะเขือ ถั่วเหลือง และ แตงกวา^๕
03-04-59-01-01-00-02-59
❖ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง และคณะ



➤ 1.3 การศึกษาชนิดของโรคพืชของพืชส่งออก..... 1316

ได้แก่ กล้วย มะยงชิด ขนุน กล้วยาสนาม แก้วมังกร และสับปะรด
พืชนำเข้า ได้แก่ เมล่อน มะนาว พริก มะเขือ ถั่วเหลือง และแตงกวา
03-04-59-01-01-00-03-59

❖ มะโนรัตน์ สุดสงวน และคณะ

➤ 1.4 การศึกษาชนิดของวัชพืชของพืชส่งออก..... 1360

ได้แก่ แก้วมะกร และสับปะรด พืชนำเข้า ได้แก่ ถั่วเหลือง และ
แตงกวา

03-04-59-01-01-00-04-59

❖ ธัญชนก จงรักไทย และคณะ

กิจกรรมที่ 2. ศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 2.12 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของ..... 2723

ผลพลั่มสดนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล

03-04-59-01-02-00-12-62

❖ วรัญญา มาลี และคณะ

➤ 2.13 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของ..... 1392

ผลท้อสดนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล

03-04-59-01-02-00-13-62

❖ ขวลิต จิตนันท์ และคณะ

➤ 2.16 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของ..... 1440

เมล็ดพันธุ์ทานตะวันนำเข้าจากประเทศอาร์เจนตินา

03-04-59-01-02-00-16-62

❖ ณิชสุตา บรรเลงสวรรค์ และคณะ

➤ 2.17 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช..... 1470

ของเมล็ดพันธุ์ข้าวฟ่างนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา

03-04-59-01-02-00-17-64

❖ คมศร แสงจินดา และคณะ

กิจกรรมที่ 3. การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าสินค้าเกษตร

การทดลอง ➤ 3.3 การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้า..... 2440

เมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน

03-04-59-01-03-00-04-63

❖ วาสนา รุ่งสว่าง และคณะ



➤ 3.5 การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้า..... 1485

เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสหรัฐอเมริกา

03-04-59-01-03-00-05-63

❖ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และคณะ

➤ 3.6 การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้า..... 1501

เมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากมาเลเซีย

03-04-59-01-03-00-06-63

❖ วาสนา ฤทธิ์ไธสง และคณะ

➤ 3.7 การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้า..... 1517

ผลทับทิมสดจากรัฐอิสราเอล

03-04-59-01-03-00-07-63

❖ อลงกต โพธิ์ดี และคณะ

กิจกรรมที่ 4. ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อการเปิดตลาดสินค้าเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 4.7 ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออก..... 1527

เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

03-04-59-01-04-00-07-63

❖ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และคณะ

➤ 4.8 ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออกผลขนุน..... 2749

03-04-59-01-04-00-08-63

❖ วรรณญา มาลี และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยการศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า (03-04-59-02)

กิจกรรมที่ 1. ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชและส่วนของพืชที่นำเข้าเพื่อ

ขยายพันธุ์

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 1.2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงโม..... 1561

นำเข้าจาก ชิลี และ ฟิลิปปินส์

03-04-59-02-01-00-02-59

❖ วันเพ็ญ ศรีชาติ และคณะ



- 1.3 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์เมล็ดอ่อน..... 1577
นำเข้าจากชิลี และ เนเธอร์แลนด์ ❖
03-04-59-02-01-00-03-59

❖ วันเพ็ญ ศรีชาติ และคณะ

- 1.10 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี..... 1591
นำเข้าจากนิวซีแลนด์ และญี่ปุ่น
03-04-59-02-01-00-12-63

❖ โสภา มีอำนาจ และคณะ

- 1.11 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ฝักซี..... 1611
นำเข้าจากอิตาลี และสหรัฐอเมริกา
03-04-59-02-01-00-13-63

❖ วานิช คำพานิช และคณะ

- 1.12 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์คะน้า..... 1624
นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน และประเทศนิวซีแลนด์
03-04-59-02-01-00-14-63

❖ พรรณิภา เป็ชัยศรี และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดศัตรูพืชกักกันของพืชส่งออก (03-04-59-03)

กิจกรรมที่ 1. วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยวิธีการอบไอน้ำเพื่อการส่งออก

กิจกรรมย่อยที่ –

- การทดลอง ➤ 1.5 วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน..... 2453
สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera latifrons* (Hendel)
ในส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเพื่อการส่งออก
03-04-59-03-01-00-05-62

❖ พุฒิพงษ์ เฟ็งฤกษ์ และคณะ

- 1.6 วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน..... 2501
สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลมะนาวแป้นพิจิตร 1 เพื่อการส่งออก ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อ
การตายของไข่แมลงวันทองในผลมะนาวที่ผ่านการอบไอน้ำ
(เปรียบเทียบระหว่างมะนาวแป้น กับมะนาวพิจิตร1) ❖
03-04-59-03-01-00-06-62

❖ สลักจิต พานคำ และคณะ



- 1.7 วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน..... 2561
เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามเพื่อการส่งออก^๑
03-04-59-03-01-00-07-62

❖ ชัยณรงค์ สนศิริ และคณะ

- 1.8 วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน..... 2608
สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์เพื่อการส่งออก
03-04-59-03-01-00-08-62

❖ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ และคณะ

- 1.9 วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน..... 2637
สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลแก้วมังกรเนื้อแดงเพื่อการส่งออก
03-04-59-03-01-00-09-62

❖ ปวีณา บุษยาเทียน และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยการศึกษาศาณภาพศัตรูพืชที่ชุกกักกันในประเทศไทย (03-04-59-04)

กิจกรรมที่ 1. การศึกษาศัตรูพืชในประเทศเพื่อการค้าระหว่างประเทศ

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 12. การศึกษาศาณภาพของรา *Bipolaris zeicola* 1636
(G.L.Stout) Shoemaker สาเหตุโรค Northern Corn Leaf
Spot ประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-12-62

❖ ชนิทร ดวงสอาด และคณะ

- 13. การศึกษาศาณภาพของเชื้อแบคทีเรีย..... 1659
Burkholderia glumae สาเหตุโรค Bacterial Panicle Blight
ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-13-62

❖ ณัฐธิมา ไชยจิตเจริญกุล และคณะ

- 14. การศึกษาศาณภาพแบคทีเรีย..... 1670
Pseudomonas syringae pv. *tomato* สาเหตุโรค Bacterial
speck ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-14-62

❖ ชลธิชา รักใคร่ และคณะ



- 15. การศึกษาสถานภาพเชื้อไวรัส..... 1682
Maize Dwarf Mosaic Virus ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-15-62
❖ สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ
- 16. การศึกษาสถานภาพของเชื้อไวรัส..... 2679
Pepper Mild Mottle Virus ของพริก
03-04-59-04-01-00-16-62
❖ เยาวภา ตันติวานิช และคณะ
- 17. การศึกษาสถานภาพของเชื้อไวรัส..... 1695
African Cassava Mosaic Virus (ACMV) ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-17-62
❖ กาญจนา วาระวิชนี และคณะ
- 18. การศึกษาสถานภาพของแบคทีเรีย *Xylella fastidiosa*..... 1721
ของงุ่นในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-18-62
❖ ธิดาวรรณ ชมเดช และคณะ
- 19. การศึกษาสถานภาพด้วงฟูเรอโรส..... 1738
Pantomorus cervinus (Boheman) ของพืชตระกูลส้มใน
ประเทศไทย^๑
03-04-59-04-01-00-19-62
❖ ดนัย ชัยเรือนแก้ว และคณะ
- 20. การศึกษาสถานภาพเพลี้ยหอย..... 1751
Aspidiotus nerii Bouché ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-20-62
❖ ดนัย ชัยเรือนแก้ว และคณะ
- 21. การศึกษาสถานภาพวัชพืช *Chenopodium album* L..... 1770
ของพืชผักในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-21-62
❖ ชุติมา อ้อมกิ่ง และคณะ
- 22. การศึกษาสถานภาพของไส้เดือนฝอยรากปม..... 1784
Meloidogyne thailandica ในจังหวัดประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-22-62
❖ ธิติยา ชยาภักพัฒนา และคณะ



- 23.การศึกษาสถานภาพของเชื้อแบคทีเรีย..... 1798

Pseudomonas fuscovaginae สาเหตุโรค brown sheath rot ของข้าวในประเทศไทย

03-04-59-04-01-00-23-63

❖ ณัฐธิมา ไชยจิตเจริญกุล และคณะ

- 24.การศึกษาสถานภาพของเชื้อไวรัส *Lettuce mosaic* 1807

virus.สาเหตุโรคใบด่างผักกาดหอมในประเทศไทย

03-04-59-04-01-00-24-63

❖ ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของ ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของ ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย (03-30-60-01)

กิจกรรมที่ 1. สํารวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 สํารวจชนิด และอนุกรมวิธานของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ

- การทดลอง ➤ 1.1.16 ชนิดของแมลงหมีขาว (Hemiptera: Aleyrodidae)..... 1834

ในพืชผักสวนครัว เพื่อการส่งออกของประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-16-62

❖ สุนัดดา เชาวลิต และคณะ

- 1.1.17 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงค์ย่อย Diaspidinae... 1857

(Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-17-62

❖ ชมัยพร บัวมาศ และคณะ

- 1.1.18 อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae 1904

(Hemiptera: Coccoidea) ในประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-18-62

❖ ชมัยพร บัวมาศ และคณะ

- 1.1.19 อนุกรมวิธานและความหลากหลายชนิดของ 1922

แตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวน วงศ์ Pentatomidae ศัตรูพืช

สำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-19-62

❖ จารุวัฒน์ แท้กุล และคณะ



- 1.1.20 อนุกรมวิธานของแมลงช่วงสั้นน้ำตาลวงศ์..... 1951
Hemerobiidae และแมลงช่วงปีกแบ่ง วงศ์ Coniopterygidae
ในประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-20-62

❖ อาทิตย์ รักกสิกร และคณะ

- 1.1.21 อนุกรมวิธานไรขาว วงศ์ Tarsonemidae 1977
ในประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-21-62

❖ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง และคณะ

- 1.1.22 การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง..... 2018
ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-22-62

❖ พัชรวิวรรณ จงจิตเมตต์ และคณะ

- 1.1.23 อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัยของ..... 2030
แมลงวันหนอนขนอบในวงศ์ Agromyzidae (Order : Diptera)
ในพืชผัก

03-30-60-01-01-01-23-62

❖ ยุวรินทร์ บุญทาบ และคณะ

- 1.1.24 อนุกรมวิธานแมลงมุมวงศ์ Oxyopidae..... 2069
03-30-60-01-01-01-24-63

❖ วิมลวรรณ โชติวงศ์ และคณะ

**กิจกรรมย่อยที่ 1.2 สํารวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช
และจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช**

- การทดลอง ➤ 1.2.13 อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และวิวัฒนาการของเชื้อรา 2091
Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช

03-30-60-01-01-02-13-63

❖ ชนินทร ดวงสอาด และคณะ

- 1.2.14 อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของราสนิม..... 2140
วงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืช

03-30-60-01-01-02-14-63

❖ ชนินทร ดวงสอาด และคณะ



- 1.2.15 จัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย..... 2180
สกุล *Radopholus* ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล
03-30-60-01-01-02-15-63

❖ อติยา ชยาภักพัฒนา และคณะ

- 1.2.16 การศึกษาและจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของ..... 2689
ยาสูบที่พบในประเทศไทย
03-30-60-01-01-02-16-63

❖ เยาวภา ตันติวานิช และคณะ

**กิจกรรมที่ 2. ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ (วงจรรชีวิต
การเข้าทำลาย พืชอาหาร และการแพร่กระจาย)**

- การทดลอง ➤ 2.1.10 สันฐานวิทยาและชีววิทยา..... 2199
ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera:
Aphididae) ในประเทศไทย
03-30-60-01-02-01-10-63

❖ เกศสุตา สนศิริ และคณะ

กิจกรรมย่อยที่ 2.3 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืช

- การทดลอง ➤ 2.3.5 ชีววิทยาของเทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia*..... 2215
(G. Don) Excell.)
03-30-60-01-02-03-05-63

❖ ธัญชนก จงรักไทย และคณะ

กิจกรรมที่ 3. การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3.15 การศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini..... 2235
(Diptera: Tephritidae) ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
03-30-60-01-03-00-15-62

❖ ยุวรินทร์ บุญทาบ และคณะ

- 3.16 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด และชนิดของ..... 2259
เพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบใน
หน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย
03-30-60-01-03-00-16-63

❖ อธิธิพล บรรณาการ และคณะ



แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร (03-31-60-01)

กิจกรรมที่ 1. การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อนำเข้าสินค้าเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.4 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*..... 2278
ในข้าวด้วยเทคนิค Real time PCR
03-31-60-01-01-00-04-62
❖ ทิพวรรณ กันหาญาติ และคณะ
- 1.5 พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย..... 2292
Ralstonia solanacearum species complex สาเหตุโรค
เหี่ยวของกล้วย ☺
03-31-60-01-01-00-05-62
❖ ทิพวรรณ กันหาญาติ และคณะ
- 1.6 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย..... 2306
Pseudomonas fuscovaginae ในข้าวด้วยเทคนิค LAMP
(Loop-Mediated Isothermal Amplification)
03-31-60-01-01-00-06-63
❖ ญัตติมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ
- 1.7 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา..... 2318
Fusarium oxysporum f.sp. cubense สายพันธุ์ Tropical
Race 4 ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction
03-31-60-01-01-00-07-63
❖ ชนินทร ดวงสอาด และคณะ
- 1.8 การตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ..... 2339
Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) ด้วยเทคนิค
Next Generation Sequencing (NGS)
03-31-60-01-01-00-08-63
❖ ภูวนารถ มณีโชติ และคณะ



กิจกรรมที่ 2. การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อ
การป้องกันกำจัด และการส่งออก

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.12 การผลิตโปรตีนและแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ..... 2353
Immunodominant membrane protein (Imp) ของเชื้อไฟโต
พลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย
ในประเทศไทย
03-31-60-01-02-00-12-62
- ❖ กาญจนา วาระวิชนี และคณะ
- 2.13 การตรวจสอบแบคทีเรีย..... 2367
Xanthomonas campestris pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ด
ด้วยเทคนิค Real-time PCR
03-31-60-01-02-00-13-62
- ❖ รุ่งนภา ทองเครื่อง และคณะ
- 2.15 การพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง..... 2385
Bactrocera correcta (Diptera: Tephritidae) เพื่อการนำเข้า
และส่งออกด้วยไพร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง
03-31-60-01-02-00-15-62
- ❖ ยวรินทร์ บุญทพ และคณะ
- 2.16 การใช้เทคนิค Multiplex PCR 2414
ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*,
M. javanica, *M. arenaria* และ *M. enterolobii*
03-31-60-01-02-00-16-63
- ❖ ไตรเดช ช่ายทอง และคณะ
- 2.17 การผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip.... 2428
เพื่อตรวจสอบไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV)
03-31-60-01-02-00-17-63
- ❖ สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ

หมายเหตุ

- ⊕ ชื่อการทดลองที่นักวิจัยแจ้งไม่ตรงกับชื่อการทดลองจากกองแผนงาน



การศึกษาสถานภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae*
 สาเหตุโรค brown sheath rot ของข้าวในประเทศไทย
 Surveillance of *Pseudomonas fuscovaginae* causes Brown Sheath Rot
 Diseases of Rice in Thailand

ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ บุรณี พัววงศ์แพทย์
 รุ่งนภา ทองเครื่อง กาญจนา ศรีไม้
 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Surveillance of *Pseudomonas fuscovaginae* causes brown sheath rot diseases of rice in Thailand was carried out during October 2019 – September 2021 to determine whether this bacterium was present or absent. The specific surveying and collecting samples that expect caused by *P. fuscovaginae* were conducted in Chiang Rai, Chiang Mai, Lamphun, Lampang, Nan, Phrae, Sukhothai, Kamphaeng Phet, Nakhon Pathom, Nonthaburi, Amnat Charoen, Ubon Ratchathani, Si Sa Ket, Surin, Buri Ram, Nakhon Ratchasima, Tak, Ratchaburi, Kanchanaburi, Phetchaburi and Prachuap Khiri Khan. The bacteria formed white-creamy colonies and produced fluorescent pigment on King's medium B were confirmed by LAMP. A target DNA of *P. fuscovaginae* not detected from all bacterial isolates. Thus, this result confirms status of *P. fuscovaginae* was absent in rice plantation of Thailand.

Keywords : Surveillance, brown sheath rot diseases, rice

รหัสการทดลอง 03-04-59-04-01-00-23-63



บทคัดย่อ

ศึกษาสถานภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* สาเหตุโรค brown sheath rot ของข้าว ในประเทศไทย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2562 – กันยายน 2564 เพื่อยืนยันการปรากฏหรือไม่ปรากฏของเชื้อชนิดนี้ในประเทศไทย โดยกำหนดพื้นที่สำรวจเป็นแหล่งปลูกข้าวในจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง น่าน แพร่ สุโขทัย กำแพงเพชร นครปฐม นนทบุรี อำนาจเจริญ อุบลราชธานี ศรีสะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์ นครราชสีมา ตาก ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 204 แปลง สำรวจแบบเฉพาะเจาะจงและเก็บตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการคล้ายโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาล นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ พบแบคทีเรียสีชาวมืดที่สร้างสารเรืองแสงจากอาหาร King's medium เมื่อตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิค LAMP ไม่พบผลผลิตเป้าหมายของแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* ในตัวอย่างที่ตรวจ ดังนั้น ผลจากการสำรวจยืนยันสถานภาพไม่ปรากฏแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* สาเหตุโรค brown sheath rot ของข้าวในประเทศไทย

คำหลัก : สถานภาพ โรคกาบใบเน่าสีน้ำตาล ข้าว

คำนำ

โรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าวเกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* อาการของโรคในแปลงนาข้าว พบอาการเน่าสีน้ำตาลที่กาบใบเปลือกหุ้มใบข้าวระยะต้นกล้าและระยะเจริญเติบโตในภายหลัง ต้นกล้าที่ติดเชื้อในระยะเริ่มแรกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลบนกาบใบด้านล่าง (Cottyn *et al.*, 1994) หลังจากนั้นจะเปลี่ยนสีจากสีเทาน้ำตาลเป็นสีน้ำตาลเข้ม ในที่สุดต้นกล้าที่ติดเชื้อจะเน่าและตายในที่สุด โรคนี้มีการกระจายอยู่ในแปลงนาข้าวชลประทานที่มีระดับความสูงระหว่าง 1300 และ 2000 เมตร ในประเทศมาดากัสการ์ความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นตามระดับความสูงของน้ำทะเล โดยพบการแตกรวงข้าวร้อยละ 10-15 การเกิดรวงข้าวเพิ่มขึ้น ในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของมาดากัสการ์มีความทนทานมากกว่าข้าวพันธุ์กึ่งแคระ (semi-dwarf) ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (Duveiller *et al.*, 1990) โรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลแพร่ระบาดในพื้นที่ปลูกข้าวของหลายประเทศทั่วโลก ในเดือนเมษายน 2554 เกิดการระบาดอย่างรุนแรงในประเทศสาธารณรัฐเกาหลีใต้สร้างความเสียหายทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงถึง 10 -20% พื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด ในประเทศอินโดนีเซีย มีรายงานว่าแปลงนาที่มีการระบาดของโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลถึง 72% ในฤดูร้อนพบว่าเมล็ดข้าวที่เก็บเกี่ยวจากแปลงที่มีการระบาดของโรคมิเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง แต่ในฤดูฝนพบว่าเมล็ดข้าวเมล็ดข้าวที่เก็บเกี่ยวมีลักษณะไม่ดีมีสีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ไม่สามารถนำไปใช้ในการขยายพันธุ์ได้ (Cahyaniati and Mortensen, 1995) เชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* สามารถติดไปกับเมล็ด (seed-borne) และเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งทางด้านกักกันพืชโดยเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยด้วย (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2550) ที่ต้องมีการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเคลื่อนย้ายหรือนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวจากประเทศที่มีการ

ระบาดของโรค สำหรับในประเทศไทยยังไม่พบรายงานการศึกษาแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ทำให้ไม่ทราบสถานะภาพของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการสำรวจสถานะภาพของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทย อย่างเป็นระบบ เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ ในการกำหนดศัตรูพืชกักกัน การจัดทำวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในการนำข้าวโพดจากประเทศสหรัฐอเมริกา การกำหนดพื้นที่ปลอดศัตรูพืช และใช้ในการจัดเตรียมบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอ
4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
8. เครื่องชั่ง
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยา LAMP
11. ข้าว

วิธีการ

1. จัดทำคู่มือการสำรวจ

โดยการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคของข้าวที่เกิดจากแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย

2. จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ

จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ ได้แก่ ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วันและเวลา สภาพดินฟ้าอากาศ ตำแหน่งที่ตั้ง (พิกัด GPS) เป็นต้น

3. วางแผนการสำรวจ

ใช้วิธีการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (Specific survey) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (Guidelines for surveillance: ISPM No. 6) โดยทำการสำรวจแบบสืบพบ (Detection survey) เพื่อสืบค้นหาศัตรูพืชเป้าหมายสำรวจอย่างน้อย 10 แปลง ต่อพื้นที่

แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ โดยเดินตามเส้นทแยงมุม ทุกๆ 10 ก้าว ตรวจโรคจุดละ 10 ต้น จำนวน 10 จุดต่อแปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง

4. การสำรวจ

กำหนดพื้นที่สำรวจโดยเป็นแหล่งผลิตข้าวที่สำคัญของประเทศ จำนวน 28 แหล่งปลูก ใน 14 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน แพร่ สุโขทัย สุพรรณบุรี ปทุมธานี อุทัยธานี นครพนม ชัยภูมิ สงขลา พัทลุง ตรัง และ นครศรีธรรมราช ดำเนินการสำรวจตาม ISPM No. 6 (Guidelines for surveillance) วางแผนการสำรวจอย่างน้อย 10 แปลง ต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ โดยเดินตามเส้นทแยงมุม ทุกๆ 10 ก้าว ตรวจโรคจุดละ 10 ต้น อย่างน้อยจำนวน 10 จุดต่อแปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง

5. วิธีการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* ในแปลงนาข้าว

จัดทำรูปภาพลักษณะอาการของโรคทุกระยะของพืชจัดทำเป็นคู่มือในการสำรวจ เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

6. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

การตรวจสอบโดยการนำตัวอย่างที่เก็บมาหรือสุ่มใบข้าวหรือต้นกล้าข้าว หรือเมล็ดข้าวที่แสดงอาการคล้ายกับรูปภavnนำมาแยกเชื้อ *P. fuscovaginae* บนอาหาร semi selective medium ได้แก่ King's medium B และ Miyajima's medium คัดเฉพาะโคโลนีสีเบจ หรือขาวครีม หรือบางโคโลนีสร้างสารสีเขียวอยู่ตรงกลางโคโลนี นำมายืนยันโดยใช้ specific primer ด้วยวิธี LAMP (loop-mediated isothermal amplification) ตามวิธีการของ Ash *et al.* (2014)

เวลาและสถานที่

- | | |
|---------|--|
| เวลา | ตุลาคม 2562 – กันยายน 2563 |
| สถานที่ | 1. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร |
| | 2. แปลงนาข้าวของเกษตรกร |

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. จัดทำคู่มือการสำรวจ

รวบรวมข้อมูลของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* และ โรคกาบใบเน่าสีน้ำตาล (brown sheath rot) ของข้าว โดยรวบรวมลักษณะอาการของโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาล (brown sheath rot) ของข้าวที่เกิดจากแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ทุกระยะของพืช เพื่อจัดทำเป็นคู่มือการสำรวจ

ข้อมูลของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae*

แบคทีเรีย *P. fuscovaginae* มีการจัดอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom Bacteria

Phylum *Proteobacteria*

Class *Gammaproteobacteria*

Order *Pseudomonadales*

Family *Pseudomonadaceae*

Genus *Pseudomonas*

Species *Pseudomonas fuscovaginae* (ex

Tanii, Miyajima and Akita, 1976) Miyajima, Tanii and Akita (1983) (Rivero-González *et al.*, 2017)

เชื้อ *P. fuscovaginae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาล พบได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าหากเข้าทำลายจะทำให้ต้นกล้าตาย แต่อย่างไรก็ตามอาการที่พบเห็นได้บ่อยมักจะเกิดในระยะข้าวตั้งท้องหรือออกรวงเนื่องจากเป็นระยะที่ข้าวมีความอ่อนแอ โดยลักษณะอาการของโรคที่สำคัญ จะพบมีอาการเริ่มแรกหลังจากเชื้อเข้าทำลายที่กาบใบ จะเป็นแผลจุดดำน้ำขนาดเล็ก สีน้ำตาลปนเขียว ต่อมาจุดแผลเหล่านี้จะขยายเชื่อมต่อกันเป็นขีดยาวหรือเป็นแถบกว้าง มีสีน้ำตาลเข้มหรือน้ำตาลเทา หากอาการโรครุนแรงปรากฏที่กาบใบของใบธงจะทำให้ก้านชูรวงข้าวแห้งตาย รวงข้าวอ่อนที่อยู่ภายในกาบใบที่เป็นโรคจะถูกเชื้อโรคเข้าทำลายด้วย โดยพบจุดแผลเริ่มต้นที่เมล็ดข้าวลักษณะดำน้ำสีน้ำตาล และในที่สุดแผลนี้จะเปลี่ยนเป็นสีดำถึงสีน้ำตาลเทาหมดทุกเมล็ดในรวงข้าวทำให้เกิดลักษณะเมล็ดต่าง (Zeigler and Alvarez, 1987) โรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลมักพบในพื้นที่สูงตั้งแต่ 1,300-2,000 เมตรจากระดับน้ำทะเล และในสภาพอากาศเย็น (20-22°C) (Duveiller *et al.*, 1990)

แบคทีเรีย *P. fuscovaginae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างเป็นท่อน หัวท้ายมน มีขนาด 0.5-0.8 x 2.0-3.5 ไมครอน สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้หางแบบ polar flagella ซึ่งมี 1-4 เส้นต่อเซลล์ ไม่สร้างสปอร์ สร้างสารเรืองแสง (fluorescence pigment) บนอาหาร King's medium B (KMB) เมื่อเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน โคโลนีมีสีขาวหรือขาวครีมจนถึงน้ำตาลอ่อน กลม วาว ขอบเรียบ โปรงแสง ส่วนลักษณะโคโลนีบนอาหาร KMB เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน บางสายพันธุ์โคโลนีมีสีขาวครีม กลม นูน ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2 มิลลิเมตร หรืออาจมีลักษณะโคโลนีกลม ค่อนข้างแบน ขอบและเส้นผ่านศูนย์กลางไม่สม่ำเสมอ ขนาดประมาณ 2-5 มิลลิเมตร อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 28 องศาเซลเซียส และแบคทีเรียจะหยุดการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Miyajima *et al.*, 1983) (Figure 1, 2)

2. จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ

โดยมีรายละเอียดของที่ตั้งแปลง ข้อมูลพิกัดภูมิศาสตร์ ชนิดพืช ชนิดศัตรูพืช ข้อมูลตัวอย่างชื่อผู้เก็บตัวอย่าง วันเดือนปีที่เก็บ (Figure 3)



3. วางแผนการสำรวจ

ใช้วิธีการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (Specific survey) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (Guidelines for surveillance: ISPM No. 6) โดยทำการสำรวจแบบสืบพบ (Detection survey) เพื่อสืบค้นหาศัตรูพืชเป้าหมายสำรวจอย่างน้อย 10 แปลง ต่อพื้นที่แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ โดยเดินตามเส้นทแยงมุม ทุก ๆ 10 ก้าว ตรวจโรคจุดละ 10 ต้น จำนวน 10 จุดต่อแปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง

4. การสำรวจ

ดำเนินการสำรวจพื้นที่ปลูกข้าว จำนวน 21 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง น่าน แพร่ สุโขทัย กำแพงเพชร นครปฐม นนทบุรี อำนาจเจริญ อุบลราชธานี ศรีสะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์ นครราชสีมา ตาก ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 204 แปลง และตัวอย่างจากการสำรวจสถานภาพของแบคทีเรีย *B. glumae* ในพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 – กันยายน 2563 จำนวน 17 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด อุตรดิตถ์ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ พิจิตร นครสวรรค์ อุทัยธานี ชัยนาท ลพบุรี สระบุรี นครนายก ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา สิงห์บุรี อ่างทอง สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา และปทุมธานี จำนวน 313 แปลง รวมทั้ง 517 แปลง จาก 38 จังหวัด เก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวที่แสดงอาการกาบใบเน่าสีน้ำตาล และเมล็ดเป็นสีน้ำตาล (Figure 4) นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการจำนวน 80 ตัวอย่าง

5. วิธีการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* ในแปลงนาข้าว

ในการสำรวจสังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างห่อกระดาษและใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

6. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

การตรวจสอบโดยการนำตัวอย่างที่แสดงอาการคล้ายกับรูปภาพมาแยกเชื้อ *P. fuscovaginae* บนอาหาร semi selective medium ได้แก่ King's medium B และ Miyajima's medium คัดเฉพาะโคโลนีสีขาวครีม สร้างสารเรืองแสง (fluorescence pigment) บนอาหาร King's medium B นำมายืนยันโดยใช้ specific primer ด้วยวิธี LAMP (loop-mediated isothermal amplification) ตามวิธีการของ Ash *et al.* (2014) ยังไม่พบแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* (Figure 5)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การสำรวจสถานภาพของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทย 21 จังหวัด ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 – กันยายน 2564 จำนวน 204 แปลง และตัวอย่างจากการสำรวจสถานภาพของแบคทีเรีย *B. glumae* ในพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 – กันยายน 2563 จำนวน จำนวน 313 แปลง รวมทั้ง 517 แปลง จาก 38 จังหวัด เก็บตัวอย่างข้าว

ที่แสดงอาการคล้ายโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาล นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการจำนวน 80 ตัวอย่าง คัดเฉพาะโคโลนีสีขาวครีม สร้างสารเรืองแสงบนอาหาร King's medium B ตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิค LAMP ไม่พบผลผลิตเป้าหมายของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในตัวอย่างที่ตรวจ ดังนั้น การสำรวจข้าวระหว่างเดือนตุลาคม 2561 – กันยายน 2564 จึงไม่ปรากฏแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* สาเหตุโรค brown sheath rot ในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตาม พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 ประกาศ ณ วันที่ 26 เมษายน 2550. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 66 ง. ลงวันที่ 1 มิถุนายน 2550.
- Ash, G.J., J.M. Lang, L.R. Triplett, B.J. Stodart, V. Verdier, C.V. Cruz, P. Rottand and J.E. Leach. 2014. Development of a genomics-based lamp (loop-mediated isothermal amplification) assay for detection of *Pseudomonas fuscovaginae* from rice. *Plant Dis.* 98: 909– 915.
- Bigirimana, V.P., G.K.H. Hua, O.I. Nyamangyoku and M. Höfte. 2015. Rice Sheath Rot: An Emerging Ubiquitous Destructive Disease Complex. *Front. Plant Sci.* 6:1066. doi: 10.3389/fpls.2015.01066.
- Cahyaniati, A and C.N. Mortensen. 1995. Bacterial sheath brown rot of rice (*Pseudomonas fuscovaginae*) grown in Indonesia. Seed Health Testing Association (ISTA) Pre-Congress Seminar on Seed Pathology, Copenhagen, Denmark, June 6, 1995.
- Cother, E., B. Stodart, D. Noble, R. Reinke and R. V. D. Ven. n, 2009. Polyphasic identification of *Pseudomonas fuscovaginae* causing sheath and glume lesions on rice in Australia. *Aust. Plant Pathol.* 38: 247-261.
- Cottyn, B., M.T. Cerez and T.W. Mew, 1994. Bacteria. In: A Manual of Rice Seed Health Testing, pp: 29-46. In : Mew, T.W. and J.K. Misra, eds. International Rice Research Institute, Philippines,
- Duveiller, E., Martinez, C., and Maraite, H 1990. Seed detection of *Pseudomonas fuscovaginae* on wheat. *Med. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent, Belgium* 55(3a): 1047-1053.
- Miyajima, K., A. Tanii, and T. Akita. 1983. *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 33: 656-657.
- Zeigler, R. S. , and E. Alvarez. 1987. Bacterial sheath brown rot of rice caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in Latin America. *Plant Disease.* 71: 592-597.



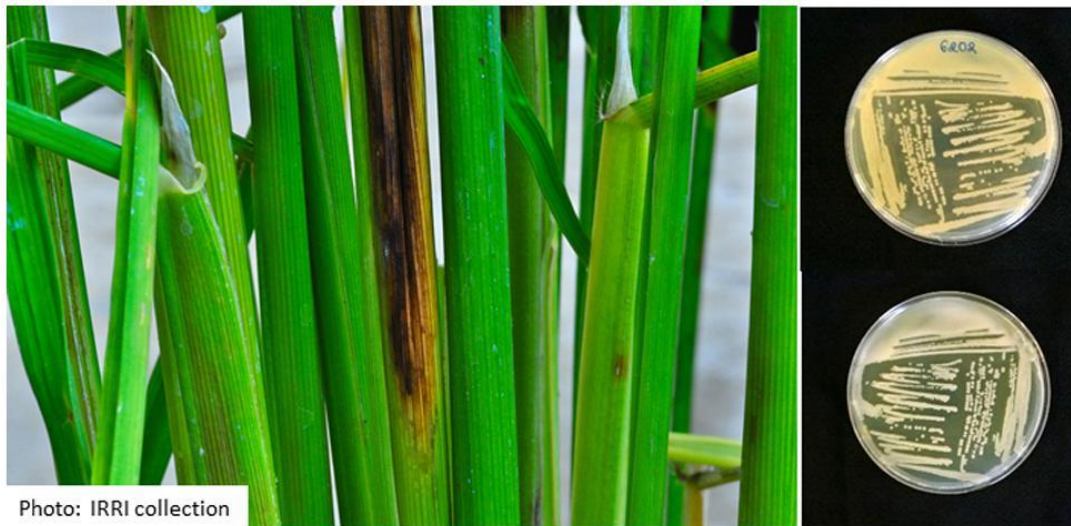


Figure 1 Symptoms caused by *Pseudomonas fuscovaginae* and morphology on King's Medium B plates after 48 h of growth at 28°C (top is reverse side, bottom is front side) (Bigirimana *et al.*, 2015)



Figure 2 Typical symptoms of sheath brown rot observed in rice panicles at Leeton Field Station (Cother *et al.*, 2009)

| ลำดับ | รหัสพิกัด | พันธุ์ข้าว | ตำบล | อำเภอ | จังหวัด | N | E | altitude | วันที่สำรวจ | ผลตรวจ PF |
|-------|-----------|------------|--------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-------------|-----------|
| 1 | 907 | จัสมิน | ขุนศรี | ไทรน้อย | นนทบุรี | 14.00588 | 100.27343 | -3 m | 16-ธ.ค.-62 | - |
| 2 | 908 | - | หนองกระทุ่ม | กำแพงแสน | นครปฐม | 14.02855 | 99.85833 | 11 m | 16-ธ.ค.-62 | - |
| 3 | 909 | - | หนองกระทุ่ม | กำแพงแสน | นครปฐม | 14.00346 | 99.87608 | 13 m | 16-ธ.ค.-62 | - |
| 4 | 910 | - | ลำเหย | ดอนตูม | นครปฐม | 13.94922 | 100.03121 | 5 m | 16-ธ.ค.-62 | - |
| 5 | 911 | - | สามควายเผือก | เมือง | นครปฐม | 13.84700 | 100.11111 | 0 m | 16-ธ.ค.-62 | - |
| 6 | 912 | - | สามควายเผือก | เมือง | นครปฐม | 13.85453 | 100.11447 | -2 m | 16-ธ.ค.-62 | - |
| 7 | 913 | - | ห้วยพระ | ดอนตูม | นครปฐม | 13.94084 | 100.07034 | 6 m | 17-ธ.ค.-62 | - |
| 8 | 914 | - | เตาปูน | โพธาราม | ราชบุรี | 13.76300 | 99.71334 | 12 m | 17-ธ.ค.-62 | - |
| 9 | 915 | - | บ้านใหม่ | ท่าม่วง | กาญจนบุรี | 13.91367 | 99.63464 | 29 m | 17-ธ.ค.-62 | - |
| 10 | 916 | - | หนองขาว | ท่าม่วง | กาญจนบุรี | 14.03057 | 99.62995 | 18 m | 17-ธ.ค.-62 | - |

Figure 3 Survey form of *Pseudomonas fuscovaginae*



Figure 4 Similar symptoms of brown sheath rot in the field caused by *Pseudomonas fuscovaginae* bacteria



Figure 5 Detection of *Pseudomonas fuscovaginae* by LAMP. 1-10, rice samples; 11, *P. fuscovaginae* (positive control); H₂O, negative control (distilled water)

การศึกษาสถานภาพของเชื้อไวรัส *Lettuce mosaic virus*

สาเหตุโรคใบด่างผักกาดหอมในประเทศไทย

Study on status of *Lettuce mosaic virus* on Lettuce in Thailand

ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ วาสนา รุ่งสว่าง ธิดาวรรณ ชมเดช โสภา มีอำนาจ
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Lettuce mosaic virus (LMV) is an economically significant virus of lettuce crops. As it is transmitted through seed, Therefore, it can spread throughout the world through international seed exchanges. Thailand has imported lettuce seeds from many countries on average 35 tons per year, causing a high risk that LMV will be associated with lettuce seeds to spread and cause damage in the country. In 2020-2021, 54 samples of lettuce seeds imported from France, the Netherlands, the Republic of Peru, Australia, the People's Republic of China, the United States of America and Taiwan were sampled according to International Seed Testing Association (ISTA) guidelines for seed health test and LMV were examined using Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques. LMV was detected in a sample of lettuce seeds imported from Taiwan. Specific surveys to confirm the status of LMV in lettuce growing areas was carried out in accordance with the International Standard on Phytosanitary Measures No. 6 (Surveillance). 80 lettuce growing area in 13 provinces was surveyed from October 2020 to September 2021. LMV was detected limit in specific areas only in 1 lettuce production field in Nakhon Ratchasima province and 3 seed production fields in Nan province, which were planted with imported lettuce seeds. Therefore, the infected plant was removed and subsequent monitoring did not detect LMV in the fields and nearby. Therefore, the status of LMV in Thailand is summarized as found in limited areas and has been eradicated.

รหัสการทดลอง 03-04-59-04-01-00-21-63



Previous detection of LMV in imported lettuce seeds led to the initiation of pest risk analysis. The assessment of the probability of entry, establish, spread and economic consequences demonstrate that LMV is a quarantine pest with medium risk. Therefore, risk management measures should be established including lettuce seeds being imported from countries where seed certification schemes have been conducted and the phytosanitary certificate issued by the National Plant Protection Organization (NPPO) of exporting country was required for certify that the seeds has been tested and found free from LMV.

Keywords: *Lettuce mosaic virus*, Lettuce, pest survey, pest status survey, surveillance

บทคัดย่อ

Lettuce mosaic virus (LMV) เป็นไวรัสที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของผักกาดหอม ไวรัสถ่ายทอดผ่านเมล็ด จึงสามารถแพร่กระจายไปทั่วโลกจากการแลกเปลี่ยนเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ ประเทศไทยนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากหลายประเทศทั่วโลกเฉลี่ยปีละ 35 ตัน จึงมีความเสี่ยงสูงที่ LMV จะติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมเข้ามาระบาดทำความเสียหาย ในปี 2563-2564 การตรวจเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ สาธารณรัฐ เปรู ออสเตรเลีย สาธารณรัฐประชาชนจีน สหรัฐอเมริกา และไต้หวัน จำนวน 54 ตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างตามหลักเกณฑ์ของ International Seed Testing Association (ISTA) และตรวจ LMV ด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ผลการตรวจพบ LMV ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากไต้หวัน จำนวน 1 ตัวอย่าง การสำรวจแบบเฉพาะเจาะจงเพื่อยืนยันสถานภาพของ LMV ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 6 (เฝ้าระวัง) ในแหล่งปลูกผักกาดหอมเพื่อบริโภคในพื้นที่ 12 จังหวัด จำนวน 70 แปลง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม นนทบุรี กรุงเทพฯ กาญจนบุรี ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น เพชรบูรณ์ พิษณุโลก และเชียงใหม่ และแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ที่จังหวัดน่าน จำนวน 10 แปลง พบ LMV จำกัดพื้นที่เฉพาะในแปลงผลิตผักกาดหอมเพื่อบริโภคที่จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 แปลง และในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ที่จังหวัดน่านจำนวน 3 แปลง ซึ่งเกษตรกรใช้เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่นำเข้าจากต่างประเทศ จึงได้ดำเนินการกำจัดต้นเป็นโรคออกจากแปลง การติดตามสำรวจโรคภายหลังไม่พบ LMV ในแปลงที่เคยตรวจพบ และบริเวณใกล้เคียง ดังนั้นจึงสรุปสถานภาพของ LMV ในประเทศไทยว่าพบในพื้นที่จำกัดและดำเนินมาตรการกำจัดหมดสิ้นแล้ว

การตรวจพบ LMV ในเมล็ดผักกาดหอมนำเข้านำไปสู่จุดเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช การประเมินความน่าจะเป็นของเข้ามา การตั้งรกราก การแพร่กระจาย และผลกระทบทางเศรษฐกิจ แสดงให้เห็นว่า LMV เป็นศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงปานกลาง ดังนั้นควรกำหนดมาตรการ



จัดการความเสี่ยงที่เหมาะสม ดังนี้ เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมต้องนำเข้าจากประเทศที่มีระบบการรับรองเมล็ดพันธุ์ (seed certification scheme) และ ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชซึ่งออกให้โดยองค์การอารักขาพืชแห่งชาติของประเทศผู้ส่งออกรับรองว่าเมล็ดพันธุ์ได้รับการตรวจและปลอดจาก LMV

คำหลัก: ไวรัส *Lettuce mosaic virus*, ผักกาดหอม, สำรองศัตรูพืช, สถานภาพศัตรูพืช, ฝักระวัง

คำนำ

Lettuce mosaic virus (LMV) เป็นสาเหตุโรคใบด่างในผักกาดหอมและ endives (*Cichorium endivia*) ซึ่งเป็นโรคสำคัญและพบระบาดมากในแหล่งปลูกผักกาดหอมทั่วโลกโดยเฉพาะในทวีปยุโรปและสหรัฐอเมริกา มีรายงานการเกิดโรครุนแรงที่รัฐฟลอริดาพบเป็นโรคถึง 100% (Dinant and Lot, 1992) แต่ยังไม่มียารักษาพบโรคนี้ในประเทศไทย เชื่อไวรัสสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมโดยมีอัตราการถ่ายทอดโรคสูงถึง 30% ปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมได้ในปริมาณที่น้อยไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร เนื่องจากสภาพภูมิอากาศไม่เหมาะสม ส่วนใหญ่จึงต้องนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศ เพื่อจำหน่ายในประเทศและส่งต่อไปยังต่างประเทศ ตั้งแต่ปี 2559-2563 ประเทศไทยนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมเฉลี่ยปีละ 35.27 ตัน มูลค่าเฉลี่ย 32.9 ล้านบาท โดยนำเข้าสูงสุดจากสาธารณรัฐประชาชนจีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกาตามลำดับ (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2562) ซึ่งทั้งสามประเทศเป็นแหล่งที่มีรายงานพบ LMV โดยเฉพาะอย่างยิ่งสาธารณรัฐประชาชนจีน และสหรัฐอเมริกา ซึ่งพบระบาดทั่วไป ในปี 2560 - 2561 กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ตรวจพบ LMV ในเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน 3 ครั้ง ปริมาณรวม 3.3 ตัน และจากเนเธอร์แลนด์ 1 ครั้ง ปริมาณ 0.5 กิโลกรัม (กลุ่มวิจัยการกักกันพืช, 2561) เนื่องจากไวรัสนี้ยังไม่เคยมีรายงานพบในประเทศไทย และมีรายงานความเสียหายรุนแรงในต่างประเทศ จึงมีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน แต่เนื่องจากตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ไม่ได้กำหนด LMV เป็นสิ่งต้องห้าม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2550 ก,ข) จึงไม่ได้มีการกำหนดมาตรการทางสุขอนามัยพืชเพื่อจัดการไวรัสนี้ การนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากแหล่งที่มีการระบาดของโรคจึงมีความเสี่ยงที่เชื้อจะติดเข้ามาในประเทศไทยได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาการติดมาของ LMV ในเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้า รวมทั้งสถานภาพการปรากฏในประเทศไทย และประเมินผลกระทบที่อาจเกิดขึ้น หากไวรัสนี้เข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย

งานวิจัยนี้เป็นการตรวจ LMV ในเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้า การปรากฏของศัตรูพืชในประเทศไทย และวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้สำหรับอ้างอิงทางวิชาการ เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมรัดกุม ลดความเสี่ยงที่ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทยและก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจได้



วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. คู่มือ เอกสาร หนังสือ วารสาร
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก ปากกามาร์กเกอร์ มีดคัตเตอร์ กรรไกรตัดกิ่ง เครื่องบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์
3. วัสดุวิทยาศาสตร์และอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น หลอด microcentrifuge หลอด conical ขนาด 50 ml เครื่องแก้ว โกร่งบดตัวอย่าง เครื่องบดเมล็ด เครื่องผสมสาร เครื่องปั่น-เหวี่ยงสาร ตู้ดูดควัน (hood) ตู้แช่แข็ง (freezer) ไปเปตและทิป เป็นต้น
4. สารเคมีต่างๆ เช่น ไพรเมอร์ ชุดตรวจสอบเชื้อไวรัสแบบสำเร็จรูป (ELISA kit) ชุดสกัดสารพันธุกรรมแบบสำเร็จรูปสำหรับสารพันธุกรรมชนิดที่เป็นอาร์เอ็นเอ (RNA Extraction kit) ชุดเอนไซม์สำเร็จรูปสำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดอาร์เอ็นเอแบบวันสเตป (One-step RT-PCR kit)
5. โรงเรือนปลูกพืชทดสอบและวัสดุการเกษตร เช่น ถาดเพาะกล้า กระจ่าง ดิน พีทมอส เป็นต้น

วิธีการ

1. การศึกษาเชื้อ LMV ในเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้า

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้า นำมาตรวจสอบเชื้อไวรัส LMV โดยตรงจากเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมเปรียบเทียบระหว่างการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA และเทคนิค RT-PCR

1.1 การตรวจสอบเชื้อไวรัส LMV ด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยชุดตรวจสอบสำเร็จรูปของ Agdia (Agdia, Inc.)

สุ่มเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมตามวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัส LMV ของ ISF (Version 4.3, July 2017) โดยทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์แต่ละรายการจำนวน (sample size) 10,000 เมล็ด และแบ่งเป็นตัวอย่างย่อย (sub-sample size) จำนวน 500 เมล็ด ดังนั้น แต่ละรายการจะประกอบด้วยตัวอย่างทั้งหมด 20 ตัวอย่าง จากนั้นดำเนินการตามขั้นตอนและวิธีการของชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Agdia ตามขั้นตอนดังนี้

1. เตรียม ELISA plate โดยการเติมสารละลาย Capture antibody-Anti-LMV ที่ความเข้มข้น 1:200 (ปริมาตรของแอนติบอดีต่อบัฟเฟอร์ Carbonate coating) ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน
2. เตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบ โดยการนำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่เตรียมไว้ไปชั่งน้ำหนัก และนำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่องบดเมล็ดพันธุ์ (Tube-mill, IKA) จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ Extraction ลงไปในเมล็ดพันธุ์ที่บดละเอียดแล้วด้วยอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักของเมล็ดต่อปริมาตรของบัฟเฟอร์) จะได้สารละลายเมล็ดสำหรับการนำไปตรวจสอบ
3. นำ ELISA plate ในข้อที่ 1 มาทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBST wash ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยการใส่สารลงไปในแต่ละหลุม บ่มไว้ 3-5 นาที ทิ้งสารโดยการคว่ำเพลทและตบบนกระดาษซับ จากนั้นทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ก่อนดำเนินการในขั้นถัดไป



4. นำสารละลายเมล็ดจากข้อที่ 2 ใส่ลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
5. นำ ELISA plate ในข้อที่ 4 มาทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBST wash ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยการใส่สารลงไปในแต่ละหลุม บ่มไว้ 3-5 นาที ทิ้งสารโดยการคว่ำเพลทและตบบนกระดาษซับ จากนั้นทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ก่อนดำเนินการในขั้นถัดไป
6. เติมสารละลาย Alkaline phosphatase enzyme conjugate-Anti-LMV ที่ความเข้มข้น 1:200 (ปริมาตรของแอนติบอดีต่อบัฟเฟอร์ ECI) ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
7. นำ ELISA plate ในข้อที่ 6 มาทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBST wash ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยการใส่สารลงไปในแต่ละหลุม บ่มไว้ 3-5 นาที ทิ้งสารโดยการคว่ำเพลทและตบบนกระดาษซับ จากนั้นทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ก่อนดำเนินการในขั้นถัดไป
8. เติมสารละลายฟอสเฟต ที่ความเข้มข้นของสารซับสเตรท (PNP) 1 มิลลิกรัมต่อบัฟเฟอร์ PNP ปริมาตร 1 มิลลิตร ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ในที่มืด) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
9. ตรวจสอบผลโดยการตรวจดูการเปลี่ยนสีด้วยตาเปล่า และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่าน ELISA reader โดยหลุมที่สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และ/หรือให้ค่า O.D. มากกว่าหรือเท่ากับ 2 เท่าของตัวอย่างเมล็ด healthy (เมล็ดพันธุ์ฝักกาดหอมที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่าไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัส LMV) จะบ่งชี้ถึงการตรวจพบเชื้อไวรัส LMV ในตัวอย่างนั้นๆ ในขณะเดียวกัน หากไม่พบการเปลี่ยนสี และ/หรือ ให้ค่า O.D. น้อยกว่า 2 เท่าของตัวอย่างเมล็ด healthy

1.2 การตรวจสอบเชื้อไวรัส LMV ด้วยเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

1.2.1 ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์ฝักกาดหอมในข้อ 1.1 ที่ให้ผลบวกกับเชื้อ LMV โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy® Plant Mini Kit of QIAGEN) ด้วยวิธีการดังนี้

1. นำส่วนของกากเมล็ดพันธุ์ฝักกาดหอมจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA มาสกัดอาร์เอ็นเอ โดยแต่ละตัวอย่างเลือกมา 10 ตัวอย่าง (sub sample) จากทั้งหมด 20 ตัวอย่าง โดยทำการบดกากเมล็ดฝักกาดหอมด้วยโกร่งนึ่งฆ่าเชื้อในบัฟเฟอร์ RLT ที่เติมสาร 2-mercaptoethanol อัตราส่วน 10 มิลลิตรต่อ 100 ไมโครลิตร (เตรียมก่อนใช้งาน)
2. ใส่น้ำบัคเมล็ดลงใน spin column (สีม่วง) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
3. ย้ายของเหลวใต้ spin column ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดใหม่และเติมสารละลาย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด 4-5 ครั้ง



4. ย้ายของเหลวทั้งหมดใส่ลงใน spin column (สีชมพู) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
5. ทิ้งของเหลวใต้ spin column แล้วเติมบัฟเฟอร์ RW1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
6. ทิ้งของเหลว เติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำอีกครั้ง) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
7. ย้าย spin column (เฉพาะชิ้นที่อยู่ด้านใน) ใส่ลงในหลอดใหม่ (หลอด 1.5 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม RNase-free water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยอดลงไปบริเวณกึ่งกลางเมมเบรน (membrane) ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ของเหลวที่ได้ในขั้นตอนนี้คือ สารละลายอาร์เอ็นเอ (Total RNA) ของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ซึ่งจะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

1.2.2 นำสารละลายอาร์เอ็นเอ (Total RNA) ของเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่สกัดได้มาตรวจสอบเชื้อไวรัส LMV ด้วยไพรเมอร์ LMV-1196 (5'- AAGGCAGTAAACTGATG -3') และ LMV-1519 (5'- CCTCGTAGCCGTCCTGAT -3') (Krause-Sakate *et al.*, 2001) โดยเพิ่มปริมาณชิ้นยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยการเตรียมสารองค์ประกอบดังต่อไปนี้

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

| | | |
|---------------------------------------|------|-----------|
| น้ำกลั่นหนึ่งขวด | 8.5 | ไมโครลิตร |
| 2X Reaction Mix | 12.5 | ไมโครลิตร |
| 10 μ M LMV-1196 | 1.0 | ไมโครลิตร |
| 10 μ M LMV-1519 | 1.0 | ไมโครลิตร |
| SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix | 1.0 | ไมโครลิตร |
| Total RNA | 1.0 | ไมโครลิตร |

นำตัวอย่างเข้าเครื่องพีซีอาร์ (thermal cycler) และกำหนดโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

| | | | | | |
|---|-------------------|-------|-----|-----------|-------|
| ขั้นที่ 1 | cDNA synthesis | 50 °C | นาน | 30 นาที | 1 รอบ |
| ขั้นที่ 2 | pre- denaturation | 94 °C | นาน | 3 นาที | 1 รอบ |
| ขั้นที่ 3 | denaturation | 94 °C | นาน | 30 วินาที | |
| ขั้นที่ 4 | annealing | 52 °C | นาน | 1 นาที | |
| ขั้นที่ 5 | extension | 72 °C | นาน | 1 นาที | |
| ทำซ้ำขั้นที่ 3 ถึง ขั้นที่ 5 จำนวน 40 รอบ | | | | | |
| ขั้นที่ 6 | post-extension | 72 °C | นาน | 10 นาที | 1 รอบ |
| ขั้นที่ 7 | hold | 20 °C | นาน | 10 นาที | 1 รอบ |



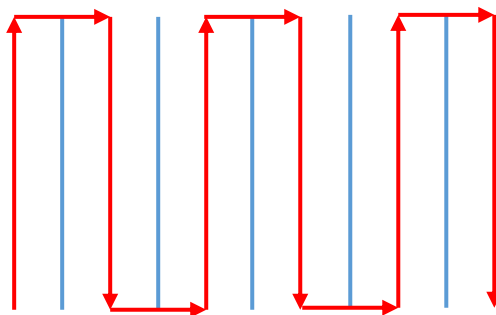
3. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตโฟเรซิส (Gel electrophoresis) โดยเตรียมสารละลายเจลที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE และเติมสารย้อมสีดีเอ็นเอ RedSafe ลงในเจลที่อัตราส่วน 5 ไมโครลิตรในสารละลายเจล 100 มิลลิลิตร รันเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 35-40 นาที จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Document และบันทึกภาพ

2. การศึกษาสถานภาพเชื้อ LMV ในประเทศไทย

2.1. จัดทำคู่มือการสำรวจ โดยการรวบรวมตัวอย่างอ้างอิงและรูปภาพของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส LMV เพื่อใช้ในการตรวจสอบอ้างอิงขณะทำการสำรวจและจัดทำข้อมูลศัตรูพืช ชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพืชอาศัย อาการของโรค รูปภาพสีของโรค และรายละเอียดของศัตรูพืชชนิดอื่นที่คล้ายคลึงกับศัตรูพืชเป้าหมาย

2.2. จัดทำฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจได้แก่ ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วัน และเวลา สภาพดินฟ้าอากาศ ตำแหน่งที่ตั้ง (พิกัด GPS) เป็นต้น

2.3. การสำรวจกำหนดพื้นที่สำรวจแหล่งปลูกผักกาดหอมบริโภคที่สำคัญของประเทศไทย (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2559) จำนวน 12 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครปฐม นนทบุรี กรุงเทพฯ กาญจนบุรี ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น เพชรบูรณ์ พิษณุโลก และเชียงใหม่ และแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่จังหวัดน่าน วางแผนการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจงตามมาตรฐาน International Standards For Phytosanitary Measures (ISPM) No.6 (Guidelines for surveillance) (McMaugh, 2005) โดยสำรวจผักกาดหอมที่แสดงอาการใบต่างคล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสให้กระจายตลอดพื้นที่ที่ปลูก โดยการเดินสำรวจ 1 ร่อง เว้น 1 ร่อง และสำรวจทุกต้น โดยการเดินสุ่มแบบตัวยู



รูปแบบการเดินสุ่มแบบตัวยู

2.4. วิธีการตรวจเชื้อไวรัส LMV ในแปลง เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือการสำรวจที่จัดทำไว้ บันทึกรายละเอียดข้อมูลของแปลง บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างใส่ถุง นำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการ

2.5. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี ELISA ตามข้อ 1.1

2.6. การบันทึกข้อมูล

- บันทึกรายละเอียดตำแหน่งของแปลงปลูกที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
- บันทึกข้อมูลจำนวนแปลง และจำนวนตัวอย่างที่ทำการสำรวจ/เก็บตัวอย่าง
 - บันทึกข้อมูลชนิดพืช ขนาดพื้นที่ปลูก ระยะการเจริญเติบโตของพืช และสภาพแวดล้อมอื่นๆ
 - บันทึกลักษณะอาการการเกิดโรค ส่วนของพืชที่พบอาการของโรค ประเมินความรุนแรงของโรค และการแพร่กระจายในพื้นที่
 - บันทึกข้อมูลชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืช และลักษณะเชื้อสาเหตุที่ตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ

3. การวิเคราะห์ความเสี่ยงของเชื้อ LMV ที่ติดมากับกับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม

ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (FAO, 2019a) และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest risk analysis for quarantine pests) (FAO, 2019b) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นขบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (stage 1: initiation) เพื่ออธิบายเหตุผลหรือเจตนาที่การวิเคราะห์ความเสี่ยงว่ามีที่มาจาก ศัตรูพืช (pest) หรือเส้นทางศัตรูพืช (pathway) หรือการทบทวนนโยบาย (policy)

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (pest risk assessment)

2.1 การประเมินโอกาสการเข้ามาและแพร่ระบาด (Assessment of the probability of introduction and spread)

2.1.1 ประเมินโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืช โดยประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชจะปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืช ปัจจัยที่นำมาพิจารณา ได้แก่

- การระบาดของศัตรูพืชอย่างรุนแรงในแหล่งผลิต
- การจัดการศัตรูพืชในแหล่งผลิต
- ช่วงวงจรชีวิตของศัตรูพืชซึ่งมีโอกาสปะปนเข้ามา กับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม ภาชนะบรรจุหรือพาหนะขนส่ง

- การรอดชีวิตของศัตรูพืชภายใต้สภาวะแวดล้อมขณะขนส่ง

- ปริมาณและความถี่ที่นำเข้ามา

- ความยากง่ายในการตรวจพบที่จุดนำเข้า

2.1.2 ประเมินโอกาสการตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of establishment)

โดยประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชสามารถเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้ โดยพิจารณาข้อมูลด้านชีววิทยาของศัตรูพืช (วงจรชีวิต พืชอาศัย การแพร่ระบาด การอยู่รอด เป็นต้น) จากพื้นที่ซึ่งศัตรูพืชนั้นปรากฏอยู่ในปัจจุบัน ปัจจัยที่นำมาพิจารณา ได้แก่



- การมีพืชอาศัย จำนวนและชนิดพืชอาศัย
 - ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
 - ศักยภาพความสามารถในการปรับตัวของศัตรูพืช
 - วิธีการมีชีวิตอยู่รอดของศัตรูพืช
 - การปฏิบัติทางการเกษตรและมาตรการป้องกันกำจัด

2.1.3 ประเมินโอกาสการแพร่ระบาดของศัตรูพืชหลังจากเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร ประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชสามารถแพร่กระจายในประเทศไทย โดยพิจารณาจากข้อมูลทางชีววิทยาที่ได้จากพื้นที่ที่ศัตรูพืชนั้นระบาดอยู่ในปัจจุบัน หรือกรณีตัวอย่างที่เคยเกิดมาแล้วกับศัตรูพืชที่คล้ายคลึงกันมาใช้ประโยชน์ในการพิจารณา ปัจจัยที่พิจารณา ได้แก่

- การกระจายของพืชอาศัยในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในสภาพธรรมชาติและ/หรือ สภาพแวดล้อมที่จัดการสำหรับการแพร่ระบาดของศัตรูพืชโดยธรรมชาติ
 - มีสิ่งกีดขวางโดยธรรมชาติ
 - ศักยภาพสำหรับการเคลื่อนย้ายไปกับสินค้าหรือพาหนะขนส่ง
 - ความตั้งใจที่จะนำสินค้าไปใช้ประโยชน์
 - พาหะที่มีศักยภาพของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ศัตรูธรรมชาติที่มีศักยภาพของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

2.2 การประเมินผลทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้น (Assessment of potential economic consequence)

2.2.1 ผลที่เกิดจากศัตรูพืชโดยตรง

- ความสูญเสียของผลผลิตในแง่ปริมาณและคุณภาพ
- รูปแบบ จำนวน และความถี่ของความเสียหาย
- ค่าใช้จ่ายในการควบคุม
- ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

2.2.2 ผลกระทบทางอ้อม

- ผลกระทบต่อการส่งออก รวมถึงการบังคับใช้กฎระเบียบด้านสุขอนามัยพืช
- ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นทำให้ราคาสินค้าสูงขึ้น
- ผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพอันเนื่องมาจากการป้องกันกำจัด
- ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

2.3 สรุปผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชโดยสรุปผลการประเมินโอกาสการเข้ามา การตั้งรกรากอย่างถาวร และการแพร่กระจาย รวมถึงผลกระทบทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้นตามตาราง Risk Estimate Matrix (Agriculture and Water Resources 2016)

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk management)



ความเสี่ยงทั้งหมดจะถูกกำหนดโดยการตรวจสอบผลลัพธ์จากการประเมินโอกาสเข้ามาเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืชและผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ กรณีที่พบความเสี่ยงอยู่ในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ ต้องดำเนิน การจำแนกมาตรการสุขอนามัยพืชที่จะลดความเสี่ยงให้ถึงระดับที่ยอมรับได้ หรือต่ำกว่าระดับที่ยอมรับได้

การจำแนกและคัดเลือกวิธีการจัดการความเสี่ยงให้เหมาะสม (Identification and selection of appropriate risk management options) มาตรการที่เหมาะสมควรเลือกโดยอาศัยพื้นฐานจากประสิทธิภาพของมาตรการนั้นในการลดโอกาสการเข้ามาแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืช และมีความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติ โดยไม่เป็นอุปสรรคขัดขวางการค้าในแง่จำกัดการนำเข้าสินค้าโดยไม่มีเหตุผล มาตรการสุขอนามัยพืชที่มีการนำมาใช้ในปัจจุบัน สามารถแบ่งได้ตามสภาพของศัตรูพืชในเส้นทางศัตรูพืช ประกอบด้วยมาตรการ ดังต่อไปนี้

- มาตรการที่ใช้กับสินค้าโดยตรง เช่น กำหนดมาตรการป้องกันกำจัดศัตรูพืชกับสินค้าด้วยสารเคมี คามเย็นหรือความร้อน
- มาตรการที่ใช้เพื่อป้องกันหรือลดปริมาณการเข้าทำลายของศัตรูพืชในแหล่งผลิต เช่น กำหนดให้ต้องมีการจัดการศัตรูพืชในแปลงผลิต
- มาตรการที่ใช้เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นว่าในพื้นที่ผลิตหรือแหล่งผลิตปราศจากศัตรูพืชเช่นการนำเข้าจากแหล่งผลิตที่ปราศจากศัตรูพืช (pest free area)
- มาตรการห้ามนำเข้าสินค้า เป็นมาตรการขั้นรุนแรงที่ใช้ในกรณีที่ไม่สามารถจัดการความเสี่ยงให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้

เวลาและสถานที่

เดือนตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 (2 ปี)

สถานที่

- 1) ห้องปฏิบัติการของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
- 2) แปลงปลูกผักกาดหอมในพื้นที่จังหวัดนครปฐม นนทบุรี กรุงเทพฯ กาญจนบุรี ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น เพชรบูรณ์ พิษณุโลก เชียงใหม่ และน่าน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาเชื้อ LMV ในเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้า

1.1 การตรวจสอบเชื้อไวรัส LMV ด้วยเทคนิค ELISA

ในปี 2563 มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากต่างประเทศ จำนวน 48 ครั้ง รวมทั้งสิ้น 84 ตัวอย่าง จากการสุ่มตรวจเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจำนวน 27 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากฝรั่งเศส 5 ตัวอย่าง เนเธอร์แลนด์ 5 ตัวอย่าง ซิลี 5 ตัวอย่าง เปรู 2 ตัวอย่าง ออสเตรเลีย 2 ตัวอย่าง สาธารณรัฐประชาชนจีน 2 ตัวอย่าง และสหรัฐอเมริกา 6 ตัวอย่าง ผลการตรวจสอบไม่พบเชื้อไวรัส LMV (Table 1) ส่วนในปี 2564 มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจำนวน



51 ครั้ง รวมทั้งสิ้น 79 ตัวอย่าง จากการสุ่มตรวจเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจำนวน 27 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากฝรั่งเศส 2 ตัวอย่าง เนเธอร์แลนด์ 2 ตัวอย่าง ซิลี 5 ตัวอย่างเปรู 1 ตัวอย่าง ออสเตรเลีย 4 ตัวอย่าง สาธารณรัฐประชาชนจีน 5 ตัวอย่าง สหรัฐอเมริกา 4 ตัวอย่าง และไต้หวัน 4 ตัวอย่าง ผลการตรวจสอบพบ LMV ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากไต้หวันจำนวน 1 ตัวอย่าง (Table 2)

1.2 การตรวจสอบเชื้อไวรัส LMV ด้วยเทคนิค RT-PCR

ผลการตรวจตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับชุดตรวจ LMV ในข้อ 1.1 มายืนยันผลด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ LMV พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 600 bp (Figure 1)

การตรวจ LMV ในเมล็ดผักกาดหอมทำได้หลายวิธี เช่น การปลูกสังเกตอาการ (grow-out test) โดยเฉพาะเมล็ดจำนวน 30,000 ในโรงเรือนป้องกันแมลง สังเกตอาการในต้นกล้าเป็นเวลา 18-21 วัน หรือการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ *Chenopodium quinoa* (Kimble *et al.*, 1975) แต่วิธีการที่ใช้ในปัจจุบันคือการตรวจด้วยเทคนิคทางเซรัมวิทยาด้วยวิธี ELISA (ISF, 2017) ซึ่งมีข้อดีคือใช้ระยะเวลาสั้น และสามารถตรวจตัวอย่างครั้งละจำนวนมาก การตรวจเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าที่ผ่านมาพบ LMV ติดมากับเมล็ดจากหลายประเทศ แสดงให้เห็นว่ามีความเสี่ยงสูงที่ LMV จะติดมากับเมล็ด ดังนั้นการตรวจเมล็ดนำเข้าจึงมีความสำคัญในการป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชเข้ามาแพร่ระบาดทำความเสียหายกับการเกษตรในประเทศ

2. การศึกษาสถานภาพเชื้อ LMV ในประเทศไทย

2.1 สืบค้นข้อมูลเชื้อ LMV

LMV เป็นสาเหตุโรคใบด่างซึ่งเป็นโรคที่สำคัญที่ทำความเสียหายรุนแรงสูงสุดในผักกาดหอมพบครั้งแรกในปี 1921 ในรัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา ปัจจุบันพบในแหล่งปลูกผักกาดหอมทั่วโลก ไวรัสสามารถถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมได้ เมล็ดจึงเป็นพาหะในการแพร่กระจายไวรัสในระยะไกล

LMV เป็นไวรัสในจีนัส (genus) *Potyvirus* และอยู่ในวงศ์ (family) *Potyviridae* ลักษณะอนุภาคเป็นท่อนยาวคด (flexuous rods) ขนาดประมาณ 750 x 13 นาโนเมตร (Revers *et al.*, 1997) เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดโรคในเมล็ดผักกาดหอมและวัชพืช chicken weed (*Senecio vulgaris*) โดยมีอัตราการถ่ายทอดในเมล็ดผักกาดหอม 0.1 – 37 % (Shukla *et al.*, 1994; Phatak, 1974) เชื้อไวรัสสามารถแพร่กระจายโดยมีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะแบบ non-persistent นอกจากนี้ไวรัสสามารถถ่ายทอดโดยวิธีกล (David *et al.*, 1997)

พืชอาศัย

LMV มีพืชอาศัยตามธรรมชาติ 26 ชนิดใน 23 สกุล (genera) ซึ่งจัดอยู่ใน 9 วงศ์ (family) ส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Asteraceae พืชอาศัยที่สำคัญอยู่ในวงศ์ Fabaceae, Brassicaceae และ Chenopodiaceae (CPC, 2020) ผักกาดหอม (lettuce; *lactuca sativa*) เป็นพืชอาศัยหลักที่สำคัญที่สุด นอกจากนี้ไวรัสยังเป็นสาเหตุโรคที่สำคัญในเอนไดฟ (endive; *Cichorium endivia*) ในยุโรป และนอกจากนี้ยังมีรายงานว่า LMV เป็นสาเหตุโรคของปวยเล้ง (spinach; *Spinacia oleracea*) ถั่ว



ลันเตา (pea; *Pisum sativum*) ถั่วลูกไก่ (chick pea; *Cicer arietinum*) คำฝอย (safflower; *Carthamus tinctorius*) แต่ไม่พบการระบาดรุนแรงในพืชเหล่านี้ (Dinant and Lot, 1992)

ลักษณะอาการ

ลักษณะอาการที่พบในผักกาดหอมผันแปรไปตามสายพันธุ์ (cultivar) และอายุพืช สภาพแวดล้อม รวมถึงสายพันธุ์ (strain) ของไวรัส ใบของต้นอ่อนที่เพาะจากเมล็ดที่ติดเชื้อจะมีรูปร่างผิดปกติ ต่างสีเขียวอ่อนโดยทั่วไปอาการใบต่าง (mosaic, mottling) จะพบในผักกาดหอมใบ (leaf lettuce) มากกว่าผักกาดหอมหัว (head lettuce) นอกจากนี้ยังพบอาการใบผิดรูป (leaf distortion) แคระแกรน (stunt) ใบเหลือง (yellowing) บางครั้งอาจพบอาการเส้นใบใส (vein clearing) และจุดเซลล์ตาย (necrotic fleck) ในผักกาดหอมหัว (head lettuce) ที่ถูกไวรัสเข้าทำลายจะมีอาการแคระแกรนไม่สร้างหัวหรือหัวเล็ก ใบต่างเขียวอ่อนถึงเหลือง ใบด้านนอกม้วนลง (Blancard *et al.*, 2006; David *et al.*, 1997; Dinant and Lot, 1992)

ในพืชอาศัยชนิดอื่นเชื้อไวรัสทำให้เกิดอาการใบต่างในถั่วลันเตาและคำฝอย อาการใบเหลืองและลดรูปใบปวยเล้ง ใบต่างและแคระแกรนในเอนไดฟ (endive) และใบต่างและยอดเหี่ยวในถั่วลูกไก่ (Dinant and Lot, 1992)

แหล่งแพร่ระบาด LMV มีพื้นที่ที่พบการระบาดแบ่งเป็นทวีป ดังนี้

ทวีปแอฟริกา – อียิปต์ กาน่า เคนยา มาลาวี มอริเชียส โมร็อกโก เซียร์ราลีโอน แอฟริกาใต้ แทนซาเนีย ตูนิเซีย แซมเบีย ซิมบับเว

ทวีปเอเชีย – อัฟกานิสถาน สาธารณรัฐประชาชนจีน อินเดีย อิหร่าน อิรัก อิสราเอล ญี่ปุ่น จอร์แดน เลบานอน มาเลเซีย ซาอุดีอาระเบีย ซีเรีย ไต้หวัน ตุรกี และเยเมน

ทวีปยุโรป – ออสเตรีย เบลเยียม โครเอเชีย เดนมาร์ก ฟินแลนด์ ฝรั่งเศส เยอรมัน กรีซ ฮังการี ไอร์แลนด์ อิตาลี เนเธอร์แลนด์ นอร์เวย์ โปแลนด์ โปรตุเกส โรมานี สโลวะเกีย สเปน สวีเดน สวิตเซอร์แลนด์และสกอตแลนด์

ทวีปอเมริกาเหนือ – แคนาดา จาไมกา เม็กซิโก ตรินิแดดและโตเบโก และสหรัฐอเมริกา

ทวีปเอเชีย – ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์

ทวีปอเมริกาใต้ – อาร์เจนตินา บราซิล ชิลี เอกวาดอร์ และอุรุกวัย (CPC, 2020)

การถ่ายทอดโรคและการแพร่กระจาย

เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดโรคในเมล็ดผักกาดหอมโดยมีอัตราการถ่ายทอดโรค 0.3 – 30 % (David *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีรายงานถ่ายทอดทางเมล็ดใน prickly lettuce; *Lactuca serriola*

เชื้อไวรัสสามารถแพร่กระจายโดยเพลี้ยอ่อน เช่น *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis gossypii*, *Macrosiphum euphorbiae* และ *Myzus persicae* เป็นพาหะแบบ non-persistent *Myzus persicae* เป็นพาหะที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดไวรัสสูงสุด (Dinant and Lot, 1992)



การป้องกันกำจัด

1. การใช้เมล็ดพันธุ์ที่ปลอดโรค(disease - free) หรือเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการรับรอง (certified seed)เป็นวิธีการป้องกันโรคที่ดีที่สุด ในสหรัฐอเมริกาการผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจะรับรองการปลอด LMV โดยกำหนดระดับการปนเปื้อนเชื้อในเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่ยอมรับได้คือ 0 ใน 30,000 เมล็ด ในขณะที่ในเนเธอร์แลนด์กำหนดให้มีเชื้อในเมล็ดไม่เกิน 0 ใน 2,000 เมล็ด (David *et al.*, 1997) การกำจัดเชื้อในเมล็ดโดยใช้ความร้อนมีผลต่อความงอกของเมล็ด และไม่พบรายงานวิธีการกำจัดเชื้อในเมล็ดที่สามารถปฏิบัติได้ผลจริง

2. การใช้พันธุ์ต้านทาน

ปัจจุบันมีการพัฒนาพันธุ์ต้านทานต่อ LMV ในผักกาดหอมและใช้ได้ผลในยุโรป อเมริกาใต้ และแหล่งปลูกอื่นๆ แต่ในสหรัฐอเมริกายังนิยมใช้เมล็ดที่ผ่านการรับรอง (certified seed) (David *et al.*, 1997)

2.2 จัดทำแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจ

จัดทำคู่มือและแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจเชื้อ LMV (Figure 2) โดยคู่มือประกอบด้วย

- ข้อมูลพื้นฐานของเชื้อ LMV ภาพตัวอย่างอาการของผักกาดหอมที่เกิดจากเข้าทำลายของเชื้อ LMV (Figure 3)

- แบบบันทึกรายงานการสำรวจโดยมีรายละเอียดคือ วันเดือนปีที่สำรวจ สถานที่สำรวจ (หมู่บ้าน ตำบล อำเภอ จังหวัด) พิกัดทางภูมิศาสตร์ ขนาดของพื้นที่ที่ทำการสำรวจ ชื่อผู้สำรวจ จำนวนแปลงที่สำรวจ ชื่อพืชที่พบรอยทำลาย อัตราการทำลาย และพืชอาศัยอื่นที่อยู่ข้างเคียง

- รูปแบบการเดินทางสำรวจโดยเดินตามแนวแถวปลูก 1 แถว เว้น 1 แถว รูปตัว U (Figure 4)

- การเก็บตัวอย่าง โดยเก็บชิ้นส่วนของพืชหรือกระดาดและใส่ถุง นำมาตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการทันที หรือนำตัวอย่างมาเก็บได้มาเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4-15 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเก็บตัวอย่างได้แค่ 7 วัน และให้รีบทำการตรวจสอบตัวอย่างทันที แต่ถ้าต้องการเก็บเพื่อตรวจสอบด้วยวิธีชีวโมเลกุล ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือ -80 องศาเซลเซียส

2.3 การสำรวจ เชื้อ LMV ในแปลงปลูกผักกาดหอม

จากการสำรวจแปลงผลิตผักกาดหอมเพื่อบริโภคในพื้นที่ 12 จังหวัด จำนวน 70 แปลง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม นนทบุรี กรุงเทพฯ กาญจนบุรี ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น เพชรบูรณ์ พิษณุโลก และเชียงใหม่ และแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่จังหวัดน่าน จำนวน 10 แปลง (Table 3) เมื่อสุ่มเก็บตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ พบไวรัส LMV ในแปลงผลิตผักกาดหอมเพื่อบริโภคที่จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 แปลง และในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ที่จังหวัดน่านจำนวน 3 แปลง (Table 3) นอกจากนี้ยังพบโรคใบด่างที่เกิดจาก *Turnip mosaic virus* (TuMV) (Figure 5) เชื้อไวรัสนี้มีรายงานพบในประเทศไทยในผักกาดเขียวปลี ผักกาดขาวปลี และผักกวางตุ้ง (กรมวิชาการเกษตร, 2557) และอาการใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora* (Figure 6) ซึ่งในประเทศ



ไทยมีรายงานพบโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora longissima* ในผักกาดหอม (กรมวิชาการเกษตร, 2557) การสำรวจโรคใบต่างในแปลงไม่สามารถวินิจฉัยโรคจากลักษณะอาการได้ เนื่องจากลักษณะอาการใบต่างที่เกิดจาก LMV มีอาการแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ และยังมีลักษณะอาการคล้ายคลึงกับอาการโรคที่เกิดจากไวรัสชนิดอื่น เช่น TuMV *Cucumber mosaic virus* (CMV) และ *Lettuce infectious yellow virus* (LIYV) ดังนั้นการวินิจฉัยโรคจึงต้องทำในห้องปฏิบัติการโดยใช้เทคนิคทางเซรัมวิทยาหรือเทคนิคทางชีวโมเลกุล (David *et al.*, 1997)

จากผลการสำรวจพบ LMV จำนวน 4 แปลง ซึ่งจำกัดพื้นที่เฉพาะในจังหวัดนครราชสีมา 1 แปลง จังหวัดน่าน 3 แปลง และจากข้อมูลที่สอบถามจากเกษตรกรพบว่าใช้เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่นำเข้าจากต่างประเทศ จึงได้ดำเนินการกำจัดต้นเป็นโรคออกจากแปลง และติดตามสำรวจโรคในพื้นที่ภายหลังไม่พบ LMV ในแปลงที่เคยตรวจพบ และบริเวณใกล้เคียง แต่อย่างไรก็ตามการสำรวจโรคในแปลงควรจะมีการเก็บข้อมูลต่อเนื่องอย่างน้อยเป็นระยะเวลาสามถึงห้าปีติดต่อกัน แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้มีงบประมาณระยะเวลาจำกัดประกอบกับสถานการณ์การระบาดของ COVID-19 ทำให้การสำรวจในปี 2563 ดำเนินการไม่ครอบคลุมตามแผน ดังนั้นควรสำรวจเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารรถนำไปใช้อ้างอิงได้

3. การวิเคราะห์ความเสี่ยงของเชื้อ LMV ที่ติดมากับกับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นขบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (stage 1: initiation)

ปัจจุบันประเทศไทยผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร เนื่องจากสภาพภูมิอากาศไม่เหมาะสม จึงจำเป็นต้องนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากต่างประเทศเพื่อจำหน่ายในประเทศและส่งต่อไปยังต่างประเทศ ตั้งแต่ปี 2559-2563 ประเทศไทยนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมเฉลี่ยปีละ 35.27 ตัน โดยนำเข้าสูงสุดจากสาธารณรัฐประชาชนจีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกาตามลำดับ (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2562) ซึ่งทั้งสามประเทศเป็นแหล่งที่มีรายงานพบ LMV โดยเฉพาะในสาธารณรัฐประชาชนจีนและสหรัฐอเมริกา ซึ่งพบระบาดทั่วไป ในปี 2560 - 2561 กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ตรวจพบ LMV ในเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน 3 ครั้ง ปริมาณรวม 3.3 ตัน และจากเนเธอร์แลนด์ 1 ครั้ง ปริมาณ 0.5 กิโลกรัม (กลุ่มวิจัยการกักกันพืช, 2561) เนื่องจากไวรัสนี้ยังไม่เคยมีรายงานพบในประเทศไทย และมีรายงานความเสียหายรุนแรงในต่างประเทศ จึงมีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน แต่เนื่องจากตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ไม่ได้กำหนด LMV เป็นสิ่งต้องห้าม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2550 ก,ข) จึงไม่ได้มีการกำหนดมาตรการทางสุขอนามัยพืชเพื่อจัดการไวรัสนี้ การนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากแหล่งที่มีการระบาดของโรคจึงมีความเสี่ยงที่เชื้อจะติดเข้ามาในประเทศไทยได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชให้เหมาะสมรัดกุม ลดความเสี่ยงที่เชื้อ LMV จะติดเข้ามาอยู่กับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทยและก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจได้



ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (stage 2: pest risk assessment)

2.1 การประเมินโอกาสการเข้ามาและแพร่ระบาด (Assessment of the probability of introduction and spread)

2.1.1 ประเมินโอกาสการเข้ามาของศัตรูพืช โดยประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชจะปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืช

โอกาสการเข้ามาสูง

ปัจจัยที่นำมาพิจารณา ได้แก่

- การระบาดของศัตรูพืชอย่างรุนแรงในแหล่งผลิต
- ช่วงวงจรชีวิตของศัตรูพืชซึ่งมีโอกาสปะปนเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม
- การรอดชีวิตของศัตรูพืชภายใต้สภาวะแวดล้อมขณะขนส่ง
- ปริมาณและความถี่ที่นำเข้า
- ความยากง่ายในการตรวจพบที่จุดนำเข้า

ประเทศไทยนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมเฉลี่ยปีละ 35.27 ตัน จำนวน 50-80 ครั้งต่อปี โดยนำเข้าสูงสุดจากสาธารณรัฐประชาชนจีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกาตามลำดับ (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2562) ซึ่งทั้งสามประเทศเป็นแหล่งที่มีรายงานพบ LMV โดยเฉพาะในสาธารณรัฐประชาชนจีน และสหรัฐอเมริกา ซึ่งพบระบาดทั่วไป รวมทั้งที่ผ่านมาประเทศไทยตรวจพบ LMV ในเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน 3 ครั้ง เนเธอร์แลนด์ 1 ครั้ง (2560-2561) และได้หวั่น 1 ครั้ง (2564) เชื้อไวรัสสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมและมีรายงานถ่ายทอดทางเมล็ดสูงถึง 30% (David *et al.*, 1997) และไม่สามารถตรวจพบที่จุดนำเข้า จะต้องสุ่มตัวอย่างเมล็ดมาตรวจในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคเฉพาะ การตรวจเชื้อที่ติดมากับเมล็ดสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การปลูกสังเกตอาการ (grow-out test) โดยเฉพาะเมล็ดจำนวน 30,000 ในโรงเรือนป้องกันแมลง สังเกตอาการในต้นกล้าเป็นเวลา 18-21 วัน หรือการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ *Chenopodium quinoa* (Kimble *et al.*, 1975) การตรวจด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาด้วยวิธี ELISA (Falk and Purcifull, 1983; ISF, 2017)

ดังนั้นจากการที่ประเทศไทยนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมในปริมาณมากจากประเทศที่มีการระบาดรุนแรง เชื้อไวรัสสามารถรอดชีวิตระหว่างขนส่งโดยอยู่ในเมล็ดพันธุ์ และมีความยุ่งยากในการตรวจที่จุดนำเข้าสามารถถ่ายทอดทางเมล็ดสูง และไม่มีวิธีการกำจัดเชื้อในเมล็ดที่ได้ผล จึงประเมินโอกาสการติดเข้ามาของ LMV กับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมสูง

2.2.2 ประเมินโอกาสการตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of establishment)

โอกาสการตั้งรกรากอย่างถาวรสูง

ปัจจัยที่นำมาพิจารณา ได้แก่

- การมีพืชอาศัย จำนวนและชนิดพืชอาศัย
- ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช



- ศักยภาพความสามารถในการปรับตัวของศัตรูพืช
- การปฏิบัติทางการเกษตรและมาตรการป้องกันกำจัด

LMV มีพืชอาศัยหลายชนิด แต่พืชอาศัยหลักของ LMV ในประเทศไทยคือผักกาดหอม ถั่วลิ้นเต่า และปวยเล้ง ซึ่งมีแหล่งปลูกกระจายทั่วทุกภาคของประเทศ จากข้อมูลแหล่งแพร่ระบาดซึ่งพบในเขตภูมิอากาศที่แตกต่างกัน แสดงว่าไวรัสมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ดังนั้นหากไวรัสติดมากับเมล็ดพันธุ์และถ่ายทอดไปยังต้นกล้าจะสามารถเจริญและเป็นแหล่งของเชื้อที่ระบาดในแปลงต่อไป เนื่องจากมีพืชอาศัยและแมลงพาหะของไวรัส *Aphis gossypii*, และ *Myzus persicae* ซึ่งพบแพร่กระจายในพื้นที่ประเทศไทย (Dinant and Lot, 1992) นอกจากนี้ยังมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเข้าทำลายพืชอาศัยของไวรัสและการเจริญของแมลงพาหะ

2.1.3 ประเมินโอกาสการแพร่ระบาดของศัตรูพืชหลังจากเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร ประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชสามารถแพร่กระจายในประเทศไทย

โอกาสการแพร่ระบาดสูง

ปัจจัยที่พิจารณา ได้แก่

- การกระจายของพืชอาศัยในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช
- ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในสภาพธรรมชาติและ/หรือสภาพแวดล้อมที่จัดการสำหรับการแพร่ระบาดของศัตรูพืชโดยธรรมชาติ
- ศักยภาพสำหรับการเคลื่อนย้ายไปกับสินค้าหรือพาหนะขนส่ง
- ความตั้งใจที่จะนำสินค้าไปใช้ประโยชน์
- พาหะที่มีศักยภาพของศัตรูพืชในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกผักกาดหอมกระจายอยู่ในภาคกลาง ภาคตะวันออกฉียงเหนือ และภาคเหนือ โดยปลูกมากที่สุด ในภาคกลาง ในปี 2561 พื้นที่ปลูกทั่วประเทศ 36 จังหวัด รวม 12,128 ไร่ จังหวัดที่ปลูกมากที่สุดคือ ราชบุรี นนทบุรี สมุทรสาคร และสุพรรณบุรี และ นครสวรรค์(กรมส่งเสริมการเกษตร, 2561) ประเภทที่นิยมปลูก ได้แก่ ผักกาดหอมท้อ (crisp Head) หรือไอซ์เบิร์ก (iceberg) ซึ่งปลูกได้ในระหว่างเดือนตุลาคม-มกราคม แต่ปลูกได้ดีที่สุดในช่วงเดือน พฤศจิกายน-ธันวาคม ช่วงเดือนมิถุนายน-กันยายนพอปลูกได้บ้างในบริเวณที่สูงทางภาคเหนือ ต้องการ อุณหภูมิในการเจริญเติบโตระหว่าง 15.5–21 องศาเซลเซียส และอีกประเภทที่นิยมปลูกคือ ผักกาดหอมใบ (loose leaf) พันธุ์นี้สามารถปลูกได้ตลอดปี และจะปลูกได้ดีที่สุดในช่วงเดือนตุลาคม – เมษายน อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 21-26.6 องศาเซลเซียส (วิกิพีเดีย, 2022)

หากมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ที่ติดเชื้อ LMV เชื้อไวรัสสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์และกระจายไปในแหล่งปลูกทั่วประเทศ ไวรัสสามารถระบาดในแปลงอย่างรวดเร็วโดยมีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ เพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* ซึ่งพบทั่วไปในประเทศไทยเป็นพาหะที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดไวรัสสูงสุด (Dinant and Lot, 1992) เนื่องจากการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อนแบบ non-persistent ซึ่งเพลี้ยอ่อนใช้เวลาเพียงไม่กี่วินาทีในการดูดกินพืชเป็นโรคและถ่ายทอดไวรัสสู่พืชปกติ (David et



al., 1997) ดังนั้นการกำจัดแมลงพาหะในแปลงไม่สามารถลดการแพร่กระจายของไวรัสได้ นอกจากนี้ยังไม่มีวิธีการกำจัดเชื้อในเมล็ดที่ได้ผล ดังนั้นการป้องกันที่ได้ผลดีที่สุดคือการใช้เมล็ดพันธุ์ที่ปลอดโรค

2.2 การประเมินผลทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้น (Assessment of potential economic consequence)

ผลกระทบทางเศรษฐกิจปานกลาง

ปัจจัยที่พิจารณา ได้แก่

2.2.1 ผลที่เกิดจากศัตรูพืชโดยตรง

- ความสูญเสียของผลผลิตในแง่ปริมาณและคุณภาพ
- ค่าใช้จ่ายในการควบคุม
- ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกผักกาดหอมรวม 12,128 ไร่ ผลผลิตรวม 8,372 ตัน ราคาเฉลี่ย 21 บาทต่อกิโลกรัม มูลค่าผลผลิตรวม 176.5 ล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2561) การบริโภคผักกาดหอมส่วนใหญ่บริโภคแบบสดเช่นใส่ในสลัด หรือเป็นผักตกแต่งจาน โรคใบด่างที่เกิดจาก LMV จะทำให้คุณภาพของผลผลิตไม่เป็นที่ต้องการของตลาด การควบคุมโรคนอกจากจะใช้เมล็ดพันธุ์ปลอดโรคแล้ว ยังต้องปลูกในสภาพโรงเรือนปิดที่สามารถป้องกันแมลงพาหะได้ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้ LMV จะกระทบต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์อย่างสูง เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตจะต้องมีการตรวจว่าปลอดจาก LMV ดังนั้นหากในอนาคตประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมเพื่อการส่งออก จะต้องมียุทธศาสตร์การตรวจและรับรองการปลอด LMV ในเมล็ด เช่นเดียวกับประเทศที่มีการผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมเช่น สหรัฐอเมริกา เนเธอร์แลนด์

2.2.2 ผลกระทบทางอ้อม

- ผลกระทบต่อการส่งออก รวมถึงการบังคับใช้กฎระเบียบด้านสุขอนามัยพืช
- ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นทำให้ราคาสินค้าสูงขึ้น
- ผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพอันเนื่องมาจากการป้องกันกำจัด
- ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

LMV จะส่งผลกระทบต่อการผลิตและส่งออกเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอม เนื่องจากต้องมีระบบการตรวจและรับรองการปลอด LMV ในเมล็ดพันธุ์ตามเงื่อนไขของประเทศปลายทาง เช่น ศรีลังกา กำหนดเงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมต้องมาจากประเทศที่ปลอดจาก LMV หรือต้องตรวจและรับรองว่าปลอดจาก LMV โดยระบุข้อความรับรองในใบรับรองสุขอนามัยพืช และบางประเทศกำหนดให้ LMV เป็นศัตรูพืชที่ต้องควบคุม เช่น เม็กซิโก กำหนดให้เป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) อียิปต์ กำหนดให้เป็นศัตรูพืชที่ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันที่ต้องมีการควบคุม (regulated non-quarantine pest) (EPPO, 2020) นอกจากนี้จะต้องเพิ่มต้นทุนในการผลิตและการป้องกันกำจัด เช่น ปลูกในโรงเรือนกันแมลง การใช้เมล็ดพันธุ์ปลอดโรค หรือหากเกิดการระบาดอย่างรุนแรงในประเทศ อาจกระทบต่อผลผลิตจนกระทั่งต้องนำเข้าจากประเทศเพื่อนบ้านทำให้ผลผลิตมีราคาสูงขึ้น



2.3 สรุปผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชโดยสรุปผลการประเมินโอกาสการเข้ามา การตั้งรกรากอย่างถาวรและการแพร่กระจาย ผลกระทบทางเศรษฐกิจที่เกิดขึ้น ดังนี้ (ความเสี่ยงสูง x ความเสี่ยงสูง x ความเสี่ยงสูง) x (ความเสี่ยงปานกลาง) = ความเสี่ยงปานกลาง

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk management)

จากผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงเพื่อกำหนดมาตรการสำหรับจัดการความเสี่ยง LMV ซึ่งมีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมเข้ามาแพร่ระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชอาศัยของไวรัสในประเทศไทย ดังนี้

1. กำหนดมาตรการนำเข้าจากประเทศที่มีระบบการรับรองเมล็ดพันธุ์ (seed certification scheme) มีการตรวจ LMV ในเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมด้วยวิธีการที่เหมาะสมก่อนส่งออก
2. กำหนดให้การนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืช หรือใบรับรองสุขอนามัยพืชสำหรับส่งออก ซึ่งออกให้โดยองค์การอารักขาพืชแห่งชาติจากประเทศผู้ส่งออก และต้องระบุข้อความเพิ่มเติมว่าเมล็ดพันธุ์ได้ผ่านการตรวจและรับรองว่าปลอดจาก LMV
3. การตรวจนำเข้าจะต้องมีการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมเพื่อตรวจ LMV ในห้องปฏิบัติการ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การตรวจสอบเชื้อ LMV ในเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้า ในปี 2563-2564 พบ LMV ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมนำเข้าจากไต้หวัน จำนวน 1 ตัวอย่าง

การสำรวจแปลงผลิตผักกาดหอมเพื่อศึกษาสถานภาพของเชื้อไวรัส LMV ในประเทศไทยในพื้นที่ 12 จังหวัด และแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่จังหวัดน่าน พบ LMV จำกัดเฉพาะพื้นที่ในแปลงผลิตผักกาดหอมเพื่อบริโภคที่จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 แปลง และในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ที่จังหวัดน่านจำนวน 3 แปลง ซึ่งเกษตรกรพบใช้เมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมที่นำเข้าจากต่างประเทศ จึงได้ดำเนินการกำจัดต้นเป็นโรคออกจากแปลง และได้ติดตามสำรวจโรคในพื้นที่ภายหลัง ผลการสำรวจไม่พบ LMV ในพื้นที่ ดังนั้นจึงสรุปสถานภาพของ LMV ในประเทศไทยว่าพบในพื้นที่จำกัดและดำเนินการกำจัดหมดสิ้นแล้ว

จากการศึกษาข้อมูลของ LMV เป็นศัตรูพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ และไม่พบในประเทศไทย และการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช สรุปผลการประเมิน ได้ว่า LMV เป็นศัตรูพืชกักกันซึ่งมีความเสี่ยงปานกลางที่จะติดเข้ามาพร้อมกับเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมแล้วมาแพร่ระบาดทำความเสียหายกับการเกษตรในประเทศไทย จึงควรกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยง โดยกำหนดให้นำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากประเทศที่มีระบบการรับรองเมล็ดพันธุ์ (seed certification scheme) และกำหนดเงื่อนไขให้มีการตรวจและรับรองว่าปลอดจาก LMV จากประเทศต้นทาง



คำแนะนำ

1. ควรจะมีการสำรวจ LMV ต่อเนื่องเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 ปี และครอบคลุมพืชอาศัย และพื้นที่ปลูกทั่วประเทศไทย จึงจะได้ข้อมูลที่สมบูรณ์เพื่อยืนยันสถานภาพของ LMV ในประเทศไทย ซึ่งสามารถใช้อ้างอิงได้
2. กำหนดให้ LMV เป็นศัตรูพืชกักกัน ตามพระราชบัญญัติกักพืช 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม
3. กำหนดมาตรการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมจากประเทศที่มีระบบการรับรองเมล็ดพันธุ์ (seed certification scheme) และกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าให้ระบุข้อความเพิ่มเติมใบรับรองสุขอนามัยพืช ว่าเมล็ดพันธุ์ได้ผ่านการตรวจและรับรองว่าปลอดจาก LMV
4. สุ่มตัวอย่างเมล็ดผักกาดหอมที่นำเข้าเพื่อตรวจ LMV ในห้องปฏิบัติการ เพื่อป้องกันไวรัสติดมากับเมล็ดพันธุ์

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลองนี้ ทำให้ทราบสถานภาพของ LMV ในประเทศไทย และเส้นทางศัตรูพืชของเชื้อ LMV ซึ่งกรมวิชาการเกษตรในฐานะองค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization, NPPO) สามารถนำไปใช้ปรับปรุงกฎระเบียบในการนำเข้า เช่นการแก้ไขประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในการกำหนดพืชหรือศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ และนำไปใช้ในการกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ผักกาดหอมเพื่อจัดการความเสี่ยงเชื้อ LMV

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ข้าราชการ พนักงานราชการ และพนักงานจ้างเหมา ของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตาม พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 ประกาศ ณ วันที่ 26 เมษายน 2550. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 66 ง. ลงวันที่ 1 มิถุนายน 2550.
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้นและเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๕) พ.ศ. 2550 ประกาศ ณ วันที่ 26 เมษายน 2550. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 66 ง. ลงวันที่ 1 มิถุนายน 2550.
- กรมวิชาการเกษตร. 2559. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ 288 หน้า.



- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2561. ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล <http://production.doae.go.th> (3 พฤษภาคม 2561).
- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2562. ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ควบคุมฯ. http://www.doa.go.th/ard/?page_id=1443. สืบค้นเมื่อวันที่ 5 กรกฎาคม 2564.
- Biosecurity Australia. 2016. Biosecurity Import Risk Analysis Guidelines 2016. Agriculture and Water Resources 2016, Biosecurity Import Risk Analysis Guidelines 2016: managing biosecurity risks for imports into Australia, Department of Agriculture and Water Resources, Canberra.
- Blancard, D., Lot, H. and Maisonneuve, B. 2006. A Color Atlas of Diseases of Lettuce and Related Salad Crops Observation, Biology and Control. Academic Press. San Diego. 297-300.
- Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI). 2020. Crop Protection Compendium. Available source: <http://www.cabi.org/cpc/> (site date: April 20, 2020).
- Davis, R.M., Subbarao, K.V., Raid, R.N. and Kurtz, E.A. 1997. Compendium of Lettuce Disease. The American Phytopathological Society. St.Paul. 43-44.
- Dinant, S. and Lot, H. 1992. Lettuce mosaic virus. Plant Pathology, 41(5):528-542.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2020. Lettuce mosaic virus in EPPO Global database. <https://gd.eppo.int/taxon/LMV000/categorization>. (site date: April 20, 2020)
- Falk BW, Purcifull DE, 1983. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test to index lettuce seeds for lettuce mosaic virus in Florida. Plant Disease, 67(4):413-416
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2018. Surveillance. International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) No.6, FAO, Rome.
- FAO. 2019a. International Standards for Phytosanitary Measures no. 2: Framework for pest risk analysis (2007) (Online). Available. <http://www.ippc.int/publications/framework-pest-risk-analysis>.
- FAO. 2019b. International Standards for Phytosanitary Measures no. 11: Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013). (Online). Available. <http://www.ippc.int/publications/pest-risk-analysis-quarantine-pests>.
- International Seed Federation (ISF). 2017. Method for the Detection of *Lettuce Mosaic Virus* in *Lettuce* Seed and Seedlings. Version 4.3, 2017.



- Krause-Sakate, R., Mello, R. N., Pavan, M. A., Zambolim, E. M., Carvalho M. G., Le Gall, O. & Zerbini, F. M. 2001. Molecular characterization of two Brazilian isolates of Lettuce mosaic virus with distinct biological properties. *Fitopatologia Brasileira* 26:153- 157.
- McMaugh, T. 2005. Guidelines for Surveillance for Plant Pests in Asia and the Pacific. ACIAR Monograph No. 119, 192p.
- McMaugh, T. 2008. คำแนะนำในการสำรวจศัตรูพืชในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิก. ACIAR Monograph No. 119, 199 p.
- Phatak HC, 1974. Seed-borne plant viruses - Identification and diagnosis in seed health testing. *Seed Science and Technology*, 2:3-155.
- Raid RN, Nagata RT, Brown LG, 1996. A recent outbreak of Lettuce mosaic potyvirus in commercial lettuce production in Florida. *Plant Disease*, 80(3): 343; 1 ref.
- Revers, F., Lot, H., Souche, S., Gall, O. L., Candresse, T. and Dunez, J. 1997b. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. *Phytopathology* 87:397-403.
- Shukla DD, Ward CW, Brunt AA, 1994. *The Potyviridae*. Wallingford, UK; CAB International, 516 pp.



Table 1 Result of LMV detection on lettuce seeds imported on 2020 by ELISA method.

| NO. | ORIGIN | AMOUNT (Samples) | Result of LMV detection | |
|--------------|-------------|---------------------|-------------------------|-------------------|
| | | | Detected | Not detected |
| 1 | CHINA | 2 | 0 | 2 |
| 2 | NETHERLANDS | 5 | 0 | 5 |
| 3 | USA. | 6 | 0 | 6 |
| 4 | FRANCE | 5 | 0 | 5 |
| 5 | AUSTRALIA | 2 | 0 | 2 |
| 6 | CHILI | 5 | 0 | 5 |
| 7 | PERU | 2 | 0 | 2 |
| Total | | 27 samples | 0 sample | 27 samples |

Table 2 Result of LMV detection on lettuce seeds imported on 2021 by ELISA method.

| NO. | ORIGIN | AMOUNT (Samples) | Result of LMV detection | |
|--------------|------------|---------------------|-------------------------|-------------------|
| | | | Detected | Not detected |
| 1 | HINA | 5 | 0 | 5 |
| 2 | ETHERLANDS | 2 | 0 | 2 |
| 3 | SA. | 4 | 0 | 4 |
| 4 | AIWAN | 4 | 1 | 3 |
| 5 | RANCE | 2 | 0 | 2 |
| 6 | USTRALIA | 4 | 0 | 4 |
| 7 | HILI | 5 | 0 | 5 |
| 8 | ERU | 1 | 0 | 1 |
| Total | | 27 samples | 1 sample | 26 samples |



Table 3 Detective survey of LMV in production area of Lettuce in Thailand.

| No | Production area of lettuce | | | Source | Survey result |
|-----|----------------------------|----------------------|-------------------|--------|---------------------------|
| | Sub district | District | Province | | |
| 1 | Lam Hoei | Don Tum | Nakhon Pathom | 4 | Absent |
| 2 | Thung Noi | Mueang Nakhon Pathom | Nakhon Pathom | 8 | Absent |
| 3 | Phra Prathon | Mueang Nakhon Pathom | Nakhon Pathom | 2 | Absent |
| 4 | Thap Luang | Mueang Nakhon Pathom | Nakhon Pathom | 1 | Absent |
| 5 | Phimon Rat | Bang Bua Thong | Nonthaburi | 1 | Absent |
| 6 | Sano Loi | Bang Bua Thong | Nonthaburi | 3 | Absent |
| 7 | Ban Mai | Bang Yai | Nonthaburi | 1 | Absent |
| 8 | Bang Phai | Bang Khae | Bangkok | 2 | Absent |
| 9 | Thawi Watthana | Thawi Watthana | Bangkok | 1 | Absent |
| 10 | Wang Sala | Tha Muang | Kanchanaburi | 1 | Absent |
| 11 | Mae Raem | Mae Rim | Chiang Mai | 2 | Absent |
| 12 | Don Han | Mueang Khon Kaen | Khon Kaen | 2 | Absent |
| 13 | Dan Thap Tako | Chom Bueng | Ratchaburi | 1 | Absent |
| 14 | Khok Mo | Mueang Ratchaburi | Ratchaburi | 1 | Absent |
| 15 | Lat Bua Khao | Ban Pong | Ratchaburi | 1 | Absent |
| 16 | Pak Chong | Chom Bueng | Ratchaburi | 1 | Absent |
| 17 | Huai Phai | Mueang Ratchaburi | Ratchaburi | 1 | Absent |
| 18 | Phong Sawai | Mueang Ratchaburi | Ratchaburi | 1 | Absent |
| 19 | Phaeng Phuai | Damnoen Saduak | Ratchaburi | 1 | Absent |
| 20 | Tha Nat | Damnoen Saduak | Ratchaburi | 1 | Absent |
| 21 | Nong Bua | Phatthana Nikhom | Lopburi | 1 | Absent |
| 22 | Khanong Phra | Pak Chong | Nakhon Ratchasima | 1 | Absent |
| 23 | Don Ta Nin Yai | Dan Khun Thot | Nakhon Ratchasima | 1 | Absent |
| 24 | Sakae Rat | Pak Thong Chai | Nakhon Ratchasima | 1 | Absent |
| 25 | Thai Samakkhi | Wang Nam Khiao | Nakhon Ratchasima | 2 | Absent |
| 26 | Mu Si | Pak Chong | Nakhon Ratchasima | 1 | Absent |
| 27 | Non A Ri | Pak Chong | Nakhon Ratchasima | 1 | Absent |
| 28* | Thai Samakkhi | Wang Nam Khiao | Nakhon Ratchasima | 5 | Absent / 4 Present / 1 |
| 29* | Nong Sarai | Pak Chong | Nakhon Ratchasima | 5 | Absent |
| 30 | Nong Yang Sua | Muak Lek | Saraburi | 1 | Absent |
| 31 | Thung Samo | Khao Kho | Phetchabun | 3 | Absent |
| 32 | Khek Noi | Khao Kho | Phetchabun | 1 | Absent |
| 33 | Khao Kho | Khao Kho | Phetchabun | 5 | Absent |
| 34 | Sado Phong | Khao Kho | Phetchabun | 1 | Absent |
| 35 | Bueng Phra | Mueang Phitsanulok | Phitsanulok | 5 | Absent |
| 36* | Puea | Chiang Klang | Nan | 5 | Absent / 2 Present / 3 |
| 37* | Wora Nakhon | Pua | Nan | 5 | Absent |

Remark: *, the areas of seed production sites



Table 4 The risk estimation matrix (Biosecurity Australia, 2016)

| Likelihood of pest entry, establishment and spread | Consequences of pest entry, establishment and spread | | | | | |
|--|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| | Negligible | Very low | Low | Moderate | High | Extreme |
| High | Negligible risk | Very low risk | Low risk | Moderate risk | High risk | Extreme risk |
| Moderate | Negligible risk | Very low risk | Low risk | Moderate risk | High risk | Extreme risk |
| Low | Negligible risk | Negligible risk | Very low risk | Low risk | Moderate risk | High risk |
| Very low | Negligible risk | Negligible risk | Negligible risk | Very low risk | Low risk | Moderate risk |
| Extremely low | Negligible risk | Negligible risk | Negligible risk | Negligible risk | Very low risk | Low risk |
| Negligible | Negligible risk | Negligible risk | Negligible risk | Negligible risk | Negligible risk | Very low risk |

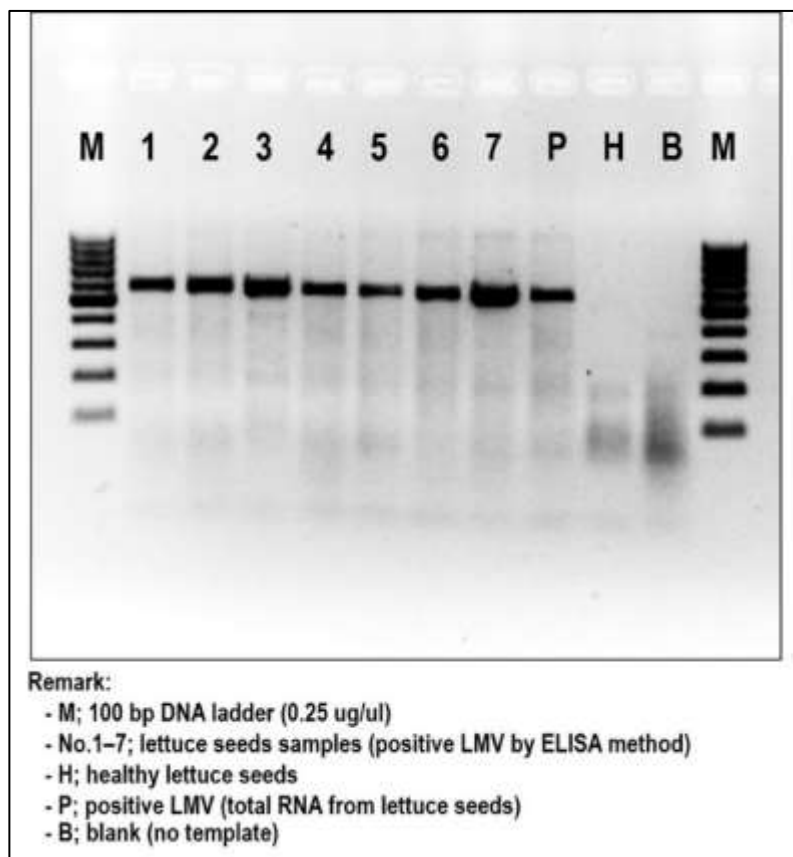


Figure 1 LMV detection by RT-PCR



Figure 2 Show the symptoms of *Lettuce mosaic virus*

ศูนย์การสำรวจและเฝ้าระวังโรค
Lettuce mosaic virus



สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร - กรมวิชาการเกษตร

แบบบันทึกรายงานการสำรวจ

| วันที่ | ชื่อเกษตรกร | ที่อยู่ | พิกัด | | เปอร์เซ็นต์การเป็นโรค | แมลงที่พบ | วัชพืช | ชนิดพืชแปลงข้างเคียง |
|--------|-------------|---------|---------|----------|-----------------------|-----------|--------|----------------------|
| | | | ละติจูด | ลองจิจูด | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |

Figure 3 Survey guide and report form.

ที่มา: T.A. Zitter Cornell University, 2019

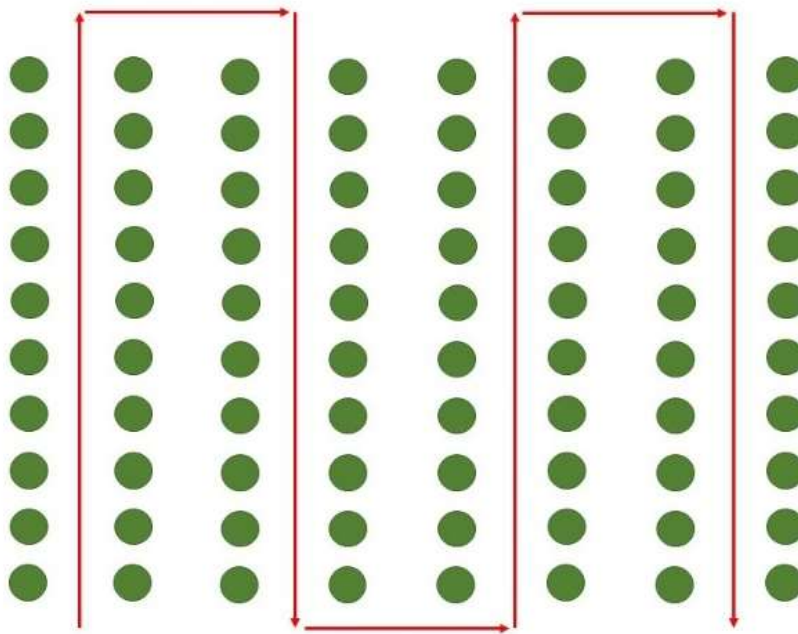


Figure 4 Survey pattern and collecting sample



Figure 5 Symptom of mosaic caused by *Turnip mosaic virus* (TuMV)



Figure 6 Symptom of leaf spot caused by *Cercospora* sp

ชนิดของแมลงหมีขาว (Hemiptera: Aleyrodidae) ในพืชผักสวนครัว
เพื่อการส่งออกของประเทศไทย
Species of Whitefly in backyard garden for export in Thailand

สุนัดดา เชาวลิต อธิธิพล บรรณาการ เกศสุตา สนศิริ สิทธิศิริโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The whitefly is one of the most important insect pests. There are severe outbreak all over the world. Thailand has received alerts from the European Union that whitefly is frequently attached to the vegetable gardens exported to the EU causing a lot of damage to Thailand and farmers and exporters. The aim of this research is to identify, host plants and distribution of species of Whitefly in backyard garden for export and contributes to an ongoing program to compile a pest database of Thailand. Leaves bearing puparia collected on backyard garden plantation was carried out during October 2019 – September 2021 in 51 provinces around Thailand, and 1,605 samples were collected and identified. This material supplemented with specimens held in the Insect Museum of Thai Department of Agriculture. Specimens were identified using external morphology on slide. Three species Aleyrodinae were found. 1) Tobacco whitefly; *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) 2) Spiralling Whitefly; *Aleurodicus dispersus* Russell and 3) Greenhouse Whitefly; *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856). Voucher specimens were deposited in the Insect Museum, Insect Taxonomy Group, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand.

Keywords : Whitefly, backyard garden, insect pest, Thailand

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-16-62



บทคัดย่อ

แมลงหรีขาวเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง มีการระบาดรุนแรงไปทั่วโลก อาศัยอยู่กับพืชมากมายหลายชนิด ประเทศไทยรับการแจ้งเตือนจากสหภาพยุโรปว่ามีแมลงหรีขาวติดไปกับพืชผักสวนครัวที่ส่งไปยังสหภาพยุโรปบ่อยครั้ง สร้างความเสียหายให้ประเทศไทยและเกษตรกรและผู้ส่งออกเป็นอย่างมาก การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบชนิด พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจายของแมลงหรีขาว เพื่อประโยชน์ในการจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืช แก้ไขปัญหาการส่งออกพืชผักสวนครัวของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างแมลงหรีขาวในพืชผักสวนครัวจาก 51 จังหวัด ของประเทศไทย รวมทั้งใช้ตัวอย่างเดิมที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาระยะดักแด้แมลงหรีขาวจำนวน 1,605 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้ 3 ชนิด ได้แก่ 1) แมลงหรีขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) 2) แมลงหรีขาวไยเกลียว *Aleurodicus dispersus* Russell และ 3) แมลงหรีขาวในโรงเรือน *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856) ในสัดส่วนร้อยละ 66.85, 33.40 และ 0.75 ตามลำดับ ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาค้นคว้านี้ เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อเตรียมจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย

คำสำคัญ : แมลงหรีขาว ผักสวนครัว แมลงศัตรูพืช ประเทศไทย

คำนำ

แมลงหรีขาว (whitefly) เป็นแมลงศัตรูพืชขนาดเล็กที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในอันดับ Hemiptera อันดับย่อย Sternorrhyncha วงศ์ Aleyrodidae ทั่วโลกมีแมลงหรีขาวที่จำแนกไว้แล้ว 166 สกุล จำนวน 1,556 ชนิด (Martin, 2007) แมลงหรีขาวมีเขตการแพร่กระจายได้ทั่วโลกและพบมากในประเทศเขตร้อนและกึ่งร้อน สำหรับประเทศไทย Mound and Halsey (1978) ได้รายงานชนิดแมลงหรีขาวที่เป็นศัตรูพืชมีไม่น้อยกว่า 50 ชนิด Hutacharem *et al.* (2007) รวบรวมรายชื่อแมลงหรีขาวที่พบในประเทศไทยมีจำนวน 93 ชนิด สมชัย (2550) รายงานชนิดแมลงหรีขาวศัตรูพืชในประเทศไทยไว้ 9 ชนิด โดยทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพืชแล้วถ่ายมูลเหนียวที่เป็นน้ำหวานออกมาตามส่วนต่าง ๆ ของพืชที่อาศัย ซึ่งมูลเหนียวนี้เป็นอาหารของเชื้อรา หากมีการถ่ายมูลหวานในปริมาณมากใบพืชจะถูกปกคลุมไปด้วยเชื้อราดำจนพืชไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง แมลงหรีขาวชนิดที่เป็นศัตรูพืชสำคัญได้แก่ แมลงหรีขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) มีการระบาดรุนแรงและแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปทั่วโลก (De Barro, 1995) อาศัยอยู่กับพืชได้หลายชนิด (polyphagous) เช่น พืชวงศ์มะเขือ พืชวงศ์ถั่ว พืชวงศ์แตง กระเพรา โหระพา แมงลัก ผักชีฝรั่ง ผักไผ่ มันสำปะหลัง และพืชสวนประดับอีกจำนวนมาก (Byrne *et al.*, 1990; กรรณิการ์และคณะ, 2554; สุนัดตาและคณะ, 2556) แมลงหรีขาวไยเกลียว *Aleurodicus*



disperses Russell พบมีพืชอาหารมากกว่า 43 ชนิด และได้รายงานในพืชผักสวนครัว ได้แก่ พืชวงศ์แตง วงศ์ถั่ว กระเจี๊ยบ ชะพลู ตำลึง แตงกวาถั่วฝักยาว ถั่วพู พริก มะเขือ มะเขือม่วง CPC (2007) รายงานว่าแมลงหริ่งขาวไยเกลียว เป็นศัตรูสำคัญของ กระเจี๊ยบ ถั่วลิสง พืชตระกูลกะหล่ำ ถั่วมะแฮะ พริกหยวก พืชวงศ์แตง พืชตระกูลถั่ว และพืชวงศ์ แมี้ยามอาหารขาดแคลนแมลงหริ่งขาวยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ แมลงหริ่งขาวยาสูบ มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในทวีปแอฟริกา ยุโรป และอเมริกา ซึ่งคาดว่าเกิดจากการติดไปกับสินค้าเกษตร (Cock, 1986) แมลงหริ่งขาวสามารถขยายพันธุ์ได้ 11-15 รุ่นต่อปีภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (Avidov, 1956) และเพศเมียหนึ่งตัวสามารถวางไข่ได้ 100-300 ฟอง ตลอดวงจรชีวิตจะอยู่ได้ประมาณ 3-6 สัปดาห์ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้แมลงหริ่งขาวสามารถเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว (Azab *et al.*, 1971; Bethke *et al.*, 1991) ปัญหาการระบาดของแมลงหริ่งขาวยาสูบจึงมีรายงานอย่างต่อเนื่อง

แมลงหริ่งขาวนอกจากเป็นแมลงศัตรูพืชแล้วยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น *Begomovirus Geminivirus Carlavirus Nepovirus Potyvirus* และ *Closterovirus* (Byrne *et al.*, 1990) แมลงหริ่งขาวยาสูบนี้มีความซับซ้อนทางพันธุกรรมสูง (species complex) ดังจะเห็นได้จากในยุคแรกมีการจำแนกแมลงหริ่งขาวยาสูบ ออกเป็น 18 ชนิดด้วยกัน โดยใช้ความเพียงแตกต่างของรูปร่างลักษณะของดักแด้ที่สำรวจได้จากพืชอาหารต่างชนิดกัน ซึ่งการจำแนกในลักษณะดังกล่าวมีข้อจำกัดอยู่มากเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับการปรับตัวของแมลงหริ่งขาวให้มีความเฉพาะเจาะจงกับพืชอาหารหรือสภาพแวดล้อม (Gill, 1992; Mound and Halsey, 1978; Russel, 1958; De Barro *et al.*, 2005; Perring, 2001) แต่ในภายหลังได้มีการศึกษาโครงสร้างอย่างละเอียดจึงได้ยุบรวมเป็นชนิดเดียว คือ *B. tabaci* (Costa *et al.*, 1993; Brown, 1994) แสดงให้เห็นว่าแมลงหริ่งขาวชนิดนี้ยากที่จะใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนกในระดับ species และ biotype ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงหริ่งขาวมีผลต่อความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ต่างกันด้วย (Bedford *et al.*, 1992, 1994) ตัวอย่างเช่น พบว่าแมลงหริ่งขาวยาสูบเป็นพาหะของเชื้อไวรัสใบหด (tabacco leaf curl virus) ซึ่งเป็นโรคสำคัญของยาสูบเป็นศัตรูพืชของแมลงหริ่งขาว (สิริวัฒน์, 2526; Ohno, 1992; ปิยรัตน์และคณะ, 2542; สมศักดิ์และคณะ, 2554)

การศึกษานุกรมวิธานและชีววิทยาของแมลงหริ่งขาวในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออก จะทำให้ประเทศไทยมีฐานข้อมูลแมลงหริ่งขาวศัตรูพืชผักสวนครัว ซึ่งเป็นข้อมูลประกอบในการปรับปรุงกระบวนการผลิตสินค้าให้ได้คุณภาพตามมาตรฐานปราศจากการปนเปื้อนของแมลงศัตรูพืช เป็นที่ยอมรับของสหภาพยุโรปและประเทศคู่ค้าอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นการเตรียมความพร้อมในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย เพื่อนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางการเกษตร รองรับการเปิดเสรีทางการค้าระหว่างประเทศสมาชิกประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (AEC) ที่จะเกิดขึ้นในอนาคต



วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) ตัวอย่างแมลงหิวข้าวที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชผักสวนครัวทั่วประเทศไทย
- 2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดตวงแมลงซึ่งบรรจุแอลกอฮอล์ 80% ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถึงรักษาความเย็น และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
- 3) อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ potassium hydroxide 10 %, alcohol 70-95 %, acetic acid gacial, Chloral-phenol, ammonia solution, hydrogen peroxide, acid fuchsin strain, clove oil และ canada balsam บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์ ตู้อบสไลด์ถาวร
- 4) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereomicroscope, compound microscope และกล้องถ่ายภาพ
- 5) อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotting และกระดาษไขเขียนแบบ
- 6) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของแมลงหิวข้าววิธีปฏิบัติการทดลอง

วิธีการ

1) กำหนดพื้นที่การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหิวข้าวจากแหล่งปลูกพืชผักสวนครัว (5 กลุ่ม 16 ชนิด ได้แก่ กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่ห่วย พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกชี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขึ้น มะระจีน มะระขี้นก และผักชีฝรั่ง) รวมถึงพืชผักสวนครัวชนิดอื่นที่มีศักยภาพในการส่งออก ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยแบ่งขอบเขตการสำรวจตามภูมิภาคของประเทศไทย ดังนี้

ปีที่ 1 เก็บรวบรวมตัวอย่าง จากภาคเหนือและภาคกลาง

ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน พะเยา แพร่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ลำพูน และอุตรดิตถ์

ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัด นครปฐม นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท พิจิตร เพชรบูรณ์ สุโขทัย อ่างทอง และอุทัยธานี

ปีที่ 2 เก็บรวบรวมตัวอย่าง จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ตราด ปราจีนบุรี ระยอง และสระแก้ว

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด ขอนแก่น นครพนม นครราชสีมา สกลนคร สุรินทร์ ศรีสะเกษ หนองคาย อุตรดิตถ์ และอุบลราชธานี

ปีที่ 3 เก็บรวบรวมตัวอย่าง จากภาคใต้และภาคตะวันตก

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดกระบี่ ชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ภูเก็ต ระนอง สงขลา และสุราษฎร์ธานี

ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี และราชบุรี

2) เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหิวข้าว ระยะตัวอ่อน ดักด้ว หรือตัวเต็มวัยจากใบพืช นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้พร้อมพืชอาศัยหรือกระดาษแล้วนำไปใส่ถุงพลาสติก กล่องพลาสติก หรือถุงสี



น้ำตาลเพื่อรักษาความชื้นของพืช หากตัวอย่างแมลงหิวข้าวที่รวบรวมได้อยู่ในระยะตัวอ่อน ต้องนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นดักแด้ บันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่ พิกัด ภูมิศาสตร์ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง

3) นำตัวอย่างดักแด้และตัวเต็มวัยแมลงหิวข้าวที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจลักษณะภายนอก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ สี ฯลฯ และทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ Martin (1985)

4) จำแนกชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของแมลงหิวข้าวตามแนวทางการวินิจฉัยของ Martin (1985) Martin และคณะ (2007) Mound และคณะ (1978) ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิด ได้แก่ ขนและหนาม (setae & spine) ขอบลำตัว (margin) อวัยวะที่ใช้ในการจับไข เช่น ช่องเปิดชนิดต่างๆ (pores) vesiform orifice lingula และ operculum เป็นต้น

5) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา โดยนำตัวอย่างแมลงหิวข้าวพร้อมตัวอย่างพืชที่มีดักแด้เกาะอยู่ และสไลด์ถาวรที่ทำเสร็จแล้ว เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

- การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลชนิดของแมลงหิวข้าว ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิด
2. ข้อมูลพืชอาหาร
3. ข้อมูลเขตการแพร่กระจาย

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถานที่ แหล่งปลูกพืชทั้งพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่า โดยเน้นพื้นที่ปลูกพืชผักสวนครัว และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยาสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจชนิดของแมลงหิวข้าวในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทย จำนวน 16 ชนิดพืช ได้แก่ กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หระ พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกชี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขึ้น มะระจีน มะระขี้นก และผักชีฝรั่ง ใน 51 จังหวัด ได้แก่ กระบี่ กาญจนบุรี ขอนแก่น จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ชัยนาท ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ตรัง ตราดตาก นครปฐม นครพนม นครราชสีมา นครศรีธรรมราช นนทบุรี น่าน ประจวบคีรีขันธ์ปราจีนบุรี พระนครศรีอยุธยา พะเยา พังงา พัทลุง พิจิตร เพชรบุรี เพชรบูรณ์แพร่ ภูเก็ต แม่ฮ่องสอน ระนอง ระยอง ราชบุรี ลำปาง ลำพูน ศรีสะเกษ สกลนคร สงขลา สระแก้วสิงห์บุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี สุราษฎร์ธานีสุรินทร์ หนองคาย อ่างทอง อุตรธานี อุตรดิตถ์ อุทัยธานี และ



อุบลราชธานี จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดักแด้ จำนวน 1,605 ตัวอย่าง ได้ 3 ชนิด ได้แก่ *Bemisia tabaci* จำนวน 1,057 ตัวอย่าง *Aleurodicus disperses* จำนวน 106 ตัวอย่าง และ *Trialeurodes vaporariorum* จำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.85, 33.40 และ 0.75 ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดดังนี้

แนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงหีขาวในพืชผักสวนครัว

- 1 - ไม่พบช่องเปิดขนาดใหญ่บนลำตัว (compound pores) แต่อาจมีช่องเปิดแบบ simple pores ขนาดใหญ่กระจายทั่วตัว lingual มีหลายขนาด มักอยู่ด้านใน vasiform orifice (ภาพที่ 1,3) 2
- มีช่องเปิดขนาดใหญ่บนลำตัว (compound pores) บริเวณอก 1 คู่ และที่ปล้องท้อง 4 คู่ ตั้งอยู่ที่ท้องปล้องที่ 3 ถึง 6 แต่ละช่องเปิดมีขนาดใกล้เคียงกัน vasiform orifice มีขนาดใหญ่ รูปร่างคล้ายหัวใจ โดยส่วนปลายเส้นมีขนแข็ง 4 เส้น (ภาพที่ 2) *Aleurodicus disperse*
- 2 - ช่องเปิดแบบขนาดใหญ่ (simple pore) 4 คู่ โดยพบที่ส่วนหัว 1 คู่ ออกปล้องแรก 1 คู่ และที่ส่วนท้อง ระหว่างปล้องท้อง 2 คู่ ลำตัวกลมมน ขอบลำตัวมีตุ่มขนาดเล็กมีรูปร่างคล้ายกรวย (papillae) เรียงรอบลำตัว ปลายของ lingual ขยายใหญ่และหยัก
.....*Trialeurodes vaporariorum*
- ลำตัวส่วนหัวโค้งมน ท้ายเรียว lingual ยาวกว่า vesiform รอยย่นที่ท้ายลำตัวมีขนาดเล็ก มีขนหนึ่งคู่ที่ท้ายลำตัว *Bemisia tabaci*

แมลงหีขาวยาสูบ

(tobacco whitefly, cotton whitefly, sweetpotato whitefly, silverleaf whitefly)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889)

ชื่อพ้อง

Aleurodes tabaci Gennadius, 1889: 1. Greece [Takahashi, 1963: 110.]

Aleurodes inconspicua Quaintance, 1900: 28. USA, Florida. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia emiliae Corbett, 1926: 273. Sri Lanka. [Synonymised by Mound & Halsey, 1987: 118.]

Bemisia costalimai Bondar, 1928: 27. Brazil. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia signata Bondar, 1928: 29. Brazil. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia bahiana Bondar, 1928: 30. Brazil. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia gossypiperda Misra & Lamba, 1929: 1. India, Bihar. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]



Bemisia achyranthes Singh, 1931: 82. India, Bihar. [Synonymised with *gossypiperda* by Corbett, 1935: 783.]

Bemisia hibisci Takahashi, 1933: 17. Taiwan. [Synonymised by Takahashi, 1936: 110.]

Bemisia longispina Priesner & Hosny, 1934: 6. Egypt. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia gossypiperda var. *mosaicivectura* Ghesquière in Mayné & Ghesquière, 1934: 30. Congo. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia goldingi Corbett, 1935: 249. Nigeria. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia nigeriensis Corbett, 1935: 250. Nigeria. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia rhodesiansis Corbett, 1936: 22. Nigeria. [Synonymised by Russell, 1957: 122.]

Bemisia manihotis Frappa, 1938: 30. Madagascar. [Synonymised by Takahashi & Mamet, 1952: 125.]

Bemisia vayssierei Frappa, 1939: 255. Madagascar. [Synonymised by Takahashi & Mamet, 1952: 125.]

Bemisia lonicerae Takahashi, 1957: 16, Japan. [Synonymised by Mound & Halsey, 1987: 118.]

Bemisia minima Danzig, 1964: 638. Georgia (Republic of). [Synonymised by Danzig, 1966: 372.]

Bemisia miniscula Danzig, 1964: Georgia (Republic of). [Synonymised by Danzig, 1966: 372.]

Cortisiana restonicae Goux, 1988: 64. Corsica. [Synonymised by Martin, 1999: 59.]

Bemisia argentifolii Bellows & Perring in Belloes, Perring, Gill & Headrick, 1994: 196. USA, California. [Synonymised by De Barro, Trueman & Frohlich, 2005: 201.]

Bemisia tuberculata Bondar, 1923: 123. Brazil

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (ภาพที่ 1 ก-ง)

วางไข่ด้านล่างของใบไม้เป็นฟองเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มไม่แน่นอน ไข่มีรูปร่างยาวเรียว มีขนาดเล็กกว่า 0.2 มิลลิเมตร และมีก้านสั้นๆ ยึดไข่ให้ติดกับผิวใบ หลังจากนั้นไข่จะเริ่มเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีน้ำตาล ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนภายใน 6-7 วัน ตัวอ่อนระยะนี้เรียกว่า “Crawler” เมื่อฟักออกมาจะเคลื่อนไหวเพียงเล็กน้อยเพื่อหาบริเวณที่เป็นแหล่งอาหาร และเมื่อหยุดนิ่งจะใช้ปากที่มีลักษณะคล้ายเข็ม (needle-like form) ดูดน้ำเลี้ยงจากพืช จากนั้นตัวอ่อนจะลอกคราบครั้งแรกเข้าสู่ระยะที่ 2 ขยายพัฒนาไม่เต็มที่ ลอกคราบครั้งที่ 2 เพื่อเข้าสู่ระยะที่ 3 ตัวอ่อนจะมีขนาด 0.4-0.8 มิลลิเมตร ลอกคราบครั้งที่ 3 ตัวอ่อนจะมีลักษณะแบนราบติดกับผิวใบ สีเหลืองอมเขียวใส สามารถมองเห็นส่วนต่างๆ



ที่อยู่ภายในได้ รวมระยะเป็นตัวอ่อนประมาณ 9 วัน หลังจากลอกคราบครั้งที่ 4 ตัวอ่อนจะมีลักษณะตัวนูนสีเหลืองเข้มขึ้น เรียกว่าระยะก่อนเข้าดักแด้ สังเกตความแตกต่างของระยะก่อนเข้าดักแด้กับระยะเข้าดักแด้โดยระยะเข้าดักแด้จะมีตารวมสีแดง เรียกว่า “red-eyed nymph” ปรากฏให้เห็นชัดเจนและตัวจะนูนมากขึ้น ระยะตัวเต็มวัย ตัวยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร ปีกปกคลุมด้วยผงสีขาว เพศเมียสามารถวางไข่ได้มากกว่า 100 ฟองและมีอายุเฉลี่ย 6.11 วัน ส่วนเพศผู้มีอายุเฉลี่ย 3.35 วัน

ลักษณะดักแด้บนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 3)

ลำตัวเรียวกลม ส่วนหัวโค้งมน ส่วนท้องเรียวยาวแหลม ขอบของลำตัวหยักเป็นคลื่นเล็กน้อย abdominal tracheal pore กว้างแบ่งขอบและส่วนลำตัวออกชัดเจน โดยปกติปล้องท้องจะปรากฏเห็นชัดเพียง 7 ปล้อง vasiform orifice มีรูปร่างค่อนข้างเป็นรูปสามเหลี่ยมเรียวยาวด้านข้างตรง ขนที่ caudal ยาวหนา และยาวกว่า vesiform orifice ขนที่ dorsum ยาวและปลายขนแหลม พบขนที่บริเวณนี้ 7 คู่ ส่วนด้านท้ายของดักแด้จะพบลักษณะเป็นร่องเล็กๆ (caudal furrow) มีขนาดใกล้เคียงกับ vasiform orifice

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา : ตารางที่ 1

ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย : พบอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณใต้ใบพืช

พืชอาหารจากการศึกษาค้างนี้ : กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หระ พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกชี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขื่น มะระจีน มะระขี้นก และผักชีฝรั่ง (ตารางที่ 2)

พืชอาหารอื่น : กุหลาบ ยาสูบ มันฝรั่ง ฝ้าย และพืชตระกูลถั่ว จากรายงานพบว่าแมลงหริ่งขาวชนิดนี้มีพืชอาหารมากกว่า 900 ชนิด อยู่ใน 63 วงศ์ (Mound & Halsey.1978)

เขตการแพร่กระจาย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน พะเยา แพร่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ลำพูน อุตรดิตถ์ นครปฐม นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท พิจิตร เพชรบูรณ์ สุโขทัย อ่างทอง อุทัยธานี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ตรวาท ปราจีนบุรี ระยอง สระแก้ว ขอนแก่น นครพนม นครราชสีมา สกลนคร สุรินทร์ ศรีสะเกษ หนองคาย อุดรธานี อุบลราชธานี กระบี่ ชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ภูเก็ต ระนอง สงขลา สุราษฎร์ธานี กาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี และราชบุรี และจากรายงานของ Mound & Halsey (1978) พบว่า แมลงหริ่งขาวชนิดนี้มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในหลายประเทศ เช่น แลบภูมิภาคพาลาเลอกติก – อังกฤษ สเปน โมร็อกโก อียิปต์ ไชปรัส อิสราเอล จอร์แดน ซาอุดีอาระเบีย อิหร่าน รัสเซีย และญี่ปุ่น แลบภูมิภาคเอธิโอเปีย – แกมเบีย ไอเวอรี กานา คาเมรูน ซูดาน เอเดน คองโก เคนยา แทนซาเนีย ยูกันดา และแองโกลา แลบภูมิภาคมาดากัสการ์- มาดากัสการ์ เมอร์ริเชียส แลบภูมิภาคโอเรียนตอล – ปากีสถาน อินเดีย จีน ไต้หวัน พม่า ศรีลังกา และไทย แลบภูมิภาคออสเตรเลีย-โอเรียนตอล – มาเลเซีย สิงคโปร์ เกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย นิวกีนิ และฟิลิปปินส์ แลบภูมิภาคออสเตรเลีย-โอเรียนตอล – ออสเตรเลีย แลบภูมิภาคแปซิฟิก- ฟิจิ แลบภูมิภาคนอร์ธทิก – สหรัฐอเมริกา แลบภูมิภาคนีโอโทรปิคอล-จาไมก้า บาบาดอส เปอโตริโก บราซิล และอาเจนตินา



หมายเหตุ : แมลงหีวขาวยาสูบจัดเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีพืชอาหารมากชนิดหนึ่ง โดยทั่วไปแมลงชนิดนี้นอกจากจะสร้างความเสียหายโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืชแล้ว นอกจากนี้ยังเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเข้าสู่พืชมากกว่า 100 ชนิด เช่น โรค Cassava mosaic (CMD) และโรค Cassava Mosaic Geminiviruses (CMGs) ที่เกิดจากพืชได้รับเชื้อไวรัส เป็นต้น

แมลงหีวขาวใยเกลียว

(Spiralling Whitefly)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Aleurodicus dispersus* Russell

ชื่อท้องถิ่น -

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (ภาพที่ 1 จ-ฉ)

แมลงหีวขาวใยเกลียววางไข่เป็นฟองเดี่ยวเรียงต่อกันเป็นวงกลมหรือเป็นเกลียววนไปมาบนใบหรือใต้ใบพืช ลักษณะไข่เรียวยาวรูปไข่ มีเส้นใยสีขาวปกคลุม แต่ละวงมีไข่ประมาณ 14-26 ฟอง ระยะไข่ใช้เวลา 7-10 วัน ระยะตัวอ่อนมี 4 วัย ตัวอ่อนวัย 1- 2 ไข่ใช้เวลา 6-9 วัน ระยะนี้เริ่มมีเส้นใยสีขาวปกคลุมแต่ไม่มาก ตัวอ่อนวัย 3 มีขนาดใหญ่ขึ้นเริ่มสร้างเส้นใยสีขาวปกคลุมตัวมากขึ้นแต่ยังสามารถมองเห็นส่วนต่างๆ ของตัวอ่อน ระยะนี้ใช้เวลา 5-13 วัน ลอกคราบครั้งที่ 3 เพื่อเข้าสู่ระยะที่ 4 ไข่ใช้เวลา 5-16 วัน หลังจากลอกคราบครั้งสุดท้าย ตัวอ่อนจะมีลักษณะตัวนูนขึ้น ระยะที่ 4 จะมีเส้นใยสีขาวคล้ายเส้นด้ายลักษณะเป็นมันวาวปกคลุมจนไม่สามารถมองเห็นส่วนต่างๆ ของลำตัวได้ ดักแต่มีความยาว 0.91 มิลลิเมตร กว้าง 0.69 มิลลิเมตร (n=20) ตัวเต็มวัย มีขนาดลำตัวยาว 2 มิลลิเมตร สีเหลืองอ่อน ปีก 2 คู่ ปกคลุมด้วยผงสีขาวคล้ายผงแป้ง

ลักษณะบนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 2)

ดักแต่ลักษณะโค้งมนเป็นรูปไข่ พบรูปประกอบจำนวน 5 คู่ มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยพบที่ส่วนหัว 1 คู่ และส่วนท้องระหว่างปล้องท้องที่ 3 ถึงปล้องท้องที่ 6 จำนวน 4 คู่ และพบรูธรรมดาดหลายๆ ขนาดกระจายอยู่ทั่วลำตัว บริเวณขอบลำตัวพบขนแข็งขนาดเล็กรอบลำตัว 12 คู่ รูเปิดที่ vasiform orifice มีรูปร่างคล้ายหัวใจโดยมีเส้นขนาดใหญ่มองเห็นได้ชัดเจน ที่ส่วนปลายลิ้นพบขนแข็ง 4 เส้น ที่ฝาปิดจะมีขนขนาดเล็ก 2 เส้น

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา ตารางที่ 1

ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย : พบอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช โดยเฉพาะบริเวณ ใต้ใบพืช

พืชอาหารจากการศึกษาครั้งนี้ : กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่ห่วย พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกชี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขึ้น มะระจีน มะระขี้เทย และ ผักชีฝรั่ง (ตารางที่ 2)

พืชอาหารอื่น : โกโก้ กล้าย กระเจี๊ยบ กระท้อน กระดังงา ขี้เหล็ก คริสมาสขาว คริสมาส ชะพลู ชมพู น้ำดอกไม้ ตดหมูตดหมา ตำลึง ถั่วฝักยาว ถั่วพู น้ำมันมะพร้าว น้อยหน่า บัว ปาล์ม ผักแพรว ฝรั่ง



พุดตาน พุทรา มะขามเทศ มันสำปะหลัง มะละกอ มะลิ เมเปิ้ล ยางพารา ลีลาวดี ละหุ่ง วัชพืช สตรังค์
หุปลาช่อน องุ่น แอปเปิ้ล อะโวคาโด และอ้อย

เขตการแพร่กระจาย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน พะเยาแพร่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ลำพูน
อุตรดิตถ์ นครปฐม นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท พิจิตร เพชรบูรณ์ สุโขทัย
อ่างทอง อุทัยธานี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ตราด ปราจีนบุรี ระยอง สระแก้ว ขอนแก่น นครพนม
นครราชสีมา สกลนคร สุรินทร์ ศรีสะเกษหนองคาย อุดรธานี อุบลราชธานี กระบี่ ชุมพร ตรัง
นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ภูเก็ต ระนอง สงขลา สุราษฎร์ธานี กาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์
เพชรบุรี และราชบุรี และจากรายงานของ Mound & Halsey (1978) พบว่ามีการแพร่ระบาดอย่าง
กว้างขวางในหลายประเทศ เช่น แลบบูมิภาคพาลาเออคติค – มาคาโลนีเซีย แลบบูมิภาคเอธิโอเปีย –
ไนจีเรีย โตโก (ในทวีปแอฟริกาทางทิศตะวันตก) ภูมิภาคตะวันออก (เอเชีย) – อินเดีย เกาะมัลดีฟ
ศรีลังกา ไทย : ทางทิศใต้ – ตะวันออก แปซิฟิก เขตทรอปิค และ อเมริกาใต้

แมลงหิวขาวในโรงเรือน (Greenhouse Whitefly)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood, 1856)

ชื่อพ้อง

Aleurodes vaporariorum Westwood, 1856, p852

Asterochiton vaporariorum (Westwood), Quaintance & Baker, 1914, p105

Trialeurodes vaporariorum (Westwood); Quaintance & Baker, 1915, pxi

Aleyrodes glacialis Bemis (misidentification in part); Bemis, 1904, p518.

Asterochiton lecanioides Maskell, 1879 (in part); synonymised by Quaintance & Baker,
1914, p105.

Trialeurodes mossopi Corbett, 1935a; synonymised by Russell, 1948, p44.

Aleurodes nicotiana Maskell, 1895; synonymised by Quaintance & Baker, 1914, p105.

Asterochiton papillifer Maskell, 1890b; synonymised by Quaintance & Baker, 1914,
p105.

Trialeurodes sesbania Corbett, 1936; synonymised by Russell, 1948, p44.

Aleyrodes sonchi Kotinsky, 1907; synonymised by Baker & Moles, 1923, p645.

Asterochiton sonchi (Kotinsky); changed combination by Quaintance & Baker, 1914,
p105.

Trialeurodes sonchi (Kotinsky); changed combination by Quaintance & Baker, 1914,
p105.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (ภาพที่ 1 ช-ฅ)



ตัวอ่อนระยะแรกมีสีเหลืองอ่อน รูปร่างแบน ลำตัวค่อนข้างเรียวยาว มีเส้นแบ่งขนาดเล็ก และสั้นรอบลำตัว เมื่อเข้าสู่ระยะดักแด่จะมีสีเข้มขึ้นและมีเส้นแบ่งรอบลำตัวเช่นกัน ขนาดดักแด่ยาว 0.98 มิลลิเมตร กว้าง 0.60 มิลลิเมตร

ลักษณะดักแด่บนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 4)

ลำตัวกลมมน มีตุ่มขนาดเล็กรูปร่างคล้ายกรวย (papillae) เรียงรอบลำตัว ขอบลำตัวเป็นรอยหยักกลมเล็ก ๆ (crenulate) พบช่องเปิดแบบขนาดใหญ่ 4 คู่ โดยพบที่ส่วนหัว 1 คู่ ออกปล้องแรก 1 คู่ และที่ปล้องท้อง 2 คู่ ขนสั้นบริเวณส่วนหัว 1 คู่ บางครั้งมีการดัดแปลงท่ออากาศส่วนนอกให้เปิดที่ขอบลำตัว ส่วนที่เป็นรอยพับของท่ออากาศเห็นไม่ชัดเจน เส้น moulting suture ไม่ได้ยาวถึงขอบ ปล้องท้องทั้ง 8 ปล้องเห็นได้ชัดเจน ปล้องท้องที่ 7 แคบตรงกลาง vasiform orifice มีรูปร่างคล้ายหัวใจ operculum ปิด lingula บางส่วน caudal furrow พบเป็นรอยย่นจาง ๆ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา : ตารางที่ 1

ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย : พบอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณใต้ใบพืช

พืชอาหารจากการศึกษาครั้งนี้ : ผักชีฝรั่ง โหระพา พริกขี้หนู มะเขือยาว และมะเขือม่วง (ตารางที่ 2)

พืชอาหารอื่น : เมเปิล ชาเขียวด ยี่โถ บอนสี ผือก สาบแร้งสาบกา หูปลาช่อน ปิ่นนกลี แอสเตอร์ เบญจมาศ ดอกกระดุม รักเร่ สาบหมา เยอบีร่า ทานตะวัน ผักกาดหอม ผักสลัด สร้อยทอง ผักกาดหอม ดาวเรือง แคนดิไลออน ผักกระชับ บานชื่น แสม เทียน แคป้า หย้างวงช้าง บัลลูนฟลาวเวอร์ กัญชา สายน้ำผึ้ง มันเทศ มอร์นิงกลอรี ผักกาด ขี้กาเทศ ฟักทอง แคนตาลูป ฟักทองน้ำเต้า แตงกวา ฟักแม้ว สุกุลมะพลับ กุหลาบพันปี หญ้ายาง ละหุ่ง ถั่วเหลือง ถั่วอัลฟัลฟา ถั่วแขก โสน ถั่วปากอ้า ไถ้ พรหมกำมะหยี่ ไฮเดรนเจีย แกลดิโอลัส ฤๅษีผสม ลาเวนเดอร์ สระระแห่น ซัลเวีย อาโวคาโด แมกโนเลีย ฮอลลีฮ็อค ฝ้าย สุกุลชบา พุดตาน ยูคาลิปตัส ฝรั่ง หว้า มะลิ มะกอก โคมญี่ปุ่น ฝั่เสื่อราตรี สุกุลกะทกรก พริกไทย มะเดื่อ พวงแก้วกุดั่น สตรอเบอร์รี่ พ룬 แพร่ กุหลาบ ผกากรอง พุดน้ำบุษย์ สุกุลส้ม ตุ่มเงินตุ้มทอง ตำเสาหนู มังกร ถุงมือจิ้งจอก ข้าวเย็น พุดสามสี พุดสีดา ลำโพง สุกุลมะเขือเทศ ยาสูบเล็ก ยาสูบ มันฝรั่ง พุฒตาล ผกากรอง เวอร์บีน่า และปรง

เขตการแพร่กระจาย : ราชบุรี นอกจากนี้ยังมีรายงานในอินโดนีเซีย มาเลเซีย และฟิลิปปินส์ อาร์เจนตินา ออสเตรเลีย ออสเตรีย บังกลาเทศ เบลเยียม เบอร์มิวดา บราซิล บัลแกเรีย แคนาดา ซิลีจีน (ฮ่องกง) โคลัมเบีย คอสตาริกา คิวบา เดนมาร์ก สาธารณรัฐโดมินิกัน เอกวาดอร์ เอลซัลวาดอร์ เอธิโอเปีย ฝรั่งเศส เยอรมนี กรีซ กวาเตอูลู กัวเตมาลา ฮาวาย ฮอนดูรัส ฮังการี อินเดีย อิหร่าน ไอร์แลนด์ อิตาลี อิสราเอล ญี่ปุ่น จาเมกา จอร์แดน เกาหลี เม็กซิโก เนเธอร์แลนด์ นิวซีแลนด์ นอร์เวย์ ปาปัวนิวกินี โปแลนด์ โปรตุเกส ปากีสถาน เปรู เปรูโตริโก เรอูนียง แอฟริกาใต้ สเปน ตุรกี ศรีลังกา สหราชอาณาจักร สหรัฐอเมริกา เวเนซุเอลา และซิมบับเว (ASCU; David & Subramaniam, 1976; Dumbleton, 1957; Evans, 2008; Martin, 1999; Martin & Lau, 2011; Tayyib *et al.*, 2014)



สถานะศัตรูพืช

T. vaporariorum เป็นศัตรูพืชที่สำคัญในพืชไร่ ไม้ผล และพืชวงศ์มะเขือ (Solanaceae) จัดเป็นศัตรูพืชสำคัญรองจากแมลงหมีขาวยาสูบ อีกทั้งแมลงหมีขาวชนิดนี้สามารถเป็นพาหะถ่ายทอดไวรัสในพืชได้ด้วย เช่น Lettuce infectious yellows virus (infectious yellows of lettuce), Tomato chlorosis virus (yellow leaf disorder of tomato) และ Tomato infectious chlorosis virus

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจชนิดของแมลงหมีขาวในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทย จำนวน 16 ชนิดพืช ได้แก่ กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่ห่วย พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกชี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขึ้น มะระจีน มะระขี้นก และผักชีฝรั่ง ใน 51 จังหวัด ได้แก่ กระบี่ กาญจนบุรี ขอนแก่น จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ชัยนาท ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ตรัง ตราดตาก นครปฐม นครพนม นครราชสีมา นครศรีธรรมราช นนทบุรี น่าน ประจวบคีรีขันธ์ปราจีนบุรี พระนครศรีอยุธยา พะเยา พังงา พัทลุง พิจิตร เพชรบุรี เพชรบูรณ์แพร่ ภูเก็ต แม่ฮ่องสอน ระนอง ระยอง ราชบุรี ลำปาง ลำพูน ศรีสะเกษ สกลนคร สงขลา สระแก้วสิงห์บุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี สุราษฎร์ธานีสุรินทร์ หนองคาย อ่างทอง อุตรธานี อุตรดิตถ์ อุทัยธานี และอุบลราชธานี จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดักแด้ จำนวน 1,605 ตัวอย่าง ได้ 3 ชนิด ได้แก่ *Bemisia tabaci* จำนวน 1,057 ตัวอย่าง *Aleurodicus disperses* จำนวน 106 ตัวอย่าง และ *Trialeurodes vaporariorum* จำนวน 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 66.85, 33.40 และ 0.75 ตามลำดับ ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อเตรียมจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐกฤต พัทพ์. 2544. เทคโนโลยีทางเลือกสำหรับ ไอ พี เอ็ม. หน้า 241-255. ใน การประชุมสัมมนาทางวิชาการการป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูอ้อยโดยวิธีผสมผสานครั้งที่ 4. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- ณัฐกฤต พัทพ์ และอนุวัฒน์ จันทรสวรรณ. 2545. เอกสารวิชาการ แมลงศัตรูอ้อยโรงงาน อ้อยเคี้ยวอ้อยคั้นน้ำ และการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 102 หน้า
- สุวัฒน์ รวยอารี. 2544. เรียนรู้การจัดการแมลงศัตรูข้าวโดยวิธีผสมผสาน กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 262 หน้า
- อรรถสิทธิ์ บุญธรรม. 2544. สถานการณ์การผลิตอ้อยและน้ำตาล.ข้าวสารสมาคมนักวิจัยอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย. 8(3)2-3



- อรนุช กองกาญจนะ และ วัชรรา ชุณหวงศ์. 2540. แมลงศัตรูข้าวโพดและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 37 หน้า
- APPPC, 1987. Insect pests of economic significance affecting major crops of the countries in Asia and the Pacific region. Technical Document No. 135. Bangkok, Thailand: Regional Office for Asia and the Pacific region (RAPA).
- Bleszynski, S. 1970. A revision of the world species of *Chilo* Zincken (Lepidoptera: Pyralidae). Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology 25: 101-195, pls 1-5.
- CABI/EPPO, 2012. *Chilo sacchariphagus*. [Distribution map]. Distribution Maps of Plant Pests, No. June. Wallingford, UK: CABI, Map 177 (1st revision).
- CIE, 1972. Distribution Maps of Plant Pests, No. 300. Wallingford, UK: CAB International
- Chundurwar RD. 1989. Sorghum stem borers in India and Southeast Asia. International Workshop on Sorghum Stemborers, ICRISAT, India. 19-25.
- Conlong DE; Goebel FR, 2006. *Trichogramma bournieri* Pintureau & Babault (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Chilo sacchariphagus* Bojer (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane in Mozambique: a new association. Annales de la Société Entomologique de France, 42(3/4):417-422.
- David H, 1986. The internode borer, *Chilo sacchariphagus indicus* (Kapur). In: David H, Easwaramoorthy S, Jayanthi R, eds. Sugarcane Entomology in India. Coimbatore, Tamil Nadu, India: Sugarcane Breeding Institute, ICAR, 121-134.
- David H & Easwaramoorthy S. 1990. Biological control of *Chilo* spp. in sugar-cane. Insect Science and its Application 11, 733-748.
- Ghahari H; Tabari M; Ostovan H; Imani S; Parvanak K, 2009. Host plants of rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) and identification of *Chilo* species in Mazandaran province, Iran. Journal of New Agricultural Science, 5 (17): Pe65 -Pe74, en10. <http://www.miau.ac.ir/SubPages/Emagazine.html>
- Guo LiangZhen; Feng RongYang; Liang EnYi; Wei DongTian; Kang FuGuo, 2000. Infestation by *Tetramoera schistaceana* Snellen, *Chilo infuscatellus* Snellen and *C. sacchariphagus* of sugarcane plants and their control by chemicals. Plant Protection, 26(1):23-25.



- Harris K.M. 1990. Biology of *Chilo* species. *Insect Science and its Application* 11, 4/5, 467-477.
- Hattori I & Siwi SS. 1986. Rice stemborers in Indonesia. *JARQ* 20, 25-30.
- Komai F., Y. Yoshiyasu, Y. Nasu and T. Saito. 2011. *A Guide to the Lepidoptera of Japan*. Tokai University, Japan. 1305 pp.
- Li Cs. 1990. Status and control of *Chilo* spp., their distribution, host range and economic importance in Oceania. *Insect Science and its application* 11, 4/5. 535-539.
- Nasu Y., T. Hirowatari, Y. Kishida 2013, *The standard of moths in Japan IV*, Gakken Education Publishing, Tokyo, 552 pp.
- Neupane FP. 1990. Status and control of *Chilo* spp. on cereal crops in southern Asia. *Insect Science and its application* 11, 501-534.
- Polaszek A, 1998. African cereal stem borers: economic importance, taxonomy, natural enemies and control. *African cereal stem borers: economic importance, taxonomy, natural enemies and control.*, x + 530 pp.; 42 pp. of ref.
- Wongsiri N. 2534. *List of insect, Mite and other Zoological Pest of Economic Plants in Thailand*. Entomology and Zoology Division, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand. 168 pp.
- Waterhouse D.F, 1993. *The Major Arthropod Pests and Weeds of Agriculture in Southeast Asia*. ACIAR Monograph No. 21. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 141 pp.
- Slamka, F. 2008. *Pyraloidea (Lepidoptera) of Europe, vol. 2, Crambinae & Schoenobiinae*. Published by author, Bratislava. 223 pp.
- Shaffer, M. E. S. Nielsen, M. Horak, 1996. *Pyraloidea*, pp. 164-199 In: Nielsen, E.S.; E. D. Edwards, T. V.Rangsi (eds.). *Checklist of the Lepidoptera of Australia*. Monographs on Australian Lepidoptera 4: 1-529.
- Uesumi Y, 1972. Some ecological notes on the sugar-cane borer, *Chilo sacchariphagus stramineellus* (Caradja)(=*Proceras[chilo]venosatus* (Walker)) in Japan. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 16(1): 53-55
- Williams JR, 1983. The sugar cane stem borer (*Chilo sacchariphagus*) in Mauritius. *Revue Agricole et Sucriere de l'île Maurice*, 62(1): 5-23
- Zincken, J. L. T. F. 1817: *Die Linneischen Tineen in ihre natürlichen Gattungen aufgelöst und beschrieben*. – *Magazin der Entomologie*, Halle 2: 24–113



ตารางที่ 1 แสดงเขตการแพร่กระจายของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวในประเทศไทย

| จังหวัด | อำเภอ | Lat | Long | <i>B.</i> <i>tabaci</i> | <i>A.</i> <i>disperses</i> | <i>T.</i> <i>vaporariorum</i> |
|------------|----------|-----------|------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| เชียงราย | เชียงแสน | 20.408557 | 99.998144 | / | / | - |
| | เมือง | 19.632623 | 98.965825 | / | / | - |
| | แม่จัน | 20.161134 | 99.868607 | / | / | - |
| เชียงใหม่ | สันทราย | 18.917546 | 99.072851 | / | / | - |
| | แมริม | 18.898965 | 98.860518 | / | / | - |
| | เชียงดาว | 19.417649 | 98.979993 | / | / | - |
| น่าน | เมือง | 18.694500 | 100.741990 | / | / | - |
| | เวียงสา | 18.544338 | 100.694311 | / | / | - |
| | เมือง | 18.803530 | 100.703155 | / | / | - |
| พะเยา | เมือง | 19.031023 | 99.950381 | / | / | - |
| | ดอกคำใต้ | 19.015773 | 100.072082 | / | / | - |
| | ปง | 19.354712 | 100.475310 | / | / | - |
| แพร่ | เด่นชัย | 18.240295 | 99.592571 | / | / | - |
| | สอง | 18.407163 | 100.207805 | / | / | - |
| | สอง | 18.415855 | 100.108833 | / | / | - |
| แม่ฮ่องสอน | เมือง | 19.578607 | 97.999687 | / | / | - |
| | ปาย | 19.296539 | 98.464105 | / | / | - |
| | สบเมย | 18.048182 | 97.917545 | / | / | - |
| ลำปาง | เมือง | 18.317324 | 99.472996 | / | / | - |
| | แม่เมาะ | 18.252443 | 99.640344 | / | / | - |
| | แม่พริก | 17.561960 | 99.004393 | / | / | - |
| ลำพูน | เมือง | 18.628437 | 99.037378 | / | / | - |
| | เมือง | 18.589291 | 99.079357 | / | / | - |
| | เมือง | 18.626317 | 99.045488 | / | / | - |
| อุตรดิตถ์ | เมือง | 17.550053 | 100.089750 | / | / | - |
| | ลับแล | 17.720093 | 99.986752 | / | / | - |
| | ท่าปลา | 17.801833 | 100.380200 | / | / | - |

ตารางที่ 1 แสดงเขตการแพร่กระจายของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวในประเทศไทย(ต่อ)

| จังหวัด | อำเภอ | Lat | Long | B. | A. | T. |
|-----------------|-----------------|------------------|------------------|---------------|------------------|---------------------|
| | | | | <i>tabaci</i> | <i>disperses</i> | <i>vaporariorum</i> |
| นครปฐม | เมือง | 13.885197 | 99.933288 | / | / | - |
| | นครชัยศรี | 13.828169 | 100.210385 | / | / | - |
| | กำแพงแสน | 13.956149 | 99.959073 | / | / | - |
| นนทบุรี | บางบัวทอง | 13.910058 | 100.389636 | / | / | - |
| | เมือง | 13.872398 | 100.467227 | / | / | - |
| | บางบัวทอง | 13.883730 | 100.436672 | / | / | - |
| พระนครศรีอยุธยา | ผักไห่ | 14.489443 | 100.311912 | / | / | - |
| | บางบาล | 14.444232 | 100.494560 | / | / | - |
| | บางปะหัน | 14.480396 | 100.508058 | / | / | - |
| สุพรรณบุรี | หนองหญ้าไซ | 14.813721 | 99.892470 | / | / | - |
| | ศรีประจันต์ | 14.634087 | 100.084729 | / | / | - |
| | อู่ทอง | 14.444997 | 99.892467 | / | / | - |
| สิงห์บุรี | เมือง | 14.938610 | 100.410990 | / | / | - |
| | เมือง | 14.889510 | 100.360178 | / | / | - |
| | อินทร์บุรี | 14.944451 | 100.361260 | / | / | - |
| ชัยนาท | หันคา | 15.094859 | 100.051389 | / | / | - |
| | เนินขาม | 15.041153 | 99.793210 | / | / | - |
| | สรรคบุรี | 15.067013 | 100.100827 | / | / | - |
| พิจิตร | โพธิ์ประทับช้าง | 16.311928 | 100.293669 | / | / | - |
| | วชิรบำรุง | 16.518746 | 100.040984 | / | / | - |
| | ตะพานหิน | 16.252241 | 100.420010 | / | / | - |
| เพชรบูรณ์ | ชนแดน | 16.059098 | 100.947436 | / | / | - |
| | วิเชียรบุรี | 15.694529 | 101.235827 | / | / | - |
| | ศรีเทพ | 15.366133 | 101.196216 | / | / | - |
| สุโขทัย | เมือง | 17.115377 | 99.701269 | / | / | - |
| | ศรีสำโรง | 17.133751 | 99.934729 | / | / | - |
| | สวรรคโลก | 17.446904 | 99.931976 | / | / | - |
| อ่างทอง | วิเศษชัยชาญ | 14.494761 | 100.307792 | / | / | - |
| | โพธิ์ทอง | 14.678167 | 100.370964 | / | / | - |
| | สามโก้ | 14°38'59.8 | 100.274832 | / | / | - |

ตารางที่ 1 แสดงเขตการแพร่กระจายของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวในประเทศไทย(ต่อ)

| จังหวัด | อำเภอ | Lat | Long | B. <i>tabaci</i> | A. <i>disperses</i> | T. <i>vaporariorum</i> |
|------------|------------|-----------|------------|---------------------|------------------------|---------------------------|
| อุทัยธานี | หนองฉาง | 15.375029 | 99.826748 | / | / | - |
| | แม่เปิน | 15.584138 | 99.457333 | / | / | - |
| | บ้านไร่ | 15.088819 | 99.495785 | / | / | - |
| จันทบุรี | นายายอาม | 12.777987 | 101.866951 | / | / | - |
| | แก่งหางแมว | 13.117541 | 101.850635 | / | / | - |
| | นายายอาม | 12.685852 | 101.939941 | / | / | - |
| ฉะเชิงเทรา | พนมสารคาม | 13.791774 | 101.424747 | / | / | - |
| | พนมสารคาม | 13.791305 | 101.425240 | / | / | - |
| | เมือง | 13.723418 | 101.066737 | / | / | - |
| ชลบุรี | พนัสนิคม | 13.515350 | 101.301706 | / | / | - |
| | บางละมุง | 12.951081 | 100.961914 | / | / | - |
| | บางละมุง | 12.950245 | 100.962043 | / | / | - |
| ตราด | เมือง | 12.378237 | 102.520809 | / | / | - |
| | ตราด | 12.167012 | 102.535933 | / | / | - |
| | เขาสมิง | 12.285216 | 102.400799 | / | / | - |
| ปราจีนบุรี | เมือง | 14.174092 | 101.435803 | / | / | - |
| | นาดี | 14.118162 | 101.820324 | / | / | - |
| | เมือง | 14.162108 | 101.445416 | / | / | - |
| ระยอง | แกลง | 12.840590 | 101.676750 | / | / | - |
| | เขาชะเมา | 12.856657 | 101.731682 | / | / | - |
| | ปลวกแดง | 12.932280 | 101.198821 | / | / | - |
| สระแก้ว | อรัญประเทศ | 13.756847 | 102.585073 | / | / | - |
| | เขาฉกรรจ์ | 13.669811 | 102.090687 | / | / | - |
| | วังน้ำเย็น | 13.501618 | 102.002796 | / | / | - |
| ขอนแก่น | กระนวน | 16.657884 | 103.063882 | / | / | - |
| | เมือง | 16.427468 | 102.813897 | / | / | - |
| | หนองเรือ | 16.470445 | 102.542366 | / | / | - |
| นครพนม | วังยาง | 17.080143 | 104.456251 | / | / | - |
| | เมือง | 17.263834 | 104.763868 | / | / | - |
| | วังยาง | 17.052246 | 104.474221 | / | / | - |
| นครราชสีมา | พระทองคำ | 15.352109 | 102.013253 | / | / | - |
| | ปากช่อง | 14.763307 | 101.447457 | / | / | - |
| | บัวใหญ่ | 15.653827 | 102.348336 | / | / | - |

ตารางที่ 1 แสดงเขตการแพร่กระจายของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวในประเทศไทย(ต่อ)

| จังหวัด | อำเภอ | Lat | Long | B. <i>tabaci</i> | A. <i>disperes</i> | T. <i>vaporariorum</i> |
|-----------------|---------------|-----------|------------|---------------------|-----------------------|---------------------------|
| สกลนคร | เมือง | 17.149173 | 104.037207 | / | / | - |
| | วานรนิวาส | 17.700794 | 103.737829 | / | / | - |
| | อากาศอำนวย | 17.575156 | 104.019354 | / | / | - |
| สุรินทร์ | เมือง | 14.833728 | 103.353466 | / | / | - |
| | เมือง | 15.019160 | 103.510020 | / | / | - |
| | โนนนาราย | 15.237900 | 103.872569 | / | / | - |
| ศรีสะเกษ | ศีลาลาด | 15.516358 | 104.090266 | / | / | - |
| | เบญจลักษ์ | 14.785983 | 104.793391 | / | / | - |
| | กันทรลักษ์ | 14.517515 | 104.542643 | / | / | - |
| หนองคาย | เมือง | 17.730746 | 102.698009 | / | / | - |
| | เมือง | 17.730818 | 102.697998 | / | / | - |
| | โพนพิสัย | 18.107340 | 103.080918 | / | / | - |
| อุดรธานี | เมือง | 17.517261 | 102.710117 | / | / | - |
| | บ้านผือ | 17.755452 | 102.405247 | / | / | - |
| | เพ็ญ | 17.655760 | 102.790743 | / | / | - |
| อุบลราชธานี | เมือง | 15.213877 | 104.809456 | / | / | - |
| | เมือง | 15.325161 | 104.787483 | / | / | - |
| | สิรินธร | 15.642788 | 104.998970 | / | / | - |
| ราชบุรี | ดำเนินสะดวก | 14.355778 | 100.549936 | / | / | / |
| | บางแพ | 13.720177 | 99.905301 | / | / | - |
| | บ้านโป่ง | 13.851321 | 99.81679 | / | / | - |
| | เมือง | 13.544948 | 99.636306 | / | / | / |
| | จอมบึง | 13.640232 | 99.445288 | / | / | - |
| เพชรบุรี | ท่ายาง | 12.827274 | 99.746484 | / | / | - |
| | เมือง | 13.084577 | 99.943735 | / | / | - |
| | บ้านลาด | 13.020019 | 99.867373 | / | / | - |
| | แก่งกระจาน | 12.902311 | 99.65528 | / | / | - |
| | หนองหญ้าปล้อง | 13.180495 | 99.606006 | / | / | - |
| ประจวบคีรีขันธ์ | หัวหิน | 12.548976 | 99.902588 | / | / | - |
| | สามร้อยยอด | 12.290886 | 99.977492 | / | / | - |

ตารางที่ 1 แสดงเขตการแพร่กระจายของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวในประเทศไทย(ต่อ)

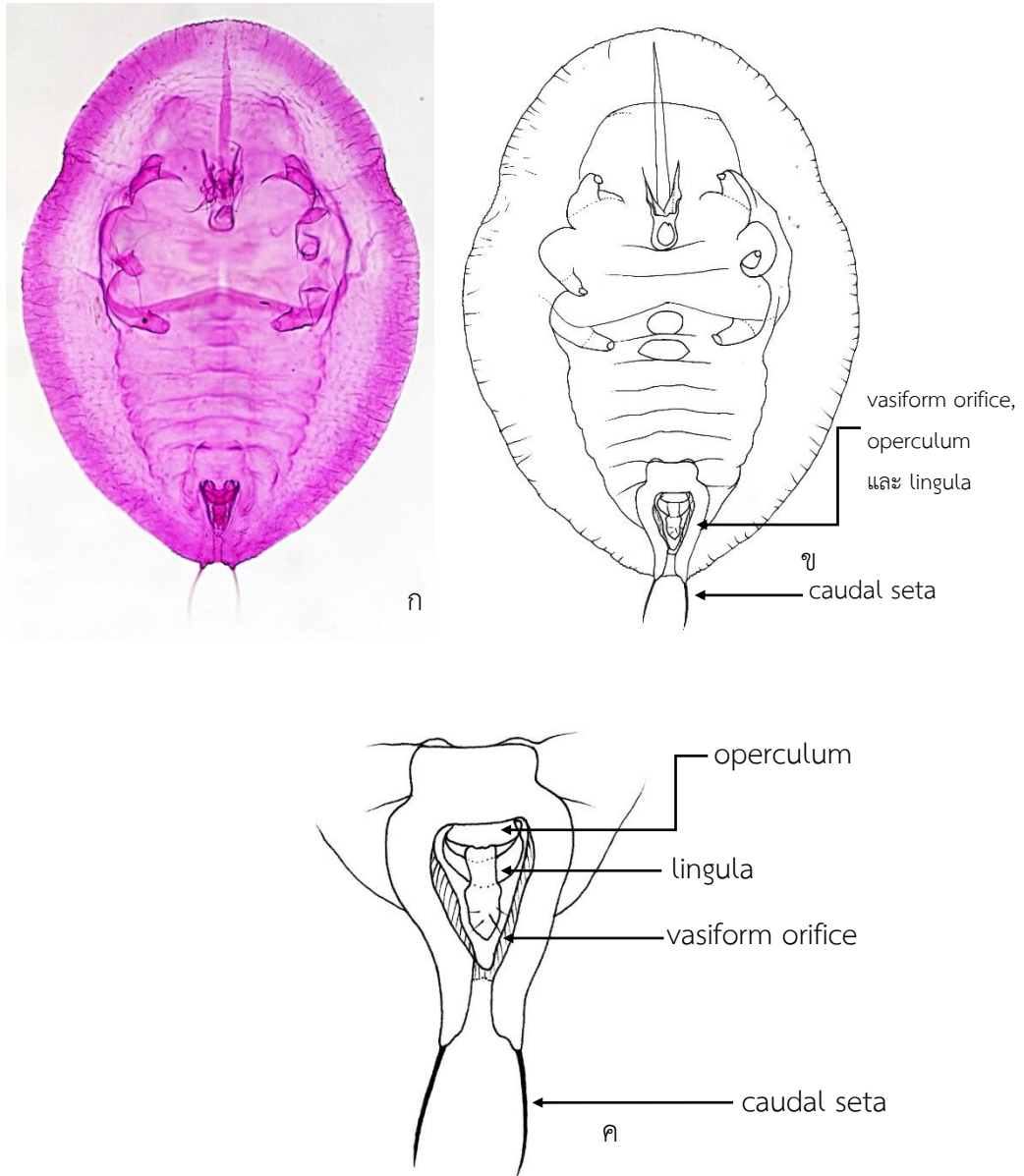
| จังหวัด | อำเภอ | Lat | Long | B. <i>tabaci</i> | A. <i>disperses</i> | T. <i>vaporariorum</i> |
|---------------|--------------|-----------|------------|---------------------|------------------------|---------------------------|
| สุราษฎร์ธานี | กุยบุรี | 12.150977 | 99.836119 | / | / | - |
| | เมือง | 11.972246 | 99.822807 | / | / | - |
| | บางสะพาน | 11.193858 | 99.363274 | / | / | - |
| | บางสะพานน้อย | 11.053871 | 99.439395 | / | / | - |
| | พนม | 8.885676 | 98.677551 | / | / | - |
| | กาญจนดิษฐ์ | 9.121728 | 99.43465 | / | / | - |
| | บ้านนาสาร | 8.883959 | 99.382752 | / | / | - |
| | ท่าชนะ | 9.674516 | 99.111519 | / | / | - |
| นครศรีธรรมราช | ไชยา | 8.584883 | 99.223688 | / | / | - |
| | ปากพนัง | 8.291952 | 100.231997 | / | / | - |
| | พรหมคีรี | 8.509863 | 99.836845 | / | / | - |
| | ลานสกา | 8.243443 | 99.57791 | / | / | - |
| | นาบอน | 9.230387 | 99.854267 | / | / | - |
| พัทลุง | ท่าศาลา | 8.67511 | 99.861092 | / | / | - |
| | เมือง | 7.605892 | 99.999358 | / | / | - |
| | ป่าพะยอม | 7.835705 | 99.860131 | / | / | - |
| | ควนขนุน | 7.739884 | 100.066234 | / | / | - |
| | ศรีนครินทร์ | 7.572423 | 99.947681 | / | / | - |
| | เขาชัยสน | 7.396766 | 100.029921 | / | / | - |

ตารางที่ 2 แสดงชนิดพืชอาหารของแมลงหิวข้าวในพืชผักสวนครัวในประเทศไทย

| พืช | <i>B. tabaci</i> | <i>A. dispersus</i> | <i>T. vaporariorum</i> |
|---------------|------------------|---------------------|------------------------|
| กะเพรา | / | / | - |
| ผักชีฝรั่ง | / | / | / |
| พริกขี้หนู | / | / | / |
| พริกขี้ฟ้า | / | / | - |
| พริกหยวก | / | / | - |
| มะเขือขาว | / | / | - |
| มะเขือจีน | / | / | - |
| มะเขือเปราะ | / | / | - |
| มะเขือม่วง | / | / | / |
| มะเขือยาว | / | / | / |
| มะเขือเหลี่ยม | / | / | - |
| มะระจีน | / | / | - |
| แมงลัก | / | / | - |
| ยี่หระ | / | / | |
| โหระพา | / | / | / |

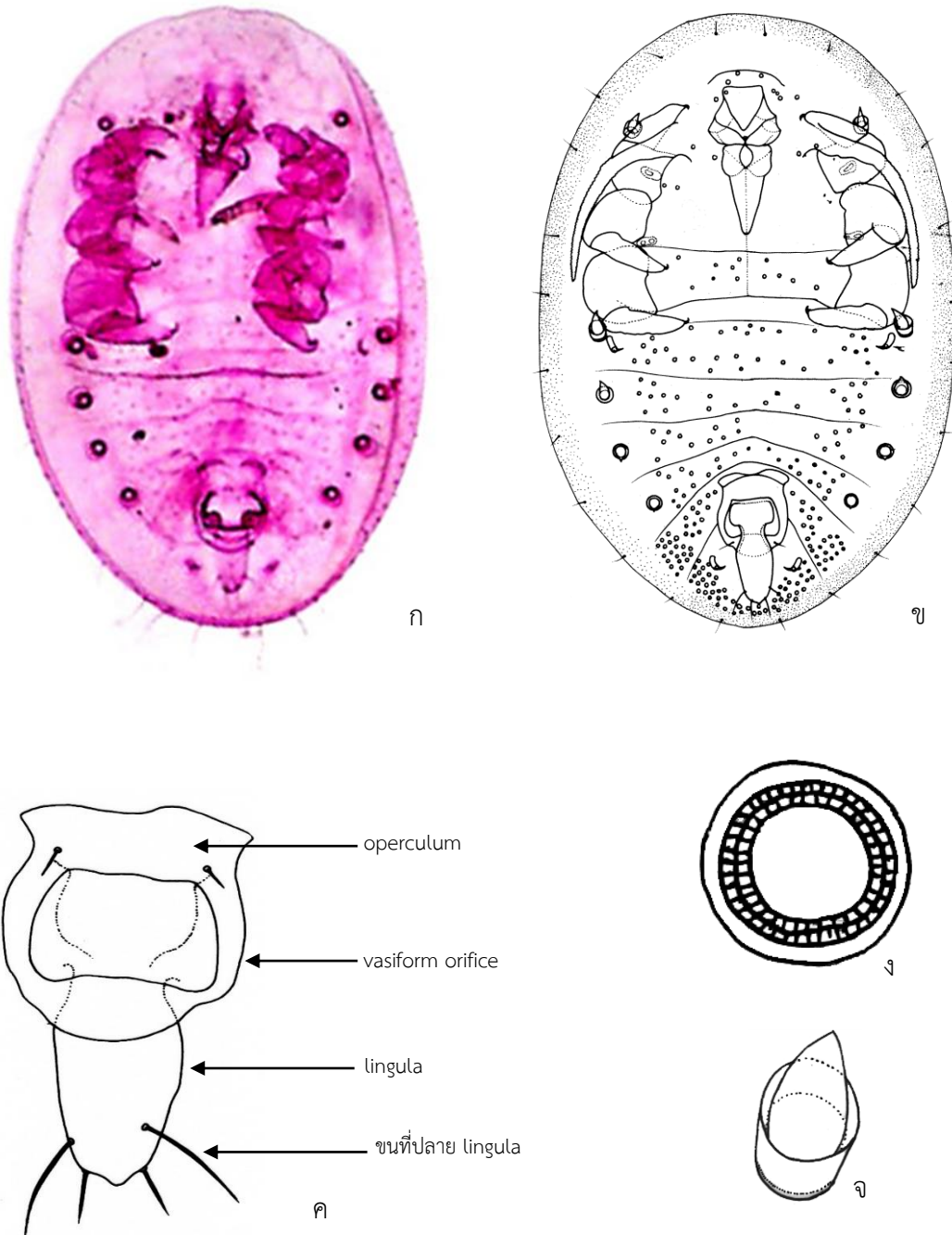


ภาพที่ 1 แมลงหิวข้าวในพืชผักสวนครัว ก-ง) แมลงหิวข้าว *Bemisia tabaci* จ-ฉ) แมลงหิวข้าว *Aleurodicus dispersus* ช-ฌ) แมลงหิวข้าว *Trialeurodes vaporariorum*

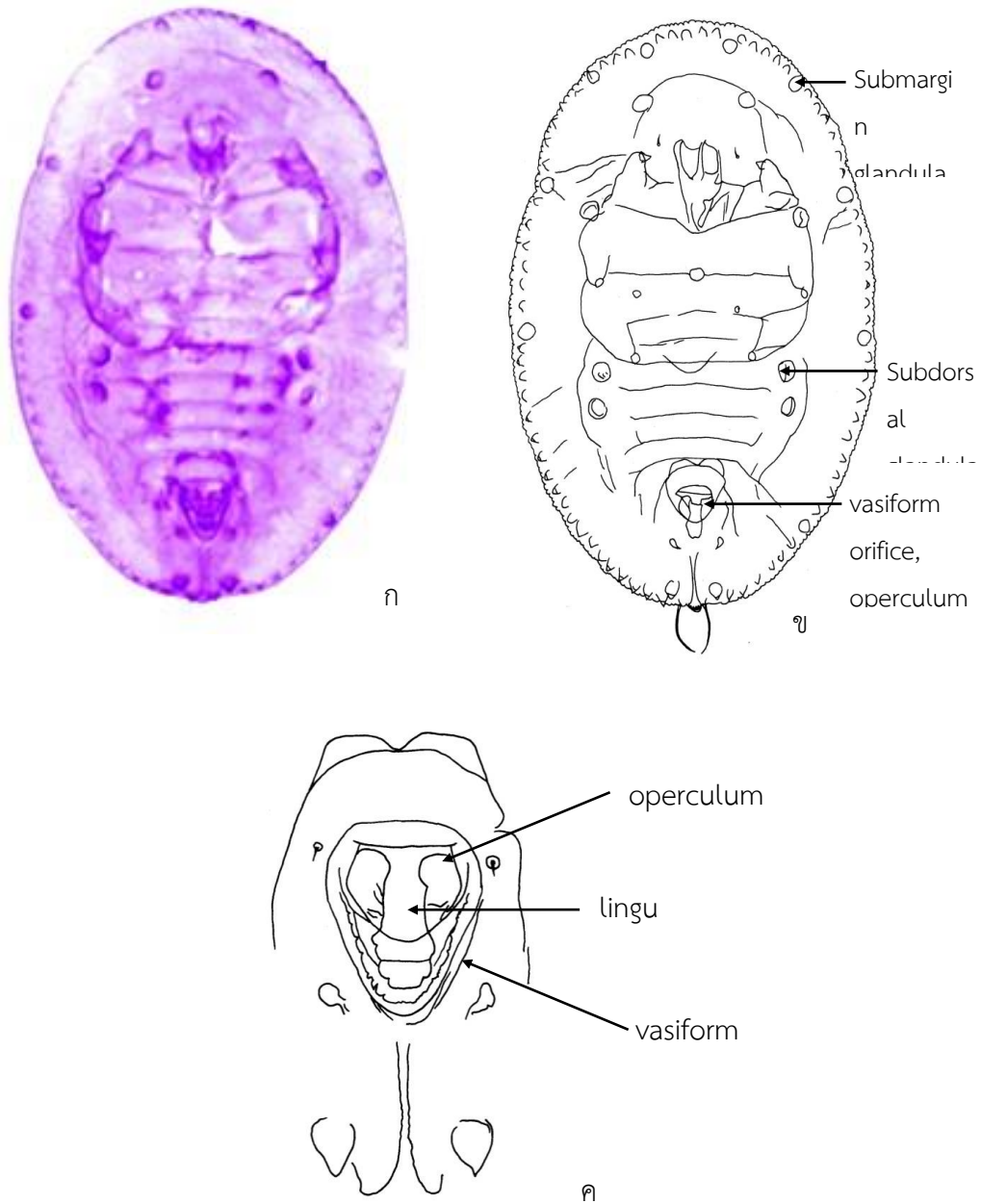


ภาพที่ 2 ลักษณะดักแด้ของแมลงหริ่ขาวยาสูบ; *Bemisia tabaci* (Gennadius)

ก) ลักษณะดักแด้บนสไลด์ ข) ลักษณะลายเส้นของดักแด้ ค) vasiform orifice, operculum



ภาพที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงหริ่ขาวไยเกลียว; *Aleurodicus disperses* Russell, 1965
 ก) ลักษณะดักแด้นสไลด์ ข) ลักษณะลายเส้นของดักแด้ ค) vasiform orifice, operculum และ lingual ง) ลักษณะของ compound pore จ) ลักษณะด้านในของ compound pore



ภาพที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาตัวเต็มของ *Trialeurodes vaporariorum* Westwood

ก) ลักษณะตัวเต็มบนสไลด์ ข) ลักษณะลายเส้นของตัวเต็ม

ค). vasiform orifice, operculum

อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Diaspidinae (Hemiptera:
Coccoidea: Diaspididae) ในประเทศไทย
Taxonomy of Armored Scale in the Subfamily Diaspidinae
(Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae) of Thailand

ชัยพร บัวมาศ ยุวรินทร์ บุญทบ จารุวัฒน์ แต่กุล สุนัดดา เขาวลิต
อาทิตย์ รักกลีกร สิทธิศิโรตม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Taxonomic study of Diaspidinae was conducted from October 2018 to September 2021. Survey and specimen collecting were carried out from various agricultural crops across Thailand. The descriptions of the species found, host plants, distribution as well as generic key to species are presented. The total of eight genera and fourteen identified species are revealed: *Aonidomytilus albus* (Cockerell), *Aulacaspis rosae* (Bouche'), *Aulacaspis tubercularis* (Newstead), *Aulacaspis vitis* (Green), *Aulacaspis* sp., *Diaspis bromeliae* (Kerner), *Lepidosaphes gloverii* (Packard), *Lepidosaphes* sp., *Parlatoria pergandii* (Comstock), *Parlatoria ziziphi* (Locau), *Pinnaspis aspidiatrae* (Signoret), *Pinnaspis strachani* (Cooley), *Pseudaulacaspis cockerelli* (Cooley) and *Unaspis citri* (Comstock) All specimens from this research collect at Insect Museum, Department of Agriculture to improve a database of insect pests in Thailand

Keywords : taxonomy, armored scale, Diaspidinae

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-17-62



รายงานผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๖๔ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ดวงค์ย่อย Diaspidinae ดำเนินการระหว่างเดือน ตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตเขตการแพร่กระจายของเพลี้ยหอยเกล็ดวงค์ย่อย Diaspidinae ที่มีอยู่ในประเทศไทย เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทั่วทุกภูมิภาคในประเทศไทย นำตัวอย่างที่รวบรวมได้ทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ด พบทั้งสิ้น 8 สกุล 14 ชนิด ได้แก่ 1) เพลี้ยหอยเกล็ดขามันสำปะหลัง *Aonidomytilus albus* (Cockerell) 2) เพลี้ยหอยเกล็ดกุหลาบ *Aulacaspis rosae* (Bouche') 3) เพลี้ยหอยเกล็ดขามะม่วง *Aulacaspis tubercularis* (Newstead) 4) เพลี้ยหอยเกล็ดชาวทุเรียน *Aulacaspis vitis* (Green) 5) เพลี้ยหอยเกล็ดชาว *Aulacaspis* sp. 6) เพลี้ยหอยเกล็ดสับปะรด *Diaspis bromeliae* (Kerner) 7) เพลี้ยหอยเกล็ดยาวส้ม *Lepidosaphes gloverii* (Packard) 8) เพลี้ยหอยเกล็ดยาว *Lepidosaphes* sp. 9) เพลี้ยหอยเกล็ดกลมส้ม *Parlatoria pergandii* (Comstock) 10) เพลี้ยหอยเกล็ดตำมะนาว *Parlatoria ziziphi* (Locau) 11) เพลี้ยหอยเกล็ดเฟิร์น *Pinnaspis aspidiatrae* (Signoret) 12) เพลี้ยหอยเกล็ดชาวฝ้าย *Pinnaspis strachani* (Cooley) 13) เพลี้ยหอยเกล็ดยี่โถ *Pseudaulacaspis cockerelli* (Cooley) 14) เพลี้ยหอยเกล็ดหิมะส้ม *Unaspis citri* (Comstock) ซึ่งได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัย พร้อมรายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดพร้อมพืชอาหาร โดยตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชในประเทศไทยต่อไป

คำหลัก : เพลี้ยหอยเกล็ด อนุกรมวิธาน วงค์ย่อย Diaspidinae

คำนำ

เพลี้ยหอยเกล็ด (armored scale) จัดอยู่ในวงศ์ Diaspididae สามารถแบ่งออกได้หลายวงศ์ย่อย รวมทั้งวงศ์ย่อย Diaspidinae ทั่วโลกมีรายงานจำนวนชนิดมากถึง 2,413 ชนิด คิดเป็น 1 ใน 3 ของจำนวนชนิดแมลงในวงศ์ใหญ่ Coccoidea (Ben-Dov *et.al*, 2014) ซึ่งแมลงกลุ่มนี้จัดเป็นแมลงปากดูดที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชได้หลายชนิด ทั้งพืชสวน และพืชไร่ โดยดูดกินน้ำเลี้ยงจากส่วนต่าง ๆ ของพืช ทำให้บริเวณที่ถูกทำลายมีลักษณะผิดปกติ เช่น ใบเหลือง หงิกงอ ลำต้นคดงอ และบางชนิดเป็นพาหะ (vector) นำโรคมานสู่พืชอาศัยที่แมลงเหล่านี้เข้าทำลายอีกด้วย เพลี้ยหอยเกล็ดในวงศ์ย่อย Diaspidinae มีรายงานในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มากกว่า 17 สกุล 170 ชนิด (Ben-Dov *et.al*, 2014) เช่น สกุล *Aulacaspis*, *Unaspis*, *Pseudaulacaspis*, *Parlatoria* และ *Pinnaspis* ซึ่งล้วนแต่เป็นศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจ ทั้งไม้ผล พืชไร่ และไม้ดอก สำหรับในประเทศไทยพบเพลี้ยหอยวงศ์ย่อย Diaspidinae เป็นศัตรูที่สำคัญในมะม่วง และพืชตระกูลส้ม (บุปผา



และ ชลิตา, 2543) และรายงานไว้เพียง 3 ชนิด ซึ่งเป็นข้อมูลที่ไม่ได้มีการปรับปรุงมากกว่า 10 ปี และในปัจจุบันสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้แมลงศัตรูพืชหลายชนิดมีความสามารถในการปรับตัว และสร้างความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจเป็นจำนวนมาก ส่งผลทำให้แมลงศัตรูพืชหลายชนิดมีความสามารถในการปรับตัว และสร้างความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้เพลี้ยหอยเกล็ดยังเป็นแมลงที่มีขนาดเล็ก สามารถติดไปกับส่วนต่างๆ ของพืชที่ใช้ในการส่งออกได้ ไม่ว่าจะเป็น ผล ใบ ส่วนต่างๆ ที่ใช้ในการขยายพันธุ์ เช่น หัว หรือเหง้า รวมทั้งส่วนที่ใช้ในการรับประทาน เป็นต้น ซึ่งจะพบว่าความเสียหายจากเพลี้ยหอยเกล็ดนั้นสามารถส่งผลกระทบต่อทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต และยังกระทบต่อมาตรการสุขอนามัยในการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรไปยังประเทศคู่ค้าต่างๆ ดังนั้นการศึกษาด้านอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อยนี้ทำให้ทราบชนิด พืชอาหาร เขตกระจาย จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช
2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ของกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง และถังรักษาความเย็น
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ (alcohol) 50-100% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) กรดแกลเซียลอะซิติก (glacial acetic acid) กรดคาร์บอลิก (carbolic acid) แอซิดฟูชซิน (acid fuchsin) โคล์ฟออย (clove oil) และ แคนาดาบัลซัม (Canada balsam) เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope กล้องถ่ายภาพ และเครื่องระบุพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS)
5. อุปกรณ์วัดภาพ ได้แก่ ปากกา rotting และกระดาษไขเขียนแบบ
6. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ Diaspididae

วิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดโดยสำรวจแหล่งปลูกพืชที่สำคัญตามภูมิภาคต่างๆ ทั่วประเทศไทย เมื่อพบตัวอย่างตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยหอยเกล็ดอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันเดือนปี ที่เก็บตัวอย่าง ชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุด จะเก็บให้ได้ตัวอย่างมากที่สุด เพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการและจัดทำสไลด์ถาวรในการจำแนกชนิดต่อไป



2. นำตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะและสีก่อนทำสไลด์ถาวร บันทึกข้อมูลตัวอย่างในแต่ละครั้งที่ทำการสำรวจอย่างละเอียดโดยจะแยกความแตกต่างจากลักษณะภายนอกเป็นข้อมูลเบื้องต้น รวมทั้งพืชอาศัย และสถานที่ แล้วดองในแอลกอฮอล์ 70%

3. คัดเลือกเพลี้ยหอยเกล็ดเพศเมีย จากข้อ 2 ไปทำสไลด์ถาวรเพื่อจำแนกชนิด โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 10-20 ตัวอย่างต่อหมายเลข

4. วิธีการทำสไลด์ถาวร

4.1 ใช้เข็มเขี่ยเปิดกระดากที่ปกคลุมลำตัวของเพลี้ยหอยเกล็ดออก เจาะบริเวณกลางส่วนท้องของตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ด นำไปแช่สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% ใช้เวลา ประมาณ 12-24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับขนาดตัวอย่าง

4.2 นำตัวอย่างจากข้อ 4.1 ย้ายลงในน้ำกลั่น กดเบา ๆ บนลำตัวด้วยเข็มตัดปลายโค้ง เพื่อให้ไข่ ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2 – 3 นาที

4.3 นำตัวอย่างจากข้อ 4.2 ย้ายลงในกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) แช่ไว้ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปย้อมสีโดยแช่ในน้ำย้อมสี ประมาณ 5-10 นาที ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง

4.4 นำตัวอย่างในข้อ 4.3 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน ยาลงในแอลกอฮอล์ 100 % แช่ไว้ 10 นาที แล้วย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.5 นำตัวอย่างในข้อ 4.4 วางบนแผ่นสไลด์แก้วหยดแคนาดาบัลซัม (Canada balsam) จำนวน 1 หยดบนตัวอย่าง จัดรูปร่างให้สวยงามไม่บิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอย่างน้อย 3 เดือน ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง

5. ตรวจจำแนกชนิดเพลี้ยหอยเกล็ดบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง สูง โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Williams and Watson (1988) และ Miller and Davidson (1990, 2005) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างสไลด์เพลี้ยหอยเกล็ดที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Diaspidinae โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ (Figure 1) ได้แก่ รูปร่างของลำตัว (Body shape) โดยส่วนหัวและอกเชื่อมติดกันระหว่างอกปล้องที่ 2 (mesothorax) และอกปล้องที่ 3 (metathorax) มีเส้นบางๆ แบ่งระหว่าง ส่วนหัวและอกปล้องที่ 2 รวมกันเรียกว่า prosoma ส่วนปล้องที่เหลือคือ postsoma ส่วนท้องปล้องที่ 1- 3 เรียก free abdominal segment ส่วนท้องปล้องที่ 4 – 8 หรือจนถึงปล้องสุดท้ายเรียก pygidium ซึ่งจะมีลักษณะแข็งไม่สามารถแบ่งปล้องได้อย่างชัดเจน รูปร่างของเพลี้ยหอยเกล็ดมีหลากหลายรูปแบบ เช่น รูปยาวรี (elongate) รูปไข่ (oval) รูปวงกลม (circular) รูปไต (reinform) รูปลูกแพร์ (pyriform)



ตา (Eyes) ส่วนใหญ่เป็นเพียงจุด (spot) บางชนิดโค้งงอ (dome) ขึ้นมา บางชนิดอาจไม่ปรากฏตาหรือปรากฏเป็นสันนูน (spine) เท่านั้น

หนวด (Antennae) เป็นติ่ง (spure) หรือแท่ง (tubercle) ยื่นออกมาจากผนังลำตัว มีขน (setae) อย่างน้อย 1 เส้น แล้วแต่ชนิด

รูหายใจ (Spiracles) มี 2 คู่ พบบนด้านท้อง (ventral side) ของส่วนอก มีลักษณะเป็นท่อแข็ง (sclerotized tube) โดยคู่ที่ 1 หรือ anterior spiracle อยู่บริเวณ mesothorax และคู่ที่ 2 หรือ posterior spiracle อยู่บริเวณ metathorax

Pygidium คือ ส่วนท้องปล้องที่ 4 – 8 (ปล้องสุดท้าย) รวมกันมีลักษณะเป็นแผ่นแข็งกว่าส่วนอื่นๆ มีรูปทรงและลวดลายชัดเจน เป็นส่วนสำคัญในการจำแนกชนิด และเป็นที่ตั้งของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ lobes, perivulvar pores, paraphyses, microducts, macroducts, gland spines, anal opening (anus) และ vulvar

ลอนแข็ง (lobes) เป็นแผ่นแข็งที่อยู่บริเวณปลายของ pygidium มักพบจำนวน 3 - 4 คู่ ได้แก่ ลอนแข็งคู่ที่ 1 หรือคู่กลาง (L1/median lobe) มักมีขนาดใหญ่ที่สุด ลอนแข็งคู่ที่ 2 (L2/second lobes) ลอนแข็งคู่ที่ 3 (L3/third lobes) ลอนแข็งคู่ที่ 4 (L4/fourth lobes) ซึ่งจะมีขนาดลดหลั่นลงมาตามลำดับจากคู่ที่ 1 จนถึงคู่ที่ 4 โดยระหว่างฐานของคู่ที่ 1 มีติ่งค่อนข้างยาวยื่นเข้าไประหว่างฐาน (yoked median lobes) ทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 ทั้ง 2 อันชิดกัน แต่ในบางชนิดจะไม่มีติ่งยื่นเข้าไป (not yoked median lobes) บริเวณฐานทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 ทั้ง 2 อันแยกห่างกันหรือกางออกจากกัน เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิด

ต่อมหนาม (Gland spines) คล้ายแท่งหนาม โดยเป็นท่อปลายเปิดยื่นออกมาจากผนังลำตัว มักมี microduct อยู่ด้านในอย่างน้อย 1 ท่อ ต่อมหนามที่พบบริเวณขอบด้านนอก (marginal) ของ pygidium มักมีท่อขนาดเล็กที่เรียวยาว (long microduct) หากพบบริเวณส่วนท้อง ส่วนอกหรือบริเวณขอบด้านใน (submarginal) มักเป็นท่อขนาดสั้นและเล็ก (short microduct) กว่าบริเวณ pygidium

ท่อ (Ducts) เป็นท่อแบบต่างๆ ที่เชื่อมต่อกับต่อมผลิตไข (wax gland) ทำหน้าที่ในการขับไข (wax) ออกจากร่างกายเพื่อนำมาสร้างแผ่นปกคลุมลำตัว (scale) มีหลายลักษณะ ได้แก่ microducts มี 2 ลักษณะ คือ long microduct และ short microduct สามารถพบได้ทั่วทั้งส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องของเพลี้ยหอยเกล็ดปรากฏทั้งด้านหลัง (dorsum) และด้านล่าง (venter) macroducts มักเห็นเป็นทรงกระบอกขนาดใหญ่ และด้านในสุดของท่อจะมีแผ่นแข็งคล้ายวงแหวนล้อมรอบ ซึ่งมี 2 ลักษณะ คือ แบบ 1 แถบ (1 - barred macroduct /single bar) และ แบบ 2 แถบ (2 - barred macroduct /pararell bar) นอกจากนี้ยังมีลักษณะคล้ายฝาปิด (duct orifice) ที่มีลักษณะเป็นท่อแข็งมักพบเป็นแนวคู่ขนาน หรือเป็นมุมสามเหลี่ยมกับขอบผนังลำตัว

รูเปิด (Disc pores) ทำหน้าที่ในการขับไข (wax) ออกจากร่างกายกระจายอยู่ตามส่วนต่างๆ ซึ่งมี ช่องเล็กๆ อยู่ด้านใน (loculi) แบบ 3 ช่อง และ 5 ช่อง พบในตำแหน่งที่แตกต่างกันไป ได้แก่ รอบรูหายใจ (perispiracular pores) และ รอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ (perivulvar pore)



แผ่นแข็ง (Plates) บริเวณขอบด้านนอกของ pygidium มีท่อขนาดเล็กอยู่ด้านใน พบระหว่างลอนปลายส่วนท้องคู่ที่ 1 กับ คู่ที่ 2 หรือ คู่ที่ 3 หรือคู่ที่ 4 มีลักษณะการแตกของปลายและขอบแผ่นแข็งหลายรูปแบบ ได้แก่ simple, bifurcate, tri furcate ,fimbriated และ fringed

เส้นขน (Setae) พบกระจายทั่วทั้งลำตัว มีหลายขนาดขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่พบ เช่น หากพบบริเวณหนวดมีขนาดใหญ่ และมักพบตามขอบของผนังลำตัวและ ปล้องท้องแต่ละปล้อง รวมทั้งบริเวณระหว่างลอนคู่ที่ 1 อีกด้วย

Paraphyses ลักษณะเป็นก้อนแข็งพบบริเวณขอบด้านข้างของลอนแต่ละคู่ซึ่งมีรูปร่าง ขนาดที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด ได้แก่ medial paraphysis, lateral paraphysis และ interlobular paraphyses

Cicatrices หรือ sclerotized bosses ลักษณะคล้ายแผลเป็นนูน หรือจุดนูนที่เห็นได้ชัดเจน พบเฉพาะผนังลำตัวด้านหลัง

ช่องเปิดส่วนท้ายระบบทางเดินอาหาร (Anus) เป็นรูเปิดแบบธรรมดา มีขนาดและตำแหน่งที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด โดยตั้งอยู่แนวกึ่งกลางตามยาวของลำตัว บริเวณ pygidium

ช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ (Vulva) ลักษณะเป็นรอยแตกตามขวาง หรือเป็นร่อง มักพบรูเปิดล้อมรอบ เป็นกลุ่มๆ เรียกว่า perivulvar pore

6. การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยหอยเกล็ดเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

7. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยหอยในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำไปเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล และจัดทำหมายเลขประจำตัวอย่างเพลี้ยหอยแต่ละสไลด์เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

เวลาสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2561 ถึง เดือนกันยายน 2564

- สถานที่
1. แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคตะวันตกและภาคใต้
 2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Diaspidinae การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่จังหวัด กรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสงคราม ลพบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท พิจิตร นครสวรรค์ อุทัยธานี กำแพงเพชร สระบุรี ภาค



ตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น มหาสารคาม อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ ยโสธร และอุบลราชธานี ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี และ ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี ตาก เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และ ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร และนครศรีธรรมราช นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่ม ศึกษาศาสตร์และสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ด พบทั้งสิ้น 8 สกุล 14 ชนิด ได้แก่ 1) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมันสำปะหลัง *Aonidomytilus albus* (Cockerell) 2) เพลี้ยหอยเกล็ดกุหลาบ *Aulacaspis rosae* (Bouche) 3) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมะม่วง *Aulacaspis tubercularis* (Newstead) 4) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวทุเรียน *Aulacaspis vitis* (Green) 5) เพลี้ยหอยเกล็ดขาว *Aulacaspis* sp. 6) เพลี้ยหอยเกล็ดสับปะรด *Diaspis bromeliae* (Kerner) 7) เพลี้ยหอยเกล็ดยาวส้ม *Lepidosaphes gloverii* (Packard) 8) เพลี้ยหอยเกล็ดยาว *Lepidosaphes* sp. 9) เพลี้ยหอยเกล็ดกลมส้ม *Parlatoria pergandii* (Comstock) 10) เพลี้ยหอย เกล็ดดำมะนาว *Parlatoria ziziphi* (Locau) 11) เพลี้ยหอยเกล็ดเฟิร์น *Pinnaspis aspidiatrae* (Signoret) 12) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวฝ้าย *Pinnaspis strachani* (Cooley) 13) เพลี้ยหอยเกล็ดดียว *Pseudaulacaspis cockerelli* (Cooley) 14) เพลี้ยหอยเกล็ดหิมะส้ม *Unaspis citri* (Comstock) ซึ่งได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัย (key) และรายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดทั้ง 14 ชนิด ดังต่อไปนี้

แนวทางการวินิจฉัยวงศ์ย่อยของเพลี้ยหอยเกล็ดในวงศ์ Diaspididae

- Macroducts one - barred; plates present; gland tubercles rarely or never present.....**Aspidiotinae**
- Macroducts two - barred; plates rarely or never present; gland spines normally present..... **Diaspidinae**

รายละเอียดของวงศ์ย่อย Diaspidinae

ลักษณะในธรรมชาติ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวมีรูปร่างที่หลากหลาย เช่น ยาวรี กลม หรือ ทรงกระบอก มีหลากหลายสี เช่น สีเหลือง สีน้ำตาล สีน้ำตาลเข้ม สีดำ คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 อยู่ ขอบด้านบน และ คราบของตัวอ่อนวัยที่ 2 มักอยู่ชิดขอบด้านล่างของคราบวัยที่ 1 และตัวอ่อนวัยที่ 3 และระยะตัวเต็มวัย สร้างแผ่นปกคลุมเชื่อมต่อกับขอบด้านล่างของคราบตัวอ่อนวัยที่ 2 โดยแผ่นปกคลุมลำตัวของเพลี้ยหอยในวงศ์ย่อยนี้ คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 ไม่อยู่ในตำแหน่งกึ่งกลาง **เพศผู้** แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรี ขนาดเล็กกว่าเพศเมียอย่างชัดเจน สีของแผ่นปกคลุมมักมีสี อ่อนกว่าเพศเมียหรือมีลักษณะคล้ายแป้งสีขาว คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 มักอยู่ขอบด้านบนของแผ่น ปกคลุมลำตัวและเชื่อมต่อกับแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้ เมื่อถึง ระยะตัวเต็มวัยมักมีปีก จำนวน 1 คู่ แต่ในบางชนิดอาจไม่มีปีก



ลักษณะทางอนุกรมวิธาน : ตัวเต็มวัยเพศเมียมีรูปร่างหลากหลาย เช่น รูปไข่ รูปทรงยาวรี รูปทรงกระบอก รูปทรงกลม pygidium ประกอบด้วย macroduct แบบ 2 แถบ มีลอนแข็งที่เห็นได้ชัดเจน จำนวน 4 คู่ (L1, L2, L3, L4) แต่ในบางชนิดคู่ที่ 4 มีขนาดเล็กมากหรืออาจไม่ปรากฏ บางชนิดอาจมีเพียงคู่ที่ 1 เท่านั้น ลอนแข็งแต่ละคู่มีลักษณะเป็นลอนขนาดเล็ก มากกว่า 2 อันขึ้นไป ยกเว้นในคู่ที่ 1 จะเห็นเป็นเพียง 1 อันเท่านั้น โดยปกติระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่มักมีต่อมหนาม และยังพบต่อมหนามบริเวณขอบนอกของผนังลำตัวส่วนท้องอีกด้วย รูหายใจคู่บน หรือคู่ที่ 1 มีรูเปิดล้อมรอบ หากปรากฏหนวดมักพบเส้นขนจำนวนมากกว่า 2 เส้น ช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์มีรูเปิดล้อมรอบซึ่งมีจำนวนกลุ่มแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด (Figure 1)

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Diaspidinae

1. Median lobes yoked basally, body shape almost always elongate.....2
 - Median lobes not yoked basally, body shape variable.....8
2. With a pair of setae between the median lobes.....*Pseudaulacaspis cockerelli* (Cooley)
 - Without a pair of setae between the median lobes.....3
3. Prosoma swollen, more or less quadrate, wider than abdomen; pygidial lobes forming a distinct notch at apex; gland spines and macroducts absent anterior to the first abdomen.....4
 - Prosoma not swollen, body tubinate or fusiform elongate quadrate, wider than abdomen; pygidial lobes forming a distinct notch at apex; gland spines and macroducts present anterior to the first abdomen.....7
4. Enlarged prosoma rounded, not angular or quadrate; submedian macroducts on segment 6 of pygidium may number up 7 on each side.....*Aulacaspis* sp.
 - Enlarged prosoma angular or quadrate or irregular; submedian macroducts on segment 6 of pygidium numbering not more than 4 on each side.....5
5. Pygidial segment 6 with 4 rows of submedian macroducts..... *Aulacaspis rosae* (Bouché)
 - Pygidial segment 6 with 1 or 2 rows of submedian macroducts.....6
6. Enlarge prosoma angular quadrate; widest at lateral tubercles, almost level with anterior spiracles; posterior spiracles usually associated with spiracular pores.....*Aulacaspis tubercularis* Newstead
 - Enlarge prosoma variable or irregular in shape, widest at mesothorax; prominent lateral tubercles sometimes present; posterior spiracles usually not associated with spiracular pores*Aulacaspis vitis* (Green)



7. Dorsal preanal scleroses present; second lobes (L2) small, usually shorter than median lobes (L1).....*Pinnaspis aspidiatrae* (Signoret)
- Dorsal preanal scleroses absent; second lobes (L2) usually as long as median lobes (L1).....*Pinnaspis strachani* (Cooley)
8. Marginal pygidial macroducts with the axis of their orifices set transversely, with each orifice surrounded by a transversely oval sclerotized rim.....10
- Marginal pygidial macroducts with the axis of their orifices set longitudinally or diagonally, with each orifice surrounded by a sclerotized rim at similar angle11
10. Marginal of prosoma bearing a conspicuous, membranous ear-like projection on either side.....*Parlatoria ziziphi* (Lucas)
- Marginal of prosoma without conspicuous, membranous ear-like projection on either side..... *Parlatoria pergandii* Comstock
11. Gland spine absent between median lobe.....12
- Gland spine present between median lobe.....13
12. Body turbinate, common species with ears-likes protuberance on head*Diaspis bromeliae* (Kerner)
- Body long and slender; head without ears-likes protuberance on head.....
.....*Unaspis citri* (Comstock)
13. Perivulvar pores absent.....*Aonidomytilus albus* (Cockerell)
- Perivulvar pores present.....14
14. Bosses present on dorsum..... *Lepidosaphes* sp.
- Bosses absent from dorsum.....*Lepidosaphes gloverii* (Packard)

รายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดแต่ละชนิด

1. Genus *Aonidomytilus*, Leonardi, 1903

Aonidomytilus Leonardi, 1903: 102. Type species: *Mytilaspis albus* concolor Cockerell by monotypy. accepted valid name

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี ความกว้างของ prosoma และ pygidium ใกล้เคียงกัน หนวดเป็นดิ่งมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 และอาจพบหรือไม่พบในคู่ที่ 2 ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 เห็นได้ชัดเจน ระหว่างฐานคู่ที่ 1 ไม่มีดิ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนแข็ง กางออกและมีต่อมหนาม 1 คู่บริเวณฐานของลอนแข็งคู่ที่ 1 ส่วนคู่ที่ 2 มักมี



ขนาดเล็กกว่าคู่ที่ 1 และคู่ที่ 3 อาจพบหรือไม่พบ มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ มีต่อมหนามจำนวนมากบริเวณลอนด้านข้างของส่วนท้องแต่ละปล้อง ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารอยู่ชิดด้านบนของ pygidium ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ขนาดใหญ่เรียงตัวแต่ละด้าน โดยเฉพาะบริเวณขอบลำตัว ไม่มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์

1.1 *Aonidomytilus albus* (Cockerell, 1893)

(Figure 2 และ 16A)

ชื่อพ้อง : *Mytilaspis albus* Cockerell, 1893

Coccomytilus albus (Cockerell, 1893)

Lepidosaphes alba (Cockerell, 1897)

Lepidosaphes cockerelliana Kirkaldy, 1904

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมันสำปะหลัง (topioca scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างเรียวยาว ลักษณะสีขาวขุ่น คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนมีสีน้ำตาล เพศผู้ แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างรีขนาดเล็กกว่าเพศเมียอย่างชัดเจน คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 สีน้ำตาลอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี ความกว้างของ prosoma และ pygidium ไกล่เคียงกัน หนวดเป็นติ่งมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 และอาจพบหรือไม่พบในคู่ที่ 2 ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 เห็นได้ชัดเจน ลอนแข็งคู่ที่ 1 เห็นได้ชัดเจน ระหว่างฐานคู่ที่ 1 ไม่มีติ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนแข็ง กางออกและมีต่อมหนาม 1 คู่บริเวณฐานของลอนแข็งคู่ที่ 1 ส่วนคู่ที่ 2 มีขนาดเล็กกว่าคู่ที่ 1 และคู่ที่ 3 มีขนาดเล็กมากเหมือนจุดแข็งเท่านั้น มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ มีต่อมหนามจำนวนมากบริเวณลอนด้านข้างของส่วนท้องแต่ละปล้อง ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารอยู่ชิดด้านบนของ pygidium ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ขนาดใหญ่เรียงตัวแต่ละด้านโดยเฉพาะบริเวณขอบลำตัว 6 - 7 ท่อ ไม่มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ บริเวณขอบของ pygidium ปรากฏต่อมหนาม 2 - 3 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ Euphorbiaceae ได้แก่ มันสำปะหลัง พบในใบและลำต้น

เขตการแพร่กระจาย : ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพฯ นครสวรรค์ อุทัยธานี กำแพงเพชร สระบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น มหาสารคาม อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี เชียงราย พิชณุโลก ฉะเชิงเทรา ระยอง ชลบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี ตาก และเพชรบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1



2. Genus *Aulacaspis* Cockerell 1893

Aulacaspis Cockerell 1893c: 180. Type species: *Aspidiotus rosae* Bouché by subsequent designation Newste1901b:168. accepted valid name.

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างทรงกระบอกท้ายเรียวเล็ก หนวดเป็นดิ่งมีขนค่อนข้างยาว prosoma ขยายคล้ายสี่เหลี่ยมมีขนาดใหญ่กว่าส่วนอื่นๆ อย่างชัดเจน รูหยาบใจคู่ที่ 1 มีรูเปิดอยู่รอบๆ จำนวนมาก ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 – 4 เห็นได้ชัดเจน ลอนแข็งแต่ละอันมีขนาดเล็กจำนวนมากกว่า 1 อัน ยกเว้นคู่ที่ 1 จะมีเพียง 1 อัน ระหว่างฐานคู่ที่ 1 ไม่มีดิ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 กางออก มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ แต่ไม่มีต่อมหนามบริเวณลอนด้านข้างของส่วนท้อง ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้กับตำแหน่งของช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ที่มีขนาดค่อนข้างสั้นเรียงตัวแต่ละด้าน มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

2.1 *Aulacaspis rosae* (Bouché, 1833)

(Figure 3 และ 16B)

ชื่อพ้อง : *Coccus rosae* Virey, 1821

Aspidiotus rosae Bouché, 1833

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขาวกุหลาบ (rose scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างกลม สีขาวขุ่น คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและมีสีน้ำตาลเข้ม โดยคราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 มักยื่นเลยแผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยอย่างชัดเจน เพศผู้ แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กกว่าเพศเมียอย่างชัดเจน ผนังลำตัวเป็นแปงสีขาว คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 มักมีสีน้ำตาลและอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างทรงกระบอกท้ายเรียวเล็ก หนวดเป็นดิ่งมีขนค่อนข้างยาว prosoma ขยายคล้ายสี่เหลี่ยมมีขนาดใหญ่กว่าส่วนอื่นๆ อย่างชัดเจน รูหยาบใจคู่ที่ 1 มีรูเปิดอยู่รอบๆ จำนวนมาก ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 – 4 เห็นได้ชัดเจน ลอนแข็งแต่ละอันมีลอนขนาดเล็กมากกว่า 1 อัน ยกเว้นคู่ที่ 1 จะมีเพียง 1 อัน และมีขนาดใหญ่เป็นสองเท่าของลอนคู่อื่นๆ ระหว่างฐานคู่ที่ 1 ไม่มีดิ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 กางออก มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ แต่ไม่มีต่อมหนามบริเวณลอนด้านข้างของส่วนท้อง ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้กับตำแหน่งของช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts สั้นๆ ใกล้บริเวณกึ่งกลาง



ของทั้งสองฝั่งของ pygidium ในปล้องที่ 6 มีจำนวนไม่เกิน 4 แถว มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ Rosaceae ได้แก่ กุหลาบ (กิ่งและลำต้น) และวงศ์ Phyllanthaceae ได้แก่ มะเเม่า (ใบ) (ชมัยพรและคณะ, 2564)

เขตการแพร่กระจาย : ได้แก่ จังหวัดสระบุรี และขอนแก่น

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

2.2 *Aulacaspis tubercularis* Newstead, 1906

(Figure 4 และ 16C)

ชื่อพ้อง : *Aulacaspis (Diaspis) tubercularis* Newstead, 1906

Aulacaspis cinnamomi Newstead, 1908

Diaspis (Aulacaspis) cinnamomi mangiferae Newstead, 1911

Aulacaspis cinnamomi mangiferae (Newstead, 1911)

Diaspis cinnamomi-mangiferae Newstead, 1911

Diaspis mangiferae Newstead, 1911

Diaspis (Aulacaspis) cinnamomi (Newstead, 1908)

Diaspis (Aulacaspis) tubercularis (Newstead, 1906)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมะม่วง (white mango scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างกลม สีขาวขุ่น คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวแต่ไม่เลยแผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัย และมีสีดำ เพศผู้ แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กกว่าเพศเมียอย่างชัดเจน ผนังลำตัวเป็นแป้งสีขาว คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 สีน้ำตาลหรือน้ำตาลเข้มมักอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัว และเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างทรงกระบอกท้ายเรียวยาวเล็ก หนวดเป็นดิ่งมีขนค่อนข้างยาว prosoma ขยายคล้ายสี่เหลี่ยมมุมฉากมีขนาดใหญ่กว่าส่วนอื่นๆ อย่างชัดเจน รูหายใจคู่ที่ 1 และ 2 มีรูเปิดอยู่รอบๆ ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 - 3 เห็นได้ชัดเจน ส่วนคู่ที่ 4 มีขนาดเล็กมาก ลอนแข็งแต่ละอันมีขนาดเล็กและมีมากกว่า 1 อัน ยกเว้นคู่ที่ 1 จะมีเพียง 1 อันและมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ระหว่างฐานคู่ที่ 1 ไม่มีดิ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 กางออก มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ แต่ไม่มีต่อมหนามบริเวณลอนด้านข้างของส่วนท้อง ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้กับตำแหน่งของช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts สั้นๆ ใกล้บริเวณกึ่งกลางของทั้งสองฝั่งของ pygidium ในปล้องที่ 6 มีจำนวนไม่เกิน 1 - 2 แถว มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม



พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ วงศ์ Anacardiaceae ได้แก่ มะม่วง (ใบ กิ่งและลำต้น) วงศ์ Mulvaceae ได้แก่ ทุเรียน (ใบ) และวงศ์ Meliaceae ได้แก่ ลองกอง (ใบ) หากมีการระบาดอย่างรุนแรงอาจทำให้ต้นพืชแห้งตายได้ (ชมัยพรและคณะ, 2564)

เขตการแพร่กระจาย : พบทุกจังหวัดในประเทศไทย

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

2.3 *Aulacaspis vitis* (Green, 1896)

(Figure 5 และ 16D)

ชื่อพ้อง : *Chionaspis vitis* Green, 1896

Trichomytilus vitis (Green, 1896)

Phenacaspis vitis (Green, 1896)

Poliaspis vitis (Green, 1896)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขาวทุเรียน (white scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างกลม ลักษณะสีขาวขุ่น ค่อนข้างโปร่งใส คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวมีสีน้ำตาลอ่อน เพศผู้ แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กกว่าเพศเมียอย่างชัดเจน ผนังลำตัวเป็นแข็งสีขาว คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 สีน้ำตาลมักอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี หนวดเป็นตีม้วนค่อนข้างยาว prosoma รูปทรงไม่แน่นอน แต่มีขนาดใหญ่กว่าส่วนอื่นๆ ไม่มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 และ 2 ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 - 3 เห็นได้ชัดเจน ส่วนคู่ที่ 4 มีขนาดเล็กมาก หรือไม่ปรากฏ ลอนแข็งแต่ละอันมีลอนขนาดเล็กจำนวน 2 - 3 อัน ยกเว้นคู่ที่ 1 มีเพียง 1 อัน ระหว่างฐานคู่ที่ 1 ไม่มีติ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 กางออก มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ แต่ไม่มีต่อมหนามบริเวณลอนด้านข้างของส่วนท้อง ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่า ลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้กับตำแหน่งของช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts สั้นๆ ใกล้บริเวณกึ่งกลางของทั้งสองฝั่งของ pygidium ในปล้องที่ 6 มีจำนวนไม่เกิน 1-2 แถว บางครั้งพบตุ่มด้านข้างบริเวณส่วนหัว มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ Mulvaceae ได้แก่ ทุเรียน ส่วนใบและบริเวณกิ่ง

เขตเขตการแพร่กระจาย : จันทบุรี ระยอง ประจวบคีรีขันธ์ และชุมพร

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1



2.4 *Aulacaspis* sp.

(Figure 6 และ 16E)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขาว (white scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างกลม สีขาวขุ่น คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและมีสีน้ำตาลเข้ม โดยคราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 มักยื่นเลยแผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยอย่างชัดเจน เพศผู้ แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กกว่าเพศเมียอย่างชัดเจน ผนังลำตัวเป็นแปงสีขาว คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 มักมีสีน้ำตาลและอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี หนวดเป็นติ่งมีขนค่อนข้างยาว prosoma ค่อนข้างกลม แต่มีขนาดใหญ่กว่าส่วนอื่นๆ ไม่มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 และ 2 ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 - 3 เห็นได้ชัดเจน ส่วนคู่ที่ 4 มีขนาดเล็กมาก หรือไม่ปรากฏ ลอนแข็งแต่ละอันมีลอนขนาดเล็กจำนวน 2 - 3 อัน ยกเว้นคู่ที่ 1 มีเพียง 1 อัน ระหว่างฐานคู่ที่ 1 ไม่มีติ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 กางออก มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ แต่ไม่มีต่อมหนามบริเวณลอนด้านข้างของส่วนท้อง ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้กับตำแหน่งของช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts สั้นๆ ใกล้บริเวณกึ่งกลางของทั้งสองฝั่งของ pygidium ในปล้องที่ 6 มีจำนวนมากว่า 7 แถว บางครั้งพบตุ่มด้านข้างบริเวณส่วนหัว มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์จำนวน 5 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนใบของต้นอะโวคาโด

เขตการแพร่กระจาย : เพชรบูรณ์ และตาก

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

3. Genus *Diaspis* Costa, 1828

Diaspis Costa 1828a: 453. Type species: *Diaspis calyptroides* Costa by subsequent designation Cocker1902d:58

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างค่อนข้างยาวรี ส่วน prosoma มีความกว้างมากกว่าส่วนอื่นๆ ค่อนข้างใส หนวดมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 จำนวนมาก ส่วน pygidium ค่อนข้างแข็ง ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 - 4 เห็นได้ชัดเจน ลอนแข็งแต่ละอันมีขนาดเล็กมากกว่า 1 อัน ยกเว้นคู่ที่ 1 มีเพียง 1 อัน ระหว่างฐานคู่ที่ 1 ไม่มีติ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 กางออก และมีต่อมหนามขนาดเล็ก จำนวน 1 คู่ มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ มักปรากฏหนามแข็งขนาดใหญ่คล้ายลอนแข็งคู่ที่ 5 ช่องเปิดส่วนท้ายของ



ระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้กับตำแหน่งของช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts สั้นๆ เรียงตัวแต่ละด้าน มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

3.1 *Diaspis bromeliae* (Kerner, 1778)

(Figure 7 และ 16F)

ชื่อพ้อง : *Coccus bromeliae* Kerner, 1778

Aspidiotes Bromeliae Bouché, 1844

Chermes bromeliae (Kerner, 1778)

Aulacaspis bromeliae (Kerner, 1778)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดสับปะรด (pineapple scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างกลม สีขาวค่อนข้างโปร่งใสสามารถมองเห็นลำตัวเพลี้ยหอยเกล็ดที่อยู่ด้านในได้ คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่เกือบกึ่งกลางของแผ่นปกคลุมลำตัวมีสีน้ำตาล เพศผู้ แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กกว่าเพศเมียอย่างชัดเจน แผ่นปกคลุมสีขาวขึ้น คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 สีน้ำตาลมักอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปไข่ส่วนท้ายของลำตัวค่อนข้างแหลม ส่วน prosoma มีความกว้างกว่าส่วนท้ายมากกว่า 5 เท่า มีตุ่มที่เห็นได้ชัดเจนยื่นออกไปทั้ง 2 ข้างคล้ายลักษณะของหู (ear-like) ผนังลำตัวค่อนข้างใส หนวดมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 จำนวนมาก ส่วน pygidium ค่อนข้างแข็ง ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แฉก ลอนแข็งคู่ที่ 1 – 4 เห็นได้ชัดเจน ลอนแข็งแต่ละอันมีลอนขนาดเล็กมากกว่า 1 อัน ยกเว้นคู่ที่ 1 มีเพียง 1 อัน มีความยาวใกล้เคียงกับความยาวของลอนแข็งคู่ที่ 2 ระหว่างฐานคู่ที่ 1 ไม่มีดิ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 กางออก ไม่มีต่อมหนามขนาดเล็กแต่มีเส้นขน 1 คู่ มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ มักปรากฏหนามแข็งขนาดใหญ่คล้ายลอนแข็งคู่ที่ 5 และมีความยาวใกล้เคียงกับความยาวของต่อมหนามที่อยู่ด้านข้าง ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้กับตำแหน่งของช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts สั้นๆ เรียงตัวแต่ละด้าน มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ Bromeliaceae ได้แก่ สับปะรด (กาบใบ)

เขตการแพร่กระจาย : ระยอง ชลบุรี และจันทบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

4. Genus *Lepidosaphes*, Shimer 1868

Lepidosaphes Shimer 1868: 373. Type species: *Lepidosaphes conchiformis* Shimer by monotypy. accepted valid name



ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี หนวดมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจทั้งคู่ที่ 1 แต่ไม่พบบริเวณคู่ที่ 2 ผนังลำตัวค่อนข้างใส แต่บางชนิดส่วน prosoma อาจมีลักษณะแข็ง ผนังลำตัวส่วนท้องมีขนาดค่อนข้างกว้าง และแต่ละปล้องเห็นเป็นลอนอย่างชัดเจน มีต่อมหนามจำนวนมากบริเวณลอนของส่วนท้องแต่ละปล้อง ส่วน pygidium ค่อนข้างแข็ง ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ มีขนาดใหญ่บริเวณขอบของผนังลำตัว ลอนแข็งคู่ที่ 1 - 2 เห็นชัดเจน คู่ที่ 3 และ 4 มีขนาดเล็กหรืออาจไม่พบ ระหว่างฐานของลอนแข็งคู่ที่ 1 มีต่อมหนามจำนวน 1 คู่ ส่วนคู่ที่ 2 มักมีลอนขนาดเล็กจำนวน 2 อันขึ้นไป มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้กับด้านบนส่วนฐานของของ pygidium ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ขนาดเล็กกว่าบริเวณขอบของผนังลำตัว ขอบด้านในอาจจะไม่มีหรือไม่มี bosses มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

4.1 *Lepidosaphes gloverii* (Packard, 1869)

(Figure 8 และ 17A)

ชื่อพ้อง *Aspidiotus gloverii* Packard, 1869

Mytilaspis gloverii (Packard, 1869)

Mytiella sexspina Hoke, 1921

Mytilaspis (Aspidiotus) gloverii (Packard, 1869)

Coccus gloverii (Packard, 1869)

Mytilococcus gloverii (Packard, 1869)

Opuntiaspis sexspina (Hoke, 1921)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดยาวส้ม (citrus long scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างเรียวยาว ส่วนท้ายมีความกว้างมากกว่าส่วนบนอย่างชัดเจน สีดำหรือน้ำตาลเข้มด้านท้ายมีเยื่อบางสีขาวขุ่น คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนและมีบางส่วนยื่นเลยแผ่นปกคลุมลำตัวและมีสีดำเข้ม เพศผู้ แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กกว่าเพศเมียอย่างชัดเจน ผนังลำตัวเป็นดำ คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 สีน้ำตาลมักอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี หนวดมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจทั้งคู่ที่ 1 แต่ไม่พบบริเวณคู่ที่ 2 ผนังลำตัวค่อนข้างใส แต่บางชนิดส่วน prosoma อาจมีลักษณะแข็ง ผนังลำตัวส่วนท้องมีขนาดค่อนข้างกว้าง และแต่ละปล้องเห็นเป็นลอนอย่างชัดเจน มีต่อมหนามจำนวนมากบริเวณลอนของส่วนท้องแต่ละปล้อง ส่วน pygidium ค่อนข้างแข็ง ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ มีขนาดใหญ่บริเวณขอบของผนังลำตัว ลอนแข็งคู่ที่ 1 - 2 เห็นชัดเจน คู่ที่ 3 และ 4 มีขนาดเล็กเหมือนเป็นจุดแข็ง ระหว่างฐานของคู่ที่ 1 มีต่อมหนามจำนวน 1 คู่ ส่วนคู่ที่ 2 มัก



มีลอนขนาดเล็กจำนวน 2 อัน มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้กับด้านบนส่วนฐานของของ pygidium ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ขนาดเล็กกว่าบริเวณขอบของผนังลำตัว มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ Musaceae ได้แก่ กล้าย (ใบ) วงศ์ Anacardiaceae ได้แก่ มะม่วง (ใบ) วงศ์ Plumeriaceae ได้แก่ สีสลาวดี (ใบ) และวงศ์ Zhiizophoraceae ได้แก่ โกงกาง (ใบ)

เขตการแพร่กระจาย : จันทบุรี เพชรบุรี และตาก

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

4.2 *Lepidosaphes* sp.

(Figure 9 และ 17B)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดยาว (long scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างเรียวยาว ส่วนท้ายมีความกว้างมากกว่าส่วนบนอย่างชัดเจน สีเหลืองหรือน้ำตาลด้านท้ายมีเยื่อบางสีขาวยื่น คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนและมีบางส่วนยื่นเลยแผ่นปกคลุมลำตัวและมีสีดำเข้ม เพศผู้ แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กกว่าเพศเมียอย่างชัดเจน ผนังลำตัวเป็นดำ คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 สีน้ำตาลมักอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ :

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี หนวดมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจทั้งคู่ที่ 1 แต่ไม่พบบริเวณคู่ที่ 2 ผนังลำตัวค่อนข้างใส แต่บางชนิดส่วน prosoma อาจมีลักษณะแข็ง ผนังลำตัวส่วนท้องมีขนาดค่อนข้างกว้าง และแต่ละปล้องเห็นเป็นลอนอย่างชัดเจน มีต่อมหนามจำนวนมากบริเวณลอนของส่วนท้องแต่ละปล้อง ส่วน pygidium ค่อนข้างแข็ง ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ มีขนาดใหญ่บริเวณขอบของผนังลำตัว ลอนแข็งคู่ที่ 1 - 2 เห็นชัดเจน คู่ที่ 3 และ 4 มีขนาดเล็กเหมือนเป็นจุดแข็งระหว่างฐานของคู่ที่ 1 มีต่อมหนามจำนวน 1 คู่ ส่วนคู่ที่ 2 มักมีลอนขนาดเล็กจำนวน 2 อัน มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้กับด้านบนส่วนฐานของของ pygidium ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏก้อนแข็ง มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายส่วนใบของหมาก กล้าย

เขตการแพร่กระจาย : ชุมพร และราชบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

5. Genus *Parlatoria* Targioni Tozzetti 1868

Parlatoria Targioni Tozzetti 1868: 735. Type species: *Parlatoria orbicularis* Targioni

Tozzetti by subsequent designation Leonar1899a:208



ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี รูปไข่ หรือค่อนข้างกลม หนดเป็นตึงมีขน 1 เส้น prosoma มีมักเรียบหรือมีตุ่มยื่นออกจากผนังลำตัวด้านข้าง คล้ายหู (ear-like) ลำตัวค่อนข้างใสยกเว้นส่วนปลายของ pygidium ค่อนข้างแข็ง มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 แต่ไม่พบในรูหายใจคู่ที่ 2 แต่มี derm pocket ระหว่างขอบของผนังลำตัวตั้งแต่รูหายใจคู่ที่ 2 ขึ้นไปจนถึงใกล้หนด ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ซึ่งบริเวณปากท่อจะมีขอบแข็งล้อมรอบ (duct orifice) ลอนแข็งคู่ที่ 1 - 3 เห็นได้ชัดเจน ส่วนคู่ที่ 4 มักมีขนาดค่อนข้างเล็ก หรือเป็นเพียงจุดแข็ง ระหว่างลอนแข็งคู่ที่ 1 แยกออกจากกัน ลอนแข็งแต่ละลอนมีขนาดเล็กมักมีเพียง 1 อัน แต่อาจพบ 2 อันในคู่ที่ 2 - 3 ส่วนคู่ที่ 4 เห็นเป็นจุดแข็งเล็กๆ มีแผ่นแข็งระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ เป็นแบบ fimbriate หรือ fringed มีต่อมหนามขนาดใหญ่บริเวณขอบด้านนอกของท้องปล้องที่ 1 ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารอยู่เกือบกึ่งกลางของ pygidium มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 4 กลุ่ม

5.1 *Parlatoria pergandii* Comstock, 1881

(Figure 10 และ 17C)

ชื่อพ้อง : *Parlatoria pergandii* Comstock, 1881

Parlatoria sinensis Maskell, 1897

Parlatoria (Euparlatoria) pergandii Comstock, 1881

Syngenaspis pergandei (Cockerell, 1899)

Parlatoreopsis pergandii (Comstock, 1881)

Parlatoria pargandii Comstock, 1881

ชื่อสามัญ : เพี้ยหอยเกล็ดกลมส้ม (chaff scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : เพี้ยหอย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างกลม หรือรี สีน้ำตาล คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวมีสีเข้มกว่าเล็กน้อย เพศผู้ แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กและสีอ่อนกว่าเพศเมีย คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 มักอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างรูปไข่ หนดเป็นตึงมีขน 1 เส้น ส่วน prosoma ไม่มีตุ่มยื่นออกจากผนังลำตัวด้านข้าง คล้ายหู (ear-like) ลำตัวค่อนข้างใสยกเว้นส่วนปลายของ pygidium ค่อนข้างแข็ง มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 แต่ไม่พบในรูหายใจคู่ที่ 2 แต่มี derm pocket กระจายระหว่างขอบของผนังลำตัวตั้งแต่รูหายใจคู่ที่ 2 ขึ้นไป ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ซึ่งบริเวณปากท่อเป็นแนวขวางและมีขอบแข็งล้อมรอบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 - 4 เห็นได้ชัดเจน ระหว่างลอนแข็งคู่ที่ 1 แยกออกจากกัน ลอนแต่ละอันมีลอนขนาดเล็กเพียง 1 อัน ลอนแข็งคู่ที่ 1 มีขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนคู่ที่ 2 - 3 มีขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนคู่ที่ 4 มีขนาดเล็กขอบหยักแหลม และปรากฏคล้ายลอนแข็งคู่ที่ 5 มีขนาดเล็กมากกว่าคู่ที่ 4 และอยู่ห่างออกไปค่อนข้างมาก มีแผ่นแข็ง



ระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ เป็นแบบ fimbriate มีต่อมหนามขนาดใหญ่บริเวณขอบด้านนอกของท้องปล้องที่ 1 ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารอยู่เลยกึ่งกลางไปทางด้านท้ายของ pygidium มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 4 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ Rutaceae ได้แก่ มะนาว (ใบ กิ่งและผล) ส้มโอ (ใบ กิ่งและผล) และวงศ์ วงศ์ Anacardiaceae ได้แก่ มะม่วง (ใบ กิ่งและผล)

เขตการแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ และราชบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

5.2 *Parlatoria ziziphi* (Lucas, 1853)

(Figure 11 และ 17D)

ชื่อพ้อง : *Coccus ziziphi* Lucas, 1853

Chermes aurantii Boisduval, 1867

Parlatoria Lucassi Targioni Tozzetti, 1868

Parlatoria (Websteriella) ziziphus (Lucas, 1853)

Apterionidia ziziphi (Lucas, 1853)

Diaspis ziziphus (Lucas, 1853)

Parlatoresopsis ziziphi (Lucas, 1853)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดดำมะนาว (black parlatoria scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า สีดำด้านท้ายมีเยื่อบางสีขาวขุ่น คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนบนสุดและมีบางส่วนยื่นเลยแผ่นปกคลุมลำตัวมีสีดำเข้ม **เพศผู้** แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กกว่าอย่างชัดเจน สีอ่อนกว่าเพศเมียเล็กน้อย คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 สีน้ำตาลมักอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี หนวดเป็นดิ่งมีขน 1 เส้น prosoma มีตุ่มยื่นออกจากผนังลำตัวด้านข้าง คล้ายหู (ear-like) ลำตัวค่อนข้างใสยกเว้นส่วนปลายของ pygidium ค่อนข้างแข็ง มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 แต่ไม่พบในรูหายใจคู่ที่ 2 แต่มี derm pocket ระหว่างขอบของผนังลำตัวตั้งแต่รูหายใจคู่ที่ 2 ขึ้นไป ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบซึ่งบริเวณปากท่อเป็นแนวขวางและมีขอบแข็งล้อมรอบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 - 3 เห็นได้ชัดเจนมีขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนคู่ที่ 4 มีขนาดเล็กเรียวแหลม ระหว่างลอนแข็งคู่ที่ 1 แยกออกจากกัน ลอนแต่ละอันมีลอนขนาดเล็กเพียง 1 อัน มีแผ่นแข็งระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่เป็นแบบ fimbriate มีต่อมหนามขนาดใหญ่บริเวณขอบด้านนอกของท้องปล้องที่ 1 ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารอยู่เกือบกึ่งกลางของ pygidium มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 4 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ วงศ์ Rutaceae ได้แก่ มะนาว มะกรูด และส้มโอ ดูดกินน้ำเลี้ยงในส่วนองใบและผล



เขตการแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสงคราม ลพบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท พิษณุโลก นครสวรรค์ สระบุรี อุทัยธานี นครราชสีมา มหาสารคาม ขอนแก่น มหาสารคาม อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ ยโสธร อุบลราชธานี เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง พะเยา พิษณุโลก อุดรดิตถ์ ฉะเชิงเทรา จันทบุรี ชลบุรี ระยอง ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

6. Genus *Pinnaspis* Cockerell 1892

Pinnaspis Cockerell 1892d: 136. Type species: *Mytilaspis pandani* Comstock by subsequent designation Fernal1903b:242

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี ความกว้างของ prosoma และ pygidium ใกล้เคียงกัน ผนังลำตัวด้านนอกของ prosoma เรียบและแคบกว่าส่วนท้อง หนวดเป็นดิ่งมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 จำนวนมาก โดยส่วนท้องแต่ละปล้องมักมีลักษณะเป็นลอนอย่างชัดเจน มีต่อมหนามขนาดใหญ่และจำนวนมากบริเวณลอนของปล้องท้องแต่ละปล้อง ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 – 2 เห็นได้ชัดเจน คู่ที่ 1 มักมีขนาดใหญ่กว่า คู่ที่ 2 ส่วนคู่ที่ 3 มีขนาดค่อนข้างเล็ก หรืออาจจะไม่ปรากฏลอนแข็งคู่ที่ 2 - 4 ระหว่างฐานคู่ที่ 1 มีติ่งยื่นเข้าไปค่อนข้างยาวทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 ทั้ง 2 อันชิดกัน มีต่อมหนามขนาดค่อนข้างยาวระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้เกือบกึ่งกลางของ pygidium ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ขนาดใหญ่เรียงตัวแต่ละด้าน โดยเฉพาะบริเวณขอบของผนังลำตัว มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

6.1 *Pinnaspis aspidiatrae* (Signoret, 1869)

(Figure 12 และ 17E)

ชื่อพ้อง : *Chionaspis aspidistrae* Signoret, 1869

Chionaspis brasiliensis Signoret, 1869

Chionaspis latus Cockerell, 1896

Pinnaspis ophiopogonis Takahashi, 1952

Pinnaspis caricis Ferris, 1957

Pinnaspis aspidistrae yunnanensis Chen, 1983

ชื่อสามัญ : เพี้ยหอยเกล็ดเฟิร์น (fern scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : เพี้ยหอย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างกลม สีน้ำตาล คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวมีสีเข้มกว่าเล็กน้อย เพี้ยหอย แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กมีลักษณะเป็นผงแปงสีขาว คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 สีมักอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้



ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี ความกว้างของ prosoma และ pygidium ใกล้เคียงกัน ผนังลำตัวด้านนอกเรียบมีขนาดแคบกว่าส่วนท้อง หนวดเป็นดิ่งมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 จำนวนมาก ซึ่งโดยส่วนท้องแต่ละปล้องมักมีลักษณะเป็นลอนอย่างชัดเจน มีต่อมหนามขนาดใหญ่และจำนวนมากบริเวณลอนของปล้องท้องแต่ละปล้อง ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 มักสั้นกว่าคู่ที่ 2 แต่มีขนาดใกล้เคียงกัน ระหว่างฐานคู่ที่ 1 มีติ่งยื่นเข้าไปค่อนข้างยาวทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 ทั้ง 2 อันชิดกัน ส่วนคู่ที่ 2 มีลอนขนาดเล็กจำนวน 2 อัน มีต่อมหนามขนาดค่อนข้างยาวระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคู่ที่ 1 และอยู่ใกล้เกือบกึ่งกลางของ pygidium ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ขนาดใหญ่เรียงตัวตั้งแต่ส่วนบนถึงท้องปล้องที่ 1 ปรากฏเส้นแข็งบริเวณผนังลำตัวด้านหลัง (dorsal preanal scleroses) มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ Musaceae ได้แก่ กล้วย (ใบ) วงศ์ Plumeriaceae ได้แก่ ลีลาวดี (ใบ) และ วงศ์ Amaranthaceae ได้แก่ บานไม่รู้โรย (ลำต้นและใบ)

เขตการแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครสวรรค์ อุทัยธานี และขอนแก่น

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

6.2 *Pinnaspis strachani* (Cooley, 1899)

(Figure 13 และ 17F)

ชื่อพ้อง : *Hemichionaspis minor strachani* Cooley, 1899

Hemichionaspis Marchali Cockerell, 1902

Hemichionaspis townsendi Cockerell, 1905

Chionaspis (Hemichionaspis) aspidistrae gossypii Newstead, 1906

Chionaspis (Hemichionaspis) aspidistrae gossypii Newstead, 1908

Hemichionaspis proxima Leonardi, 1914

Pinnaspis temporaria Ferris, 1942

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดขาวฝ้าย (cotton white scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างกลม สีขาว คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวสีน้ำตาลหรือสีดำ **เพศผู้** แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็ก ลักษณะเป็นแผงสีขาว คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 มักอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวสีน้ำตาลหรือสีดำและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี ความกว้างของ prosoma และ pygidium ใกล้เคียงกัน ผนังลำตัวด้านนอกของ prosoma เรียบและแคบกว่าส่วนท้อง หนวดเป็นดิ่งมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 จำนวนมาก โดยส่วนท้องแต่ละปล้องมักมีลักษณะเป็นลอนอย่างชัดเจน มีต่อมหนามขนาดใหญ่และจำนวนมากบริเวณลอนของปล้องท้องแต่ละปล้อง ส่วน



pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 – 2 เห็นได้ชัดเจน คู่ที่ 1 มีขนาดใหญ่กว่าเป็นสองเท่าของคู่ที่ 2 ส่วนคู่ที่ 3 มีขนาดค่อนข้างเล็กมาก ระหว่างฐานคู่ที่ 1 มีติ่งยื่นเข้าไปค่อนข้างยาวทำให้ลอนแข็งคู่ที่ 1 ทั้ง 2 อันชิดกัน มีต่อมหนามขนาดค่อนข้างยาวระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ขนาดใหญ่เรียงตัวตั้งแต่ส่วนบนถึงท้องปล้องที่ 1 ไม่ปรากฏเส้นแข็งบริเวณผนังลำตัวด้านหลัง (Dorsal preanal scleroses) ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนคู่ที่ 1 และอยู่เกือบกึ่งกลางของ pygidium มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ Euphorbiaceae ได้แก่ มันสำปะหลัง (ลำต้น) วงศ์ Plumeriaceae ได้แก่ สีสาวดี (ใบ) และ วงศ์ Amaranthaceae ได้แก่ บานไม่รู้โรย (ลำต้นและใบ) และบานไม่รู้โรย (ลำต้นและใบ) และวงศ์ Asparagaceae ได้แก่ ถั่วลิสง (ใบ)

เขตการแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครสวรรค์ อัญธานี สระบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น มหาสารคาม ฉะเชิงเทรา ระยอง ชลบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี และตาก

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

7. Genus *Pseudaulacaspis* MacGillivray, 1921

Pseudaulacaspis MacGillivray 1921: 305. Type species: *Diaspis pentagona*

Targioni Tozzetti

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี หรือทรงกระบอก ความกว้างของ prosoma และ pygidium ใกล้เคียงกัน หนวดมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 และอาจพบหรือไม่พบในคู่ที่ 2 โดยส่วนท้องแต่ละปล้องมักมีลักษณะเป็นลอนอย่างชัดเจน มีต่อมหนามขนาดใหญ่และจำนวนมากบริเวณลอนของปล้องท้องแต่ละปล้อง ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 เห็นได้ชัดเจน ระหว่างฐานของคู่ที่ 1 ไม่มีติ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนคู่ที่ 1 กางออกและปรากฏขน 1 คู่ ลอนแข็งคู่ที่ 2 มีขนาดเล็กกว่าคู่ที่ 1 มากและมักมีลอนขนาดเล็กจำนวนมากกว่า 1 อัน คู่ที่ 3 อาจพบหรือไม่พบ ซึ่งลอนแข็งที่ปรากฏมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดค่อนข้างมาก มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารอยู่ชิดด้านบนของ pygidium ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ขนาดใหญ่เรียงตัวแต่ละด้านโดยเฉพาะบริเวณขอบด้านในและบริเวณใกล้แกว่งกึ่งกลางลำตัว มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

7.1 *Pseudaulacaspis cockerelli* (Cooley, 1897)

(Figure 14 และ 17G)

ชื่อพ้อง : *Chionaspis cockerelli* Cooley, 1897

Chionaspis aucubae Cooley, 1897

Chionaspis dilatata Green, 1899



Phenacaspis natalensis Cockerell, 1902

Chionaspis candida Banks, 1906

Phenacaspis eugeniae sandwicensis Fullaway, 1932

Chionaspis syringae Borchsenius, 1938

Chionaspis hattorii Kanda, 1941

Chionaspis akebiae Takahashi, 1952

Phenacaspis ferrisi Mamet, 1959

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดอีโถ (oleander scale)

ลักษณะในธรรมชาติที่สำคัญ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างเรียวยาว สีขาวขุ่น คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวมีสีเหลือง **เพศผู้** แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กมีลักษณะเป็นผ่งแป้ง คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 สีมักอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี หรือทรงกระบอก ความกว้างของ prosoma และ pygidium ใกล้เคียงกันมีต่อมหนามจำนวนมากบริเวณลอนของส่วนท้องแต่ละปล้อง หนวดมีขนค่อนข้างยาว มีรูเปิดรอบรูหายใจคู่ที่ 1 และอาจพบหรือไม่พบในคู่ที่ 2 ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 เห็นได้ชัดเจนบริเวณฐานไม่มีดิ่งขนาดใหญ่ ทำให้ลอนแข็งแต่ละข้างกางออกและปรากฏขน 1 คู่ ส่วนลอนแข็งคู่ที่ 2 มีขนาดเล็กกว่าคู่ที่ 1 มาก และมักมีลอนขนาดเล็กจำนวน 3 อัน ลอนแข็งคู่ที่ 3 มีขนาดเล็กกว่าคู่อื่นๆ มีต่อมหนามระหว่างลอนแข็งแต่ละคู่ ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารอยู่ชิดด้านบนของ pygidium ผงลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ขนาดใหญ่เรียงตัวแต่ละด้านโดยเฉพาะบริเวณขอบด้านในและบริเวณใกล้แกว่งกึ่งกลางลำตัว มีรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ จำนวน 5 กลุ่ม

พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ Areaceae ได้แก่ หมาก (ใบ) วงศ์ Moraceae ได้แก่ มะเดื่อฝรั่ง (ใบ) และวงศ์ Apocynaceae ได้แก่ ยี่โถ (ใบ)

เขตการแพร่กระจาย : ปทุมธานี ชุมพร และอุทัยธานี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

8. Genus *Unaspis* MacGillivray, 1921

Unaspis MacGillivray, 1921: 308. Type species: *Chionaspis acuminata* Green by monotypy and original designation

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี หนวดเป็นดิ่งมีขนค่อนข้างยาว ส่วน prosoma มีความกว้างใกล้เคียงกับ pygidium ขอบผนังลำตัวด้านนอกค่อนข้างเรียบ ขนาดแคบกว่าส่วนท้อง มีรูเปิดรอบรูหายใจทั้งคู่ที่ 1 และ 2 ส่วนท้องแต่ละปล้องมีลักษณะเป็นลอนอย่างชัดเจนและมีต่อมหนามจำนวนมากในแต่ละปล้อง ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ลอนแข็งคู่ที่ 1 - 3 เห็น



ชัดเจน ระหว่างฐานของคูที่ 1 ไม่มีติ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนคูที่ 1 กางออก ลอนแข็งแต่คูมีลอนขนาดเล็ก จำนวน 2 - 3 อัน ยกเว้นคูที่ 1 มีเพียง 1 อัน ระหว่างลอนแข็งแต่ละคูมีต่อมหนาม ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคูที่ 1 และอยู่ใกล้เกือบกึ่งกลางของ pygidium ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ขนาดใหญ่เรียงตัวแต่ละด้านโดยเฉพาะบริเวณขอบของผนังลำตัว มีเส้นขนตามยาวบริเวณกึ่งกลางอาจพบหรือไม่พบรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์

8.1 *Unaspis citri* (Comstock, 1883)

(Figure 15 และ 17H)

ชื่อพ้อง : *Chionaspis citri* Comstock, 1883

Howardia citri (Comstock, 1883)

Chionaspis citricola Comstock, 1883

Dinaspis annae Malenotti, 1916

Prontaspis citri (Comstock, 1883)

Dinaspis veitchi Green & Laing 1923

Trichomytilus veitchi (Green & Laing, 1923)

Diaspis annae (Malenotti, 1916)

Chionaspis annae (Malenotti, 1916)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยหอยเกล็ดหิมะส้ม (citrus snow scale)

ลักษณะในธรรมชาติ : เพศเมีย แผ่นปกคลุมลำตัวของตัวเต็มวัยค่อนข้างยาวรี สีน้ำตาลหรือน้ำตาลเข้มเป็นสันขนบริเวณกึ่งกลางลำตัวตั้งแต่ส่วนบนจนถึงส่วนท้ายลำตัว คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 อยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวมีสีเข้มกว่าเล็กน้อย เพศผู้ แผ่นปกคลุมลำตัวค่อนข้างยาวรีขนาดเล็กมีลักษณะเป็นผงบั้งสีขาว คราบของตัวอ่อนวัยที่ 1 มักอยู่ขอบด้านบนของแผ่นปกคลุมลำตัวและเชื่อมด้วยแผ่นปกคลุมที่สร้างขึ้นสำหรับตัวอ่อนวัยที่ 2 จนถึงระยะดักแด้

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปร่างยาวรี หนวดเป็นติ่งมีขนค่อนข้างยาว ส่วน prosoma มีความกว้างใกล้เคียงกับ pygidium ขอบผนังลำตัวด้านนอกค่อนข้างเรียบ ขนาดแคบกว่าส่วนท้อง มีรูเปิดรอบรูหายใจคูที่ 1 จำนวน 8 - 15 รู และคูที่ 2 จำนวน 3 - 5 รู ส่วนท้องแต่ละปล้องมีลักษณะเป็นลอนอย่างชัดเจนและมีต่อมหนามจำนวนมากในแต่ละปล้อง ส่วน pygidium ประกอบด้วย macroducts แบบ 2 แถบ ซึ่งบริเวณปากท่อเป็นแนวยาวและมีขอบแข็งล้อมรอบ ลอนแข็งคูที่ 1 - 3 เห็นชัดเจน ลอนแข็งคูที่ 1 มีขนาดใหญ่กว่าลอนอื่นๆ ชัดเจน ระหว่างฐานของคูที่ 1 ไม่มีติ่งยื่นเข้าไปทำให้ลอนคูที่ 1 กางออก ลอนแข็งแต่คูมีลอนขนาดเล็กจำนวน 2 อัน ยกเว้นคูที่ 1 มีเพียง 1 อัน ระหว่างลอนแข็งแต่ละคูมีต่อมหนาม ช่องเปิดส่วนท้ายของระบบทางเดินอาหารมีขนาดเล็กกว่าลอนแข็งคูที่ 1 และอยู่ใกล้เกือบกึ่งกลางของ pygidium ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏ macroducts ขนาดใหญ่เรียงตัวแต่ละด้านโดยเฉพาะบริเวณขอบของผนังลำตัว มีเส้นขนตามยาวบริเวณกึ่งกลางอาจพบหรือไม่พบรูเปิดรอบช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์



พืชอาหาร : พบลงทำลายพืชวงศ์ Rutaceae ได้แก่ มะนาว (ใบ ลำต้นและผล) ส้มโอ (ผล) และวงศ์ Clusiaceae ได้แก่ มังคุด (ใบ)

เขตการแพร่กระจาย : กรุงเทพฯ และนครศรีธรรมราช

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา : Table 1

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Diaspidinae ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2564 จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ พบเพลี้ยหอยเกล็ดในพืชหลายชนิด ได้แก่ มะนาว มะกรูด ส้มโอ มันสำปะหลัง มะม่วง ทูเรียน กล้วย มังคุด ลองกอง อะโวคาโด สับปะรด หมาก บานชื่น บานไม่รู้โรย ยี่โถ ลีลาวดี ลั่นมังกระ แคระ กุหลาบ มะเดื่อฝรั่ง ผักหวานบ้าน และโกก้าง ในพื้นที่ 42 จังหวัด พบทั้งสิ้น 8 สกุล 14 ชนิด ได้แก่ 1) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมันสำปะหลัง *Anidomytilus albus* (Cockerell) 2) เพลี้ยหอยเกล็ดกุหลาบ *Aulacaspis rosae* (Bouche') 3) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวมะม่วง *Aulacaspis tubercularis* (Newstead) 4) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวทูเรียน *Aulacaspis vitis* (Green) 5) เพลี้ยหอยเกล็ดขาว *Aulacaspis* sp. 6) เพลี้ยหอยเกล็ดสับปะรด *Diaspis bromeliae* (Kerner) 7) เพลี้ยหอยเกล็ดยาวส้ม *Lepidosaphes gloverii* (Packard) 8) เพลี้ยหอยเกล็ดยาว *Lepidosaphes* sp. 9) เพลี้ยหอยเกล็ดกลมส้ม *Parlatoria pergandii* (Comstock) 10) เพลี้ยหอยเกล็ดดำมะนาว *Parlatoria ziziphi* (Locau) 11) เพลี้ยหอยเกล็ดเฟิร์น *Pinnaspis aspidiatrae* (Signoret) 12) เพลี้ยหอยเกล็ดขาวฝ้าย *Pinnaspis strachani* (Cooley) 13) เพลี้ยหอยเกล็ดยี่โถ *Pseudaulacaspis cockerelli* (Cooley) 14) เพลี้ยหอยเกล็ดหิมะส้ม *Unaspis citri* (Comstock) ซึ่งได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัย (key) รายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดพร้อมพืชอาหาร โดยตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชในประเทศไทยต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ และลูกจ้างกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บและเตรียมตัวอย่างทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

บุปผา เหล่าสินชัย และชลิตา อุณหุฒิ. 2543. *เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอยศัตรูพืชที่สำคัญ*. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว, กรุงเทพฯ. 70 หน้า.

Ben-Dov, Y., Miller, D.R. and Gibson, G.A.P. 2014. *ScaleNet: a database of the scale insects (Hemiptera; Coccoidea) of the world*. <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/htm> accessed May 4, 2014.



- Miller, D.R. and J.A. Davidson. 1990. List of the Armored Scale Insect Pests, pp.299-306. In: D. Rosen, ed., *The Armored Scale Insects, Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol. B*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Miller, D.R. and J.A. Davidson. 2005. Armored Insect Pests of Trees and Shrubs (Hemiptera: Diaspididae). Cornell University Press, New York. 442 pp.
- Williams, D.J. and G.W. Watson. 1988. *The Scale Insects of the Tropical South Pacific Region Part I, the armored scale (Diaspididae)*. CAB International Institute of Entomology, Wallingford. 290 pp.

Table 1 Host plant and location of samples in this study.

| Host Plants | Locations | Species |
|-----------------|--|------------------------|
| Cassava | Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Nakhon Sawan N 15°52'20.1" E 99°30'4.8" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Kamphaeng Phet N 16°08'29.1" E 99°34'48.0" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Saraburi N 14°52'56.5" E 101°7'9.1" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Khonkhen N 16°35'18.1" E 101°59'28.2" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Maharakham N 16°04'38.7" E 103°09'24.4" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Udonthani N 17°41'9.5" E 102°35'6.7" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Nong Khai N 18°2'39.8" E 102°20'11.5" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Mukdahan N 16°22'47.4" E 100°51'45.2" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Buriram N 14°41'50.2" E 102°29'50.7" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Si Sa Ket N 14°46'14.0" E 104°44'53.2" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Yasothon N 14°39'51.6" E 104°15'51." (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Ubonratchathani N 14°58'28.7" E 104°58'35.5" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Chiangrai N 19°53'08.6" E 99°52'24.4" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Phitsanulok N 17°44'12.0" E 99°02'13.0" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Chachoengsao N 13°37'58.6" E 101°18'16.9" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Chonburi N 12°57'23.2" E 101°13'9.3" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Kanchanaburi N 14°31'56.0" E 99°32'13.0" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Cassava | Tak N 17°2'54.9" E 99°4'3.5" (C. Buamas) | <i>A. albus</i> |
| Star gooseberry | Khon Kaen N 16°27'43.6" E 102°37'13.1" (C. Buamas) | <i>A. rosae</i> |
| Rose | Saraburi N 16°27'43.6" E 102°37'13.1" (C. Buamas) | <i>A. rosae</i> |
| Mango | Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Nonthaburi N 13°80'9.2" E 100°47'34.2" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Pathum Thani N 14°08'9.2" E 100°53'34.2" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Nakhon Pathom N 14°23'9.2" E 99°97'34.2" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |



Table 1 Host plant and location of samples in this study.(Continue)

| Host Plants | Locations | Species |
|-------------|--|------------------------|
| Mango | Samut Songkhram N 13°26'9.2" E 99°56'34.2" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Lopburi N 14°50'55.5" E 100°56'21.5" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Singburi N 14°50'34.5" E 100°25'25.2" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Chainat N 15°8'48.4" E 100°14'26.3" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Phichit N 16°25'7.5" E 100°8'34.6" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Nakhon Sawan N 15°52'20.1" E 99°30'4.8" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Kamphaeng Phet N 16°8'29.1" E 99°34'48.0" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Saraburi N 14°52'56.5" E 101°7'9.1" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Khonkhen N 16°35'18.1" E 101°59'28.2" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Maharakham N 16°04'38.7" E 103°09'24.4" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Udonthani N 17°41'9.5" E 102°35'6.7" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Nong Khai N 18°2'39.8" E 102°20'11.5" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Mukdahan N 16°22'47.4" E 100°51'45.2" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Buriram N 14°41'50.2" E 102°29'50.7" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Si Sa Ket N 14°46'14.0" E 104°44'53.2" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Yasothon N 14°39'51.6" E 104°15'51." (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Ubonratchathani N 14°58'28.7" E 104°58'35.5" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Chiangmai N 18°60'52.0" E 98°89'21.0" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Chiangrai N 19°53'08.6" E 99°52'24.4" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Lamphun N 18°33'44.0" E 98°59'27.0" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Lampang N 17°44'12.0" E 99°02'13.0" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Phitsanulok N 17°44'12.0" E 99°02'13.0" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Uttaradit N 17°14'22.0" E 100°14'42.3" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Chachoengsao N 13°37'58.6" E 101°18'16.9" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Chantaburi N 12°30'47.6" E 102°10'16.8" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Durian | Chantaburi N 12°29'31.8" E 102°13'53.3" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Chonburi N 12°57'23.2" E 101°13'9.3" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Durian | Rayong N 12°39'7.5" E 101°27'3.3" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Kanchanaburi N 14°31'56.0" E 99°32'13.0" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Tak N 17°2'54.9" E 99°4'3.5" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Petchaburi N 12°5'43.0" E 99°54'13.3" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Prachuap Khiri Khan N 11°5'49.6" E 99°28'47.3" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Surat Thani N 9°8'31.7" E 99°37'55.5" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Chumphon N 10°20'34.9" E 99°4'45.5" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Langsat | Chumphon N 10°15'25.6" E 98°54'52.5" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |
| Mango | Nakhon Si Thammarat N 8°18'27.4" E 99°46'25.4" (C. Buamas) | <i>A. tubercularis</i> |



Table 1 Host plant and location of samples in this study.(Continue)

| Host Plants | Locations | Species |
|-----------------------|--|-------------------------|
| Durian | Chantaburi N 12°30'47.6" E 102°10'16.8" (C. Buamas) | <i>A. vitis</i> |
| Durian | Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas) | <i>A. vitis</i> |
| Durian | Prachuap Khiri Khan N 11°3'15.0" E 99°26'0.7" (C. Buamas) | <i>A. vitis</i> |
| Mango | Chumphon N 10°15'30.9" E 98°55'39.6" (C. Buamas) | <i>A. vitis</i> |
| Avacado | Phetchabun N 16°35'11.1" E 100°57'23.14" (A. Rukkasikorn) | <i>Aulacaspis</i> sp. |
| Avacado | Tak N 16°75'15.9" E 98°93'55.3" (C. Buamas) | <i>Aulacaspis</i> sp. |
| Pineapple | Rayong N 12°55'33.3" E 101°14'43.2" (C. Buamas) | <i>D. bromeliae</i> |
| Pineapple | Chonburi; N 12°53'49.0" E 101°53'17.5" (C. Buamas) | <i>D. bromeliae</i> |
| Pineapple | Chanthaburi N 12°44'23.4" E 101°08'21.4" (C. Buamas) | <i>D. bromeliae</i> |
| <i>Rhizophora</i> sp. | Chanthaburi N 12°34'27.4" E 101°54'11.7" (C. Buamas) | <i>L. gloverii</i> |
| Banana | Petchaburi N 12°5'43.0" E 99°54'13.3" (C. Buamas) | <i>L. gloverii</i> |
| Frangipani | Tak N 17°2'54.9" E 99°4'3.5" (C. Buamas) | <i>L. gloverii</i> |
| Mango | Petchaburi N 12°5'43.0" E 99°54'13.3" (C. Buamas) | <i>L. gloverii</i> |
| Nut palm | Chumphon N 10°15'30.9" E 98°55'39.6" (C. Buamas) | <i>Lepidosaphes</i> sp. |
| Banana | Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas) | <i>Lepidosaphes</i> sp. |
| Lime | Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas) | <i>P. pergandii</i> |
| Pomelo | Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas) | <i>P. pergandii</i> |
| Mango | Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas) | <i>P. pergandii</i> |
| Lime | Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Nonthaburi N 13°80'9.2" E 100°47'34.2" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Pathum Thani N 14°08'9.2" E 100°53'34.2" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Nakhon Pathom N 14°23'9.2" E 99°97'34.2" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Samut Songkhram N 13°26'9.2" E 99°56'34.2" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Lopburi N 14°50'55.5" E 100°56'21.5" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Singburi N 14°50'34.5" E 100°25'25.2" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Chainat N 15°8'48.4" E 100°14'26.3" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Phichit N 16°25'7.5" E 100°8'34.6" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Nakhon Sawan N 15°52'20.1" E 99°30'4.8" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Kamphaeng Phet N 16°8'29.1" E 99°34'48.0" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Saraburi N 14°52'56.5" E 101°7'9.1" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Khonkhen N 16°35'18.1" E 101°59'28.2" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Maharakham N 16°04'38.7" E 103°09'24.4" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Udonthani N 17°41'9.5" E 102°35'6.7" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Nong Khai N 18°2'39.8" E 102°20'11.5" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Mukdahan N 16°22'47.4" E 100°51'45.2" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Buriram N 14°41'50.2" E 102°29'50.7" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Si Sa Ket N 14°46'14.0" E 104°44'53.2" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Yasothon N 14°39'51.6" E 104°15'51." (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |



Table 1 Host plant and location of samples in this study.(Continue)

| Host Plants | Locations | Species |
|--------------------------|--|-----------------------|
| Lime | Ubonratchathani N 14°58'28.7" E 104°58'35.5" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Chiangmai N 18°60'52.0" E 98°89'21.0" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Chiangrai N 19°53'08.6" E 99°52'24.4" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Pomelo | Chiangrai N 19°53'08.6" E 99°52'24.4" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Lamphun N 18°33'44.0" E 98°59'27.0" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Lampang N 17°44'12.0" E 99°02'13.0" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Phitsanulok N 17°44'12.0" E 99°02'13.0" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Uttaradit N 17°14'22.0" E 100°14'42.3" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Chachoengsao N 13°37'58.6" E 101°18'16.9" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Chantaburi N 12°30'47.6" E 102°10'16.8" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Chonburi N 12°57'23.2" E 101°13'9.3" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Rayong N 12°39'7.5" E 101°27'3.3" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Kanchanaburi N 14°31'56.0" E 99°32'13.0" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Tak N 17°2'54.9" E 99°4'3.5" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Petchaburi N 12°5'43.0" E 99°54'13.3" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Prachuap Khiri Khan N 11°5'49.6" E 99°28'47.3" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Surat Thani N 9°8'31.7" E 99°37'55.5" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Pomelo | Chumphon N 10°20'34.9" E 99°4'45.5" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Chumphon N 10°15'25.6" E 98°54'52.5" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Lime | Nakhon Si Thammarat N 8°18'27.4" E 99°46'25.4" (C. Buamas) | <i>P. ziziphi</i> |
| Banana | Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas) | <i>P. aspidiatrae</i> |
| <i>Gomphrena globosa</i> | Pathum Thani N 14°08'9.2" E 100°53'34.2" (S.Sukkul) | <i>P. aspidiatrae</i> |
| Banana | Nakhon Sawan N 15°52'20.1" E 99°30'4.8" (C. Buamas) | <i>P. aspidiatrae</i> |
| Banana | Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas) | <i>P. aspidiatrae</i> |
| Frangipani | Khonkhen N 16°35'18.1" E 101°59'28.2" (C. Buamas) | <i>P. aspidiatrae</i> |
| <i>Gomphrena globosa</i> | Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| <i>Zinnia violacea</i> | Pathum Thani N 14°08'9.2" E 100°53'34.2" (S.Sukkul) | <i>P. strachani</i> |
| Cassava | Nakhon Sawan N 15°52'20.1" E 99°30'4.8" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Cassava | Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Cassava | Kamphaeng Phet N 16°8'29.1" E 99°34'48.0" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Cassava | Saraburi N 14°52'56.5" E 101°7'9.1" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Cassava | Nakhon Ratchasima N 14°23'45.0" E 101°41'22.2" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Cassava | Khonkhen N 16°35'18.1" E 101°59'28.2" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Snake plant | Maharakham N 16°04'38.7" E 103°09'24.4" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Cassava | Nong Khai N 18°2'39.8" E 102°20'11.5" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Cassava | Chachoengsao N 13°37'58.6" E 101°18'16.9" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |



Table 1 Host plant and location of samples in this study.(Continue)

| Host Plants | Locations | Species |
|-------------|--|---------------------|
| Cassava | Rayong N 12°57'23.7" E 101°3'9.3" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Cassava | Chonburi N 12°57'23.2" E 101°13'9.3" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Cassava | Ratchaburi N 13°32'28.9" E 99°22'37.8" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Cassava | Kanchanaburi N 14°31'56.0" E 99°32'13.0" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Frangipani | Tak N 17°2'54.9" E 99°4'3.5" (C. Buamas) | <i>P. strachani</i> |
| Fig | Pathum Thani N 14°08'9.2" E 100°53'34.2" (S. Sukkul) | <i>P. cockerlli</i> |
| Oleander | Uthai Thani N 15°28'48.1" E 99°52'42.3" (C. Buamas) | <i>P. cockerlli</i> |
| Lime | Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (S. Sukkul) | <i>U. citri</i> |
| Pomelo | Bangkok N 13°85'9.7" E 100°57'47.2" (S. Sukkul) | <i>U. citri</i> |
| Mangosteen | Nakhon Si Thammarat N 8°18'27.4" E 99°46'25.4" (C. Buamas) | <i>U. citri</i> |



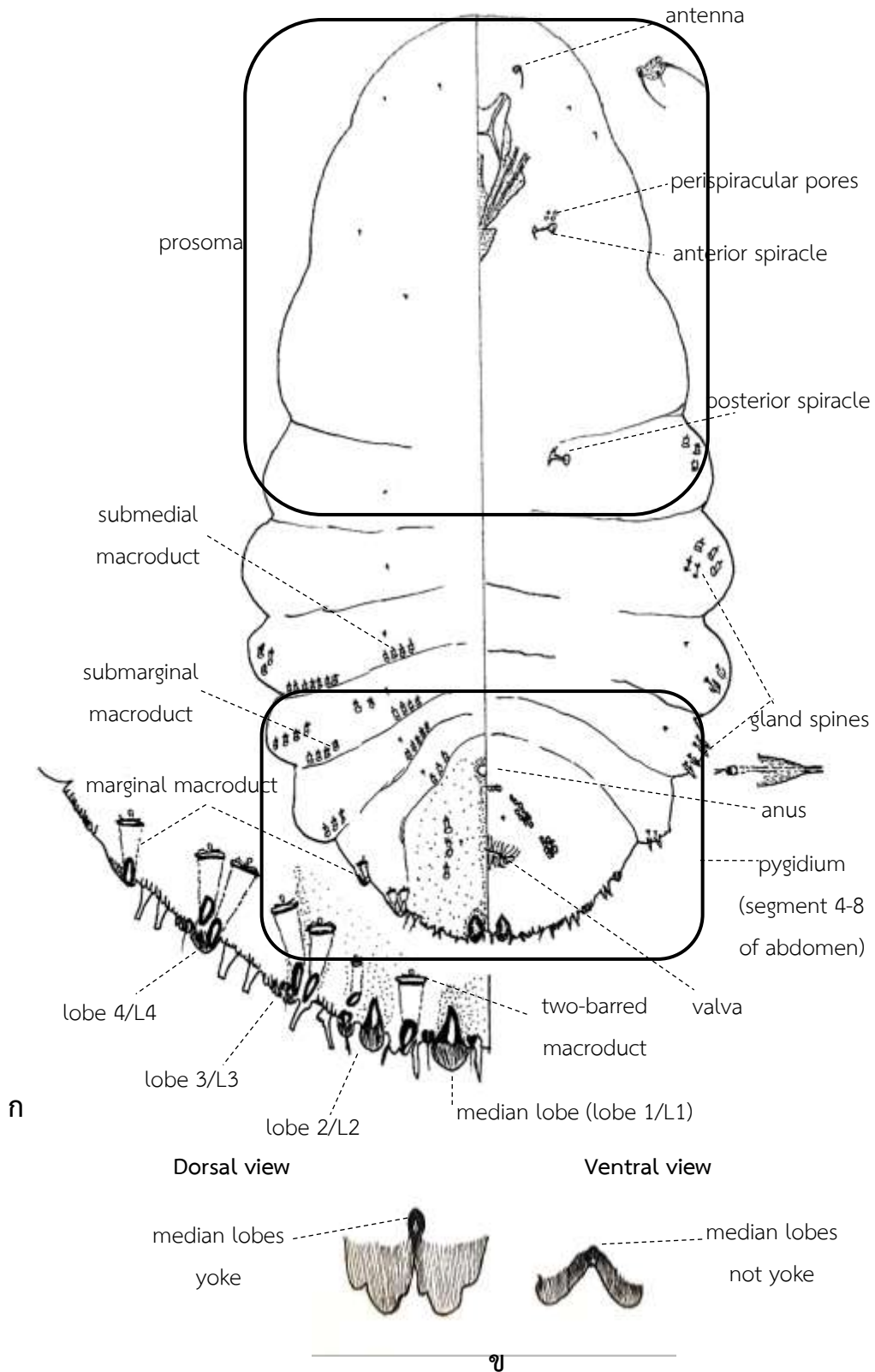


Figure 1 A) General morphology of slide – mounted adult female Diaspidinae
 B) Characters of median lobes basally

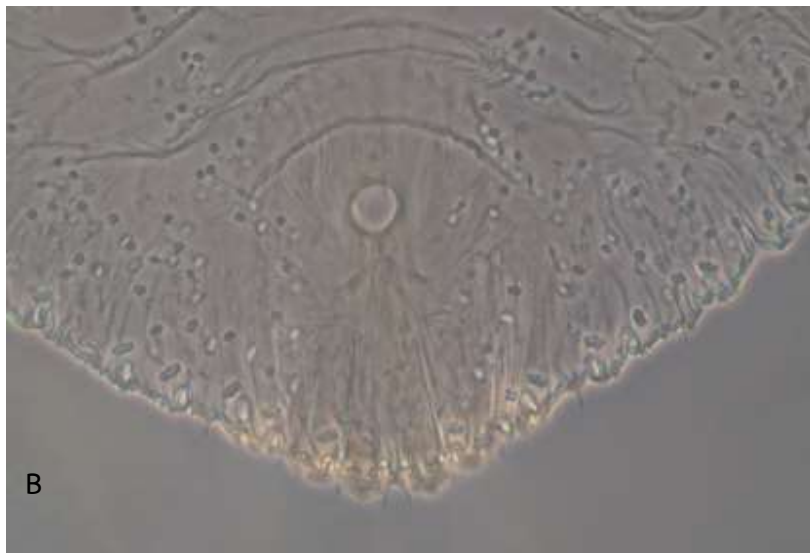
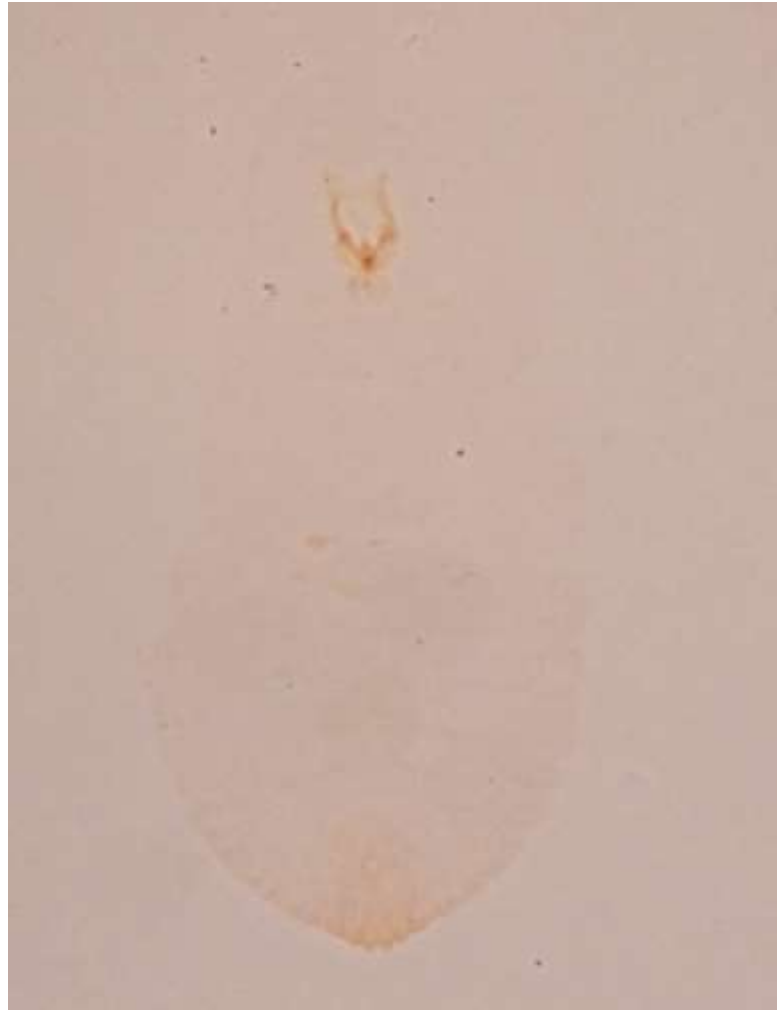


Figure 2 *Aonidomytilus albus* (Cockerell, 1893); A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium



Figure 3 *Aulacaspis rosae* (Bouché, 1833); A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium



Figure 4 *Aulacaspis tubercularis* Newstead, 1906; A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium



Figure 5 *Aulacaspis vitis* (Green, 1896); A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium

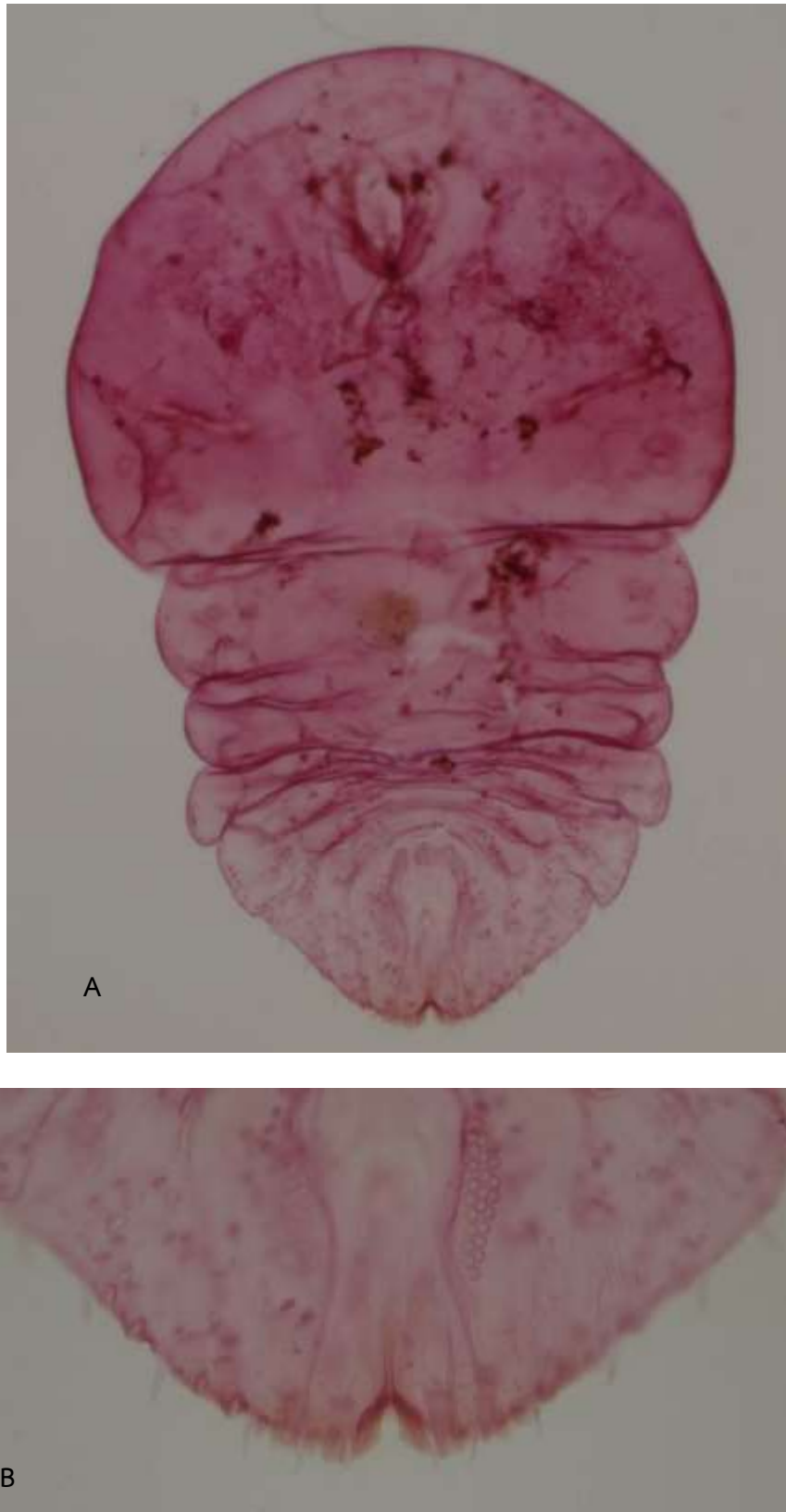


Figure 6 *Aulacaspis* sp.; A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium



Figure 7 *Diaspis bromeliae* (Kerner, 1778); A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium

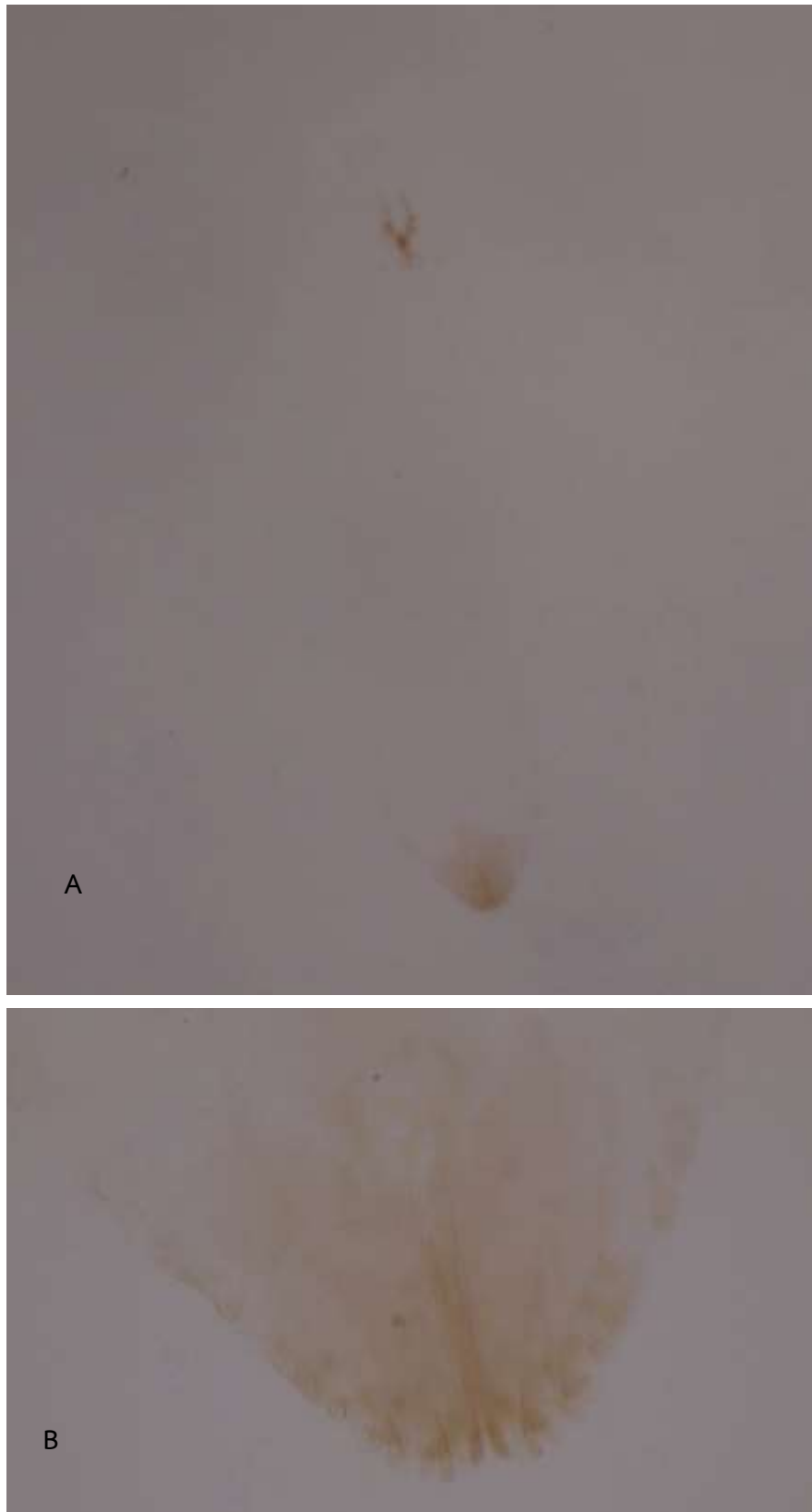


Figure 8 *Lepidosaphes gloverii* (Packard, 1869); A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium

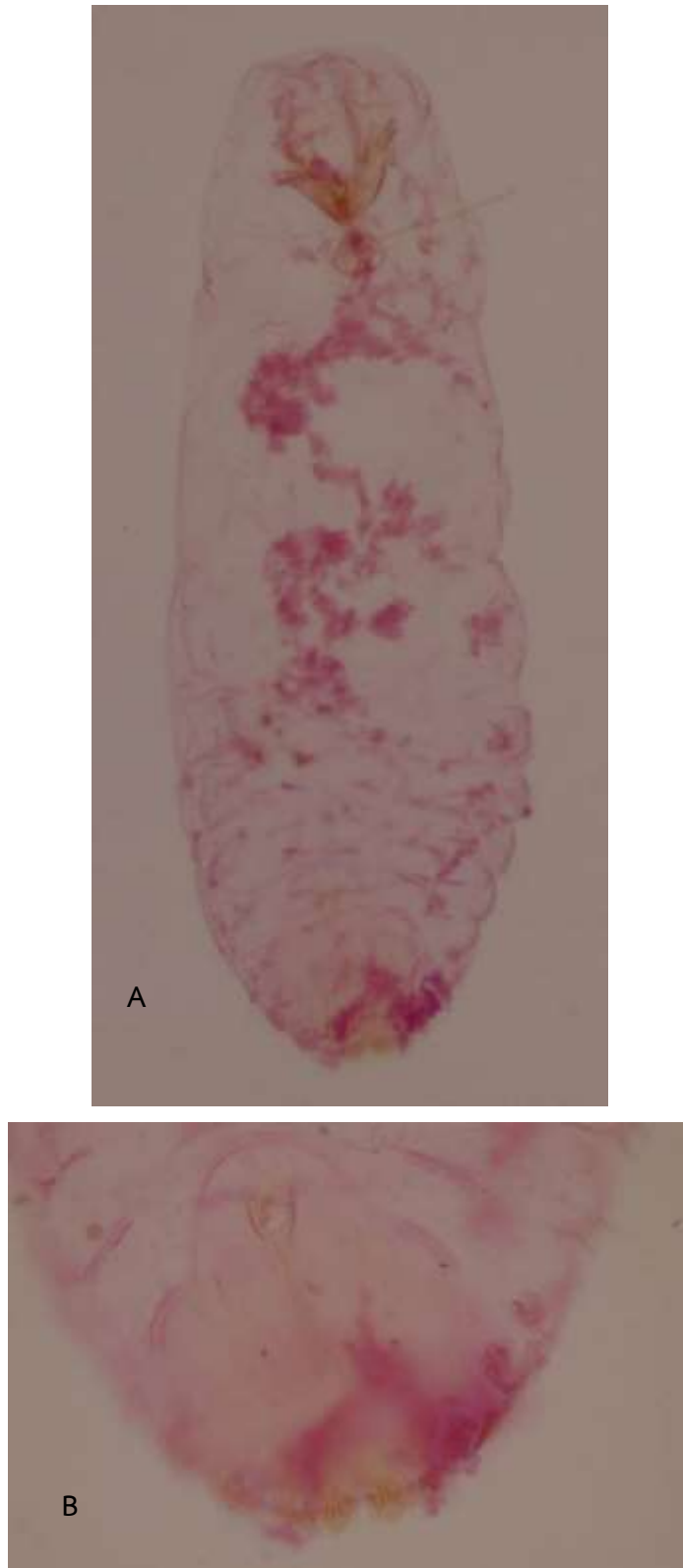


Figure 9 *Lepidosaphes* sp.; A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium

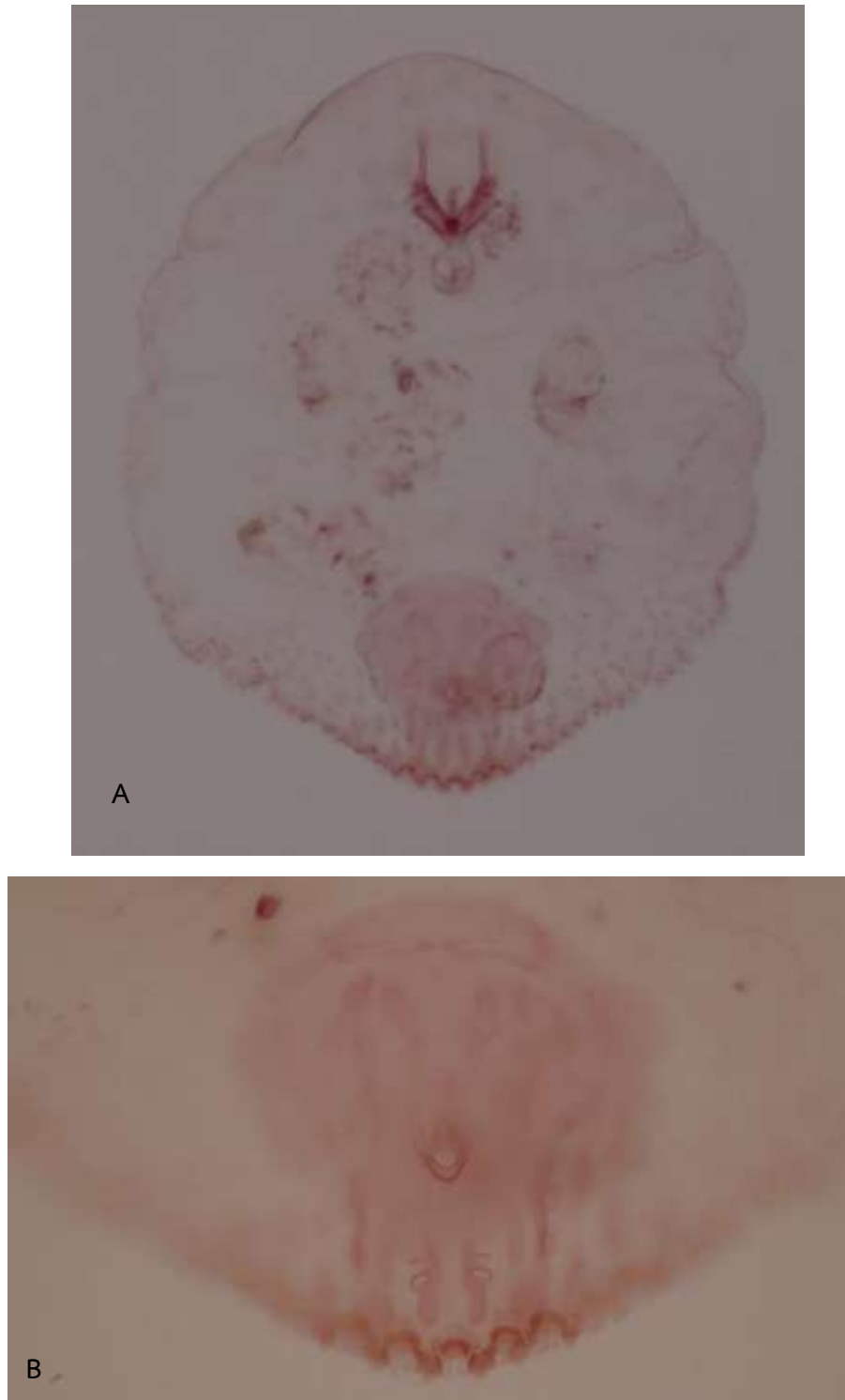


Figure 10 *Parlatoria pergandii* Comstock, 1881; A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium

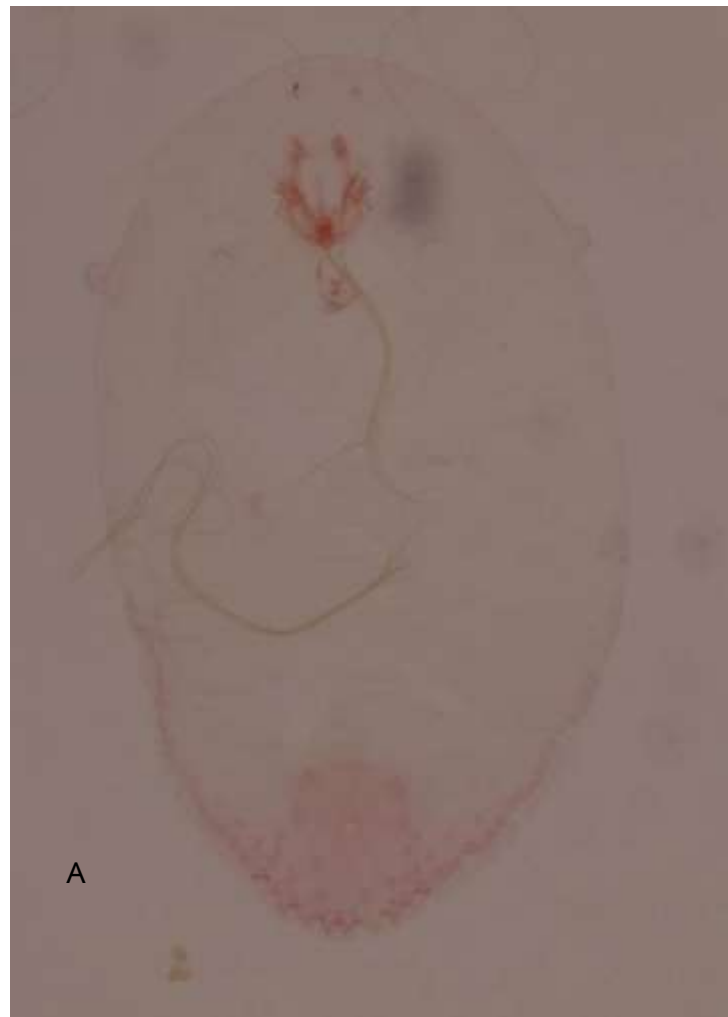


Figure 11 *Parlatoria ziziphi* (Lucas, 1853); A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium



Figure 12 *Pinnaspis aspidiatrae* (Signoret, 1869); A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium



Figure 13 *Pinnaspis strachani* (Cooley, 1899); A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium

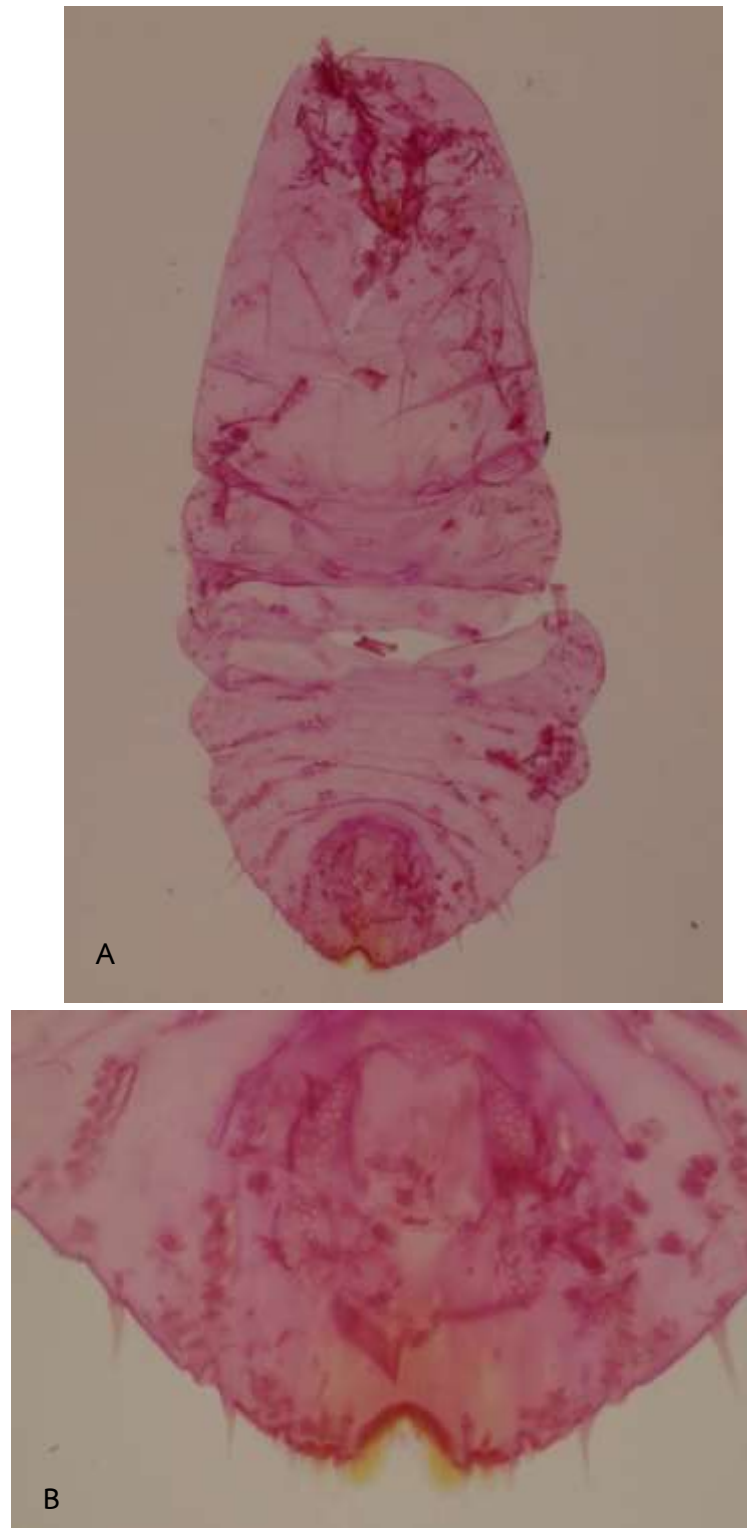


Figure 14 *Pseudaulacaspis cockerelli* (Cooley, 1897);

A) Microscope view of adult female

B) Microscope view of pygidium

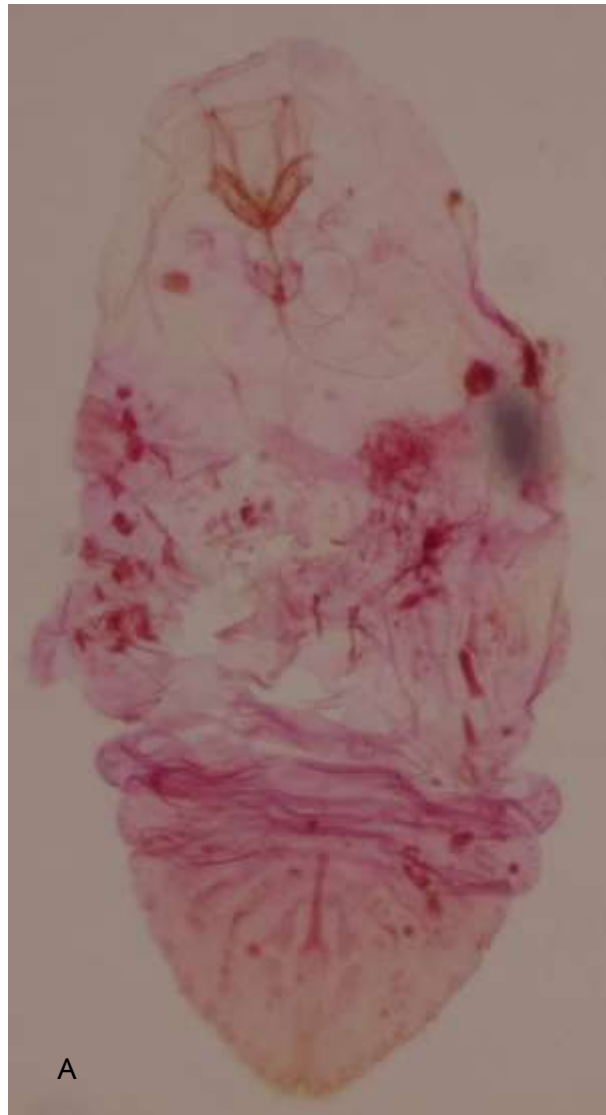


Figure 15 *Unaspis citri* (Comstock, 1883); A) Microscope view of adult female
B) Microscope view of pygidium



Figure 16 Field view of Diaspidinae; A) *Aonidomytilus albus* (Cockerell),
 B) *Aulacaspis rosae* (Bouche'), C) *A. tubercularis* (Newstead)
 D) *A. vitis* (Green), E) *Aulacaspis* sp., F) *Diaspis bromeliae* (Kerner)

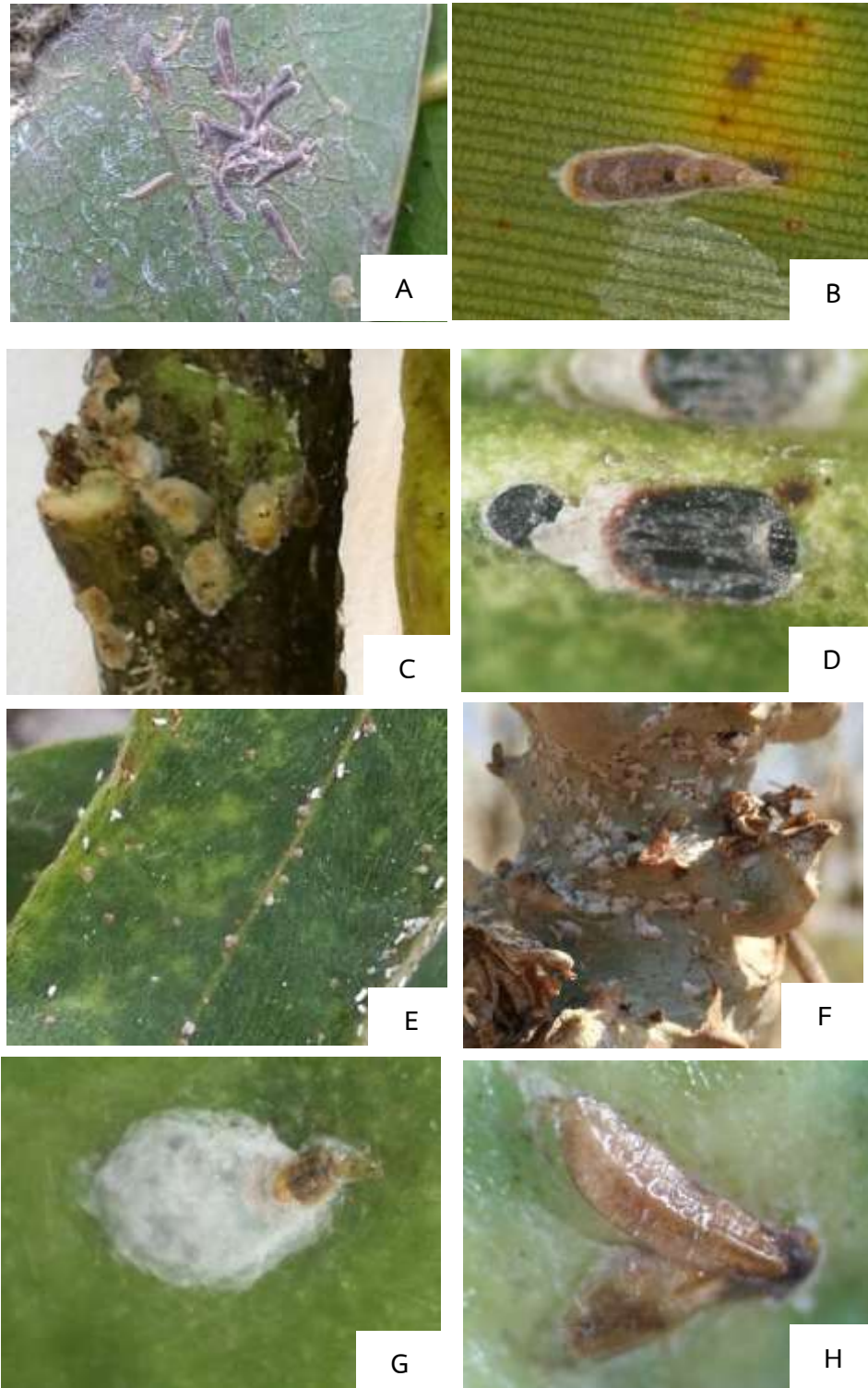


Figure 17 Field view of Diaspidinae; A) *Lepidosaphes gloverii* (Packard),
 B) *Lepidosaphes* sp., C) *Parlatoria pergandii* (Comstock),
 D) *P. ziziphi* (Locau), E) *Pinnaspis aspidiatrae* (Signorest),
 F) *P. strachani* (Cooley), G) *Pseudaulacaspis cockerelli* (Cooley),
 H) *Unaspis citri* (Comstock)

อนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae (Hemiptera: Coccoidea)
ในประเทศไทย

Taxonomy of Root Mealybug in the Family Rhizoecidae (Hemiptera:
Coccoidea) of Thailand

ชัยพร บัวมาศ ยูวรินทร์ บุญทบ จารุวัฒน์ แต่กุล

สุนัดดา เขาวลิต สิทธิศิริโรดม แก้วสวัสดิ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Survey and specimen collecting were carried out from various agricultural crops across Thailand. The descriptions of the species found, host plants, distribution as well as generic key to species are presented. The total of three genera and three identified species are revealed: 1) *Geococcus coffeae* Green 2) *Rhizoecus americanus* (Hambleton) 3) *Ripersiella saintpauliae* (Williams) and has provided key. All specimens from this research collect at Insect Museum, Department of Agriculture to improve a database of insect pests in Thailand. In addition, can be used as a key for inspection of various plants that are imported with planting material. In order to prevent alien pest species and prepare the most suitable method to management in the future.

Keywords : root mealybug, ground mealybug, subteranian mealybug, Rhizoecidae

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-18-62



รายงานผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๖๔ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae ดำเนินการระหว่างเดือน ตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ที่มีอยู่ใน ประเทศไทย เก็บรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทั่วทุกภูมิภาคในประเทศไทย นำตัวอย่างที่ รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงาน อนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิด ตัวอย่างเพลี้ยแป้งในราก จำนวน 95 ตัวอย่าง พบเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae จำนวน 3 สกุล 3 ชนิด ได้แก่ 1) *Geococcus coffeae* Green 2) *Rhizoecus americanus* (Hambleton) 3) *Ripersiella saintpauliae* (Williams) และได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัยพร้อมรายละเอียด โดยตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อจัดทำ ฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชในประเทศไทย นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการตรวจสอบการ นำเข้าพืชชนิดต่างๆ ที่มีการนำเข้าพร้อมวัสดุปลูกเพื่อป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นและความพร้อมในการหา แนวทางป้องกันกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสมในอนาคตต่อไป

คำหลัก : เพลี้ยแป้งในราก เพลี้ยแป้งในดิน เพลี้ยแป้งใต้ดิน วงศ์ Rhizoecidae

คำนำ

เพลี้ยแป้งหลายชนิดจัดเป็นเพลี้ยแป้งที่อาศัยอยู่ในดิน (subterranean mealybug) มักพบ อาศัยอยู่บริเวณส่วนรากของพืช ซึ่งมีอยู่หลายวงศ์ด้วยกัน ไม่ว่าจะเป็น วงศ์ Pseudococcidae และ Potuidae แต่วงศ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ Rhizoecidae (root mealybug หรือ ground mealybug) ทั่วโลกมีรายงานไว้จำนวน 18 สกุล 244 ชนิด ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบจำนวน 6 สกุล 41 ชนิด (Ben-Dov., et. al., 2014) ซึ่งพบว่ามีเพลี้ยแป้งในรากวงศ์นี้อาศัยอยู่ในดินเท่านั้น โดยดูดกินน้ำเลี้ยง บริเวณรากของพืชอาศัย และมีพืชอาศัยหลายชนิดโดยเฉพาะกลุ่มพืชเศรษฐกิจ ทั้งไม้ผล ไม้ยืนต้น และไม้ดอกไม้ประดับ (Hambleton, 1976) นอกจากนี้ในบางชนิดอาศัยอยู่ร่วมกับกับมด ซึ่งสามารถ สร้างความเสียหายให้แก่รากของพืชได้ หากพบประชากรของเพลี้ยแป้งเพิ่มปริมาณมากจนคลุมทั้ง บริเวณของรากซึ่งทำให้รากไม่สามารถหาอาหารได้ พืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ หรือชะงักการ เจริญเติบโตโดยไม่ทราบสาเหตุ และทำให้มีลักษณะผิดปกติต่าง ๆ เช่น ใบเหลือง ยอดแห้ง และยืนต้น ตาย สำหรับเพลี้ยแป้งในรากวงศ์ในประเทศไทยมีข้อมูลน้อยมากโดยเฉพาะข้อมูลในพืชเศรษฐกิจ

เนื่องจากเพลี้ยแป้งในรากวงศ์นี้มีขนาดค่อนข้างเล็กเมื่อเทียบกับเพลี้ยแป้งในรากวงศ์อื่นๆ ซึ่งอาจติดไปกับส่วนรากของพืชที่ใช้ในการขยายพันธุ์และสามารถส่งผลกระทบต่อทั้งด้านปริมาณและ คุณภาพของพืชโดยที่เกษตรกรไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริง และยังกระทบต่อมาตรการสุขอนามัย และ สุขอนามัยพืชในการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรไปยังประเทศคู่ค้าต่างๆ โดยเฉพาะการส่งหัวพันธุ์ และไม้ดอกไม้ประดับที่มีส่วนของรากติดไปโดยเฉพาะกลุ่มที่ส่งไปพร้อมวัสดุปลูก ดังนั้นการศึกษา



ด้านอนุกรมวิธานของเพ็ลี่ยแบ่งในรากนี้ทำให้สามารถจัดทำแนวทางการวินิจฉัยเพื่อทราบชนิด รวมทั้งพืชอาหารและเขตการแพร่กระจาย เพื่อสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืชที่พบในประเทศ การจัดทำแนวทางในการจำแนกชนิด รวมทั้งการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมเพื่อเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกร และนักวิชาการเกี่ยวข้องต่อไปสามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพ็ลี่ยแบ่งในรากที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช
2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดตอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ของกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง และถังรักษาความเย็น
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ (alcohol) 50-100% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% กรดแกลเซียลอะซิติก (glacial acetic acid) แอซิดฟุซซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) โคล์ฟออย (clove oil) และ แคนาดาบัลซัม (Canada balsam) เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล้องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope กล้องถ่ายภาพ และเครื่องระบุพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS)
5. อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotting และกระดาษเขียนแบบ
6. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพ็ลี่ยแบ่งในราก วงศ์ Rhizoecidae

วิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพ็ลี่ยแบ่งในราก โดยสำรวจแหล่งปลูกพืชที่สำคัญตามภูมิภาคต่างๆ ทั่วประเทศไทย เมื่อพบตัวอย่างเพ็ลี่ยแบ่งในราก ตัดชิ้นส่วนของรากที่มีเพ็ลี่ยแบ่งอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก และใช้วิธีการสังเกตอาการต่างๆ เช่น ใบร่วง ยอดแห้ง ยืนต้นตายโดยไม่ทราบสาเหตุ และทำการชุดบริเวณราก นอกจากนี้จะใช้วิธีการชุดดินบริเวณรอบๆ รากของต้นพืช นำไปแยกแมลงโดยใช้ Berlese funnel เพื่อช่วยในการแยกแมลง บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์(GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุด จะเก็บให้ได้ตัวอย่างมากที่สุด เพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการและจัดทำสไลด์ถาวรในการจำแนกชนิดต่อไป

2. นำตัวอย่างเพ็ลี่ยแบ่งในรากที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะและสีของเพ็ลี่ยแบ่งในรากก่อนทำสไลด์ถาวร บันทึกข้อมูลหมายเลข (LOT. number) ตัวอย่างในแต่ละครั้งที่พบอย่างละเอียดโดยจะแยกเป็นชนิดศัตรูพืช พืชอาศัย และสถานที่ แล้วดองในแอลกอฮอล์ 70%



3. นำตัวอย่างเปลือกแบ่งในรากเทศเมีย จากข้อ 2) ไปทำสไลด์ถาวรเพื่อจำแนกชนิด โดยใช้ตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่างต่อหมายเลข (LOT. number) หากมีปริมาณเพียงพอ

4. วิธีการทำสไลด์ถาวร

4.1 ใช้เข็มเย็บเจาะบริเวณกลางส่วนท้องของตัวอย่างเปลือกแบ่งในราก

4.2 นำไปแช่สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% ใช้เวลา ประมาณ 12-24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับขนาดตัวอย่าง

4.3 นำตัวอย่างเปลือกแบ่งในรากย้ายลงในน้ำกลั่น กดเบา ๆ บนลำตัวด้วยเข็มตัดปลายโค้ง เพื่อให้ไข่ ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมันตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2 – 3 นาที

4.4 ย้ายลงในกรดแอลกอฮอล์ (acid alcohol) ซึ่งเป็นสารละลายของกรดแกลซีลอะซิดิก 1 ส่วน และแอลกอฮอล์ 50% 4 ส่วน แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

4.5 ย้อมสีตัวอย่างโดยแช่ในน้ำย้อมสี ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) และน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง

4.6 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

4.7 ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

4.8 นำตัวอย่างเปลือกแบ่งในรากวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟออยส่วนที่เกินออก หยดแคนาดาบัลซั่ม (Canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่างให้สวยงามไม่ปิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

4.9 นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอย่างน้อย 3 เดือน ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง

5. ตรวจจำแนกชนิดเปลือกแบ่งในรากบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Williams (2004) Hodgson (2012) Jansen (2003) Jansen and Westenberg (2015) และ Tanaka (2016) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างสไลด์เปลือกแบ่งในรากที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรและวาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเปลือกแบ่งในรากแต่ละชนิด และจัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดเปลือกแบ่งในราก วงศ์ *Rhizoecidae* ซึ่งจะนำตัวอย่างสไลด์ที่ได้ มาเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ของลำตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง ตรวจสอบดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ รูปทรงของลำตัว จำนวนปล้องหนวด (antennae) ไม่เกิน 6 ปล้อง ความยาวของหนวดปล้องสุดท้าย ลักษณะของท่อที่มี 3 ช่องประกบกันหรือพันเป็นเกลียว (tritubular duct) มีเพียง 2 ช่องประกบกันหรือพันเป็นเกลียว (bitubular duct) ลักษณะของท่อที่มี 3 ช่องยื่นยาวมาจากผนังลำตัว (tritubular cerores) ท่อที่มี 2 ช่องยื่นยาวมาจากผนังลำตัว (bitubular cerores) ช่องเปิดที่มีลักษณะคล้ายรอย



แตกตามขวางของลำตัว (ostioles) ช่องเปิด (pores) รูปแบบต่างๆ ได้แก่ ช่องเปิดรูปวงกลม (multilocular disc pore) ช่องเปิดรูปสามเหลี่ยม (trilocular disc pore) รูวงกลม (curculi) การปรากฏของส่วนต่างๆ บนผนังลำตัวด้านหลัง (dorsum) หรือ ผนังลำตัวด้านท้อง (venter) และ ลักษณะของลอนปลายส่วนท้อง (anal lobe) แผ่นแข็งบริเวณลอนปลายส่วนท้อง (sclerotized anal lobes) วงแหวนปลายส่วนท้อง (anal ring) จำนวนเส้นขนบนวงแหวนปลายส่วนท้อง (anal ring setae) นำลักษณะที่สำคัญเหล่านี้มาเพื่อเปรียบเทียบกับในแต่ละชนิด หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลต่างๆ ที่ได้รวบรวมจัดทำแนวทางวินิจฉัยระดับสกุลและระดับชนิดของเพลี้ยแป้งในรากวงค์นี้ และยังมีข้อมูล การแพร่กระจาย พร้อมพีชอาศัย

6. การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพลี้ยแป้งในรากเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพีชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

7. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำไปเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล และจัดทำบาร์โค้ด (barcode) ของตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากแต่ละสไลด์เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

เวลาสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2561 ถึง เดือนกันยายน 2564

- สถานที่
1. แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคตะวันตกและภาคใต้
 2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในพื้นที่เขตภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดสมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี ปทุมธานี นนทบุรี กรุงเทพฯ เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม ขอนแก่น อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร และอุบลราชธานี เขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง และภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร นครศรีธรรมราช และระนอง จากแปลงปลูกพืชต่าง ๆ ได้แก่ ทูเรียน มังคุด มะม่วง น้อยหน่า จิง ข่า ไผ่เขียน ปทุมมา ขวนชม ลิ้นมังกร ว่านงาช้าง และวัชพืช นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง



กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่าง เพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae จำนวน 95 ตัวอย่าง พบทั้งสิ้น 3 สกุล 3 ชนิด ได้แก่ 1) *Geococcus coffeae* Green 2) *Rhizoecus americanus* (Hambleton) 3) *Ripersiella saintpauliae* (Williams) ซึ่งได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัย (key) และรายละเอียดของเพลี้ยแป้งใน รากทั้ง 3 ชนิด ดังต่อไปนี้

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae

- มีแผ่นแข็งที่หนามากบริเวณปลายส่วนท้อง ท่อที่มี 3 ท่อประกบกันเป็นรูปทรงสามเหลี่ยม มีขน แข็งจำนวน 1 คู่บริเวณระหว่างลอนปลายส่วนท้องทั้ง 2 อันและมีอีก 1 คู่บริเวณขอบของส่วนหัวตรง ข้ามกับหนดพบบนผนังลำตัวด้านหลังเท่านั้น *Geococcus coffeae* Green
- ไม่มีแผ่นแข็งบริเวณปลายส่วนท้องหรืออาจจะมีเพียงบางๆ มีท่อที่มี 3 ท่อพันเป็นเกลียวและท่อที่มี 2 ท่อพันเป็นเกลียว2
- พบท่อที่มี 3 ท่อยื่นยาวมาจากผนังลำตัวด้านหลังมีขนาดใหญ่ที่สุด ท่อที่มี 3 ท่อยื่นยาวมาจากผนัง ลำตัวด้านหลังมี 2 ขนาดแต่มีขนาดเล็กกว่าที่พบบนผนังลำตัวด้านหลังอย่างชัดเจน.....
..... *Rhizoecus americanus* (Hambleton)
- พบท่อที่มี 2 ท่อยื่นยาวมาจากผนังลำตัวด้านหลังมีลักษณะอ้วน ท่อที่มี 2 ท่อยื่นยาวมาจากผนัง ลำตัวด้านหลังมีขนาดที่เล็กกว่าที่พบบนผนังลำตัวด้านหลังมาก.....*Ripersiella saintpauliae* (Williams)

1. Genus *Geococcus* Green, 1902

Geococcus Green, 1902: 262. Type species: *Geococcus radicum* Green by original designation.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปทรงยาวรี หรือรูปไข่กว้าง ลอนปลายส่วน ท้องเห็นได้ชัดเจน มีแผ่นแข็งขนาดใหญ่และหนาล้อมรอบ หนดค่อนข้างสั้น มีจำนวน 6 ปล้อง หนด ปล้องสุดท้ายมีความยาวมากกว่าปล้องอื่นๆ ไม่มีตา รวงกลม มี 3 จุด ได้แก่ จุดกึ่งกลางของอกปล้องที่ 3 (metathorax) ท้องปล้องที่ 2 และ 3 มีขนแข็งบนส่วนหัวของผนังลำตัวด้านหลังตรงข้ามกับหนด และระหว่างลอนปลายส่วนท้อง มีท่อที่มี 3 ท่อประกบกันเป็นลักษณะรูปทรงสามเหลี่ยม โดยไม่มี ลักษณะของท่อที่ยื่นยาวออกมาจากผนังลำตัว

Geococcus coffeae Green, 1933

(Figure 1 และ 2)

ชื่อพ้อง : *Geococcus coffeae* Green, 1933

ชื่อสามัญ : เพลี้ยแป้งรากกาแฟ (coffee root mealybug)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ : บริเวณของลอนปลายส่วนท้องมีแผ่นแข็งค่อนข้างหนาและมี ขนาดใหญ่ล้อมรอบ ปลายของลอนมีลักษณะเป็นหนามแข็งยาว ส่วนฐานค่อนข้างอ้วนและมีปลายยาว



แหลม มีขนแข็ง 1 บริเวณระหว่างลอนปลายส่วนท้องทั้ง 2 อันและมีอีก 1 คู่บริเวณขอบของส่วนหัว ตรงข้ามกับหนวด ส่วนผนังลำตัวด้านท้องปรากฏท่อที่มี 3 ท่อประกบกันเป็นลักษณะรูปทรงสามเหลี่ยมโดยไม่มีลักษณะของท่อที่ยื่นยาวออกมาจากผนังลำตัว และมีขนาดใหญ่กว่าขนาดที่พบบนผนังลำตัวด้านท้องอย่างชัดเจน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา : Thailand, 5 females; Mahasarakham N 16°04'38.7"

E 103°09'24.4" (C. Buamas), 7 females; Chiang Mai N 18°2'39.8" E 102°20'11.5"

(C. Buamas), 3 females; Prachuap Khiri Khan N 11°54'13.1" E 099°46'46.7" (C. Buamas)

พืชอาหาร พบอาศัยอยู่บริเวณรากของต้นไมยราบยักษ์ หลู่ข้าวชืดใบมอน

การแพร่กระจาย จังหวัดเชียงใหม่ ประจวบคีรีขันธ์ มหาสารคาม

2. Genus *Rhizoecus* Kunckel d'Herculais, 1878

Rhizoecus Kunckel d'Herculais, 1878: 163. Type species: *Rhizoecus falcifer* Kunckel d'Herculais

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปทรงยาวรี หรือรูปไข่กว้าง หนวด มีจำนวน 5 - 6 ปล้อง ขาเจริญเติบโตดี ปรากฏท่อที่มี 3 ท่อพื้นเป็นเกลียวและยื่นยาวมาจากผนังลำตัวด้านหลัง และผนังลำตัวด้านท้อง ลอนปลายส่วนท้องเห็นได้ชัดเจน วงแหวนปลายส่วนท้องมีขนยาว จำนวน 6 เส้น ไม่มีแผ่นแข็งบริเวณลอนปลายส่วนท้อง

Rhizoecus americanus (Hambleton, 1946)

(Figure 3 และ 4)

ชื่อพ้อง : *Morrisonella americana* Hambleton, 1946

Rhizoecus americanus (Hambleton, 1946)

ชื่อสามัญ : เพลี้ยแป้งในราก (root mealybug)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปทรงยาวรี หนวด มีจำนวน 5-6 ปล้อง ขาเจริญดี ลอนปลายส่วนท้องเห็นได้ชัดเจน วงแหวนปลายส่วนท้องมีขนยาว จำนวน 6 เส้น ตา 1 คู่ ผนังลำตัวด้านหลังปรากฏลักษณะของท่อที่มี 3 ท่อยื่นยาวมาจากผนังลำตัวมีความกว้างกว่าขนาดของรูรูปวงกลม ผนังลำตัวส่วนท้องปรากฏลักษณะของท่อที่มี 3 ท่อยื่นยาวมาจากผนังลำตัว มี 2 ขนาดที่แตกต่างกันแต่มีขนาดเล็กกว่าที่ปรากฏบนผนังลำตัวด้านหลังอย่างชัดเจน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา : Thailand, 10 females; Bangkok N 13°51'14.7" E 100°34'32.4"

(C. Buamas), 10 females; Pathum Thani (S. Sukkul), 5 females; Nakhon Pathom

N 14°00'39.7" E 99°58'51." (C. Buamas), 5 females; Ratchaburi N 13°30'55.2" E

99°23'19.3" (C. Buamas), 15 females; Mahasarakham N 16°04'38.7" E 103°09'24.4"



(C. Buamas), 5 females; Chiang Mai N 18°60'52.0" E 98°89'21.0" (C. Buamas), 10 females; Chiang Rai, N 19°54'02.6" E 99°58'46.8" (C. Buamas), 10 females; Chumphon N 10°20'34.9" E 99°4'45.5" (C. Buamas)

พืชอาหาร พบอาศัยอยู่บริเวณรากของต้นโป๊ยเซียน ลิ้นมังกรแคระ ว่านงาช้าง ว่านเงินไหลมา ตะไคร้ บริเวณหัวของต้นปทุมมา

การแพร่กระจาย กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครปฐม ราชบุรี มหาสารคาม เชียงใหม่ เชียงราย ชุมพร

3. Genus *Ripersiella* Tinsley, 1899

Ripersiella Tinsley 1899m: 278. Type species: *Ripersia rumicis* Maskell by original designation.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปทรงยาวรี หนวด มีจำนวน 5 - 6 ปล้อง มีตา 1 คู่ ขาเจริญดี ปรากฏท่อที่มี 2 ท่อพันเป็นเกลียวและยื่นยาวมาจากผนังลำตัวด้านหลัง และผนังลำตัวด้านท้อง ลอนปลายส่วนท้องเห็นได้ชัดเจน วงแหวนปลายส่วนท้องมีขนยาว จำนวน 6 เส้น อาจปรากฏลักษณะของแผ่นแข็งล้อมรอบลอนปลายส่วนท้องขนาดเล็กบางๆ

Ripersiella saintpauliae (Williams, 1985)

(Figure 5 และ 6)

ชื่อพ้อง : *Rhizoecus saintpauliae* Williams, 1985

ชื่อสามัญ : เพลี้ยแป้งในราก (root mealybug)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ : ตัวเต็มวัยเพศเมียรูปทรงยาวรี หนวด มีจำนวน 5 ปล้อง ขาเจริญเติบโตดี ลอนปลายส่วนท้องเห็นได้ชัดเจน มีแผ่นแข็งบางและขนขนาดยาว จำนวน 3 เส้นในแต่ละลอน มีวงแหวนปลายส่วนท้องมีขนปรากฏอยู่ จำนวน 6 เส้น ปรากฏท่อที่มี 2 ท่อยื่นยาวมาจากผนังลำตัว ด้านหลังมีขนาดใหญ่กว่าที่ปรากฏบนผนังลำตัวด้านท้องอย่างชัดเจน

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา : Thailand, 5 females; Mahasarakham N 16°31'44.6" E 102°14'29.3" (C. Buamas), 5 females; Bangkok Bangkok N 13°51'14.7" E 100°34'32.4" (C. Buamas) 3 females; Nonthaburi (C. Buamas), 2 females; Prachuap Khiri Khan N 11°54'13.1" E 099°46'46.7" (C. Buamas)

พืชอาหาร พบอาศัยอยู่บริเวณรากของต้นชวนชม ต้นกล้วยาคา บริเวณหัวของต้นปทุมมา

การแพร่กระจาย กรุงเทพฯ นนทบุรี มหาสารคาม ประจวบคีรีขันธ์

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้นอกจากตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากวงศ์ Rhizoecidae แล้ว ยังพบเพลี้ยแป้งในวงศ์ Pseudococcidae ที่สามารถสามารถอยู่บริเวณรากของพืชชนิดต่างๆ ได้ เช่น เพลี้ยแป้งสับประรดสีชมพู *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) พบในรากของต้นผักบุ้ง จ. มหาสารคาม มีรายงานพบในส่วนต่างๆของต้นสับประรดทั้งในส่วนของราก ลำต้น กาบใบ หรือในส่วนของผลสับประรด และเพลี้ยแป้ง *Formicococcus* sp. ที่พบในรากต้นมะม่วง จ. เชียงใหม่ ซึ่งเพลี้ย



แป้งชนิดนี้เป็นแป้งที่อาศัยอยู่เฉพาะในบริเวณรากของต้นพืชเท่านั้น จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างจะเห็นได้ว่าแป้งในรากวงศ์ Rhizoecidae ที่พบเป็นแป้งในรากที่มีขนาดเล็กมาก เมื่อเทียบกับแป้งที่พบในรากวงศ์ Pseudococcidae ปริมาณตัวอย่างที่พบมีจำนวนค่อนข้างน้อยในแต่ละจุดที่ และการเก็บตัวอย่างเป็นไปได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากส่วนใหญ่พืชที่มีแป้งในรากอาศัยอยู่หากมีปริมาณไม่มากจะไม่มีลักษณะอาการบ่งชี้ถึงความผิดปกติ จนกว่าจะมีการระบาดที่หนาแน่นจนทำให้สังเกตเห็นอาการได้ และพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นกลุ่มพืชที่เป็นพืชผัก หรือไม้ดอกไม้ประดับที่มีการปลูกในกระถาง ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างได้ง่ายโดยการสุมถอนพืชผักขึ้นมาทั้งต้นและราก หรือการถอนออกมาจากกระถางซึ่งลักษณะแป้งสีขาว คล้ายเส้นใย หรือเชื้อรา แต่เมื่อส่องได้กล้องจุลทรรศน์แล้วจะพบว่าเป็นแป้งในรากนั่นเอง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae ในพื้นที่ 29 จังหวัด ในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาค ภาคตะวันตก และภาคใต้จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ได้แก่ ทูเรียน มังคุด มะม่วง น้อยหน่า ชিং ข่า โป๊ยเซียน ปทุมมา ชวนชม ลิ้นมังกร ว่านงาช้าง และวัชพืช นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างแป้งในราก จำนวน 95 ตัวอย่าง พบจำนวน 3 สกุล 3 ชนิด ได้แก่ 1) *Geococcus coffeae* Green 2) *Rhizoecus americanus* (Hambleton) และ 3) *Ripersiella saintpauliae* (Williams) ซึ่งได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัย (key) และรายละเอียดของแป้งในรากทั้งระดับสกุลและชนิด โดยตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชในประเทศไทยต่อไป และจากการเก็บตัวอย่างบางส่วนที่พบแป้งในรากของไม้กระถาง เช่น ชวนชม โป๊ยเซียน ลิ้นมังกรแคระ ว่านงาช้าง เป็นต้น ถือเป็นข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ในการเฝ้าระวังหรือเพิ่มเติมมาตรการในการตรวจสอบการนำเข้าพืชชนิดต่างๆ ที่มาพร้อมวัสดุปลูกเพื่อลดความเสี่ยงของศัตรูพืชต่างถิ่นที่จะเข้ามาในประเทศไทยอีกด้วย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ และลูกจ้างกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บและเตรียมตัวอย่างทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ



เอกสารอ้างอิง

- Ben-Dov, Y., Miller, D.R. and Gibson, G.A.P. 2014. ScaleNet: a database of the scale insects (Hemiptera; Coccoidea) *of the world*. ผิดพลาด! การอ้างอิงไฮเปอร์ลิงก์ไม่ถูกต้อง accessed May 2014.
- Hodgson, C.J. 2012. Comparison of the morphology of the adult males of the rhizoecine, phenacoccine and pseudococcine mealybugs (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea), with the recognition of the family Rhizoecidae Williams. *Zootaxa* 3291:1–79
- Jansen, M.G.M. 2003. A new species of *Rhizoecus* Kunkel d'Herculais (Hemiptera, Coccoidea, Pseudococcidae) on bonsai trees. *Tijdschrift voor Entomologie* 146: 297–300
- Jansen, M.G.M. and Westenberg, M. 2015. Morphological and molecular studies of a new species of the root mealybug genus *Ripersiella* Tinsley (Hemiptera: Coccoidea: Rhizoecidae) from greenhouses in The Netherlands and a first incursion of the American root mealybug *Rhizoecus keysensis* Hambleton in Europe. *Tijdschrift voor Entomologie* 158 :1-19
- Tanaka, H. 2016. A new genus and species of Rhizoecidae (Hemiptera, Sternorrhyncha, Cocomorpha) associated with *Acropyga yaeyamensis* (Hymenoptera, Formicidae, Formicinae). *ZooKeys* 616:115–124
- Williams, D.J. 2004. *Mealybug of Southern Asia*. The Natural History Museum, Kuala Lumpur: Southdene SDN. BHD, 896 pp.



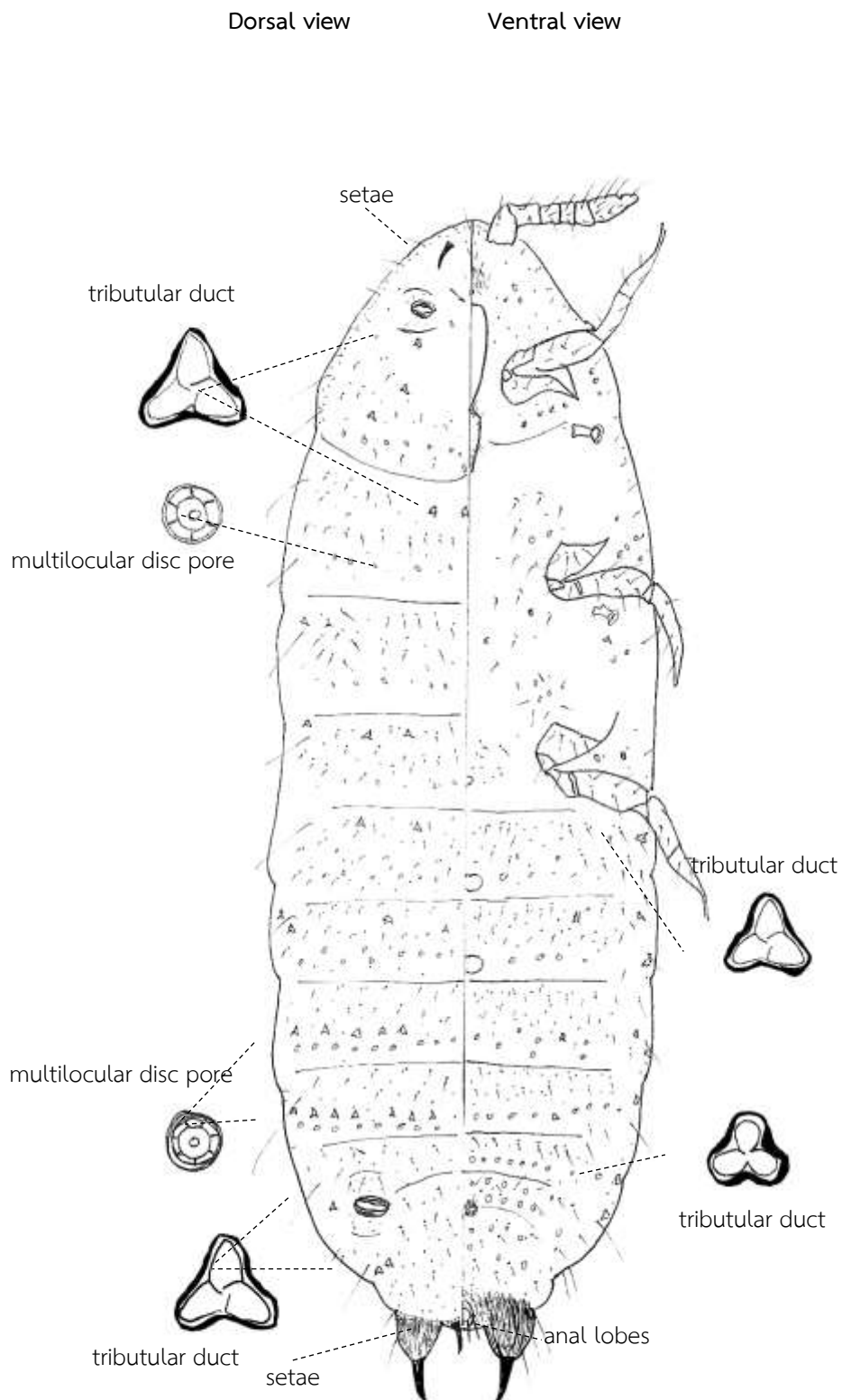


Figure 1 Morphology of slide-mounted adult female of *Geococcus coffeae* Green, 1933



Figure 2 Microscope view of *Geococcus coffeae* Green, 1933

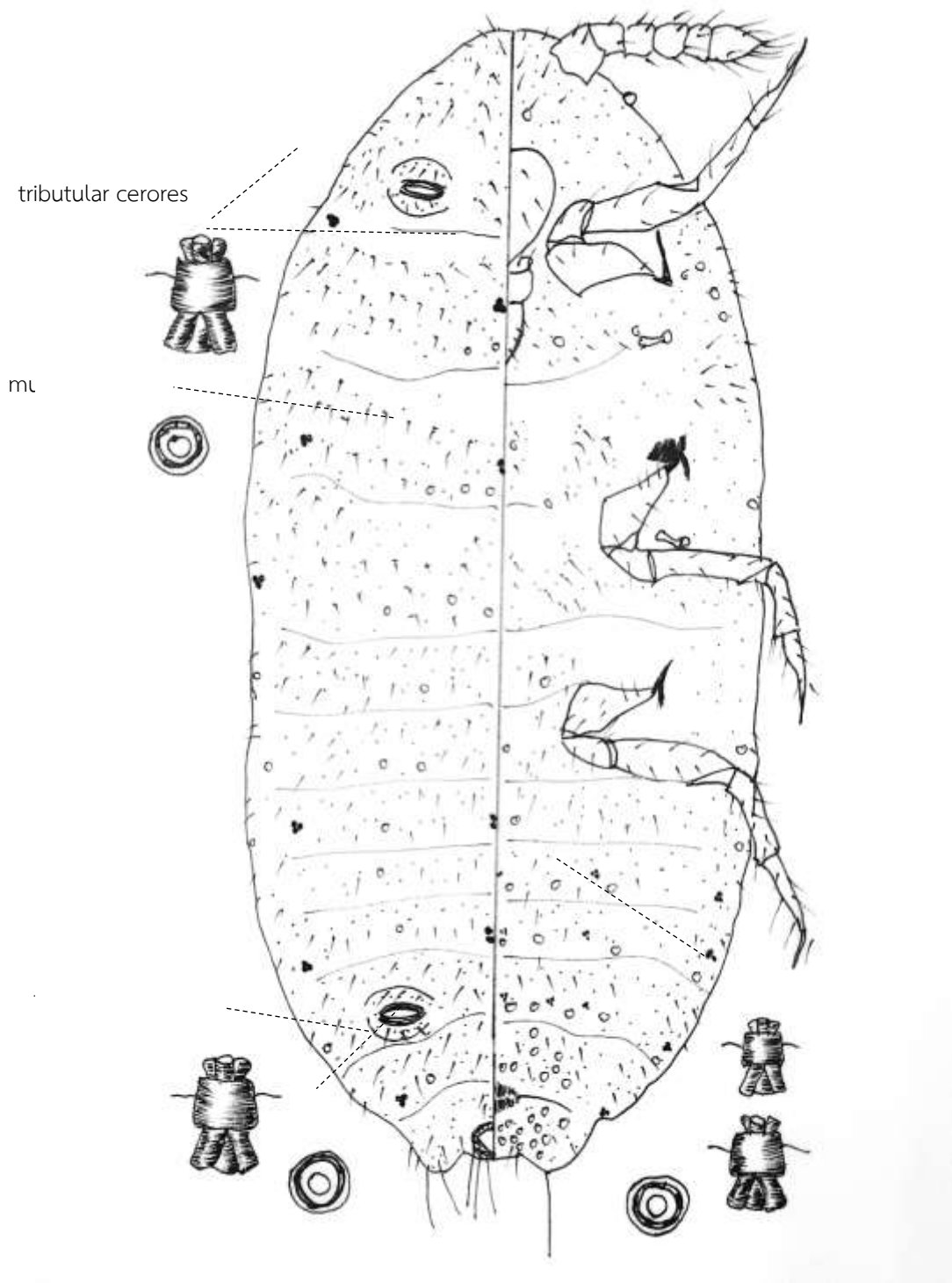


Figure 3 Morphology of slide-mounted adult female of *Rhizoeus americanus* (Hambleton, 1946)

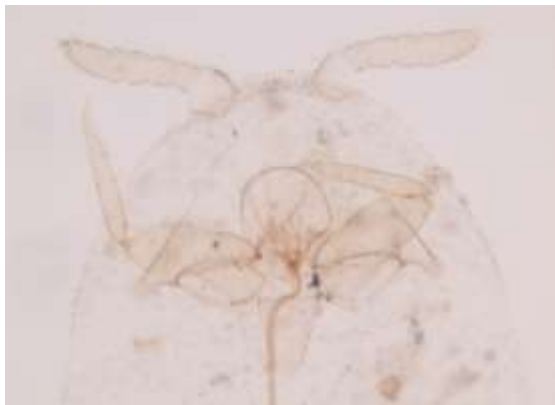
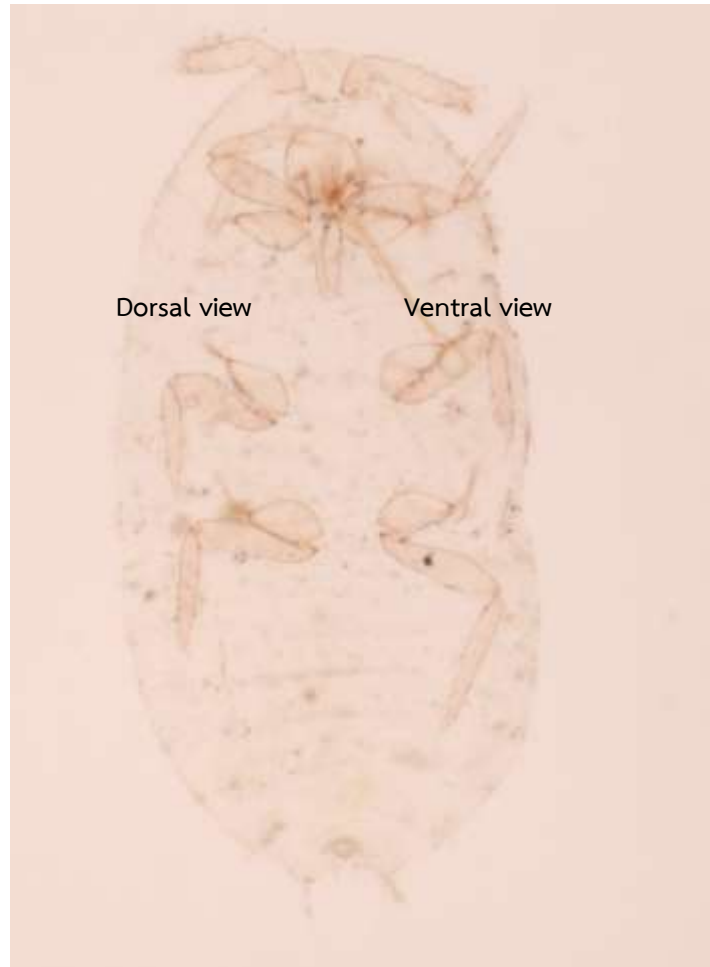


Figure 4 Microscope view of *Rhizoecus americanus* (Hambleton, 1946)

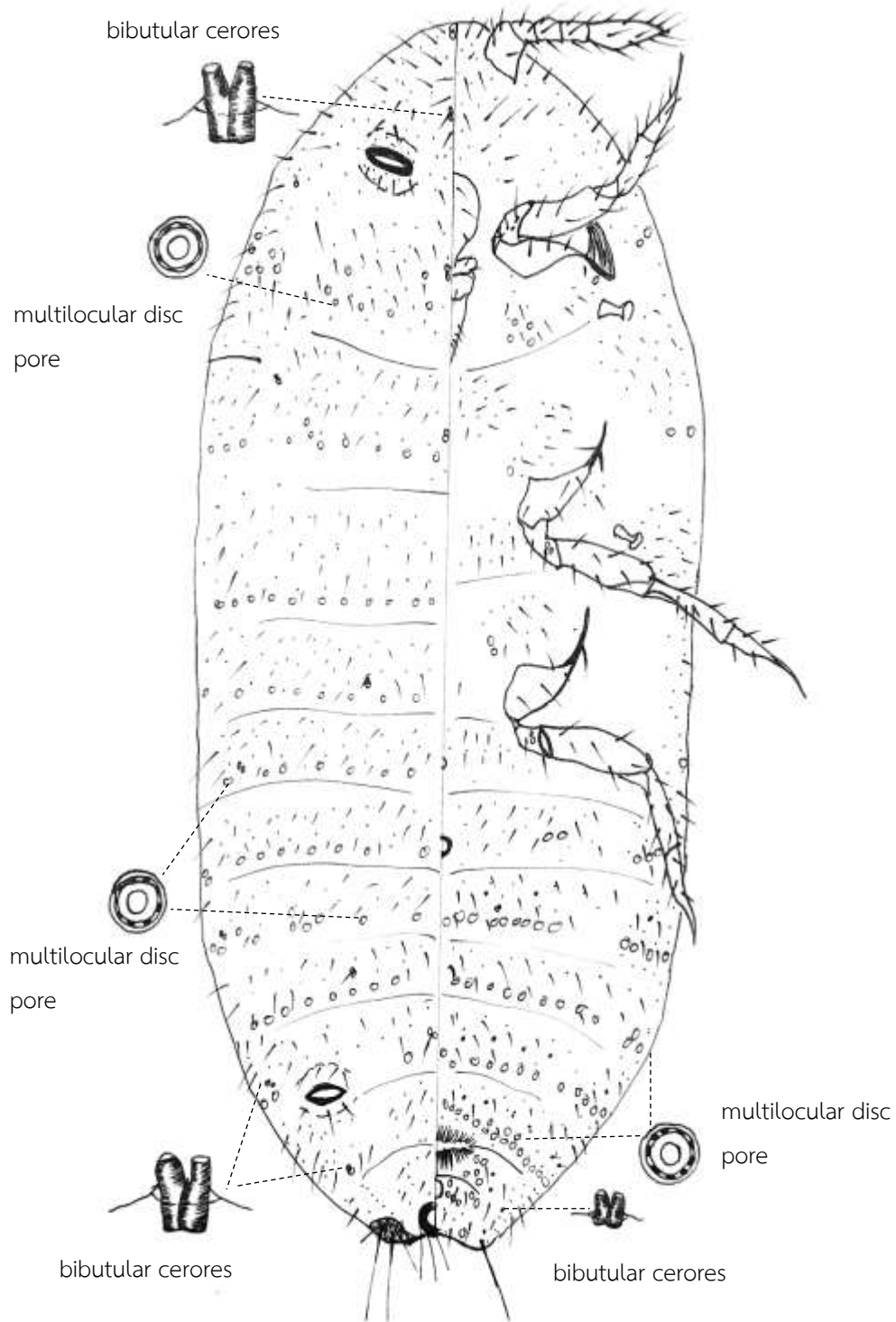


Figure 5 Morphology of slide-mounted adult female of
Ripersiella saintapauliae (Williams, 1985)



Figure 6 Microscope view of *Rhizoecus americanus* (Hambleton, 1946)



Figure 7 Field view of Rhizoecidae: A) - C) *Rhizoecus americanus* (Williams)
D) *Ripersiella saintpauliae* (Williams)

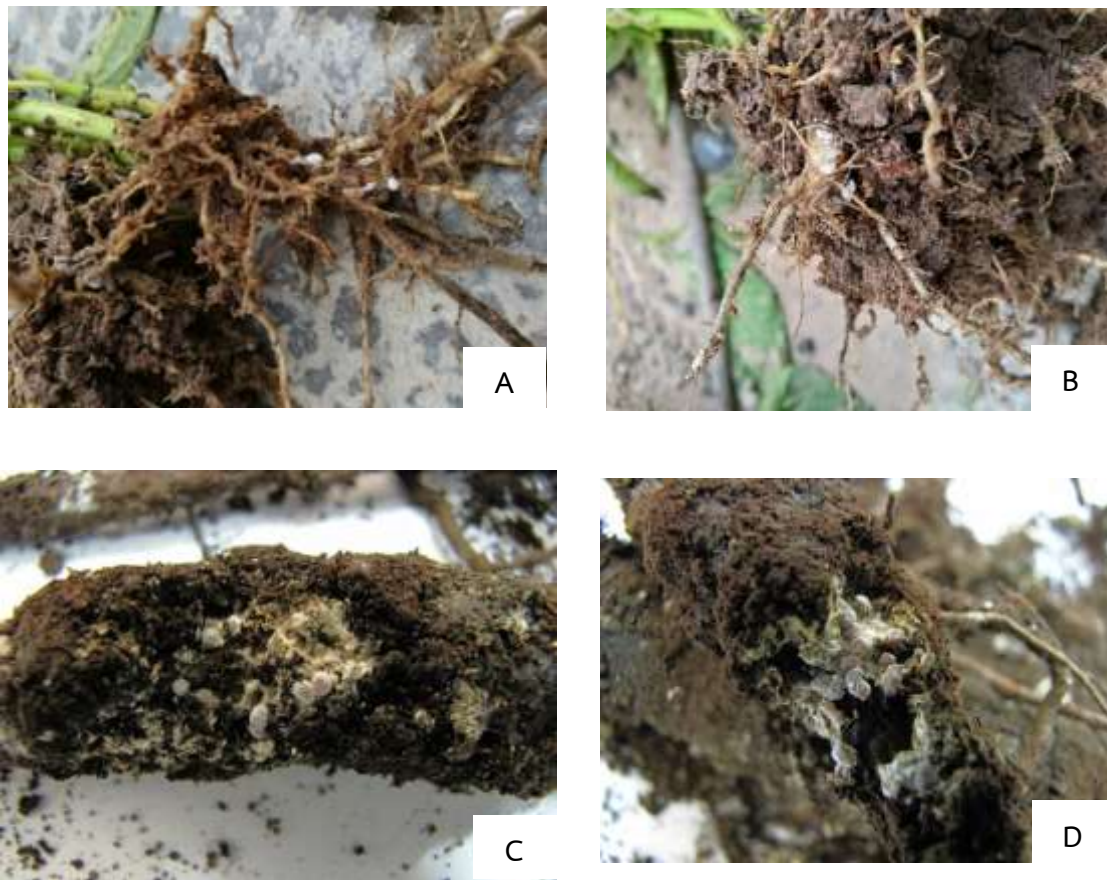


Figure 8 Field view of Pseudococcidae: A) – B) *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) on roots of *Ipomoea aquatica* Forsk , C) -D) *Formicococcus* sp. on roots of *Mangifera indica* Linn

อนุกรมวิธานและความหลากหลายชนิดของแตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวน
วงศ์ Pentatomidae ศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย
Taxonomic study and species richness of egg parasitoids attacking true
bugs (Pentatomidae) economically important pests of Thailand

จารุวัฒน์ แต่กุล ยุวรินทร์ บุญทบ สุนัดดา เขาวลิต ชมัยพร บัวมาศ
อิทธิพล บรรณการ เกศสุดา สนศิริ อาทิตย์ รักกลีกร
จอมสุรางค์ ดวงธิดาร สิริศิริโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

True bugs or stink bugs (Hemiptera: Heteroptera, Pentatomidae) are considered one of the important economic pests. One of the potential species, Brown Marmorated Stink Bug (BMSB), *Halyomorpha halys* (Stål) has been reported as potential invasive alien species in certain countries in North and South America as well as Europe. There is no evidence of egg parasitoids, the important natural enemies to control this pest in Thailand. The objectives of this research are to understand the species richness, valid scientific names, morphological differences of egg parasitoids attaching the stink bugs (Pentatomidae) and obtain the voucher specimens to curate at the insect museum. The experiment was carried out from October 2019 – September 2021. The Survey and Collecting were implemented on the agricultural field where stink bugs were or used to be the key pests. The results revealed that one parasitoid family were found, Platygasteridae. The genus *Trissolcus* sp. which is the important natural enemy contains 7 species including *Trissolcus basalis* (Wollaston), *T. japonicus* (Ashmead), *T. thyantae* Ashmead, *T. latisulcus* Crawford, *T. comperei* Ashmead, *T. mitsukurii* Ashmead,

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-19-62



T. vindicius (Nixon). Besides *Trissolcus* other genera attacking the eggs of stink bug were discovered: *Gryon* sp., *Telenomus* sp., *Idris* sp., *Calliscelio* sp., *Scelio* sp., *Psix* sp., *Phanuromyia* sp., *Trichoteleia* sp. and *Macroteleia* sp. The genus *Trissolus* is deemed to have an effective quality for biological control agents to control pentatomid bugs because there are a number of successful cases in certain countries.

Keywords: Egg parasitoids of stink bugs, Platygastridae, *Trissolcus*, Biological control, Biological Diversity

บทคัดย่อ

แมลงศัตรูพืชในกลุ่มมวนวงศ์ Pentatomidae จัดเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจกลุ่มหนึ่ง ในปัจจุบันมีรายงานการระบาดของมวนชนิดหนึ่ง ชื่อว่า Brown Marmorated Stink Bug (BMSB), *Halyomorpha halys* (Stål) ระบาดในทวีปอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้รวมถึงยุโรป อย่างไรก็ตามหากมีการระบาดของมวนชนิดนี้ประเทศไทยยังไม่มีข้อมูล แต่พบเบียนไข่ศัตรูธรรมชาติที่สำคัญของมวนศัตรูพืชในวงศ์นี้ วัตถุประสงค์ของการทดลอง เพื่อทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ของแตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวน (Pentatomidae) และได้ตัวอย่างแตนเบียนไข่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง ดำเนินการสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างแตนเบียนไข่มวน ตั้งแต่ ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564 ในพื้นที่ทางการเกษตรที่เคยมีการระบาดของมวนศัตรูพืช ผลการทดลอง พบแตนเบียนไข่มวน 1 วงศ์ ได้แก่ Platygastridae พบสกุลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้แก่สกุล *Trissolcus* sp. ซึ่งมี 7 ชนิดได้แก่ *Trissolcus basalis* (Wollaston), *T. japonicus* (Ashmead), *T. thyantae* Ashmead, *T. latisulcus* Crawford, *T. comperei* Ashmead, *T. mitsukurii* Ashmead, *T. vindicius* (Nixon) นอกจากนี้พบแตนเบียนไข่มวนในสกุลอื่นอีก 9 สกุล ได้แก่ *Gryon* sp., *Telenomus* sp., *Idris* sp., *Calliscelio* sp., *Scelio* sp., *Psix* sp., *Phanuromyia* sp., *Trichoteleia* sp. และ *Macroteleia* sp. แต่พบเบียนไข่ในสกุล *Trissolus* จัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพและมีการนำมาใช้ในการพัฒนาผลิตขยายเพื่อควบคุมมวนศัตรูพืชแล้วในหลายประเทศ

คำหลัก : แตนเบียนไข่มวน, วงศ์ Platygastridae, สกุล *Trissolcus*, การควบคุมโดยชีววิธี, ความหลากหลายทางชีวภาพ



คำนำ

แมลงศัตรูพืชในกลุ่มมวน (Pentatomidae) เป็นแมลงกลุ่มหนึ่งที่คนส่วนใหญ่มองข้ามถึงแม้ว่ามีความสำคัญทางการเกษตรและเคยมีการระบาดทำความเสียหายในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด อาทิการระบาดของแมงแกงหรือมวนลำไยในเขตภาคเหนือ ซึ่งในทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย มีความสามารถเข้าทำลายได้ทั้งลำไยและลิ้นจี่ การระบาดพบประจำทุกปีในช่วงที่ลำไยและลิ้นจี่ออกดอกติดผล (กองกัญและสัตตวิทยา, 2542) การระบาดของมวนเขียวข้าวซึ่งนอกจากข้าวแล้วยังเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของงั่วเหลืองและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอีกหลายชนิด ในถั่วเหลืองทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากทุกส่วนของพืช ทำให้ลำต้นเป็นจุดสีดำก่อนที่ถูกทำลายสับและร่วงหล่นส่วนฝักแก่ที่ยังไม่แห้งเมล็ดจะเป็นจุดสีดำ เมล็ดไม่เจริญเติบโตและฝักสับ นอกจากนี้แล้วความเสี่ยงหรือโอกาสการเข้ามาระบาดของแมลงในกลุ่มนี้ชนิดต่างถิ่น ปัจจุบันมีการระบาดอย่างรุนแรงของมวนกลุ่มนี้ ในแถบอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้รวมถึงยุโรป ถึงแม้ว่ายังไม่พบการระบาดในประเทศไทยซึ่งอาจเนื่องมาจากเป็นศัตรูพืชต่างถิ่นหรือมีการควบคุมในระบบนิเวศเดิม ซึ่งการศึกษาในแง่ศัตรูธรรมชาติของมวนศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย มีรายงานอยู่น้อยหรือแทบจะไม่มีเลย

มวนชนิดหนึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา และบางประเทศแถบยุโรป ในชื่อสามัญว่า BMSB หรือ Brown Marmorated Stink Bug มวนชนิดนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Halyomorpha halys* (Stål) มีถิ่นกำเนิดมาจากแถบประเทศ จีน ญี่ปุ่น เกาหลีและไต้หวัน แมลงชนิดนี้มีความสามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 100 ชนิด (polyphagous) ส่วนใหญ่เป็นพวกไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับและพืชผักบางชนิด ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของ BMSB เข้าดูดกินน้ำเลี้ยงจากส่วนใบ ผล ของพืชเหล่านี้ พบว่าสร้างความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรระดับวิกฤติในหลายพืชในประเทศญี่ปุ่น (Hoebeke & Carter 2003) เอกสารทางวิชาการในประเทศแถบเอเชียอ้างอิงเกี่ยวกับแมลงชนิดนี้ตามลักษณะสีของลำตัวว่าเป็นมวนเหลืองน้ำตาล (yellow-brown stink bug) และรายงานว่าเป็น *H. picus* หรือ *H. mista* ในประเทศสหรัฐอเมริกาชนิดนี้ถูกสำรวจพบครั้งแรกประมาณ กลางทศวรรษ 1990 ในรัฐเพนซิลเวเนีย ในปัจจุบัน BMSB ระบาดอย่างรุนแรงในประเทศอเมริกา พบว่าระบาดหนักถึง 38 รัฐ และรวมถึงกรุงวอชิงตัน ดี ซี (Leskey *et al.*, 2012) และยังพบว่าเป็นศัตรูต่างถิ่นรุกรานในประเทศสหพันธรัฐสวิส (Wermelinger *et al.*, 2008) และแคนาดา (Fogain & Graff 2011) แมลงชนิดนี้เข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตรได้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ตัวเมียวางไข่ได้ประมาณ 28 ฟองต่อกลุ่มไข่โดยวางไข่อยู่ใต้ใบพืช ทั้งนี้ปริมาณการวางไข่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ไข่ใช้เวลาฟัก 3 – 4 วัน ตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยมีทั้งสิ้น 5 ระยะ ในเขตร้อนชื้นแถบทวีปเอเชียมวน BMSB มี 1 ชั่วอายุขัยในช่วงระยะเวลา 1 ปี อย่างไรก็ตามในเขตร้อน (sub-tropical) มวนชนิดนี้สามารถขยายพันธุ์ได้ถึง 2 ชั่วอายุ (Fujiie, 1985) และยังมี



รายงานที่สามารถขยายพันธุ์ได้สูงถึง 5 – 6 ชั่วโมงทางตอนใต้ของประเทศจีน (Hoffmann, 1931) ศัตรูธรรมชาติของ BMSB มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด

ทั้งนี้ยังไม่พบการระบาดของอย่างรุนแรงของ BMSB ในประเทศไทย มีตัวอย่างแมลงสกุลนี้เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *Halyomorpha* sp. 1 ตัวอย่าง และ *H. scutellata* Distant จำนวน 3 ตัวอย่าง ไม่มีตัวอย่าง *H. halys* ในพิพิธภัณฑ์ ทั้งนี้มีข้อสมมุติฐานเกี่ยวกับ การไม่ระบาดของแมลงชนิดนี้ในประเทศไทยอยู่ 2 ประการกล่าวคือ 1) ยังไม่มีการพบศัตรูพืชชนิดนี้ในประเทศไทยมาก่อน ทั้งนี้อาจเป็นศัตรูพืชต่างถิ่น รุกรานในอนาคต 2) แมลงชนิดนี้เป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นของประเทศไทย แต่มีศัตรูธรรมชาติช่วยควบคุม แมลงชนิดนี้ไม่ให้เกิดการระบาด ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจังเกี่ยวกับมวลศัตรูพืช BMSB และศัตรูธรรมชาติในประเทศไทย

Hymenoptera เป็นอันดับของแมลงในกลุ่ม ผีเสื้อ ต่อ แตน และ มด จัดว่าเป็นแมลงกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุดในแง่แมลงที่มีประโยชน์ ความหลากหลายชนิดของแมลงในกลุ่มนี้มีมากกว่า 115,000 ชนิด (LaSalle & Gauld, 1993) จากการศึกษาถึงสายวิวัฒนาการ (phylogenetic position) พบว่า Hymenoptera มีความสัมพันธ์มากที่สุด กับกลุ่มแมลงที่มีการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ complete metamorphosis หรือ holometabola (Sharkey, 2007; Savard *et al.*, 2006) อันดับ Hymenoptera แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่มกินพืช หรือที่เรียกว่ากลุ่ม paraphyletic Symphyta (sawflies, woodwasps) และแมลงผสมเกสร มด และ แตน หรือกลุ่ม monophyletic Apocrita ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย monophyletic Aculeata และ polyphyletic Parasitica กลุ่มย่อย Aculeata และ Parasitica เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในแง่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแตนเบียนไข่ (parasitoids wasps) พบว่าการนำเข้าแตนเบียนไข่เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช (classical biological control) ประสบความสำเร็จสูงถึง 87% จากกรรมวิธีนำเข้าแมลงศัตรูธรรมชาติทั้งหมด (Greathead, 1986; LaSalle and Gauld, 1993) แมลงในกลุ่มแตนเบียนไข่มีความน่าสนใจมากที่สุดในกลุ่มแมลงศัตรูธรรมชาติในแง่ของชีววิทยา แมลงในกลุ่มนี้สามารถอาศัยบริโภคอาหารทั้งในตัวเหยื่อ (endoparasitoids) และบนตัวเหยื่อ (ectoparasitoids) แตนเบียนแตกต่างจากตัวห้ำและตัวเบียนกล่าวคือ ตัวห้ำ (predator) เข้าทำลายและฆ่าเหยื่อโดยตรงและครั้งละหลายตัว ตัวเบียน (parasite) สร้างความรำคาญหรือบาดเจ็บให้กับเหยื่อแต่จะไม่ฆ่าเหยื่อ ในทางกลับกันแตนเบียน (parasitoids) เข้าทำลายเหยื่อครั้งละ 1 ตัว ตัวอ่อนกัดกินอวัยวะภายในเหยื่อและทำให้เหยื่อตายในที่สุด จำนวนของแตนเบียนภายในเหยื่ออาจแตกต่างกัน มีเพียงแค่ 1 ตัว (solitary) หรือหลายตัว (gregarious)

แตนเบียนไข่ คือแตนเบียนที่เข้าทำลายไข่ของเหยื่อ พบว่ามีการใช้แตนเบียนไข่ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีถึง 7 วงศ์ และมี 1 ชนิด ผลิตเพื่อเป็นการค้าและประสบความสำเร็จในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้แก่ *Trichogramma* (Mills, 2010) ทั้งนี้จากแตนเบียนไข่ที่ถูกค้นพบ แต่ยังมีแตนเบียน



ไข่อีกหลายชนิดที่อยู่ในธรรมชาติที่ยังไม่มีการค้นพบและศึกษา จากรายงานพบว่าแตนเบียนไข่วงศ์ใหญ่ Platygastroidea จัดเป็นแตนเบียนไข่ที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง มีการจัดจำแนกสายบรรพบุรุษในกลุ่มเดียวกันกับวงศ์ใหญ่ Prototrupoidea และ Cynipoidea สร้างเครือข่ายความสัมพันธ์ชนิด monophyly (Sharkey, 2007) ระดับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน มีการรวบรวมข้อมูลปัจจุบันใน Hymenoptera On-line database โดย Johnson (2014) มีเพียง 1 วงศ์ได้แก่ Platygastriidae ประกอบด้วย 5 วงศ์ย่อยและมีความหลากหลายชนิดดังต่อไปนี้ Platygastriinae (45 genera, 1,745 species), Sceliotrachelinae (28 genera, 142 species), Scelioninae (155 genera, 2,571 species), Teleasinae (13 genera, 509 species), และ Telenominae (20 genera, 907 species) มีเขตการแพร่กระจายครอบคลุมทั่วโลก การศึกษาแมลงในกลุ่มนี้ เขตร้อนชื้นเป็นเขตที่ได้มีการศึกษาน้อยที่สุด (Austin et al., 2005)

แตนเบียนไข่หลายสกุลในวงศ์ Platygastriidae ที่มีประสิทธิภาพในการเบียนไข่แมลงในกลุ่มมวน ในทวีปเอเชียมีแตนเบียนไข่หลายชนิด ในสกุล Trissolcus ที่มีศักยภาพสูงในการเบียนไข่ของมวน BMSB นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานถึงแมลงวันก้นขนซึ่งมีประสิทธิภาพในการเบียนทั้งไข่และตัวเต็มวัยของมวนชนิดนี้ (Yang et al., 2009) ทั้งนี้ Telenomus podisi ซึ่งเป็นแตนเบียนไข่สกุลหนึ่งที่สำคัญในวงศ์ย่อย Telenominae (Platygastriidae) ที่สามารถเบียนและเข้าทำลายไข่ของแมลงกลุ่มมวน BMSB นอกจากนี้แล้ว Leskey et al. (2012) ได้ให้ข้อสังเกตที่สำคัญกล่าวคือแตนเบียนไข่ที่สำรวจได้จากแหล่งปลูกพืชหรือแหล่งเกษตรกรรมมีศักยภาพในการเบียนไข่สูงกว่าแตนเบียนไข่ในสภาพธรรมชาติหรือพื้นที่ที่ไม่มีการเพาะปลูก

วัตถุประสงค์ของการทดลอง เพื่อทราบชนิด ชื่อวิทยาศาสตร์ ลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ของแตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวน (Pentatomidae) ศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย ได้ตัวอย่างแตนเบียนไข่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ก๊ับตักแมลง Yellow pan trap, Malaise trap, Slam trap รวมทั้งสวิงจับแมลง
2. ethanol ความเข้มข้น 95% เพื่อใช้ในการจัดเก็บตัวอย่างสดของแมลง
3. กระดาษคุณภาพสูง (acid free) เพื่อการเก็บรักษาตัวอย่างแห้งในระยะยาว
4. อุปกรณ์บันทึกเขตการแพร่กระจายในระดับละเอียด (GPS)
5. Forceps ขนาดเล็ก
6. ขวดแก้วขนาดเล็กสำหรับตัวอย่างสด
7. กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope กำลังขยายมากกว่า 50 เท่าขึ้นไป



8. สารเคมีในการทำแห้งตัวอย่างแมลง
9. พัดลมดูดอากาศ (Laminar Flow Clean Air Bench)
11. โรงเรือนทดลองกรณีเลี้ยงมวนเพื่อให้ได้ไข่ในการเลี้ยงแตนเบียนไข่
12. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอแบบกำลังขยายสูงสำหรับงานทางอนุกรมวิธานแมลง Leica M205 C พร้อมเลนส์ Planapo Objective 1.0x สำหรับการถ่ายภาพเพื่อตีพิมพ์ในเอกสารวิชาการ

วิธีการ

การเก็บรวบรวมและรักษาตัวอย่างแตนเบียนไข่ (Acquisition of research material)

เก็บรวบรวมตัวอย่างแตนเบียนไข่ของมวนวงศ์ Pentatomidae ในพื้นที่ที่มีการระบาดหรือเคยมีการระบาดของมวนกลุ่มนี้ รวมถึงพื้นที่ป่าหรือพื้นที่ใกล้เคียงแหล่งเกษตรกรรมได้แก่

- ภาคเหนือ จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน จำนวน 15 แปลง ในไม้ผลเศรษฐกิจ เช่น ลำไย ลิ้นจี่ มะม่วง เป็นต้น
- ภาคตะวันออกและภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด ลพบุรี นครสวรรค์ อุทัยธานี สิงห์บุรี อโยธยา ชัยนาท สุพรรณบุรี ในพืชสวนเศรษฐกิจอื่นๆ เช่นเงาะ ลองกอง ทุเรียน รวมถึงไม้ดอกไม้ประดับ และพืชผัก จำนวน 15 แปลง
- ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัด ชุมพร ระนอง พังงา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ตรัง สงขลา จำนวน 10 แปลงในไม้ผล เช่น มังคุด ทุเรียน ลองกอง มะพร้าว
- ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด นครราชสีมา อุตรธานี สกลนคร กาฬสินธุ์ ขอนแก่น หนองบัวลำภู ยโสธร อำนาจเจริญ สุรินทร์ อุบลราชธานี ไปแปลงปลูกไม้ยืนต้นเช่น ยางพารา ไม้สัก ก้ามปู เป็นต้น

ดำเนินการเก็บตัวอย่างแตนเบียนไข่ของมวนในวงศ์ Pentatomidae ด้วย 2 กรรมวิธีประกอบไปด้วย 1) การเก็บตัวอย่างแห้ง ซึ่งจะเก็บในห้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิต่ำ และ 2) การเก็บตัวอย่างสดเพื่องานวิจัยทางชีวโมเลกุล ทั้งนี้ใช้ 4 วิธีพื้นฐานทางกีฏวิทยาในการเก็บตัวอย่างได้แก่ สวิงโฉบแมลง Yellow Pan Traps (YPT), Malaise trap และ Slam trap. การใช้ YPT จะทำการเก็บแมลงทุกวันโดยทิ้งระยะเวลา 24 ชั่วโมงโดยวางกับดักเวลา 08:00 นาฬิกา และทำการเก็บแมลงในช่วงเช้าวันถัดไประหว่างเวลา 09:00 – 10:00 นาฬิกา และวางกับดัก Malaise trap และ Slam trap สามารถเว้นระยะเวลา 5-10 วัน นำแมลงออกจากกับดักโดยใช้ ตาข่ายความละเอียดพิเศษ (fine-mesh aquarium net) สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุดทำการบันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์(GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตลอดถึงเทคนิคที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง รวมถึงบันทึกลักษณะทางชีววิทยา นิเวศวิทยาเบื้องต้นของมวนศัตรูพืชที่แตนเบียนไข่เข้าทำลาย ตัวอย่างจะถูกเก็บในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% หลังจากนั้นเก็บ



รักษาตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอเพื่อเตรียมทำตัวอย่างแห้ง หรือรอไว้เพื่องานวิจัยทางด้านสักรัด ดี เอ็น เอ ต่อไป

การจัดจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสักรัดฐานวิทยา

นำแมลงที่เก็บได้จากสภาพธรรมชาติ จัดหมวดหมู่ (classification) จำแนกในระดับอันดับ (order) โดยใช้การวินิจฉัยของ Goulet & Huber (1993) นับจำนวนของแมลงในแต่ละอันดับในแต่ละครั้ง ที่ทำการเก็บตัวอย่าง ทั้งนี้เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของกับดัก วิธีการเก็บแมลง แมลงในกลุ่มเป้าหมาย Hymenoptera จะถูกแยกกลุ่มในระดับ Superfamily การจัดแบ่งในหมวด วงศ์และสกุล (Family และ genus) ดำเนินการเฉพาะในกลุ่มที่ต้องการศึกษา Chalcidoidea (Trichogrammatidae) และ Platygastroidea (Platygastridae) เอกสารหลักที่ใช้ในการจัดจำแนกได้แก่ “Hymenoptera of the world: an identification guide to families” (Masner 1993) และความร่วมมือจากนักวิจัยจากประเทศแคนาดา (CNCI: Canadian National Collection of Insects) การศึกษาภายใต้กล้อง stereo microscope ใช้โปรแกรมการถ่ายภาพ AutoMontage หรือ Cartograph extended-focus โดยใช้ JVC KY-F75U digital camera, Leica Z16 APOA

ลักษณะทางสักรัดฐานวิทยาที่ใช้ในการทดลอง

ลักษณะและคำศัพท์ทางสักรัดฐานวิทยาที่ใช้ในการทดลอง: A1, A2, ... A12: antennomere 1, 2, ...12; claval formula (ลักษณะเฉพาะของแมลงในกลุ่มนี้คือ multiporous basiconic sensilla ส่วนล่างหนวดของแมลงเพศเมีย (Bin, 1982); POL: posterior ocellar line, ระยะที่สั้นที่สุดระหว่าง inner margins of posterior ocelli; OOL: ocular ocellar line, ระยะที่สั้นที่สุดจาก inner orbit และ outer margin ของ lateral ocellus (Masner, 1980); T1, T2, ... T7: metasomal tergite 1, 2, ... 7. ลักษณะทางสักรัดฐานวิทยานอกจากนี้อ้างอิงจาก Masner (1980) และ Mikó *et al.* (2007).

การลงทะเบียนและระบบฐานข้อมูลแตนเบียนในประเทศไทย

ตัวอย่างแห้งของแตนเบียนไข่แต่ละตัวอย่างถูกติดตั้งด้วย บาร์โค้ดโดยใช้รหัส EMBT ENT (Entomology and Zoology Museum Bangkok Thailand) ซึ่งเป็นรหัสที่ได้รับการลงทะเบียนอย่างเป็นทางการ ณ ฐานข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของพิพิธภัณฑ์ The Global Registry of Biorepositories (GRBio) หากมีการค้นพบชื่อวิทยาศาสตร์ชนิดใหม่ของโลกจะมีการตีพิมพ์และขึ้นทะเบียนกับ IZCN-Zoobank (Polaszek *et al.* 2005) รวมถึงสถานที่ ที่ค้นพบ รูปแบบการเขียนตีพิมพ์ผลงานวิจัย (taxonomic description) ดำเนินการตามแบบมาตรฐานของ Pyle *et al.* (2008) และ Johnson *et al.* (2008) ตัวอย่างแมลงทั้งหมดจะถูกเก็บรวบรวม พร้อมทั้ง ลงบันทึกเขตการแพร่กระจายแหล่งที่เก็บ แมลงอาศัย ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร



การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลรายละเอียดแต่ละตัวอย่างที่เก็บได้ ประกอบด้วย แหล่งที่เก็บ พิกัดทางภูมิศาสตร์ พืชอาศัย วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง เทคนิคการเก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง เป็นต้น

การลงทะเบียนในระบบฐานข้อมูลแดนเบียนไซในประเทศไทยโดย ตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมีรายละเอียดแยกกันอย่างชัดเจน (specimen barcode) หากมีการค้นพบชื่อวิทยาศาสตร์ชนิดใหม่ ดำเนินการตีพิมพ์และขึ้นทะเบียนกับ IZCN-Zoobank (Polaszek *et al.* 2005)

รูปแบบการเขียนตีพิมพ์ผลงานวิจัย (taxonomic description) ดำเนินการตามแบบมาตรฐานของ Pyle *et al.* (2008)

เก็บรักษาตัวอย่างแมลงทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ณ พิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

เวลาและสถานที่

เก็บรวบรวมตัวอย่างแดนเบียนไซของมวนวงศ์ Pentatomidae ในพื้นที่ที่มีการระบาดหรือเคยมีการระบาดของมวนกลุ่มนี้ รวมถึงพื้นที่ป่าหรือพื้นที่ใกล้เคียงแหล่งเกษตรกรรม โดยมีแผนการดำเนินการดังนี้

- ปี 2562 ดำเนินการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ภาคเหนือ จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน เป็นต้น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่จังหวัด นครราชสีมา อุตรธานี สกลนคร กาฬสินธุ์ ขอนแก่น หนองบัวลำภู โยโสธร อำนาจเจริญ สุรินทร์ อุบลราชธานี เป็นต้น
- ปี 2563 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางได้แก่จังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด ลพบุรี นครสวรรค์ อุทัยธานี สิงห์บุรี อัญญา ชัยนาท สุพรรณบุรี เป็นต้น
- ปี 2564 ภาคใต้ได้แก่จังหวัด ชุมพร ระนอง พังงา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ตรัง สงขลา เป็นต้น

การตรวจวินิจฉัยจัดหมวดหมู่ของแดนเบียนไซของมวนวงศ์ Pentatomidae ดำเนินการ ณ พิพิธภัณฑ์แมลงและห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

หมายเหตุ: ทุกขั้นตอนในการดำเนินการ วิธีการทำการทดลองเหมือนกันในแต่ละปี



ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

วงศ์ Platygastriidae

แนวทางการวินิจฉัยระดับสกุลในวงศ์ย่อย Telenominae

Key to genera of Telenominae

- 1) T2 at most slightly longer or as long as T3 , always distinctly shorter than subsequent terga combined; fore wing with stigmal vein and usually postmarginal vein present, the veins rarely indistinct or absent; antennae usually with 11-12 segments, very rarely with 10 or fewer segments; male flagellomere 3 modified, Metasoma with wide laterotergites loosely attached to sternites**Telenominae**..2
- T2 several times longer than T3, usually as long as or longer than subsequent terga combined; fore wing without stigmal and postmarginal veins, usually veinless; Antennae usually with 10 segments, rarely with fewer segments; male flagellomere 2 or rarely 1 modified, Metasoma with narrow laterotergites closely attached to sternites to form an impressed submarginal ridge
.....**Scelioninae, Teleasinae, Platygastriinae, Sceliotrachelinae**
- 2) Central keel on frons present; clypeus and labrum fused; lateral ocelli far from inner orbits; genal striae present, at least at base of mandible.....3
- Central keel on frons absent; clypeus and labrum not fused; lateral ocelli very close almost touching to inner orbits; genal striae entirely absent.....4
- 3) Central keel structure on frons bifurcation passing outside antennal insertions, fading at medial ocellus; head shape in dorsal view transverse; frontal sculpture with dense microsculpture surrounding central keel and orbital carina; 1st and 2nd coxa close together; lateral mesosoma sculpture filled with sulcus.....
.....**Psix Kozlov & Lê**
- Central keel structure on frons bifurcation passing outside antennal insertions, forming Y-shape on medial ocellus; head shape in dorsal view weakly transverse; frontal sculpture mostly smooth throughout; 1st and 2nd coxa distance to each other; lateral mesosoma sculpture smooth, reduced sulcus.....
.....**Paratelenomus Dodd**



- 4) Orientation of malar sulcus attached relatively behind compound eyes; the presence of episternal foveae next to 1st coxa; occipital carina sculpture punctate; hyperoccipital carina present.....5
- Orientation of malar sulcus attached below compound eyes; the absence of episternal foveae next to 1st coxa; occipital carina sculpture microsculptured; hyperoccipital carina absent.....*Phanuromyia* Dodd
- 5) Frontal sculpture coarsely punctate throughout or sometimes reticulate punctate microsculpture; setations on compound eyes short, sparse or almost absent; number of calvomeres in female antenna always 6 segments*Trissolcus* Ashmead
- Frontal sculpture mostly smooth throughout if sculpture on frons setations on compound eyes long and dense; number of calvomeres in female antenna always 3, 4 or 5 segments.....*Telenomus* Haliday

สกุล *Trissolcus* Ashmead

Type Species: *Telenomus brochymenae* Ashmead

Original description: *Trissolcus* Ashmead, 1893: 161. Type: *Telenomus brochymenae* Ashmead, by original designation. Key to species.

Synonyms: *Aphanurus* Kieffer, *Asolcus* Nakagawa, *Immsia* Cameron, *Kozlotelenomus* Mineo, O'Connor & Ashe, *Microphanurus* Kieffer, *Telenomus* (Aphanurus) Kieffer

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description) ขนาดลำตัวเพศเมียยาว 0.94 – 1.98 มิลลิเมตร (n=20) ขนาดลำตัวเพศผู้ยาว 0.89 – 1.69 มิลลิเมตร หัว (Head) ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนอก (mesosoma) รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะค่อนข้างแคบตามแนวขวาง (weakly transverse) ไม่มีสันแข็งบริเวณหน้า (frontal depression) ร่องลึกลับโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณด้านหลังของตา รวม ไม่มีเส้นขนพาดผ่านกลางใบหน้า แผ่นเนื้อริมฝีปากบนและริมฝีปากบนไม่เชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียว ไม่มีเส้นขนรอบตา รวม (orbital carina) ไม่มีรอยกดหรือสัน (frontal depression) บนใบหน้า ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเม็ดขนาดเล็ก (microsculpture) หรือมีลักษณะเป็นผนังขรุขระหรือเป็นรอยตาข่ายปกคลุมทั่วใบหน้า. ไม่มีเส้นขนพาดตามขวาง (frontal transverse carinae) ไม่มีขนในตา รวม ส่วนปลายของกราม (mandibles) มี 2 แฉก (bidentate) ผนังลำตัวบริเวณพื้นที่ด้านหลังของหัวกะโหลก (occiput) มีลักษณะเป็นหลุมเล็กๆ (punctate) กระจายตัวสม่ำเสมอ มีเส้นขนแข็งด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนว mesosoma ตาเดี่ยว



ด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ใกล้หรือเกือบติดกับขอบด้านในของตารวม ไม่มีแถบลายเส้น ด้านข้างแก้มรูปใบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ไม่มีกลุ่มขนหรือพอบอยู่อย่างกระจัดกระจายบริเวณด้านข้างของหัวกะโหลกเหนือกราม

หนวด (Antennae) เพศเมียมีหนวดจำนวน 6 ปล้องที่รวมตัวกันแน่นมีรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere) การจัดเรียงของต่อมรับรู้กลิ่นหรือฮอร์โมนที่พีชปลดปล่อยในเพศเมีย (claval formula) มีดังนี้ A11-A7/1-2-2-2-2 เพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง ออก (Mesosoma) รูปร่างโดยทั่วไปของส่วนอก มีลักษณะนูนทั้งด้านบนและด้านข้าง ไม่มีแผ่นแข็งลักษณะเป็นมันวาว (skaphion) อยู่ทางตอนบนของปล้องอก ส่วนปลายของอกปล้องที่ 3 (metascutellum) ไม่มีหนามแหลมยื่นออกมา ขอบด้านหลังของอกปล้องที่ 3 มีลักษณะโค้งมน ไม่มีหลุมที่เรียงตัวกันเป็นแถว (episternal foveae) บนผนังลำตัวเหนือฐานของขาปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 อยู่ห่างจากกัน มีลวดลายของหลุมค่อนข้างน้อย บริเวณด้านข้างของผนังลำตัวส่วนอก ไม่มีเส้นขอบด้านข้าง (parapsidal line) บริเวณอกปล้องที่สอง ด้านบน (dorsal mesoscutum) ไม่มีพื้นที่บนส่วนผนังลำตัวรูปร่างคล้ายกระสวยทอผ้า (netrion) บริเวณด้านข้างของอก (lateral mesosoma) มีร่องบริเวณขอบด้านบนของอกปล้องที่ 2 (notaulus) มีสันนูนทางด้านข้างของอกปล้องที่ 1 (vertical epomial carina) ปีก (Wings) บนปีกคู่หน้าไม่มีเส้นปีก basal vein (Rs+M) เส้นปีก M เส้นปีก Rs และไม่มีปื้นสีดำหรือสีเทา (pseudostigma) บริเวณเส้นปีก marginal vein (R) เส้นปีก marginal vein (R) บนปีกคู่หน้าค่อนข้างสั้นเกือบเท่ากับเส้นปีก stigmalis (r-rs) หรือในบางชนิดสั้นกว่า มีเส้นปีก postmarginal vein (R1) บนปีกคู่หลังมีเส้นปีก submarginal vein (R) ท้อง (metasoma) มีรูปร่างเรียวยาว ในบางชนิดมีรูปร่างสั้นและป้อม ไม่มีลักษณะนูนโหนกคล้ายเขา (horn) บริเวณฐานของท้องปล้องที่ 1 ท้องปล้องที่ 2 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 3 อย่างชัดเจน ลักษณะของท้องปล้องที่ 6 ในเพศเมียมีลักษณะขอบทุ่มซี่ออก (blunt edge) ไม่มีหลุมเรียงกันเป็นแถว บริเวณด้านข้างของท้องปล้องที่ 1 ไม่มีแนวร่องลึก (antecostal sulcus) อยู่ด้านบนของท้องปล้องที่ 2 และ 3 ระบบอวัยวะวางไข่ในเพศเมียเป็นแบบ *Ceratobaeus*-type (Austin & Field 1997)

การวินิจฉัย (Diagnosis) แตนเบียนไซสกุส *Trissolcus* มีลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา คล้ายคลึงกับสกุล *Telenomus* แต่สามารถแยกออกมาได้จากลักษณะของผนังใบหน้า (frontal sculpture) มีลักษณะเป็นเม็ดนูนขนาดเล็ก (microsculpture) หรือมีลักษณะเป็นผนังขรุขระหรือเป็นรอยตาข่ายปกคลุมทั่วใบหน้า ไม่มีขนขึ้นในตารวมหรือบางครั้งมีอยู่อย่างกระจัดกระจาย และขนสั้น มีจำนวนปล้องหนวดจำนวน 6 ปล้องเท่านั้นที่รวมตัวกันแน่นเป็นรูกระบอง (clavomeres)



แนวทางการวินิจฉัยแตนเบียนไข่สกุล *Trissolcus* Ashmead
ที่เข้าทำลายมวนศัตรูพืชวงศ์ Pentatomidae

- 1) Metapleuron without paracoxal sulcus visible in ventral half; frons without facial striae.....2
 - Metapleuron with paracoxal sulcus visible in ventral half; frons with facial striae extending as rugulae from anterior mandibular articulation toward compound eye...
.....*Trissolcus latusulcus* Crawford
- 2) T2 reticulate punctate or variable ; metapostnotum invaginated distance from propodeal spiracle.....3
 - T2 smooth or with faintly impressed striation posterior to antecostal sulcus; metapostnotum invaginated near propodeal spiracle, not separating propodeum from metanotum near metascutellum.....*Trissolcus comperei* Ashmead
- 3) Inner margin of eye without orbital furrow; mesoscutellum variable.....4
 - Inner margin of eye with orbital furrow constricted ventrally; mesoscutellum rugose, at least laterally and usually throughout; first laterotergite usually with setae; mesoscutum often with median mesoscutal sulcus.....
.....*Trissolcus mitsukurii* Ashmead
- 4) Clypeus with setation; orbital furrow absent.....5
 - Clypeus smooth without setae; orbital furrow present.....6
- 5) Clypeus with 4 setae; mesopleuron with episternal foveae well-defined and deep, forming a continuous line of cells from postacetabular sulcus to mesopleural pit; mesoscutum without median mesoscutal carina.....
.....*Trissolcus japonicus* (Ashmead)
 - Presence of 2 clypeal setae; a well-defined and ventrally expanded orbital furrow; episternal foveae extend from the postacetabular sulcus to the mesopleural pit; and a mesoscutum without a median mesoscutal carina.....
.....*Trissolcus vindicius* (Nixon)
- 6) Mesoscutellum entirely smooth, without microsculpture; Gena in lateral view narrow; Mesopleural carina absent ventrally.....*Trissolcus thyantae* Ashmead



- Mesoscutellum with distinct coriaceous microsculpture and setal bases usually pustulate; mesopleuron with episternal foveae shallowly impressed and distinctly separated from mesopleural pit ; netrion sulcus incomplete.....

.....*Trissolcus basalis* (Wollaston)

Trissolcus basalis (Wollaston)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

หัว (Head) ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนอก (mesosoma) รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะแคบตามแนวขวาง (transverse) ไม่มีสันแข็งบริเวณหน้า (frontal depression) มีร่องลึกบนโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณด้านหลังของตารวม มีเส้นนูน (central keel) 2 เส้นล้อมรอบฐานหนวด (antennal insertion) มาบรรจบกันและพาดผ่านกลางใบหน้า และค่อยๆหายไป บริเวณด้านหน้าตาเดี่ยวที่อยู่ตรงกลาง (medial ocellus) แผ่นเหนื่อริมฝีปากบนและริมฝีปากบนเชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียว มีเส้นนูนรอบตารวม (orbital carina) ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเม็ดขนาดเล็ก (microsculpture) แทรกอยู่อย่างหนาแน่นบริเวณเส้นนูนกลางใบหน้าและรอบตารวม มีเส้นนูนพาดตามขวาง (frontal transverse carinae) ซึ่งเกิดขึ้นมาจากฐานของเส้นนูนกลางใบหน้า ไม่มีขนในตารวม ส่วนปลายของกรามมี 3 แฉก (tridentate) มีเส้นนูนแข็งด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) ไม่มีตุ่มใส (blister plate) อยู่ด้านล่างของตารวม หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนวอกด้านบน ตาเดี่ยวด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ห่างจากขอบด้านในของตารวม มีแถบลายเส้นด้านข้างแฉกแบบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ไม่มีกลุ่มขนหรือพบอยู่อย่างกระจัดกระจายบริเวณด้านข้างของหัวกะโหลกเหนือกราม หนวด (Antennae) เพศเมียมีหนวดจำนวน 5 ปล้อง รวมตัวกันแน่นรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere) เพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง

อก (Mesosoma) รูปร่างโดยทั่วไปของส่วนอก มีลักษณะนูนทั้งด้านบนและด้านข้าง ไม่มีแผ่นแข็งลักษณะเป็นมันวาว (skaphion) อยู่ทางตอนบนของปล้องอก ส่วนปลายของอกปล้องที่ 3 (metascutellum) ไม่มีหนามแหลมยื่นออกมา ขอบด้านหลังของอกปล้องที่ 3 มีลักษณะโค้งมน ไม่มีหลุมที่เรียงตัวกันเป็นแถว (episternal foveae) บนผนังลำตัวเหนือฐานของขาปล้องที่ 1 ฐานของขาปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 อยู่ชิดติดกัน มีลวดลายของหลุม (mesosoma sulcus) หนาแน่นบริเวณด้านข้างของผนังลำตัวส่วนอก ไม่มีเส้นขอบด้านข้าง (parapsidal line) บริเวณอกปล้องที่สองด้านบน (dorsal



mesoscutum) ไม่มีพื้นที่บนส่วนผนังลำตัวรูปร่างคล้ายกระสวยทอผ้า (netrion) บริเวณด้านข้างของอก (lateral mesosoma) มีร่องบริเวณขอบด้านบนของอกปล้องที่ 2 (notaulus) ไม่มีสันนูนทางด้านข้างของอกปล้องที่ 1 (vertical epomial carina)

ปีก (Wings) บนปีกคู่หน้าไม่มีเส้นปีก basal vein (Rs+M) เส้นปีก M เส้นปีก Rs และไม่มีปื้นสีดำหรือสีเทา (pseudostigma) บริเวณเส้นปีก marginal vein (R) เส้นปีก marginal vein (R) บนปีกคู่หน้าค่อนข้างสั้นเกือบเท่ากับเส้นปีก stigmalis (r-rs) หรือในบางชนิดสั้นกว่า มีเส้นปีก postmarginal vein (R1) บนปีกคู่หลังมีเส้นปีก submarginal vein (R)

ท้อง (metasoma) มีรูปร่างสั้นและป้อม ไม่มีลักษณะนูนโหนกคล้ายเขา (horn) บริเวณฐานของท้องปล้องที่ 1 ท้องปล้องที่ 2 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 3 อย่างชัดเจน แผ่นแข็งด้านล่างของท้องปล้องที่ 3 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 4 หรือในบางครั้งขนาดเกือบเท่ากัน ลักษณะของท้องปล้องที่ 6 ในเพศเมียมีลักษณะขอบทู่ไม่ชี้ออก (blunt edge) ไม่มีหลุมบริเวณด้านข้างของท้องปล้องที่ 1 มีแนวร่องลึก (antecostal sulcus)

การวินิจฉัย (Diagnosis) บริเวณส่วนกลางของอก (mesoscutellum) พบลักษณะผิวขรุขระ (coriaceous microsculpture) เห็นได้อย่างชัดเจน เส้นขนทางตอนฐานมีลักษณะเป็นร่างแหห่างกัน (pustulate) แผ่นแข็งๆ (mesopleuron) มีลักษณะตื้นและกดทับซึ่งมีระยะห่างระหว่างหลุมทั้งสอง (mesopleural pit) ลักษณะของ netrion ไม่สมบูรณ์

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ชัยนาท สมุทรสาคร
สมุทรสงคราม

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0002689, 0002682, 0000278, 0003463 – 0003470, 0002146 – 0002155, 0002741, 0002756, 0002765, 0002523, 0002732

Trissolcus japonicus (Ashmead)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

หัว (Head) ส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงส่วนอก (mesosoma) รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะค่อนข้างแคบตามแนวขวาง (weakly transverse) ไม่มีสันแข็งบริเวณหน้า (frontal depression) ร่องลึกบนโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณใต้ตา รวม ไม่มีเส้นนูนพาดผ่านกลางใบหน้า แผ่นเหนือริมฝีปากบนและริมฝีปากบนไม่เชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียว ไม่มีเส้นนูนรอบตา รวม (orbital carina) ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture)



มีลักษณะเป็นรอยขีดสานเป็นร่างแหและมีเม็ดขนาดเล็กแทรกอยู่ ไม่มีเส้นนูนพาดตามขวาง (frontal transverse carinae) ไม่มีขนในตารวม ส่วนปลายของกราม (mandibles) มี 2 แฉก (bidentate) ผนังลำตัวบริเวณพื้นที่ด้านหลังของหัวกะโหลก (occiput) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ (microsculpture) หนาแน่นและกระจายตัวสม่ำเสมอ ไม่มีเส้นนูนแข็งด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนว mesosoma ตาเดี่ยวด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ใกล้หรือเกือบติดกับขอบด้านในของตารวม ไม่มีแถบลายเส้นด้านข้างแฉกแบบใบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ไม่มีกลุ่มขนหรือพบอยู่อย่างกระจัดกระจายบริเวณด้านข้างของหัวกะโหลกเหนือกราม หนวด (Antennae) เพศเมียมีหนวดจำนวน 5 ปล้องที่รวมตัวกันแน่นมีรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere) การจัดเรียงของต่อมรับรู้กลิ่นหรือฮอโรโมนที่พืชปลดปล่อยในเพศเมีย (claval formula) มีดังนี้ A11-A9/1-2-2 เพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง

อก (Mesosoma) รูปร่างโดยทั่วไปของส่วนอก มีลักษณะนูนทั้งด้านบนและด้านข้าง ไม่มีแผ่นแข็งลักษณะเป็นมันวาว (skaphion) อยู่ทางตอนบนของปล้องอก ส่วนปลายของอกปล้องที่ 3 (metascutellum) ไม่มีหนามแหลมยื่นออกมา ขอบด้านหลังของอกปล้องที่ 3 มีลักษณะโค้งมน มีหลุมที่เรียงตัวกันเป็นแถว (episternal foveae) บนผนังลำตัวเหนือฐานของขาปล้องแรก ฐานของขาปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 อยู่ห่างจากกัน มีรอยแตกของหลุมก่อนข้างน้อยบริเวณด้านข้างของผนังลำตัวส่วนอก ไม่มีเส้นขอบด้านข้าง (parapsidal line) บริเวณอกปล้องที่สองด้านบน (dorsal mesoscutum) ไม่มีพื้นที่บนส่วนผนังลำตัวรูปร่างคล้ายกระสวยทอผ้า (netrion) บริเวณด้านข้างของอก (lateral mesosoma) ไม่มีร่องบริเวณขอบด้านบนของอกปล้องที่ 2 (notaulus) ไม่มีสันนูนทางด้านข้างของอกปล้องที่ 1 (vertical epomial carina)

ปีก (Wings) บนปีกคู่หน้าไม่มีเส้นปีก basal vein (Rs+M) เส้นปีก M เส้นปีก Rs และไม่มีปื้นสีดำหรือสีเทา (pseudostigma) บริเวณเส้นปีก marginal vein (R) เส้นปีก marginal vein (R) บนปีกคู่หน้าค่อนข้างสั้นเกือบเท่ากับเส้นปีก stigmalis (r-rs) หรือในบางชนิดสั้นกว่า มีเส้นปีก postmarginal vein (R1) บนปีกคู่หลังมีเส้นปีก submarginal vein (R)

ท้อง (metasoma) มีรูปร่างเรียวยาว ไม่มีลักษณะนูนโหนกคล้ายเขา (horn) บริเวณฐานของท้องปล้องที่ 1 ท้องปล้องที่ 2 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 3 อย่างชัดเจน ลักษณะของท้องปล้องที่ 6 ในเพศเมียมีลักษณะขอบทู่ไม่ชี้ออก (blunt edge) ไม่มีหลุมบริเวณด้านข้างของท้องปล้องที่ 1 ไม่มีแนวร่องลึก (antecostal sulcus) อยู่ด้านบนของท้องปล้องที่ 2 และ 3

การวินิจฉัย (Diagnosis) บริเวณปากส่วนล่าง (clypeus) มีขนจำนวน 4 เส้น ด้านข้างของอกพบแผ่นแข็งเรียกว่า mesopleuron และมีรอยพับอยู่บนพื้นผิวแผ่นแข็งนี้ (episternal foveae) เกิดเป็นเส้น



ต่อเนื่องกันเป็นช่องๆ จาก postacetabular sulcus ไปยังหลุมด้านข้าง mesopleural pit ออกปล้องกลางไม่มีเส้นนูนด้านข้างเกิดขึ้น (mesoscutal carina)

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สุรินทร์ มหาสารคาม อุบลราชธานี กาฬสินธุ์ อุทัยธานี นครสวรรค์ พิษณุโลก

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0003542, 0004597, 0003425, 0002454 – 0002463, 0003472 – 0003481, 0003461 – 0003470

Trissolucs. thyantae Ashmead

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

หัว (Head) ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนอก (mesosoma) รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะค่อนข้างแคบตามแนวขวาง (weakly transverse) ไม่มีสันแข็งบริเวณหน้า (frontal depression) พบร่องลึกบนโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณด้านหลังของตารวม มีเส้นนูน (central keel) 2 เส้นล้อมรอบฐานหนวด (antennal insertion) มาบรรจบกันและพาดผ่านกลางใบหน้า และไปบรรจบกันอีกครั้งเป็นรูปตัว Y (Y-shape) ด้านหน้าตาเดี่ยวที่อยู่ตรงกลาง (medial ocellus) แผ่นเหนือริมฝีปากบนและริมฝีปากบนเชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียว ไม่มีเส้นนูนรอบตารวม (orbital carina) ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเรียบและบางครั้งสะท้อนแสง (smooth throughout) ไม่มีเส้นนูนพาดตามขวาง (frontal transverse carinae) ไม่มีขนในตารวม ส่วนปลายของกราม (mandibles) มี 2 แฉก (bidentate) ผนังลำตัวบริเวณพื้นที่ด้านหลังของหัวกะโหลก (occiput) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ (microsculpture) หนาแน่นและกระจายตัวสม่ำเสมอ ไม่มีเส้นนูนแข็งด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนวปล้องอกด้านบน ตาเดี่ยวด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ห่างจากขอบด้านในของตารวม มีแถบลายเส้นด้านข้างแกมรูปใบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ไม่มีกลุ่มขนหรือพอบอยู่อย่างกระจัดกระจายบริเวณด้านข้างของหัวกะโหลกเหนือกราม

หนวด (Antennae) เพศเมียมีหนวดจำนวน 4 ปล้องที่รวมตัวกันแน่นมีรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere) การจัดเรียงของต่อมรับรู้กลิ่นหรือฮอร์โมนที่พืชปลดปล่อยในเพศเมีย (claval formula) มีดังนี้ A11-A8/1-2-2-2 เพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง

อก (Mesosoma) รูปร่างโดยทั่วไปของส่วนอก มีลักษณะนูนทั้งด้านบนและด้านข้าง ไม่มีแผ่นแข็งลักษณะเป็นมันวาว (skaphion) อยู่ทางตอนบนของปล้องอก ส่วนปลายของอกปล้องที่ 3 (metascutellum) ไม่มีหนามแหลมยื่นออกมา ขอบด้านหลังของอกปล้องที่ 3 มีลักษณะโค้งมน ไม่มีหลุมที่เรียงตัวกันเป็นแถว (episternal foveae) บนผนังลำตัวเหนือฐานของขาปล้องที่ 1 ฐานของขาปล้องที่ 1



และปล้องที่ 2 อยู่ห่างจากกัน มีลวดลายของหลุมค่อนข้างน้อยบริเวณด้านข้างของผนังลำตัวส่วนอก ไม่มีเส้นขอบด้านข้าง (parapsidal line) บริเวณอกปล้องที่สองด้านบน (dorsal mesoscutum) ไม่มีพื้นที่บนส่วนผนังลำตัวรูปร่างคล้ายกระสวยทอผ้า (netrion) บริเวณด้านข้างของอก (lateral mesosoma) มีร่องบริเวณขอบด้านบนของอกปล้องที่ 2 (notaulus) ไม่มีสันนูนทางด้านข้างของอกปล้องที่ 1 (vertical epomial carina)

ปีก (Wings) บนปีกคู่หน้าไม่มีเส้นปีก basal vein (Rs+M) เส้นปีก M เส้นปีก Rs และไม่มีปื้นสีดำหรือสีเทา (pseudostigma) บริเวณเส้นปีก marginal vein (R) เส้นปีก marginal vein (R) บนปีกคู่หน้าค่อนข้างสั้นเกือบเท่ากับเส้นปีก stigmatis (r-rs) หรือในบางชนิดสั้นกว่า มีเส้นปีก postmarginal vein (R1) บนปีกคู่หลังมีเส้นปีก submarginal vein (R)

ท้อง (metasoma) มีรูปร่างเรียวยาว ไม่มีลักษณะนูนโหนกคล้ายเขา (horn) บริเวณฐานของท้องปล้องที่ 1 ท้องปล้องที่ 2 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 3 อย่างชัดเจน

การวินิจฉัย (Diagnosis) พื้นผิวของอกปล้องที่ 2 ลักษณะเรียบและมัน ไม่พบลักษณะขรุขระหรือร่างแห ส่วนของแก้มเมื่อมองจากด้านข้างแคบและยาว พบแผ่นแข็งทางด้านข้างหรือ mesopleuron และค่อยๆ จางหายไปทางส่วนล่างของอก

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) เพชรบุรี ตราด นครราชสีมา อุบลราชธานี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาริโค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0008797, 0005764, 0004562, 0005674 – 0005680

Trissolcus latisulcus Crawford

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

หัว (Head) ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนอก (mesosoma) รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะแคบตามแนวขวาง (transverse) ไม่มีสันแข็งบริเวณหน้า (frontal depression) มีร่องลึกบนโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณด้านหลังของตา รวม มีเส้นนูน (central keel) 2 เส้นล้อมรอบฐานหนวด (antennal insertion) มาบรรจบกันและพาดผ่านกลางใบหน้า และค่อยๆ หายไปบริเวณด้านหน้าตาเดี่ยวที่อยู่ตรงกลาง (medial ocellus) แผ่นเหนื่อริมฝีปากบนและริมฝีปากบนเชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียว มีเส้นนูนรอบตา รวม (orbital carina) ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเม็ดขนาดเล็ก (microsculpture) แทรกอยู่อย่างหนาแน่นบริเวณเส้นนูนกลางใบหน้าและรอบตา รวม มีเส้นนูนพาดตามขวาง (frontal transverse carinae) ซึ่งเกิดขึ้นมาจากฐานของเส้นนูนกลางใบหน้า ไม่มีขนในตา รวม ส่วนปลายของกรามมี 3 แฉก (tridentate) มีเส้นนูนแข็ง



ด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) ไม่มีตุ่มใส (blister plate) อยู่ด้านล่างของตารวม หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนวอกด้านบน ตาเดี่ยวด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ห่างจากขอบด้านบนของตารวม มีแถบลายเส้นด้านข้างแฉกแบบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ไม่มีกลุ่มขนหรือพบบ่อยอย่างกระจุกกระจายบริเวณด้านข้างของหัวกะโหลกเหนือกราม

หนวด (Antennae) เพศเมียมีหนวดจำนวน 5 ปล้อง รวมตัวกันแน่นรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere) เพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง

อก (Mesosoma) รูปร่างโดยทั่วไปของส่วนอก มีลักษณะนูนทั้งด้านบนและด้านข้าง ไม่มีแผ่นแข็งลักษณะเป็นมันวาว (skaphion) อยู่ทางตอนบนของปล้องอก ส่วนปลายของอกปล้องที่ 3 (metascutellum) ไม่มีหนามแหลมยื่นออกมา ขอบด้านหลังของอกปล้องที่ 3 มีลักษณะโค้งมน ไม่มีหลุมที่เรียงตัวกันเป็นแถว (episternal foveae) บนผนังลำตัวเหนือฐานของขาปล้องที่ 1 ฐานของขาปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 อยู่ชิดติดกัน มีลวดลายของหลุม (mesosoma sulcus) หนาแน่นบริเวณด้านข้างของผนังลำตัวส่วนอก ไม่มีเส้นขอบด้านข้าง (parapsidal line) บริเวณอกปล้องที่สองด้านบน (dorsal mesoscutum) ไม่มีพื้นที่บนส่วนผนังลำตัวรูปร่างคล้ายกระสวยทอผ้า (netrion) บริเวณด้านข้างของอก (lateral mesosoma) มีร่องบริเวณขอบด้านบนของอกปล้องที่ 2 (notaulus) ไม่มีสันนูนทางด้านข้างของอกปล้องที่ 1 (vertical epomial carina)

ปีก (Wings) บนปีกคู่หน้าไม่มีเส้นปีก basal vein (Rs+M) เส้นปีก M เส้นปีก Rs และไม่มีปื้นสีดำหรือสีเทา (pseudostigma) บริเวณเส้นปีก marginal vein (R) เส้นปีก marginal vein (R) บนปีกคู่หน้าค่อนข้างสั้นเกือบเท่ากับเส้นปีก stigmalis (r-rs) หรือในบางชนิดสั้นกว่า มีเส้นปีก postmarginal vein (R1) บนปีกคู่หลังมีเส้นปีก submarginal vein (R)

ท้อง (metasoma) มีรูปร่างสั้นและป้อม บริเวณฐานของท้องปล้องที่ 1 ท้องปล้องที่ 2 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 3 อย่างชัดเจน แผ่นแข็งด้านล่างของท้องปล้องที่ 3 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 4 หรือในบางครั้งขนาดเกือบเท่ากัน ลักษณะของท้องปล้องที่ 6 ในเพศเมียมีลักษณะขอบทู่ไม่ชี้ออก (blunt edge) ไม่มีหลุมบริเวณด้านข้างของท้องปล้องที่ 1 มีแนวร่องลึก (antecostal sulcus) อยู่ด้านบนของท้องปล้องที่ 2 และไม่พบลักษณะดังกล่าวในท้องปล้องที่ 3

การวินิจฉัย (Diagnosis) พบแผ่นแข็งที่อกปล้องที่ 3 หรือ metapleuron ลักษณะด้านล่างของอกปล้องที่ 3 มีลักษณะเป็นหลุมตื้นๆ อยู่เหนือส่วนของขาปล้องที่หนึ่ง (paracoxal sulcus) เรียกว่า paragon พื้นผิวผนังลำตัวส่วนหน้าเห็นเป็นร่องตามขอบจากส่วนหน้าจนถึงกรามซึ่งติดต่อกับส่วนของตารวม



แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) ราชบุรี สมุทรสาคร นครปฐม

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0008976,

0003465, 0009875, 0003452 – 0003457, 0003564 – 0003568

Trissolcus comperei Ashmead

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

หัว (Head) ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนอก (mesosoma) รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะแคบตามแนวขวาง (transverse) ไม่มีสันแข็งบริเวณหน้า (frontal depression) มีร่องลึกบนโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณด้านหลังของตา รวม มีเส้นนูน (central keel) 2 เส้นล้อมรอบฐานหนวด (antennal insertion) มาบรรจบกันและพาดผ่านกลางใบหน้า และค่อยๆ หายไปบริเวณด้านหน้าตาเดี่ยวที่อยู่ตรงกลาง (medial ocellus) แผ่นเหนือริมฝีปากบนและริมฝีปากบน เชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียว มีเส้นนูนรอบตา รวม (orbital carina) ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเม็ดขนาดเล็ก (microsculpture) แทรกอยู่อย่างหนาแน่น บริเวณเส้นนูนกลางใบหน้าและรอบตา รวม มีเส้นนูนพาดตามขวาง (frontal transverse carinae) ซึ่งเกิดขึ้นมาจากฐานของเส้นนูนกลางใบหน้า ไม่มีขนในตา รวม ส่วนปลายของกรามมี 3 แฉก (tridentate) มีเส้นนูนแข็งด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) ไม่มีตุ่มใส (blister plate) อยู่ด้านล่างของตา รวม หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนวอกด้านบน ตาเดี่ยวด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ห่างจากขอบด้านในของตา รวม มีแถบลายเส้นด้านข้างแฉกรูปใบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ไม่มีกลุ่มขนหรือพอย้อย่างกระจัดกระจายบริเวณด้านข้างของหัวกะโหลกเหนือกราม

หนวด (Antennae) เพศเมียมีหนวดจำนวน 4 ปล้อง รวมตัวกันแน่นรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere) เพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง

อก (Mesosoma) รูปร่างโดยทั่วไปของส่วนอก มีลักษณะนูนทั้งด้านบนและด้านข้าง ไม่มีแผ่นแข็งลักษณะเป็นมันวาว (skaphion) อยู่ทางตอนบนของปล้องอก ส่วนปลายของอกปล้องที่ 3 (metascutellum) ไม่มีหนามแหลมยื่นออกมา ขอบด้านหลังของอกปล้องที่ 3 มีลักษณะโค้งมน ไม่มีหลุมที่เรียงตัวกันเป็นแถว (episternal foveae) บนผนังลำตัวเหนือฐานของขาปล้องที่ 1 ฐานของขาปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 อยู่ชิดติดกัน มีลวดลายของหลุม (mesosoma sulcus) หนาแน่นบริเวณด้านข้างของผนังลำตัวส่วนอก ไม่มีเส้นขอบด้านข้าง (parapsidal line) บริเวณอกปล้องที่สองด้านบน (dorsal mesoscutum) ไม่มีพื้นที่บนส่วนผนังลำตัวรูปร่างคล้ายกระสวยทอผ้า (netrion) บริเวณด้านข้างของอก (lateral mesosoma) มีร่องบริเวณขอบด้านบนของอกปล้องที่ 2 (notaulus) ไม่มีสันนูนทางด้านข้างของอกปล้องที่ 1 (vertical epomial carina)



ปีก (Wings) บนปีกคู่หน้าไม่มีเส้นปีก basal vein (Rs+M) เส้นปีก M เส้นปีก Rs และไม่มีปื้นสีดำหรือสีเทา (pseudostigma) บริเวณเส้นปีก marginal vein (R) เส้นปีก marginal vein (R) บนปีกคู่หน้าค่อนข้างสั้นเกือบเท่ากับเส้นปีก stigmalis (r-rs) หรือในบางชนิดสั้นกว่า มีเส้นปีก postmarginal vein (R1) บนปีกคู่หลังมีเส้นปีก submarginal vein (R)

ท้อง (metasoma) มีรูปร่างสั้นและป้อม ไม่มีลักษณะนูนโหนกคล้ายเขา (horn) บริเวณฐานของท้องปล้องที่ 1 ท้องปล้องที่ 2 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 3 อย่างชัดเจน แผ่นแข็งด้านล่างของท้องปล้องที่ 3 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 4 หรือในบางครั้งขนาดเกือบเท่ากัน ลักษณะของท้องปล้องที่ 6 ในเพศเมียมีลักษณะขอบทู่ไม่ชี้ออก (blunt edge) ไม่มีหลุมบริเวณด้านข้างของท้องปล้องที่ 1 มีแนวร่องลึก (antecostal sulcus) อยู่ด้านบนของท้องปล้องที่ 2 และไม่พบลักษณะดังกล่าวในท้องปล้องที่ 3 ระบบอวัยวะวางไข่ในเพศเมียเป็นแบบ Ceratobaeus-type (Austin & Field 1997)

การวินิจฉัย (Diagnosis) ท้องปล้องที่ 2 เรียบหรือบางครั้งพบเป็นรอยพับเป็นครีบทางส่วนหลังติดต่อไปยังหลุมลึกไปยังส่วนปลายท้อง บริเวณท้องปล้องสุดท้ายมีลักษณะเป็นปลายเปิดอยู่ที่ปลายของท้องด้านข้างซึ่งใช้เป็นช่องสำหรับหายใจ (propodeal spiracle) ออกปล้องสุดท้ายเชื่อมติดต่อกันกับส่วนของแผ่นแข็งที่วิวัฒนาการมาจากท้องปล้องที่หนึ่งหรือเรียกว่า propodeum (จำนวน 2 ตัวอย่าง เขตการแพร่กระจาย)

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) สุพรรณบุรี

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0006789, 0002312,

Trissolcus mitsukurii Ashmead

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

หัว (Head) ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนอก (mesosoma) รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะแคบตามแนวขวาง (transverse) ไม่มีสันแข็งบริเวณหน้า (frontal depression) มีร่องลึกบนโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณด้านหลังของตา รวม มีเส้นนูน (central keel) 2 เส้นล้อมรอบฐานหนวด (antennal insertion) มาบรรจบกันและพาดผ่านกลางใบหน้า และค่อยๆหายไปบริเวณด้านหน้าตาเดี่ยวที่อยู่ตรงกลาง (medial ocellus) แผ่นเหนื่อริมฝีปากบนและริมฝีปากบนเชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียว มีเส้นนูนรอบตา รวม (orbital carina) ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเม็ดขนาดเล็ก (microsculpture) แทรกอยู่อย่างหนาแน่นบริเวณเส้นนูนกลางใบหน้าและรอบตา รวม มีเส้นนูนพาดตามขวาง (frontal transverse carinae) ซึ่งเกิดขึ้นมาจากฐานของเส้นนูนกลางใบหน้า ไม่มีขนในตา รวม ส่วนปลายของกรามมี 3 แฉก



(tridentate) มีเส้นนูนแข็งด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) ไม่มีตุ่มใส (blister plate) อยู่ด้านล่างของตา รวม หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนวอกด้านบน ตาเดี่ยวด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ห่างจากขอบด้านในของตา รวม มีแถบลายเส้นด้านข้างแฉกแบบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ไม่มีกลุ่มขนหรือพบอยู่อย่างกระจัดกระจายบริเวณด้านข้างของหัวกะโหลกเหนือกราม

หนวด (Antennae) เพศเมียมีหนวดจำนวน 5 ปล้อง รวมตัวกันแน่นรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere) เพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง

อก (Mesosoma) รูปร่างโดยทั่วไปของส่วนอก มีลักษณะนูนทั้งด้านบนและด้านข้าง ไม่มีแผ่นแข็งลักษณะเป็นมันวาว (skaphion) อยู่ทางตอนบนของปล้องอก ส่วนปลายของอกปล้องที่ 3 (metascutellum) ไม่มีหนามแหลมยื่นออกมา ขอบด้านหลังของอกปล้องที่ 3 มีลักษณะโค้งมน ไม่มีหลุมที่เรียงตัวกันเป็นแถว (episternal foveae) บนผนังลำตัวเหนือฐานของขาปล้องที่ 1 ฐานของขาปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 อยู่ชิดติดกัน มีลวดลายของหลุม (mesosoma sulcus) หนาแน่นบริเวณด้านข้างของผนังลำตัวส่วนอก ไม่มีเส้นขอบด้านข้าง (parapsidal line) บริเวณอกปล้องที่สองด้านบน (dorsal mesoscutum) ไม่มีพื้นที่บนส่วนผนังลำตัวรูปร่างคล้ายกระสวยทอผ้า (netrion) บริเวณด้านข้างของอก (lateral mesosoma) มีร่องบริเวณขอบด้านบนของอกปล้องที่ 2 (notaulus) ไม่มีสันนูนทางด้านข้างของอกปล้องที่ 1 (vertical epomial carina)

ปีก (Wings) บนปีกคู่หน้าไม่มีเส้นปีก basal vein (Rs+M) เส้นปีก M เส้นปีก Rs และไม่มีปิ่นสีดำหรือสีเทา (pseudostigma) บริเวณเส้นปีก marginal vein (R) เส้นปีก marginal vein (R) บนปีกคู่หน้าค่อนข้างสั้นเกือบเท่ากับเส้นปีก stigmalis (r-rs) หรือในบางชนิดสั้นกว่า มีเส้นปีก postmarginal vein (R1) บนปีกคู่หลังมีเส้นปีก submarginal vein (R)

ท้อง (metasoma) มีรูปร่างสั้นและป้อม ไม่มีลักษณะนูนโหนกคล้ายเขา (horn) บริเวณฐานของท้องปล้องที่ 1 ท้องปล้องที่ 2 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 3 อย่างชัดเจน แผ่นแข็งด้านล่างของท้องปล้องที่ 3 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 4 หรือในบางครั้งขนาดเกือบเท่ากัน

การวินิจฉัย (Diagnosis) ขอบด้านในของตา รวมเห็นเป็นร่องลึกโดยรอบและค่อยๆ ลึกลงเรื่อยๆ ทางตอนล่าง ปล้องกลางของอกมีลักษณะเป็นหลุมลึกอย่างน้อยที่สุดทางด้านข้างและส่วนใหญ่เห็นเป็นร่องลึกโดยตลอด (rugose) ด้านข้างของปล้องท้องส่วนใหญ่มีขนปกคลุม บ่อยครั้งจะพบเป็นแผ่นแข็งๆ ที่มีหลุมอยู่ทางด้านข้าง (median mesoscutal sulcus)

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) นครสวรรค์ สุพรรณบุรี ตาก กำแพงเพชร ประจวบคีรีขันธ์



ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0005462, 0005465, 0006547 – 0006549, 0005435 – 0005444

Trissolcus vindicius (Nixon)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

หัว (Head) ส่วนหัวมีขนาดเล็กกว่าส่วนอก (mesosoma) รูปร่างของส่วนหัวเมื่อมองจากด้านบน (dorsal view) มีลักษณะแคบตามแนวขวาง (transverse) ไม่มีสันแข็งบริเวณหน้า (frontal depression) มีร่องลึกบนโหนกแก้ม (malar sulcus) เริ่มจากบริเวณด้านหลังของตารวม มีเส้นนูน (central keel) 2 เส้นล้อมรอบฐานหนวด (antennal insertion) มาบรรจบกันและพาดผ่านกลางใบหน้า และค่อยๆหายไปบริเวณด้านหน้าตาเดี่ยวที่อยู่ตรงกลาง (medial ocellus) แผ่นเหนือริมฝีปากบนและริมฝีปากบนเชื่อมต่อกันเป็นเนื้อเดียว มีเส้นนูนรอบตารวม (orbital carina) ลักษณะผนังลำตัวส่วนหน้าบริเวณใต้ตาเหนือส่วนปาก (frontal sculpture) มีลักษณะเม็ดขนาดเล็ก (microsculpture) แทรกอยู่อย่างหนาแน่นบริเวณเส้นนูนกลางใบหน้าและรอบตารวม มีเส้นนูนพาดตามขวาง (frontal transverse carinae) ซึ่งเกิดขึ้นมาจากฐานของเส้นนูนกลางใบหน้า ไม่มีขนในตารวม ส่วนปลายของกรามมี 3 แฉก (tridentate) มีเส้นนูนแข็งด้านหลังของหัวกะโหลก (hyperoccipital carina) ไม่มีตุ่มใส (blister plate) อยู่ด้านล่างของตารวม หัวกะโหลกมีลักษณะโค้งมนเว้าตามแนวอกด้านบน ตาเดี่ยวด้านข้างทั้ง 2 ข้าง (lateral ocelli) ตั้งอยู่ห่างจากขอบด้านในของตารวม มีแถบลายเส้นด้านข้างแฉกแบบพัด (fan-like striae) ติดกับส่วนฐานของกราม ไม่มีกลุ่มขนหรือพบบ่อยอย่างกระจายบริเวณด้านข้างของหัวกะโหลกเหนือกราม หนวด (Antennae) เพศเมียมีหนวดจำนวน 5 ปล้อง รวมตัวกันแน่นรูปร่างเป็นกระบอง (clavomere) เพศผู้มีปล้องหนวด 12 ปล้อง

อก (Mesosoma) รูปร่างโดยทั่วไปของส่วนอก มีลักษณะนูนทั้งด้านบนและด้านข้าง ไม่มีแผ่นแข็งลักษณะเป็นมันวาว (skaphion) อยู่ทางตอนบนของปล้องอก ส่วนปลายของอกปล้องที่ 3 (metascutellum) ไม่มีหนามแหลมยื่นออกมา ขอบด้านหลังของอกปล้องที่ 3 มีลักษณะโค้งมน ไม่มีหลุมที่เรียงตัวกันเป็นแถว (episternal foveae) บนผนังลำตัวเหนือฐานของขาปล้องที่ 1 ฐานของขาปล้องที่ 1 และปล้องที่ 2 อยู่ชิดติดกัน มีลวดลายของหลุม (mesosoma sulcus) หนาแน่นบริเวณด้านข้างของผนังลำตัวส่วนอก ไม่มีเส้นขอบด้านข้าง (parapsidal line) บริเวณอกปล้องที่สองด้านบน (dorsal mesoscutum) ไม่มีพื้นที่บนส่วนผนังลำตัวรูปร่างคล้ายกระสวยทอผ้า (netrion) บริเวณด้านข้างของอก (lateral mesosoma) มีร่องบริเวณขอบด้านบนของอกปล้องที่ 2 (notaulus) ไม่มีสันนูนทางด้านข้างของอกปล้องที่ 1 (vertical epomial carina)

ปีก (Wings) บนปีกคู่หน้าไม่มีเส้นปีก basal vein (Rs+M) เส้นปีก M เส้นปีก Rs และไม่มีปื้นสีดำหรือสีเทา (pseudostigma) บริเวณเส้นปีก marginal vein (R) เส้นปีก marginal vein (R) บนปีกคู่



หน้าค่อนข้างสั้นเกือบเท่ากับเส้นปีก stigmalis (r-rs) หรือในบางชนิดสั้นกว่า มีเส้นปีก postmarginal vein (R1) บนปีกคู่หลังมีเส้นปีก submarginal vein (R)

ท้อง (metasoma) มีรูปร่างสั้นและป้อม ไม่มีลักษณะนูนโหนกคล้ายเขา (horn) บริเวณฐานของท้องปล้องที่ 1 ท้องปล้องที่ 2 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 3 อย่างชัดเจน แผ่นแข็งด้านล่างของท้องปล้องที่ 3 ยาวกว่าท้องปล้องที่ 4 หรือในบางครั้งขนาดเกือบเท่ากัน ลักษณะของท้องปล้องที่ 6 ในเพศเมียมีลักษณะขอบทู่ไม่ชี้ออก (blunt edge) ไม่มีหลุมบริเวณด้านข้างของท้องปล้องที่ 1 มีแนวร่องลึก (antecostal sulcus) อยู่ด้านบนของท้องปล้องที่ 2

การวินิจฉัย (Diagnosis) ริมีผีปากกลางพบขน 2 เส้น (clypeal setae) ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจน ด้านล่างของริมีผีปากกลางจะขยายออกเห็นเป็นร่องลึก ผนังลำตัวมีลักษณะเป็นหลุมทางด้านกลาง ติดต่อไปยังแผ่นแข็งด้านกลางของอก (postacetabular – mesopleural) ออกจากด้านข้างส่วนกลาง (mesoscutum) ไม่เห็นแผ่นนูน (median mesoscutal carina)

แหล่งที่เก็บตัวอย่าง (Collected locality) เพชรบูรณ์

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Material Examined) บาร์โค้ดตัวอย่าง EMBT ENT 0007843, 0006743

ข้อสังเกตและวิจารณ์ผลการทดลอง (Comments and Discussions)

มีหลายประเทศประสบความสำเร็จในการใช้แตนเบียนไข่วงศ์ Platygasteridae ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช Orr (1988) ได้รายงานถึงความสำเร็จในการใช้แตนเบียนไข่ ในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี พบว่ามีการนำเข้าแตนเบียนไข่ในวงศ์นี้ในประเทศต่างๆ สูงถึง 30 ชนิด (classical biological control) นอกจากนี้แล้วสามารถใช้แตนเบียนไข่ชนิดนี้ในทุกวิธีการของการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีซึ่งประกอบไปด้วย การนำเข้า (classical control) การดูแลรักษาสมดุล (conservation) และการปล่อยอย่างท่วมท้น (augmentation) แตนเบียนที่ประสบความสำเร็จโดยการนำเข้า (classical biological control) ได้แก่ *Trissolcus basalis*, *Telenomus remus*, *Trissolcus semistriatus*, *Trissolcus nigribasalis*, *Trissolcus mitsukurii*, *Telenomus chloropus*, *Telenomus cyrus*, *Psix lacunatus*, *Telenomus proditor*, *Telenomus applanatus*, *Telenomus alsophilae* และแตนเบียนที่ประสบความสำเร็จในการผลิตขยายให้ได้ปริมาณมากและปล่อยควบคุมศัตรูพืช (augmentative biological control) ได้แก่ *Gryon muscaeforme*, *Trissolcus flavipes*, *Telenomus gifuensis*, *Trissolcus basalis*, *Trissolcus grandis*, *Trissolcus semistriatus*, *Trissolcus remus*, *Telenomus olsenni* แตนเบียนไข่ในสกุล *Trissolcus* เป็นสกุลที่มีศักยภาพในการนำมาใช้พัฒนาผลิตขยายเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี ซึ่งจากการทดลองนอกจากพบแตนเบียนในสกุล *Trissolcus* แล้วยังพบแตนเบียนในสกุลอื่นอีก 9 สกุล



ได้แก่ *Gryon* sp., *Telenomus* sp., *Idris* sp., *Calliscelio* sp., *Scelio* sp., *Psix* sp., *Phanuromyia* sp., *Trichoteleia* sp. และ *Macroteleia* sp. อย่างไรก็ตามเนื่องจากแตนเบียนไข่ในสกุล *Trissolus* จัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพและมีการนำมาใช้ในการพัฒนาผลิตขยายเพื่อควบคุมมวนศัตรูพืชจึงได้ดำเนินการวินิจฉัยจนถึงระดับชนิด ทั้งนี้แตนเบียนในสกุลอื่นยังมีแนวโน้มในการนำมาพัฒนาเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชได้เช่นกัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจเก็บตัวอย่างในพื้นที่ทางการเกษตรที่เคยมีการระบาดของมวนศัตรูพืช และดำเนินการศึกษาอนุกรมวิธานและความหลากหลายชนิด ผลการทดลองพบแตนเบียนไข่มวน 1 วงศ์ ได้แก่ *Platygastridae* พบสกุลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้แก่สกุล *Trissolcus* sp. ซึ่งมี 7 ชนิดได้แก่ *Trissolcus basalis* (Wollaston), *T. japonicus* (Ashmead), *T. thyantae* Ashmead, *T. latusulcus* Crawford, *T. comperei* Ashmead, *T. mitsukurii* Ashmead, *T. vindicius* (Nixon) นอกจากนี้พบแตนเบียนไข่มวนในสกุลอื่นอีก 9 สกุล ได้แก่ *Gryon* sp., *Telenomus* sp., *Idris* sp., *Calliscelio* sp., *Scelio* sp., *Psix* sp., *Phanuromyia* sp., *Trichoteleia* sp. และ *Macroteleia* sp. แตนเบียนไข่ในสกุล *Trissolus* จัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพและมีการนำมาใช้ในการพัฒนาผลิตขยายเพื่อควบคุมมวนศัตรูพืชแล้วในหลายประเทศ เสนอแนะถึงการพัฒนาแตนเบียนสกุล *Trissolcus* เพื่อควบคุมมวนศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจต่อไปในอนาคต

จากการทดลองเมื่อได้ชนิดของแตนเบียนไข่ที่เข้าทำลายแมลงในกลุ่มมวนวงศ์ *Pentatomidae* ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะถูกเก็บเป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้เป็นประโยชน์ในอนาคต เช่นการศึกษาประสิทธิภาพการเข้าทำลายเหยื่อ ผลิตขยายเป็นชีวภัณฑ์ใหม่ ได้ตัวอย่างแตนเบียนไข่ในพิพิธภัณฑ์แมลงทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ซึ่งนอกจากใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงสำหรับการเทียบหาชื่อวิทยาศาสตร์ ทั้งนี้ตัวอย่างสดที่ได้สามารถใช้ประกอบในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแตนเบียนไข่ โดยใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลในอนาคต ตัวอย่างแตนเบียนไข่ในสกุลที่ยังไม่วินิจฉัยจำแนกชนิด จะถูกเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง เพื่อนักอนุกรมวิธานทั่วโลก ที่วิจัยในสกุลนั้นๆ ยืมตัวอย่างเพื่อการศึกษาวิจัยในอนาคต ในกรณีที่มีการระบาดของมวนศัตรูพืช โดยเฉพาะการรองรับการระบาดของมวนศัตรูพืชต่างถิ่นที่สำคัญ ได้แก่ BMSB ข้อมูลเหล่านี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี ทั้งการพัฒนาแตนเบียนไข่สายพันธุ์ท้องถิ่นหรือการนำเข้าจากต่างประเทศ ได้ฐานข้อมูลสากลที่สมบูรณ์ ทั้งนี้อาจได้แมลงศัตรูธรรมชาติชนิดใหม่ที่เข้าทำลายมวนในวงศ์ *Pentatomidae* ถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้สู่นักชีววิทยา งานทางด้านการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีสามารถนำฐานข้อมูลดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต



คำขอบคุณ

-

เอกสารอ้างอิง

- Austin, A. D., N. F. Johnson, and M. Dowton. 2005. Systematics, evolution, and biology of scelionid and platygastriid wasp (Hymenoptera). *Annual Review of Entomology*. 50: 553–582.
- Fogain R. and S. Graff S. 2011. First records of the invasive pest, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in Ontario and Quebec. *J. Entomol. Soc. Ont.* 142: 45–48.
- Fujiie, A. 1985. Seasonal life cycle of *Halyomorpha mista*. *Bulletin of Chiba-Ken Agricultural Experiment*. 26: 87–93.
- Goulet, H. and J.T. Huber. 1993. *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Ottawa, Agric. Canada. 667 pp.
- Greathead, D.J. 1986. Parasitoids in classical biological control. pp. 289–318. *In: Waage, J. and Greathead, D.J. (Eds), Insect Parasitoids*. Academic Press, London.
- Hoebeke, E.R. and M.E. Carter. 2003. *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae). A polyphagous plant pest from Asia newly detected in North America. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*. 105(1): 225–237
- Hoffmann, W.E. 1931. A pentatomid pest of growing bean in south China. *Peking Nat. Hist. Bull.* 5: 25–26
- Johnson, N. F. 2014. *Hymenoptera* (Online). Available. <http://hol.osu.edu/> (2 April 2018).
- Johnson, N.F., L. Masner, L. Musetti, L., S. Van Noort, K. Rajmohana, D.C. Darling, A.E. Guidotti and A. Polaszek. 2008. Revision of world species of the genus *Heptascelio* Kieffer (Hymenoptera: Platygastroidea, Platygastriidae). *Zootaxa*. 1776: 1–51.
- LaSalle, J. and I.D. Gauld 1993. Hymenoptera: their diversity, and their impact on the diversity of other organisms. pp. 1–26. *In: LaSalle J., Gauld I.D. (Eds), Hymenoptera and Biodiversity*. CAB International, Wallingford, UK.
- Leskey, T., G. C. Hamilton, A. L.Nielsen, D.F. Polk, C. Rodriguez-Saona, J. C. Bergh, D. A. Herbert, T. P. Kuhar, D. Pfeiffer, G. P. Dively, C. R. R. Hooks, M. J. Raupp, P. M.



- Shrewsbury, G. Krawczyk, P. W. Shearer, J. Whalen, C. Koplinka-Loehr, E. Myers, D. Inkley, K. A. Hoelmer, D. H. Lee, and S. E. Wright. 2012. Pest status of the Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha Halys* in the USA. *Outlooks on Pest Management* 23(5): 218–226
- Masner, L. 1980. Key to genera of Scelionidae of the Holarctic region, with descriptions of new genera and species (Hymenoptera: Proctotrupoidea). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. 1(13): 1–54.
- Masner, L. 1993. Superfamily Platygastroidea, pp. 559-563. *In* Goulet H., and J.T. Huber [eds.], *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Ottawa, Agric. Canada.
- Mikó, I., L. Vilhelmsen, N.F. Johnson, L. Masner and Z. Péntzes 2007. Skeletomusculature of Scelionidae (Hymenoptera: Platygastroidea): head and mesosoma. *Zootaxa*. 1571: 1–78.
- Mills, N. 2010. Egg parasitoids in biological control and integrated pest management. pp. 389–409. *In*: Consoli, F.L. et al. (Eds), *Egg parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on Trichogramma*. Springer Science & Business Media B.V. US.
- Orr, D. B. 1988. Scelionid wasps as biological control agents: a review. *The Florida Entomologist*. 71(4): 506-528.
- Polaszek, A.D., D. Agosti, M. Alonso-Zarazaga, G. Beccaloni, P.P. Bjørn, et al. 2005. A universal register for animal names. *Nature*. 437: 477
- Pyle, R.L., J.L. Earle and B.D. Greene. 2008. Five new species of the damselfish genus *Chromis* (Perciform es: Labroides: Pomacentridae) from deep coral reefs in the tropical western Pacific. *Zootaxa*. 1671: 3–31.
- Savard, J., T. Diethard, S. Richards, G.M. Weinstock, R.A. Gibbs, J.H. Werren, H. Tettelin and M.J. Lercher. 2006. Phylogenetic analysis reveals bees and wasps (Hymenoptera) at the base of the radiation of holometabolous insects. *Genome Research*. 16:1334–1338.
- Sharkey, M.J. 2007. Phylogeny and classification of Hymenoptera. *Zootaxa*. 1668: 521–548.
- USDA-NIFA SCRI. 2014. Coordinated Agricultural Project, grant #2011-51181-30937 (Online). Available. <http://www.stopbmsb.org/index.cfm> (2 June 2017).



- Wermelinger, B., D. Wyniger and B. Forster. 2008. First records of an invasive bug in Europe: *Halyomorpha halys* Stål (Heteroptera: Pentatomidae), a new pest on woody ornamentals and fruit trees? *Mitteilungen Der Schweizer Entomologischen Gesellschaft*. 81:1–8
- Yang Z.Q., Y.X. Yao, L. Qui and Z. Li. 2009. A new species of *Trissolcus* (Hymenoptera: Scelionidae) parasitizing eggs of *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae) in China with comments on its biology. *Annals of the Entomological Society of America*. 102: 39–47.
- กองกีฏและสัตววิทยา. 2542. แมลงศัตรูไม้ผล. เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการ เกษตร. 145 หน้า



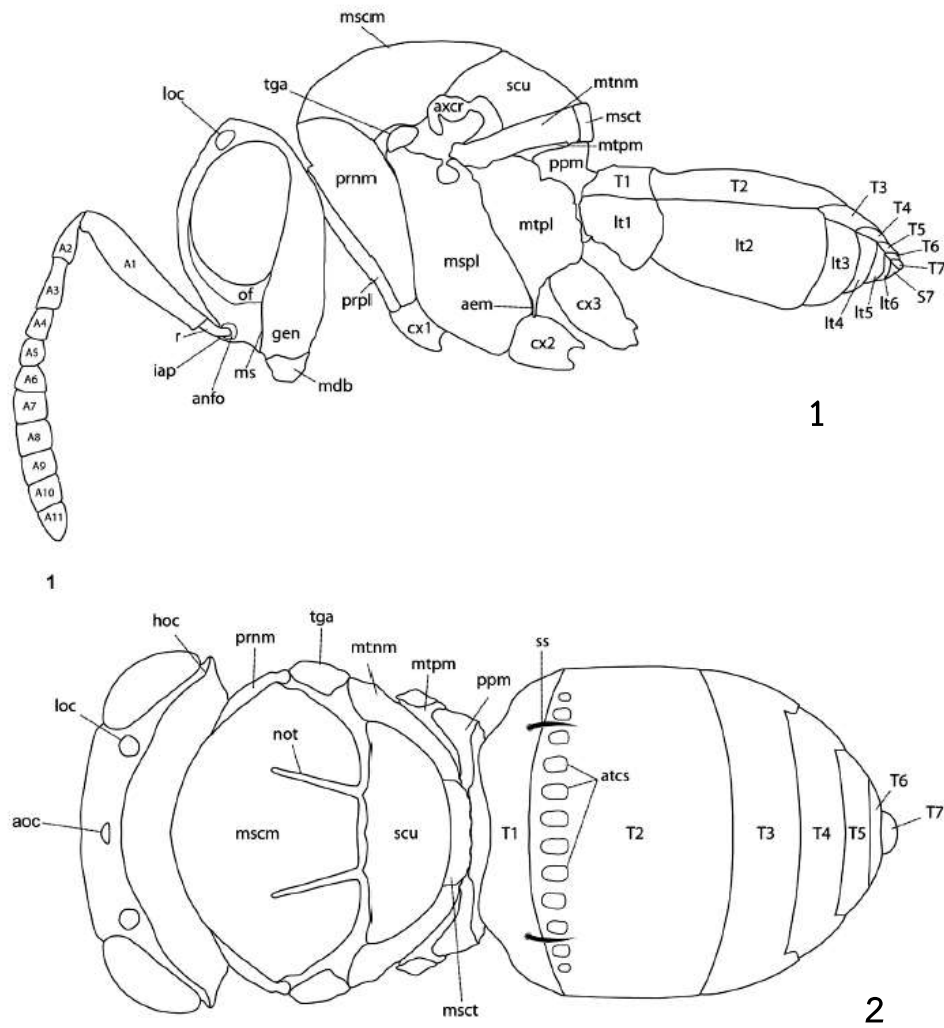


Figure 1-2. Morphological characters of *Trissolcus* sp.; 1, Dorsal habitus; 2, Lateral habitus

Characters annotations; A1–12 - antennomeres 1–12, ac - acetabular carina; aem -anteroventral extension of metapleuron; anfo - antennal foramen; aoc - anterior ocellus; as - antennal scrobe, atcs - antecostal sulcus; ats - postacetabular sulcus; axcr - axillar crescent; bs - basiconic sensilla ; cs - clypeal setae; ctk - central keel; cx1 - procoxa; cx2- mesocoxa; cx3 – metacoxal; eps - episternal foveae; fs - facial striae; gc - genal carina; gen - gena; hoc - hyperoccipital carina; iap - interantennal process; loc - lateral ocellus; lt(s) - laterotergite(s); mc - mesopleural carina; mdb - mandible; mmc - median mesoscutal carina; mms - median mesoscutal sulcus; mpp - mesopleural pit; ms - malar sulcus; mscm - mesoscutum; msct - metascutellum; mshs - mesoscutal humeral sulcus; mspl - mesopleuron; mtnm - metanotum; mtpl - metapleuron; mtpm - metapostnotum ; nes - netrion sulcus ; not - notaulus; of - orbital furrow; pcxs - paracoxal sulcus; ppm - propodeum; prnm - pronotum; prpl - propleuron; pvm - posteroventral portion of metapleuron; r - radicle; scu - mesoscutellum; ss - sublateral seta; T1–6 - mediotergite; tga – tegula

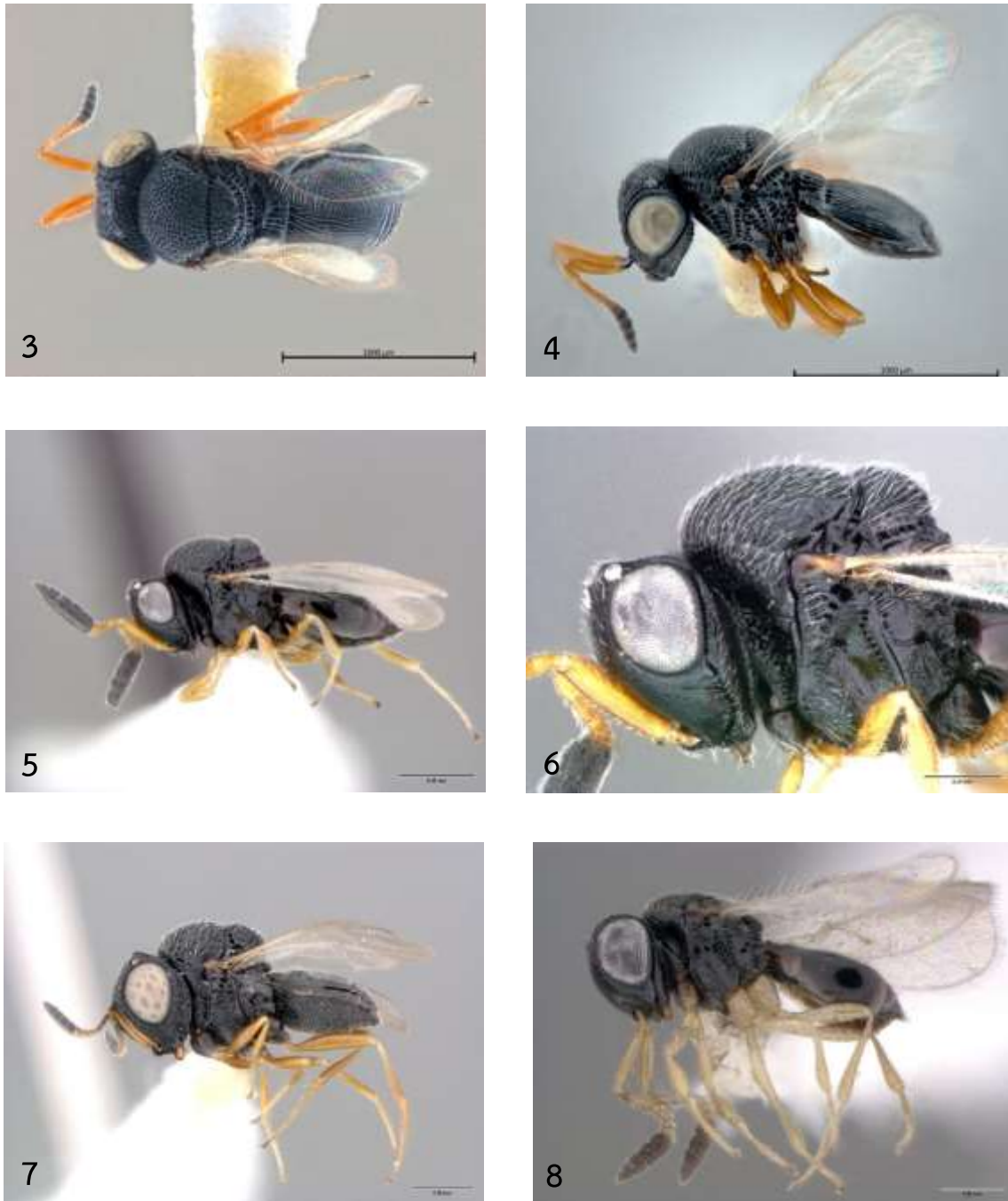


Figure 3 – 8. Identification process to genera level; 3, *Psix* sp. dorsal view; 4, *Psix* sp. lateral view; 5, *Trissolcus* sp. lateral view; 6, *Trissolcus* sp. lateral mesosoma; 7, *Gryon* sp. lateral view; 8, *Telenomus* lateral view

อนุกรมวิธานของแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแบ่ง
วงศ์ Coniopterygidae ในประเทศไทย
Taxonomy of Brown Lacewings (Family Hemerobiidae) and Dusty-wings
(Family Coniopterygidae) in Thailand

อาทิตย์ รักกลีกร จารุวัฒน์ แต่กุล พลอยชมพู กรวิภาสเรือง ชมัยพร บัวมาศ
อิทธิพล บรรณาการ ประภัสสร เขยคำแหง สิทธิศิริโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

This study on taxonomy of brown lacewings (Family Hemerobiidae) and dusty-wings (Family Coniopterygidae) is based on collections from plantation areas in all parts of Thailand between October 2018 – September 2021, and examination of specimens in the Insect Museum, Department of Agriculture. As a result, 2 brown lacewing taxa were identified to species and one only to genus, belonging to 3 subfamilies and 3 tribes: *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961, *Micromus timidus* Hagen, 1853 and *Drepanacra* sp.; while 1 dusty-wings taxon was identified to species and 1 only to genus, belonging to 1 subfamily and 2 tribes: *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836) and *Coniopteryx* sp.. Two species, *M. timidus* and *S. aleyrodiformis*, can be found in all parts of Thailand. The larvae of both species are often found as predators of many sucking-mouthpart pests, such as aphids and whiteflies. Thus they could be agriculturally important species which can be used in biological pest control, especially to control pests with sucking-mouthparts in future.

Keywords: lacewings , Hemerobiidae, dusty-wings , Coniopterygidae

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-20-62



บทคัดย่อ

การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแบ้ง วงศ์ Coniopterygidae โดยการสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 และจากตัวอย่างแมลงข้าง ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถวินิจฉัยแมลงข้างสีน้ำตาล ในระดับชนิดได้จำนวน 2 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 3 วงศ์ย่อย และ 3 เผ่า คือ *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961 *Micromus timidus* Hagen, 1853 และ *Drepanacra* sp. และสามารถวินิจฉัยแมลงข้างปีกแบ้ง ในระดับชนิดได้จำนวน 1 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 1 วงศ์ย่อย และ 2 เผ่า คือ *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836) และ *Coniopteryx* sp. โดยแมลงข้างทั้ง 2 วงศ์นี้ ชนิดที่สามารถพบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย มีจำนวน 2 ชนิด คือ *M. timidus* และ *S. aleyrodiformis* ซึ่งแมลงข้างทั้งสองชนิดนี้ มักพบตัวอ่อนกัดกินแมลงปากดูด ได้แก่ เพลี้ยอ่อน และแมลงหวี่ขาว อยู่บ่อยครั้ง จึงจัดว่าเป็นแมลงตัวห้ำที่น่าจะมีความสำคัญทางการเกษตร นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูด ในอนาคต

คำหลัก : แมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae แมลงข้างปีกแบ้ง

คำนำ

แมลงข้างอยู่ในอันดับ Neuroptera เป็นแมลงที่มีการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis) แมลงข้างเป็นแมลงตัวห้ำ กินแมลงและสัตว์ขนาดเล็กอื่นๆ เป็นอาหาร โดยเฉพาะในระยะตัวอ่อน แมลงข้างหลายชนิดเป็นศัตรูธรรมชาติของศัตรูพืชที่มีความสำคัญ โดยเป็นแมลงตัวห้ำของแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะแมลงปากดูด ซึ่งแมลงข้างในวงศ์ที่มีความสำคัญทางการเกษตร ได้แก่ แมลงข้างปีกใสสีเขียว วงศ์ Chrysopidae เป็นแมลงตัวห้ำของศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยแบ้ง เพลี้ยหอย เพลี้ยอ่อน ไรแดง และไข่ขนาดเล็กของแมลงอื่นๆ แมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae เป็นแมลงตัวห้ำของศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยแบ้ง เพลี้ยหอย เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว ไรแดง และไข่ขนาดเล็กของแมลงอื่นๆ แมลงข้างปีกแบ้ง วงศ์ Coniopterygidae เป็นแมลงตัวห้ำของศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยแบ้ง เพลี้ยหอย เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เพลี้ยไก่แจ้ ไรแดง และไข่ขนาดเล็กของแมลงอื่นๆ (ศานิต, 2550; ไสว, 2544; Brooks & Barnard, 1990; Cranshaw, 2004)

ในปัจจุบันมีการนำแมลงข้างสีน้ำตาลบางชนิดมาใช้ควบคุมการระบาดของแมลงศัตรูพืชปากดูดที่ทำความเสียหายพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ได้ผลการป้องกันกำจัดที่ดี โดยเฉพาะในสวนผลไม้ เช่น ลิ้นจี่ ลำไย เงาะ ส้มโอ ส้มเขียวหวาน รวมถึงพืชไร่ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เป็นต้น แต่ไม่แพร่หลายเท่ากับการใช้แมลงข้างปีกใสในการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี (รัตนา, 2544; รัตนา และประภัสสร, 2554)



เนื่องจากการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี มีความสำคัญมากในการอารักขาพืชผลทางการเกษตร โดยเฉพาะในประเทศไทย แต่ฐานข้อมูลเกี่ยวกับแมลงข้างสีน้ำตาลและแมลงข้างปีกแบ่งนั้นมีอยู่ไม่มากนัก ดังนั้น การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแบ่ง วงศ์ Coniopterygidae ในประเทศไทยนี้ จึงมีความสำคัญที่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐาน และทราบชนิดของแมลงข้างสีน้ำตาลและแมลงข้างปีกแบ่งที่อาศัยในระบบนิเวศเกษตรของประเทศไทย เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี หรือคัดเลือกชนิดแมลงข้างชนิดใหม่ๆ จากธรรมชาติของประเทศไทย ที่มีศักยภาพมาใช้ควบคุมการระบาดของแมลงศัตรูพืชได้ดียิ่งขึ้น ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) ตัวอย่างแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแบ่ง วงศ์ Coniopterygidae ที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจ และตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตร
- 2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ขวดฆ่า ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ของกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถังรักษาความเย็นและเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
- 3) สารเคมีต่างที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ 80%
- 4) อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ โหลขึ้น ตู้อบแมลง ฯลฯ
- 5) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น Ethyl alcohol 50-100%, sodium hydroxide 10%, clove oil และ Canada balsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้ว ปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร
- 6) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope และกล้องถ่ายภาพ
- 7) อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ camera lucida ปากกา rotting และกระดาษไขเขียนแบบ
- 8) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแบ่ง วงศ์ Coniopterygidae ได้แก่ New (2003) และ Sziráki (2011)

วิธีการ

- 1) เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแบ่ง วงศ์ Coniopterygidae โดยสำรวจจากแหล่งปลูกพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ มันสำปะหลัง ข้าวโพด ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มะนาว เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ และพืชผักต่างๆ เป็นต้น



2) การเก็บตัวอย่างแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae แบ่งเป็น 3 วิธี ดังนี้

- การเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงโดยใช้สวิงจับแมลง (insect net) โฉบเพื่อเก็บตัวแมลงข้างปีกใสจากแปลงปลูกพืชในช่วงเวลากลางวัน ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยาเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) หลังจากแมลงข้างตายแล้ว เก็บลงในซองกระดาษสามเหลี่ยมแยกใส่ไว้ในกล่องใส่ตัวอย่างแมลง นำกล่องใส่ตัวอย่างใส่ไว้ในกล่องรักษาความเย็นอีกชั้นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย

- การใช้กับดักแสงไฟ (light trap) ติดตั้งในแปลงเกษตร เพื่อดึงดูดแมลงข้างในช่วงเวลากลางคืน คัดเลือกแมลงข้างที่ต้องการศึกษา ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่าซึ่งบรรจุน้ำยาเอทิลอะซิเตต และเก็บตัวอย่างโดยใช้ซองกระดาษสามเหลี่ยมเช่นเดียวกัน

- การสำรวจและเก็บตัวอย่างระยะตัวอ่อนแมลงข้าง โดยการเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลง เก็บตัวอ่อนแมลงข้างทุกระยะใส่กล่องพลาสติกพร้อมเหยื่อศัตรูพืชที่พบ และส่วนของพืชที่พบ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการทั้งตัวอ่อนแมลงข้างและศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อ เพื่อศึกษาชีวประวัติ เปลี่ยนเหยื่ออาหารและทำความสะอาดกล่องเลี้ยงตัวอ่อนแมลงข้างเมื่อกล่องเลี้ยงเริ่มสกปรก บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตโดยดูจากการลอกคราบของตัวอ่อนแต่ละระยะ บันทึกขนาด สี รูปร่าง หรือรายละเอียดอื่นๆที่สังเกตได้ เลี้ยงจนเป็นตัวเต็มวัยร่อนปีกและสีของตัวเต็มวัยพัฒนาเต็มที่จึง ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า นำตัวอย่างที่ได้ไปจัดรูปร่างเพื่อรอการจำแนกชนิด

3) การบันทึกข้อมูล ได้แก่ ชื่อพืชเศรษฐกิจในแปลงนั้น พันธุ์พืช อายุพืช ศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อ ลักษณะการทำลายของศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อ สถานที่ พิกัดภูมิศาสตร์ สถานที่ วัน/เดือน/ปี ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ขนาดพื้นที่ และข้อมูลอื่นๆ ในระบบนิเวศน์ที่สามารถบันทึกได้

4) นำตัวอย่างแมลงข้างจัดรูปร่าง บนไม้จัดรูปร่าง (setting board) โดยใช้เข็มไร้สนิม (stainless steel) เบอร์ 000, 00, 0, 1 หรือ 3 ปักกลางอกด้านบน จัดปีกให้กางออกโดยให้ขอบบนของปีกคู่หลังตั้งฉากกับลำตัว และขอบบนของปีกคู่หลังไม่ซ้อนทับกับขอบล่างของปีกคู่หน้า นำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 วัน

5) การตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ New (2003) และ Sziráki (2011) ดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะ และสี ฯลฯ โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ด้วยการใช้ออกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด ประกอบกับการเปรียบเทียบตัวอย่างแมลงที่ได้จำแนกแล้วในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร สำหรับแมลงข้างบางชนิดซึ่งมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากจำเป็นต้องใช้อวัยวะสืบพันธุ์ประกอบในการจำแนก ซึ่งมีขั้นตอนการทำสไลด์อวัยวะสืบพันธุ์ดังนี้



- ตัดส่วนท้องของแมลงข้างแซในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ที่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หรือต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 20 นาที

- ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมน้ำกลั่นเพื่อล้างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ยังหลงเหลืออยู่ออกให้หมด ทำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง ย้อมสีด้วยเกจส์สแตน (Gage's stain) ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟuchsine 0.5 กรัม กรดเกลือ 10% 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ นาน 2-3 นาทีหรือนานถึง 12 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวอย่างแมลงข้างที่จะติดสีได้ง่ายหรือยาก

- ย้ายตัวอย่างลงในน้ำกลั่นเพื่อทำการผ่าเอาอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้อง ถ้าเป็นเพศผู้ใช้ปากคืบปลายแหลมดึงอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้องปล้องสุดท้าย แต่ถ้าเป็นเพศเมียใช้มีดผ่าตัดผ่าผนังลำตัวด้านข้างออกเพื่อป้องกันการเสียหายของอวัยวะสืบพันธุ์ใช้ปากคืบปลายแหลมค่อยๆ แยกผนังลำตัวออกจากอวัยวะสืบพันธุ์ จากนั้นใช้ฟู่กันเบอร์ 00 หรือเบอร์ 0 และทำความสะอาดไขมันส่วนเกินออกให้หมด

- ย้ายตัวอย่างลงแอลกอฮอล์ 30% จัดรูปร่างอวัยวะสืบพันธุ์ให้ได้ตามลักษณะที่ต้องการ ถ้าเป็นตัวอย่างที่โครงสร้างอ่อนนิ่มหรือบอบบาง ให้กำจัดน้ำออกให้หมดก่อนโดยการ ย้ายตัวอย่างแช่ในแอลกอฮอล์ 60% ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วย้ายลงแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย้ายลงแอลกอฮอล์ 80% เป็นเวลา 20 นาที แล้วย้ายลงแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างแช่ในโคลฟอย (clove oil) 20-30 นาที เพื่อให้ตัวอย่างใส

- ย้ายอวัยวะสืบพันธุ์ วางบนสไลด์ที่หยดน้ำยากานาดา บาลซัม (Canada balsam) แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์นำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50 °C นาน 4 - 6 สัปดาห์ จึงนำออกมาศึกษา

6) บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาพร้อมทั้งถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound วาดรูปโดยใช้เครื่องมือ camera lucida บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของแมลงข้างปีกใสแต่ละตัวได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ ปีที่จำแนกชนิด ชื่อผู้จำแนกชนิด และรหัสกำกับตัวแมลง พิกัดภูมิศาสตร์ สถานที่ วัน/เดือน/ปี ชื่อผู้เก็บพืชที่พบ ศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อ และวิธีการเก็บตัวอย่าง

7) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแบ่ง วงศ์ Coniopterygidae ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

8) จัดเก็บตัวอย่างแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแบ่ง วงศ์ Coniopterygidae ทุกชนิดที่จำแนกเรียบร้อยแล้วไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง



เวลาและสถานที่

1) แหล่งปลูกพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ มันสำปะหลัง ข้าวโพด ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มะนาว เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ และพืชผักต่างๆ เป็นต้นตามภูมิภาคต่างๆ โดยในปี 2562 สํารวจในเขตภาคตะวันตกและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากตัวอย่างแมลงข้างสีน้ำตาล และแมลงข้างปีกแบ่ง ที่เก็บรวบรวมได้จากการสำรวจในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 และตัวอย่างแมลงข้างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถวินิจฉัยแมลงข้างสีน้ำตาล ในระดับชนิดได้จำนวน 2 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 3 วงศ์ย่อย และ 3 เผ่า และสามารถวินิจฉัยแมลงข้างปีกแบ่ง ในระดับชนิดได้จำนวน 1 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 1 วงศ์ย่อย และ 2 เผ่า

โดยสามารถวินิจฉัยในระดับวงศ์ โดยใช้รูปรูปร่าง (key) ที่ปรับปรุงจากแนวทางการวินิจฉัยของ Brooks & Barnard (1990) และ New (2003) ดังนี้

1. แมลงข้างมีขนาดเล็กมาก มีความยาวของปีกคู่หน้าแต่ละปีก น้อยกว่า 5 มิลลิเมตร ทั้งปีกคู่หน้าและปีกคู่หลัง มีเส้นปีกจำนวนน้อย (Figure 8 & 9)..... Family Coniopterygidae
 - 1'. แมลงข้างมีขนาดเล็กถึงขนาดกลาง มีความยาวของปีกคู่หน้าแต่ละปีก มากกว่า 5 มิลลิเมตร ทั้งปีกคู่หน้าและปีกคู่หลัง มีเส้นปีกจำนวนมาก (Figure 1, 2, 5, 6 & 7).....2
 2. ปีกคู่หน้า มักมีเส้นปีก radial sector (Rs) เส้นเดียว ที่บริเวณขอบปีกคู่หน้าพบเส้นขวางปีก costal cross veins ลักษณะไม่แตกแขนง (Figure 1) ขณะแมลงมีชีวิต มักมีสีเขียวหรือสีเหลือง.....Family Chrysopidae
 - 2'. ปีกคู่หน้า มักมีเส้นปีก radial sector (Rs) มากกว่า 2 เส้น ที่บริเวณขอบปีกคู่หน้าพบเส้นขวางปีก costal cross veins ลักษณะแตกแขนง (Figure 2) ขณะแมลงมีชีวิต มักมีสีน้ำตาลหรือสีเขียว Family Hemerobiidae
- วงศ์แมลงข้างสีน้ำตาล (Family Hemerobiidae) ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถวินิจฉัยในระดับชนิด โดยใช้รูปรูปร่าง (key) ที่ปรับปรุงจากแนวทางการวินิจฉัยของ Garzon-Orduna *et al.* (2016) Ghosh (2000) Makarkin (1993) New (2003) และ Oswald (1993) ดังนี้



1. ปลายปีกคู่หน้ามีลักษณะโค้งงอ ค้ำยตะขอ (falcate) (Figure 5)..... *Drepanacra* sp.
 - 1'. ปลายปีกคู่หน้าไม่มีลักษณะโค้งงอ หรือไม่ค้ำยตะขอ (falcate).....2
 2. ที่บริเวณฐานของขอบปีกคู่หน้า พบเส้น recurrent humeral vein ปรากฏอยู่ (Figure 3 & 6) *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961
 - 2'. ที่บริเวณฐานของขอบปีกคู่หน้า ไม่พบเส้น recurrent humeral vein ปรากฏอยู่ (Figure 4 & 7) *Micromus timidus* Hagen, 1853
- วงศ์แมลงช่วงปีกแปง (Family Coniopterygidae) ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถวินิจฉัยในระดับชนิด โดยใช้รูปวิธาน (key) ที่ปรับปรุงจากแนวทางการวินิจฉัยของ Meinander (1972) New (2003) และ Sziráki (2011) ดังนี้
1. ที่ปีกคู่หน้า ที่บริเวณจุดแยกของเส้นปีก M_{1+2} และ M_{4+5} ไม่พบเส้นขวางปีก M-Cu ปรากฏอยู่ในแนวเฉียง ในปีกคู่หลังเส้นปีก media vein (M) ไม่แตกแขนงออกเป็น 2 แฉก (Figure 8)..... *Coniopteryx* sp.
 - 1'. ที่ปีกคู่หน้า ที่บริเวณจุดแยกของเส้นปีก M_{1+2} และ M_{4+5} จะพบเส้นขวางปีก M-Cu ปรากฏอยู่ในแนวเฉียง ในปีกคู่หลังเส้นปีก media vein (M) แตกแขนงออกเป็น 2 แฉก (Figure 9)..... *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836)
- ทั้งนี้ สามารถจำแนกระดับชั้นทางอนุกรมวิธาน (taxonomic category) ของชนิดที่วินิจฉัยชื่อได้จากการศึกษาครั้งนี้ ตามแนวทางการศึกษาของ Garzon-Orduna *et al.* (2016) Ghosh (2000) Meinander (1972) New (2003) และ Oswald (1993) ได้ ดังนี้

Order Neuroptera

Suborder Hemerobiiformia

Superfamily Hemerobioidea Latreille, 1802

Family Hemerobiidae Latreille, 1802

Subfamily Drepanacrinae Oswald, 1993

Tribe Drepanacrini Oswald, 1993

Genus *Drepanacra* Tillyard, 1916

Drepanacra sp.

Subfamily Zachobiellinae Garzon-Orduna *et al.*, 2016.



Tribe Zachobiellini Garzon-Orduna *et al.*, 2016.

Genus *Psectra* Hagen, 1866

***Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961**

Subfamily Microminae Krüger, 1822

Tribe Micromini Krüger, 1822

Genus *Micromus* Rambur, 1842

***Micromus timidus* Hagen, 1853**

Superfamily Coniopterygoidea Burmeister, 1839

Family Coniopterygidae Burmeister, 1839

Subfamily Coniopteryginae Burmeister, 1839

Tribe Coniopterygini Burmeister, 1839

Genus *Coniopteryx* Curtis, 1834

***Coniopteryx* sp.**

Tribe Conwenziini Enderlein, 1905

Genus *Semidalis* Enderlein, 1905

***Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836)**

Genus *Drepanacra* Tillyard, 1916

Drepanacra Tillyard, 1916; *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* 41: 293.

Menopteryx Krüger, 1922; *Stettin. ent. Ztg.* 83: 170.

Drepanacrella Kimmins, 1940; *Ann. Mag. nat. Hist.* 6(11): 222.

Drepanacra Oswald, 1993; *J. Newyork Entomol. Soc.* 101(2): 237.

Type species: *Drepanacra humilis* (MacLachlan, 1863)

1. *Drepanacra* sp. (Figure 10.)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงข้างขนาดเล็ก ความยาวลำตัว ประมาณ 8 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลอ่อน ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร มีตาธรรม 1 คู่ ไม่มีตาเดี่ยว ปากกัดกินแบบ orthognathous เมื่อเกาะพักมักซ่อนส่วนหัวไว้ใต้ส่วนอกและขอบปีก ที่บริเวณลำตัว รวมทั้งแผ่นปีก มีขนขนาดเล็กและสั้นปกคลุม ขาเป็นแบบขาเดิน (walking leg) มีจำนวน 3 คู่ ปีกมี 2 คู่ แบบเยื่อบาง (membranous) มีจำนวนเส้นปีกมาก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 15 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย ปลายปีกคู่หน้ามีลักษณะโค้งงอ คล้ายตะขอ (falcate) ที่บริเวณฐานของขอบปีกคู่หน้า



พบเส้น recurrent humeral vein ปรากฏอยู่ ที่บริเวณกลางปีกมีชุดเส้นขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: จากการตรวจเอกสาร พบว่า แมลงช้างสีน้ำตาลในสกุลนี้ ไม่มีรายงานการพบในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในพื้นที่ใกล้เคียงกัน พบว่ามีรายงานชนิด *Drepanacra khasiana* (Kimmins, 1940) จากรัฐอัสสัม ในประเทศอินเดีย โดย Meinander (1972) *Drepanacra binocular* (Newman, 1838) จากเครือรัฐออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ และชนิด *Drepanacra plaga* Banks, 1939 จากไต้หวัน โดย New (2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่

ฤดูกาลที่พบ: พบในเดือนพฤษภาคม

หมายเหตุ: แมลงช้างชนิดนี้ จากการสำรวจ สามารถดักจับได้เพียงตัวอย่างเดียว โดยพบบินเล่นแสงไฟในเวลากลางคืน บนพื้นที่ระดับสูงของจังหวัดเชียงใหม่

Genus *Psectra* Hagen, 1866

Psectra Hagen, 1866; *Stellin. ent. Ztg.* 27 : 376.

Annandalia Needham, 1909; *Rec. Indian Mus.* 3: 208.

Eucarobius Esben-Petersen, 1928; *Neuroptera*. In : *Insects of Samoa and other Samoan terrestrial Arthropoda*. Fasc. 3, part vii, p. 95.

Kimminsiella Nakahara. 1960; *Mushi* 34: 14.

Psectra Oswald, 1993; *J. New York Entomol. Soc.* 101(2): 230.

Type species: *Psectra diptera* (Burmeister, 1839)

2. *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961 (Figure 11.)

Psectra siamica Nakahara & Kuwayama, 1961; *Nature and life in Southeast Asia*. 1: 261.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงช้างขนาดเล็ก ความยาวลำตัว ประมาณ 5 - 8 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) ทั้งตัวแมลงมีสีเขียวยอ่อน ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร มีตาธรรม 1 คู่ ไม่มีตาเดี่ยว ปากกัดกินแบบ orthognathous ตลอดลำตัว รวมทั้งแผ่นปีก มีขนขนาดเล็กและสั้นปกคลุม ขาเป็นแบบขาเดิน (walking leg) มีจำนวน 3 คู่ ปีกมี 2 คู่ แบบเยื่อบาง (membranous) มีจำนวนเส้นปีกมาก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 10 - 12 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย รูปร่างค่อนข้างกลม ที่บริเวณฐานของขอบปีกคู่หน้า พบเส้น recurrent humeral vein ปรากฏอยู่ บริเวณกึ่งกลางปีกมีชุดเส้นขวางปีก gradate crossveins เพียงชุดเดียว

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: พบในประเทศไทย จีน และสิงคโปร์ (New, 2003)



การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดน่าน ขอนแก่น และชัยนาท

ฤดูกาลที่พบ: พบในเดือนมีนาคม และกันยายน

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ได้ทั้งหมด จับได้โดยกับดักแสงไฟ

Genus *Micromus* Rambur, 1842

Micromus Rambur, 1842: Hémérobides. in Histoire Naturelle des Insectes, Néuroptères. 416 p.

Nesomicromus Perkins, 1899; Neuroptera, In Fauna Hawaiiensis, 2 : 37.

Pseudosectra Perkins, 1899; *Ibid.* pl. 46.

Nesothauma Perkins, 1899; *Ibid.* pl. 46.

Nenus Navàs, 1912; *Mems. R. Acad. Cienc. Artes Barcelona* (3)10 : 199.

Eumicromus Nakahara, 1915; *Annotnes Zool. Jap.* 9: 36.

Paramicromus Nakahara, 1919; *Insect Wid.* 23: 137.

Archaeomicromus Krüger, 1922; *Stettin. ent. Ztg.* 83: 171.

Indomicromus Krüger, 1922; *Ibid.* pl. 171.

Stenomicromus Krüger, 1922; *Ibid.* pl. 171.

Heteromicromus Krüger, 1922; *Ibid.* pl. 171.

Neomicromus Krüger, 1922; *Ibid.* pl. 154.

Pseudomicrimus Krüger, 1922; *Ibid.* pl. 172.

Paramicromus Krüger (not Nakahara), 1922; *Ibid.* pl. 172.

Stenomus Navàs, 1922; *Broteria (Zool.)* 20: 55.

Phlebiomus Navàs, 1922; *Revta R. Acad. Cienc. exact. fis.-quim. nat. Zaragoza.* 7: 24.

Tanca Navàs, 1929; *Ann. Mus. Civ. Stor. nat.* 53: 373.

Menutus Navàs, 1932; *Bolo. Soc. eot. Esp.* 15: 35.

Idiomicromus Nakahara, 1955; *Kontyu* 23: 8.

Spilomicromus Nakahara, 1960; *Mushi* 34: 26.

Anomicromus Nakahara, 1960; *Ibid.* pl. 30.

Afromicromus Nakahara, 1960; *Ibid.* pl. 34.

Austromicromus Nakahara, 1960; *Ibid.* pl. 35.

Micromus, Oswald, 1993; *J. New York, Entomol. Soc.* 101(2): 253.

Type species: *Micromus variegates* (Fabricius, 1793)



3. *Micromus timidus* Hagen, 1853 (Figure 12, 13, 14 & 15.)

Micromus timidus Hagen, 1853: *Bericht über die zur Bekanntmachung Geeigneten Verhandlungen der Konigl. Preuss. Akademie der Wissenschaften zu Berlin* 1853: 481.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงข้างขนาดเล็ก ความยาวลำตัว ประมาณ 5 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลอ่อน ยาวประมาณ 8 มิลลิเมตร มีตาธรรม 1 คู่ ไม่มีตาเดี่ยว ปากกัดกินแบบ orthognathous ตลอดลำตัว รวมทั้งแผ่นปีก มีขนขนาดเล็กและสั้นปกคลุม ขาเป็นแบบขาเดิน (walking leg) มีจำนวน 3 คู่ ปีกมี 2 คู่ แบบเยื่อบาง (membranous) มีจำนวนเส้นปีกมาก ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 12 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย ที่บริเวณฐานของขอบปีกคู่หน้า ไม่มีเส้น recurrent humeral vein ปรากฏอยู่ และมีชุดเส้นขวางปีก inner gradate crossveins ชัดเจน แต่ไม่พบเส้นขวางปีก 2m-cu ลักษณะเป็นส้อมปรากฏอยู่ เนื่องจากเส้นปีก M2 และ CuA เชื่อมติดกันในแมลงข้างสีน้ำตาลชนิดนี้

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: มีการกระจายกว้าง จากทวีปแอฟริกา ถึงหมู่เกาะทางตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิก (Makarkin, 1993; New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง ตาก อุตรดิตถ์ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ เลย ขอนแก่น ชัยนาท สุพรรณบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี และกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: พบได้เกือบตลอดปี แต่มักจะพบมากในช่วงเดือน เดือนธันวาคม มกราคม กุมภาพันธ์ มีนาคม และเมษายน

หมายเหตุ: พบตัวอ่อนบนต้นพืชที่มีเหยื่ออาศัยอยู่ ได้แก่ ชาทอง และซีเหล็กเทศ โดยพบว่าเหยื่อของตัวอ่อนแมลงข้างสีน้ำตาลชนิดนี้ ได้แก่ แมลงหวี่ขาว และเพลี้ยอ่อน

Genus *Coniopteryx* Curtis, 1834

Coniopteryx Curtis, 1834; *British Entomology* pl. 528.

Malacomyza Wesmael, 1836; *Bull. Acad. Roy. Brux.* 3: 166.

Sciodus Zetterstedt, 1840; *Insecta Lapponica* pl. 1050.

Aleuroxia Fitch, 1856; *First and second report on the noxious, beneficial and other insects of the State New York* pl. 96.

Deasia Navàs & Marcet, 1910; *Rev. Montserratina* pl. 150.

Coniopteryx Meinander, 1972; *Acta Zool. Fennica* 136: 236.

Type species: *Coniopteryx tineiformis* Curtis, 1834



4. *Coniopteryx* sp. (Figure 16.)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงข้างขนาดเล็่มาก ความยาวลำตัว ประมาณ 3 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีดำยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร มีตา 1 คู่ ไม่มีตาเดี่ยว ปากกัดกินแบบ orthognathous ตลอดลำตัว รวมทั้งขาและแผ่นปีก มีผงสีขาวปกคลุม ขาเป็นแบบขาเดิน (walking leg) มีจำนวน 3 คู่ ปีก มี 2 คู่ แบบเยื่อบาง (membranous) มีจำนวนเส้นปีกน้อย ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 4 มิลลิเมตร ปีก คู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย ที่บริเวณจุดแยกของเส้นปีก M1+2 และ M4+5 พบเส้นขวางปีก M-Cu ปรากฏอยู่ในแนวเฉียง ในปีกคู่หลังเส้นปีก media vein (M) ไม่แตกแขนงออกเป็น 2 แฉก

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: เขตอบอุ่นและกึ่งร้อนของทวีปยุโรปและเอเชีย รวมทั้งมาเลเซีย และไทย (New, 2003; Sziráki, 2002)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่

ฤดูกาลที่พบ: เดือนพฤษภาคม

หมายเหตุ: แมลงข้างชนิดนี้ จากการสำรวจ สามารถดักจับได้เพียงตัวอย่างเดียว โดยพบติดใยแมงมุมในเวลากลางวัน บนพื้นที่ระดับสูงของจังหวัดเชียงใหม่ แต่สอดคล้องกับรายงานการสำรวจของ Sziráki (2002) ที่รายงานแมลงข้างชนิดนี้จากจังหวัดเชียงใหม่

Genus *Semidalis* Enderlein, 1905

Semidalis Enderlein, 1905a: *Wiener Entomol. Zeitung* 24: 197.

Alema Enderlein, 1905c: *Zool. Anz.* 24: 226.

Coniopteryx Curtis. Bank, 1906: *Proc. Entomol. Soc. Washington* 8: 80.

Alemella Enderlein, 1906: *Zool. Jahrb. (Abt. Syst.)* 23: 208.

Niphias Enderlein, 1908a: *Genera Insectorum fasc.* 67. 12 p.

Parasemidalis Roepke, 1916: *Zool. Mededeel.* 2: 156.

Protosemidalis Karny, 1924: *Ann. Mag. Nat. Hist.* (9) 13: 474.

Metasemidalis Karny, 1924: *Ann. Mag. Nat. Hist.* (9) 13: 478.

Ahlersia Enderlein, 1929: *Zool. Anz.* 48: 221.

Nipheta Enderlein, 1930: *Arch. Klassifikatorische Phylogenetische Entomol.* 1: 106.

Type species: *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836)

5. *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836) (Figure 17, 18, 19, 20 & 21.)

Coniopteryx aleyrodiformis Stephens, 1836: *Illustrations of British Entomology: Mnadibulata* VI. 116 p.



Coniortes aleyrodiformis Stephens. Walker, 1853: List of specimens of Neuropterous insects in the collection of the British Museum, Part 2 (Sialidae-Nemopteridae) 299 p.

Semidalis aleyrodiformis Stephens. Killington, 1937b: The generic name of British Insects 4: 73.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงข้างขนาดเล็กมาก ความยาวลำตัว ประมาณ 2 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีดำยาวประมาณ 1 มิลลิเมตร มีตาธรรม 1 คู่ ไม่มีตาเดี่ยว ปากกัดกินแบบ orthognathous ตลอดลำตัว รวมทั้งขาและแผ่นปีก มีผงสีขาวปกคลุม ขาเป็นแบบขาเดิน (walking leg) มีจำนวน 3 คู่ ปีกมี 2 คู่ แบบเยื่อบาง (membranous) มีจำนวนเส้นปีกน้อย ความกว้างช่วงปีก ประมาณ 3 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย ที่บริเวณจุดแยกของเส้นปีก M_{1+2} และ M_{4+5} จะพบเส้นขวางปีก M-Cu ปรากฏอยู่ในแนวเฉียง ในปีกคู่หลังเส้นปีก media vein (M) แตกแขนงออกเป็น 2 แฉก

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: เขตอบอุ่นและกึ่งร้อนของทวีปยุโรปและเอเชีย รวมทั้งมาเลเซีย และไทย (New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย จันทบุรี และกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมกราคม กุมภาพันธ์ มีนาคม และเมษายน

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ได้ส่วนมาก รวบรวมจากตัวเต็มวัยที่พบบนต้นพืชที่มีเหยื่ออาศัยอยู่ ได้แก่ มะม่วง ชี้เหล็กเทศ ทรงบาดาล มันสำปะหลัง มะยม ชมพู และซาฮกเกี้ยน นอกจากนี้พบว่าเหยื่อของแมลงข้างปีกใสชนิดนี้ ได้แก่ แมลงหรีวขาว และไร หลายชนิด

การศึกษานุกรมวิธานของแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแป้ง วงศ์ Coniopterygidae ในประเทศไทยนั้น การสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงข้าง โดยใช้กับดักแสงไฟ รวมถึงการสำรวจเก็บตัวอย่างด้วยสวิงโฉบในแปลงพืช ในจำนวนนี้เป็นการเก็บตัวอย่างด้วยสวิงโฉบในแปลงปลูกกาแฟ ในจังหวัดเชียงราย ซึ่งก็ได้ทั้งตัวอย่างแมลงข้างสีน้ำตาลและแมลงข้างปีกแป้ง ซึ่งสามารถบ่งชี้ว่าแมลงข้างทั้ง 2 วงศ์นี้ เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูกาแฟได้ อีกทั้งมักพบตัวอ่อนแมลงข้างชนิด *M. timidus* และ *S. aleyrodiformis* กัดกินแมลงปากดูด ได้แก่ เพลี้ยอ่อน และแมลงหรีวขาว อยู่บ่อยครั้ง ในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มะม่วง ชมพู มะยม มันสำปะหลัง และกาแฟ เป็นต้น จึงจัดว่าเป็นแมลงตัวห้ำที่น่าจะมีความสำคัญทางการเกษตร นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูดชนิดต่างๆ

แต่การสำรวจพบจำนวนชนิดของแมลงข้างทั้ง 2 วงศ์นี้ เพียงแค่ 5 ชนิดนั้น ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะในสภาพแปลงเกษตร มักมีการปลูกพืชเศรษฐกิจเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ไม่มีความหลากหลายของพืช และแมลงเหยื่อ อีกทั้งมีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช อาจเป็นเหตุให้พบจำนวนชนิดแมลงข้างไม่มากนัก นอกจากนี้หากมีการสำรวจแมลงข้างกลุ่มนี้ ในพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าในพื้นที่



เกษตรกรรมซึ่งมักพบความหลากหลายทางชีวภาพน้อย อีกทั้งการศึกษาชีววิทยาของแมลงข้างชนิดนั้นๆ ควบคู่กันกับการสำรวจ อาจทำให้สามารถค้นหาชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยชีววิธีได้ในอนาคต

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงข้างสีน้ำตาล วงศ์ Hemerobiidae และแมลงข้างปีกแบ่ง วงศ์ Coniopterygidae โดยการสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 และจากตัวอย่างแมลงข้าง ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถวินิจฉัยแมลงข้างสีน้ำตาล ในระดับชนิดได้จำนวน 2 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 3 วงศ์ย่อย และ 3 เผ่า คือ *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961 *Micromus timidus* Hagen, 1853 และ *Drepanacra* sp. และสามารถวินิจฉัยแมลงข้างปีกแบ่ง ในระดับชนิดได้จำนวน 1 ชนิด และในระดับสกุลได้จำนวน 1 ชนิด ใน 1 วงศ์ย่อย และ 2 เผ่า คือ *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836) และ *Coniopteryx* sp. โดยแมลงข้างทั้ง 2 วงศ์นี้ ชนิดที่สามารถพบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย มีจำนวน 2 ชนิด คือ *M. timidus* และ *S. aleyrodiformis* ซึ่งแมลงข้างทั้งสองชนิดนี้ มักพบตัวอ่อนกัดกินแมลงปากดูด ได้แก่ เพลี้ยอ่อน และแมลงหรีวขาว อยู่บ่อยครั้ง ในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น มะม่วง ชมพู่มะยม มันสำปะหลัง และกาแพ เป็นต้น จึงจัดว่าเป็นแมลงตัวทำที่น่าจะมีความสำคัญทางการเกษตร นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูดชนิดต่างๆ

นอกจากนี้หากมีการสำรวจแมลงข้างกลุ่มนี้ ในพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าในพื้นที่เกษตรกรรมซึ่งมักพบความหลากหลายทางชีวภาพน้อย อีกทั้งการศึกษาชีววิทยาของแมลงข้างชนิดนั้นๆ ควบคู่กันกับการสำรวจ อาจทำให้สามารถค้นหาชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีได้ในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณวุฒิพล ปฐมวัฒน์นุรักษ์ คุณภราดร ดอกจันทร์ ผู้ร่วมการทดลองทุกท่าน ตลอดจนผู้ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์อื่นๆ ที่อาจไม่ได้กล่าวถึงครบทุกท่านในที่นี้ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานจนสำเร็จลุล่วงได้ ขอขอบคุณอย่างสูงอีกครั้ง มา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

รัตน์ นชะพงษ์. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงห้ำ. หน้า 87-89. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.



- รัตน์ นชพงษ์ และประภัศร เขยคำแหง. 2554. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงตัวห้ำ. หน้า 11-15. ใน เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตร แมลง-ศัตรูศัตรูพืช และการป้องกันกำจัด ครั้งที่ 15. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา 25-29 กรกฎาคม 2554 ณ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- ศานิต รัตนภุมมะ. 2550. กีฏวิทยาแม่บท. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ดีพรีน และแทนท็อบบี้เซนเตอร์, เชียงใหม่. 571 หน้า.
- ไสว บุรณพานิชพันธุ์. 2544. อนุกรมวิธานแมลง. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 441 หน้า.
- Brooks, S.J. & P.C. Barnard. 1990. The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera: Chrysopidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Ent.)* 59(2): 117-286.
- Cranshaw, W. 2004. Garden Insects of North America: The Ultimate Guide to Backyard Bugs. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 656 p.
- Garzon-Orduna, I.J., I. Menchaca-Armenta, A. Contreras-Ramos, X. Liu & S.L. Winterton. 2016. The phylogeny of brown lacewings (Neuroptera: Hemerobiidae) reveals multiple reductions in wing venation. *BMC Evolutionary Biology* 16(1): 192.
- Ghosh, S.K. 2000. Neuroptera Fauna of North-East India. *Rec. zool. Surv. India, Occ. Paper No.* 184: 1-179.
- Makarkin, V.N. 1993. The Brown Lacewings from Vietnam (Neuroptera: Hemerobiidae). *Tropical Zoology* 6: 217-226.
- Meinander, M. 1972. A Revision of the Family Coniopterygidae (Planipennia). *Acta zoologica Fennica* 136: 1-357.
- New, T.R. 2003. Fauna Malesiana Handbook 4: The Neuroptera of Malesia. Fauna Malesiana Foundation, Leiden. 204 p.
- Oswald, J.D. 1993. Revision and Cladistic Analysis of the World Genera of the Family Hemerobiidae (Insecta: Neuroptera). *J. New York Entomol. Soc.* 101(2): 143-299.
- Sziráki, G. 2002. Coniopterygidae (Neuroptera) from Thailand. *Folia Entomol. Hung.* 63: 53-64.
- Sziráki, G. 2011. Coniopterygidae of the World: Annotated Check-list and Identification keys for Living Species, Species Groups and Supraspecific Taxa of the Family. Lambert Academic Publishing, Delaware. 249 pp.



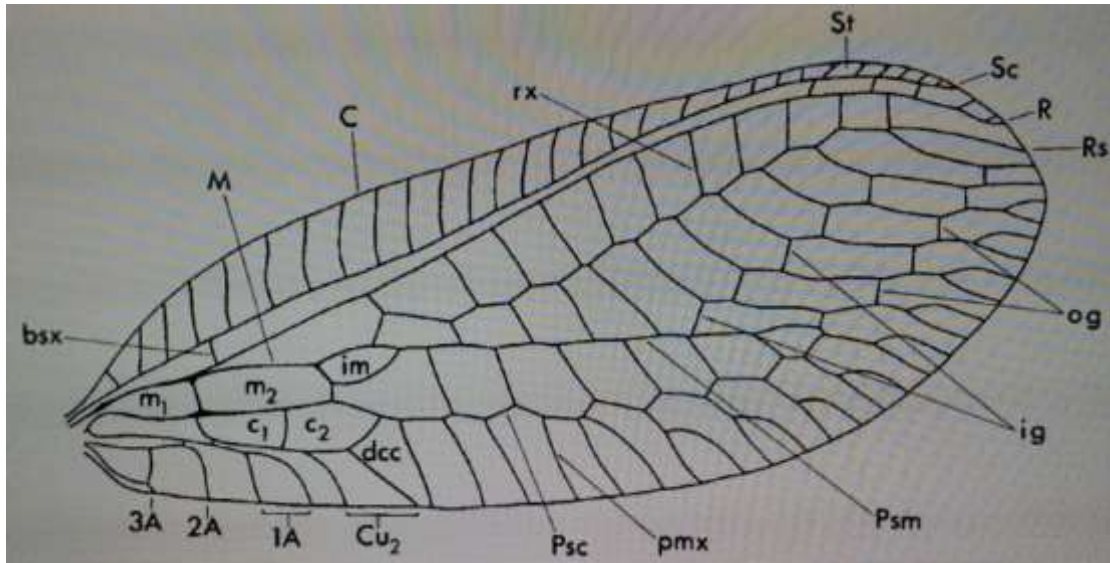


Figure 1 Wing venation pattern in fore wing of the green lacewings (Family Chrysopidae).
 bsx; basal subcostal crossvein, ig; inner gradate crossveins, im; intramedian cell,
 m₁ and m₂; 1st and 2nd median cell, og; outer gradate crossveins, R; radius, Rs;
 radial sector, Sc; subcosta, St; pterostigma (From: Brooks & Barnard, 1990)

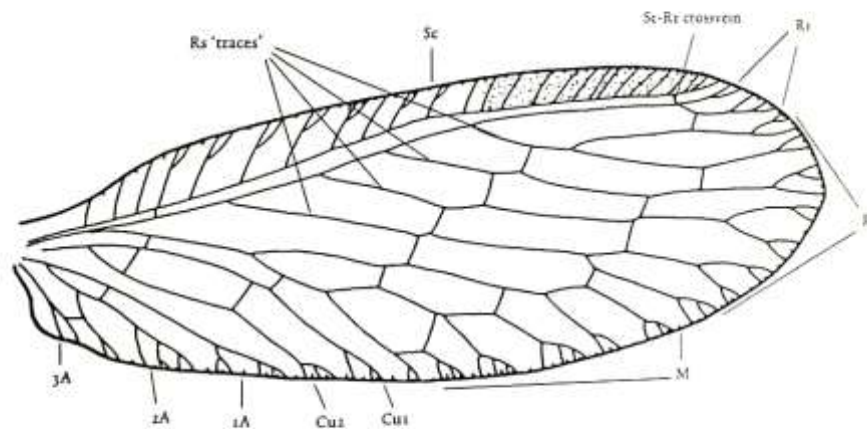


Figure 2 Wing venation pattern in fore wing of the brown lacewings
 (Family Hemerobiidae). 1A 2A and 3A; 1st 2nd and 3rd Anal vein, Cu1 and Cu2;
 1st and 2nd Cubitus, M; Media, Rs; radial sector, Sc; subcosta. (From: New, 2003)

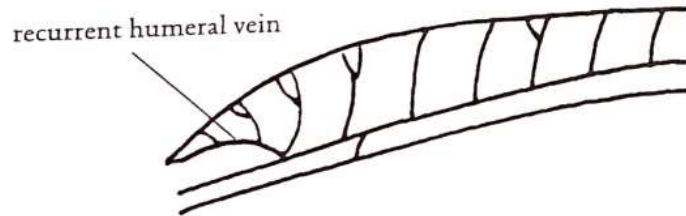


Figure 3 Wing venation pattern at costal area base in fore wing of the brown lacewings; Recurrent humeral vein present (From: New, 2003)

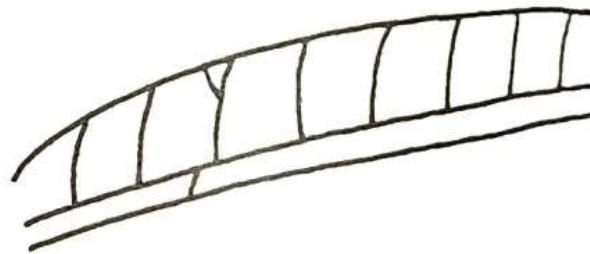


Figure 4 Wing venation pattern at costal area base in fore wing of the brown lacewings; Recurrent humeral vein absent (From: New, 2003)

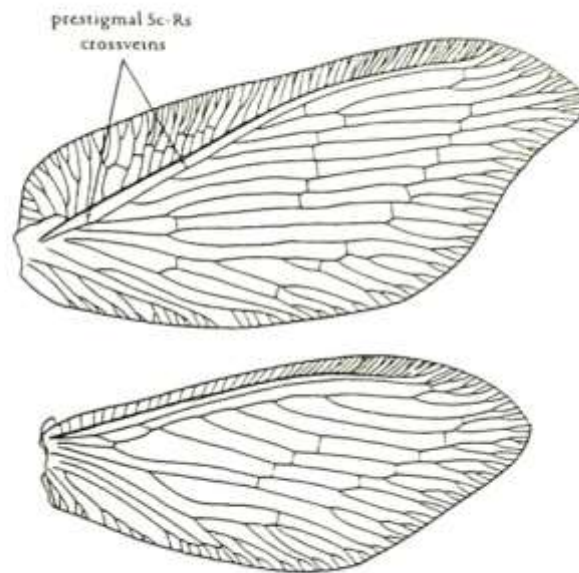


Figure 5 Wing venation pattern in both wings of the brown lacewings; genus *Drepanacra* (From: New, 2003)

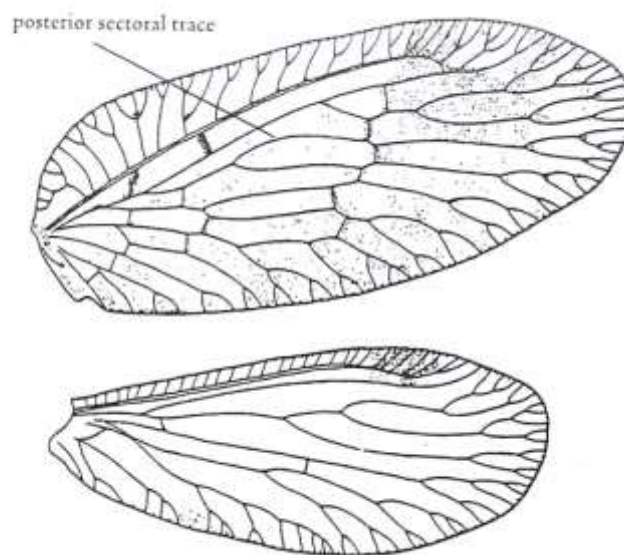


Figure 6 Wing venation pattern in both wings of the brown lacewings; genus *Psectra* (From: New, 2003)

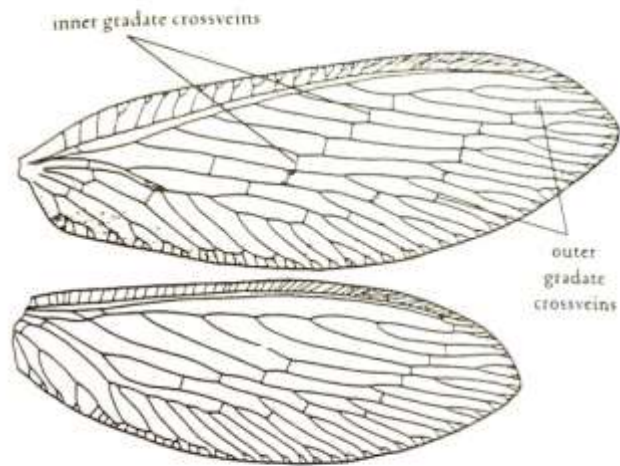


Figure 7 Wing venation pattern in both wings of the brown lacewings; genus *Micromus* (From: New, 2003)

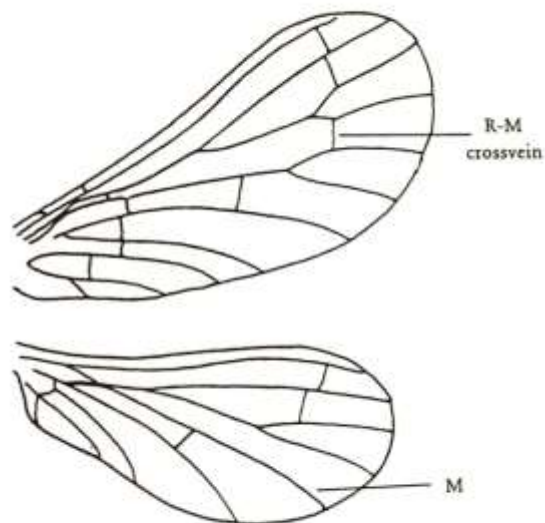


Figure 8 Wing venation pattern in both wings of the dusty-wings; genus *Coniopteryx* (From: New, 2003)

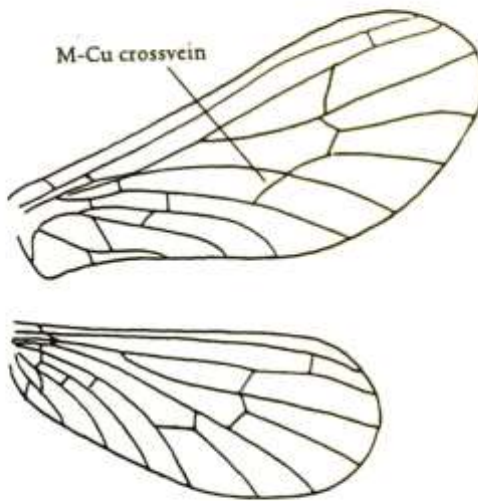


Figure 9 Wing venation pattern in both wings of the dusty-wings; genus *Semidalis* (From: New, 2003)

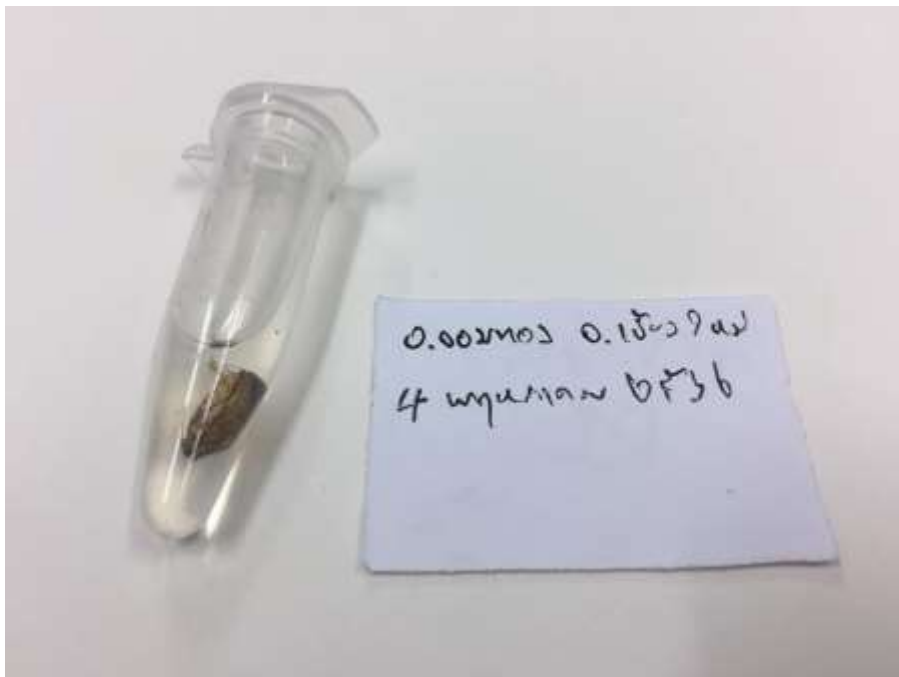


Figure 10 Preserved *Drepanacra* Tillyard, 1916 in 70% ethyl alcohol



Figure 11 *Psectra siamica* Nakahara & Kuwayama, 1961



Figure 12 *Micromus timidus* Hagen, 1853



Figure 13 A final instar larva of *M. timidus*



Figure 14 *M. timidus* larva feeding on whitefly larvae



Figure 15 *M. timidus* larva feeding on aphids



Figure 16 *Coniopteryx* Curtis, 1834



Figure 17 *Semidalis aleyrodiformis* (Stephens, 1836)



Figure 18 A living *S. aleyrodiformis*



Figure 19 *S. aleyroformis* larva feeding on whitefly larvae



Figure 20 Cocoon of *S. aleyroformis*



Figure 21 *S. aleyrodiformis* pupa in the cocoon

อนุกรมวิธานไรขาว วงศ์ Tarsonemidae ในประเทศไทย
Taxonomic Study of Mite Family Tarsonemidae in Thailand.

พลอยชมพู กรวิภาสเรือง วิมลวรรณ โชติวงศ์ ณพชรรณ ธโรชัยชัย
อทิติยา แก้วประดิษฐ์ วีระชัย สมศรี
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Broad mites, the family Tarsonemidae are considered one of the primary pests causing damage to several economic crops especially on premature fruit, inflorescences, and young shoots. Despite extremely small in size which not be able to see with the naked eyes, this mite is considered the only single family which has not yet been addressed as the quarantine pest of the country. Therefore, this survey will pose significant benefit to fulfill quarantine pest information in the long run. The survey and collecting of broad mites were implemented in 48 provinces from October 2018 to December 2021. The results revealed that two family and fifteen species were found, eight of which were mite pests. Other seven species are not the pests: six species might be the fungal-feeding mites and one predatory mite. The broad mite pests consisted of *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904), *Polyphagotarsonemus* sp., *Nasutitarsonemus onami* Lofego, Hountondji, Al-Shanfari&Morales, 2011; *Nasutitarsonemus* sp.; *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, 1956; *Steneotarsonemus* sp.; *Steneotarsonemus spinki* Smiley, 1967 and single unidentified species. Besides pests, other six broad mite species included *Fungitarsonemus setillus* Sousa, Lofego & Gondim, 2014; *Fungitarsonemus* sp.; *Neotarsonemoides* sp.; *Tarsonemus bilobatus* Suski, 1965; *Tarsonemus* sp.; and *Steneotarsonemus* sp. Another found predator mite was *Amblyseius largoensis* (Muma, 1955). From this study, three species of broad mite is considered important to the economic crops; *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904) causes damage to several plants making their leaves curl, bent or twisted out of shape.

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-21-62



Steneotarsonemus furcatus De Leon, 1956; is a coconut broad mite which cause brown - hard wound on coconut fruit, unqualified sizes, as well as crooked shape. The broad mite *Steneotarsonemus spinki* Smiley, 1967 is sometimes found on leave rice. If this pest, however, cause severe damage rice production may significantly decrease.

Keywords : tarsonemid mite, phytophagus mite, broad mite

บทคัดย่อ

ไรขาวในวงศ์ Tarsonemidae เป็นไรศัตรูที่มีความสำคัญเข้าทำลายผลอ่อน ช่อดอก และยอดอ่อนของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ลักษณะตัวมีขนาดเล็กมองเห็นได้ยากด้วยตาเปล่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งไรขาวเป็นศัตรูพืชในวงศ์เดียวของประเทศที่ยังไม่มีรายชื่อเป็นศัตรูพืชกักกันในประเทศ ดังนั้นการสำรวจในครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ในการเพิ่มข้อมูลศัตรูพืชกักกันให้สมบูรณ์ครบถ้วนยิ่งขึ้น โดยการสำรวจไรขาวในพืชเศรษฐกิจบนพื้นที่ 48 จังหวัด ระหว่างเดือนตุลาคม 2561-เดือนธันวาคม 2564 พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 15 ชนิด เป็นไรศัตรูพืช 8 ชนิด ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นศัตรูพืชหรืออาจจะเป็นไรที่กินเชื้อราอีก 6 ชนิดและ ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ไรขาวศัตรูพืชที่พบได้แก่ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904), *Polyphagotarsonemus* sp.; *Nasuitarsonemus onami* Lofego, Hountondji, Al-Shanfari&Morales, 2011; *Nasuitarsonemus* sp., *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, 1956; *Steneotarsonemus* sp.; *Steneotarsonemus spinki* Smiley, 1967 และอีกชนิดไม่สามารถจำแนกชนิดได้ สำหรับไรขาวอีก 5 ชนิดได้แก่ *Fungitarsonemus setillus* Sousa, Lofego & Gondim, 2014; *Fungitarsonemus* sp.; *Neotarsonemoides* sp.; *Tarsonemus bilobatus* Suski, 1965; *Tarsonemus* sp. และ *Steneotarsonemus* sp. ไม่พบอาการเข้าทำลายอย่างชัดเจน คาดว่าน่าจะเป็นไรขาวที่กินเชื้อราเป็นอาหาร นอกจากนี้พบไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma, 1955) จากการสำรวจพบว่าไรขาวชนิดที่มีความสำคัญมี 3 ชนิดคือ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904) เป็นไรขาวที่เข้าทำลายพืชได้หลากหลายชนิด ทำให้ใบพืชมีมันหนิกงอ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, 1956 เป็นไรขาวศัตรูสำคัญบนผลมะพร้าวทำให้มะพร้าวเป็นแผลแข็งสีน้ำตาล ผลไม่ได้ขนาด หากเข้าทำลายรุนแรงผลจะบิดเบี้ยว และ *Steneotarsonemus spinki* Smiley, 1967 เป็นไรขาวที่พบบนใบข้าว ระบาดเป็นครั้งคราวแต่หากระบาดทำให้ผลผลิตข้าวลดลง

คำหลัก : ไรขาว, ไรศัตรูพืช, ไรขาวพริก



คำนำ

ไรขาวในวงศ์ Tarsonemidae อยู่ในวงศ์ Tarsonemidae มีถิ่นอาศัยอยู่กว้างขวาง เช่นกินเชื้อรา กินสาหร่าย กินพืช เป็นตัวห้ำของไรชนิดอื่น เป็นตัวเบียนในแมลง แบบพึ่งพาอาศัยกันกับแมลง และเป็นศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ไรขาวเป็นไรที่มีขนาดเล็กกรองลงมาจากรีสีขา มีสีขาวใส แผ่นหลังนูน รูปรี กลม หรือลำตัวยาว ขึ้นอยู่กับชนิดของไร โดยมากแล้วตัวผู้จะมีขนาดเล็กกว่าตัวเมียอย่างเห็นได้ชัด ไรขาวมีรายงานทั่วโลก 529 ชนิด 40 สกุล (Lin and Zhang, 2002) ชนิดที่มีความสำคัญเข้าทำลายพืชไปทั่วโลกเช่น *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) เป็นไรพบเข้าทำลายพืชทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพไร่ มีรายงานแพร่กระจายทั่วโลกถึง 124 ประเทศ บนพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากถึง 34 ชนิด เช่นส้ม มะนาว มะม่วง องุ่น กาแฟ พริก ถั่ว ถั่วเหลือง ถั่วลันเตา มะเขือเทศ แตงกวา และพืชอื่นๆ อีกมากมาย ในหลายๆ ประเทศเช่น ประเทศบราซิล ออสเตรเลีย อินเดีย ญี่ปุ่น เกาหลี (Lin and Zhang, 2002; Venzon *et al*, 2008, CABI, 2018) แต่สำหรับประเทศไทย ไรชนิดนี้พบดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณใบอ่อน หรือยอดที่แตกใหม่ และทำให้ใบหงิก ขอบใบม้วนลง ยอดอ่อนแตกเป็นฝอย ก้านใบยึดออก ใบเรียวยาวเล็ก ทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต และมีรายงานเข้าทำลายพืชปลูกได้หลายชนิดเช่น ส้มโอ ชา พริก ฝ้าย ปอกระเจา บวบ ถั่วเขียว โหระพามันฝรั่ง มะม่วง และ ไม้ดอกหลายชนิด เช่น เยอปีรา เบญจมาศ ไชยลาเมน (วัฒนา และคณะ, 2543) ไรขาว *Steneotarsonemus spinki* Smiley เป็นศัตรูที่สำคัญในข้าว *Tarsonemus myceliophagus* เป็นไรขาวที่พบเข้าทำลายเห็ดหลายชนิด (Cho, 2013) *Phytonemus pallidus* เป็นศัตรูที่สำคัญในสตอเบอรี่ และไม้ดอกหลายชนิดในโรงเรือน (Zhang, 2003), *Tarsonemus setifer* Ewing เป็นไรขาวที่มีเขตการแพร่กระจายไปในหลาย ๆ ทวีปเช่นในทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ บนพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเช่น ทับทิม สตอเบอรี่ ท้อ องุ่น กุหลาบ ไม้ blackberry dewberry raspberry และ พืชอื่นอีกหลายชนิด *Tarsonemus smithi* Ewing มีรายงานพบใน แอปเปิล ส้ม ท้อ พลัม มะเขือเทศ และไม้ดอกพวกเบญจมาศ โดยมีรายงานพบใน ประเทศโปรตุเกส เวียดนาม และ สหรัฐอเมริกา (Jepson *et al*, 1975) *Phytonemus pallidus* (Zimmerman) เป็นไรศัตรูที่สำคัญในสตอเบอรี่ในยุโรปและอเมริกาเหนือ (Fountain *et al*, 2010), *Steneotarsonemus concavuscutum* Lofego and Gondim เป็นไรขาวที่รายงานการเข้าทำลายในข้าวผลมะพร้าวขนาดเล็กที่ประเทศบราซิล (Lofego and Gondim, 2006) ในประเทศจีนมีรายงานการพบไรขาวทั้งหมด 93 ชนิด 15 สกุล (Lin and Zhang, 1999) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบไรขาวอยู่ 7 ชนิด 4 สกุล ได้แก่ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Baker, 1975), *Steneotarsonemus spinki* Smiley และ *Steneotarsonemus oryzae* พบในนาข้าว (พิเชฐ และคณะ, 2548; Wongsiri, 1991; Charanasri *et al.*, 1977; Kongchuensin *et al.*, 2005), *Tarsonemus cryptocephalus* (Ewing) พบในกล้วยไม้ (วัฒนา และคณะ 2526), *Tarsonemus weitei* Banks พบในองุ่น ส่วนอีก 2 ชนิดคือ *Hemitarsonemus* sp. และ *Tarsonemus* sp. พบในลิ้นจี่ และองุ่น ตามลำดับ (วัฒนา และมานิตา, 2533; วัฒนาและคณะ, 2535; พิเชฐ และคณะ, 2548) ไรขาวจึงนับเป็นไรที่มีความสำคัญสร้างความ



เสียหายทางเศรษฐกิจให้กับผลิตผลทางการเกษตร แต่ในประเทศไทยข้อมูลของไรชวายังมีไม่มากนัก มีรายงานพบไรชวในประเทศเพียง 7 ชนิด ในขณะที่ทั่วโลกมีรายงานการพบมากถึง 529 ชนิด (Lin and Zhang, 2002) เนื่องจากไรชวเป็นไรที่มีขนาดเล็กมากการใช้กล้องจุลทรรศน์ในการจำแนกชนิด ในอดีตเทคโนโลยีของกล้องยังไม่ทันสมัย ไม่สามารถที่จะส่องดูลักษณะที่สำคัญของไรชวได้ เนื่องจากข้อจำกัดของกล้องและคู่มือการจำแนกชนิดของไรชวไม่สมบูรณ์และละเอียดมากพอ ปัจจุบันด้วยเทคโนโลยีอันทันสมัยของกล้องจุลทรรศน์ ทำให้มีคู่มือการจำแนกชนิดไรชวนี้ได้อย่างละเอียด และซับซ้อนมากกว่าคู่มือเดิม ใช้ตรวจสอบและจำแนกชนิดของไรชวจากต่างประเทศที่ติดมากับส้มแมนดาริน ประเทศอเมริกา ทางด้านตรวจศัตรูพืชแหลมฉับพบมีชื่อว่า *Dendroptus* sp. ยังไม่สามารถจำแนกได้ถึงระดับชนิด เนื่องจากไม่พบไรตัวผู้ในตัวอย่างที่ส่งมาจำแนก แต่ไรชวนี้เป็นสกุลที่ไม่มีรายงานการพบในประเทศไทยมาก่อน ดังนั้นไรชวชนิดนี้จึงอาจเป็นไรศัตรูพืชชนิดใหม่ก็ได้ จากข้อมูลตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๓) พ.ศ. ๒๕๕๐ พบว่ามีไรศัตรูพืชกักกันที่เป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติอยู่ทั้งหมด 32 ชนิด เป็นไรแดงวงศ์ Tetranychidae ทั้งหมด 25 ชนิด ไรสีขาวงศ์ Eriophyidae 3 ชนิด ไรศัตรูในโรงเก็บรวงศ์ Acaridae 4 ชนิด โดยไม่มีไรชวที่เป็นศัตรูพืชที่สำคัญ ประกาศในพระราชบัญญัตินี้เลย ดังนั้นการสำรวจไรชวในครั้งนี้นี้ จะได้ข้อมูลที่ถูกต้องและทันสมัย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานแจ้งให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทราบ ใช้ประกาศเพิ่มเติมถึงชนิดของไรชวที่เป็นศัตรูที่สำคัญที่ยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทย เพื่อประโยชน์ในการต่อรองเจรจาทางการค้าและเป็นการป้องกันไม่ให้มีไรชวชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจากต่าง ประเทศ ติดเข้ามาทำความเสียหายให้กับประเทศได้

วิธีดำเนินการ

กิจกรรมที่ 1 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

การทดลองที่ 1.1.20 อนุกรมวิธานไรชว วงศ์ Tarsonemidae ในประเทศไทย

Taxonomic Study of Mite Family Tarsonemidae in Thailand.

(ปีเริ่มต้น 2562- สิ้นสุด 2564)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างไร: ได้แก่ ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กล่องพลาสติกฟูกันเบอร์ 0, ขวดดองตัวอย่างไร ขนาด 1 แตรม บรรจุแอลกอฮอล์ 70% กล่องพลาสติกรักษาความเย็นขนาด 68 คิวทซ์ แวนชยาย (กำลังขยาย 20x)

2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน: ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ (stereo microscope) โคมไฟ ฟูกันเบอร์ 0 เข็มเขี่ยปลายแหลม แผ่นกระจกปิดสไลด์ สไลด์ สำลี แผ่นพลาสติกเจาะรู จานแก้ว กล่องใส่สไลด์ แป้นหมุนสำหรับผนึกขอบสไลด์ น้ำยา



ผนึกขอบสไลด์ สารเคมี สำหรับใช้เตรียมน้ำยาเมาท์ ตู้อบ/เครื่องอุ่นสไลด์ ตั้งอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส

3). อุปกรณ์สำหรับใช้ในการตรวจจำแนกชนิดของไร: ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ติดอุปกรณ์วาดภาพ (camera lucida) key สำหรับใช้จำแนกชนิดของไรในวงศ์ Tarsonemidae

4). อุปกรณ์วาดภาพ : ได้แก่ กระดาษ ดินสอ ยางลบ ปากกา Rotring หมึกดำ กระดาษลอกลาย กระดาษเขียนแบบ

วิธีการ

ขั้นตอนการทำงานวิจัย มีดังนี้

-วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การเก็บและรักษาตัวอย่างไรขาว

1.1 สำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างไรในวงศ์ Tarsonemidae โดยทำการสำรวจบนใบพืชทั้งใต้ใบและบนใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติโดยเฉพาะบริเวณยอดอ่อน ผลอ่อน และดอกของพืชซึ่งมักจะพบไรขาวเข้าทำลาย บนพืชปลูกต่าง ๆ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยสำรวจบนพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคใต้ ภาคตะวันออก และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ สุพรรณบุรี ชัยนาท นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ประจวบคีรีขันธ์ สงขลา เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แพร่ จันทบุรี ระยอง ชลบุรี สระแก้ว ปราจีนบุรี ขอนแก่น นครราชสีมา โดยจะทำการสำรวจตลอดทั้งปี

1.2 โดยเก็บใบ กิ่ง ผล หรือส่วนต่าง ๆ ของพืช ที่แสดงอาการผิดปกติลงในกล่องพลาสติก หรือถุงกระดาษพับปากถุง บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างไร เช่น ชื่อพืช ผู้เก็บ สถานที่ที่เก็บตัวอย่างไร บันทึกข้อมูลพิกัด (GPS) จากนั้นนำตัวอย่างแช่ลงในกระติกน้ำแข็งก่อนนำกลับมาห้องปฏิบัติการ

1.3 การทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereomicroscope หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรลงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดทำทางของไรขาวให้อยู่ในท่าคว่ำ และท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย coverglass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ผนึกขอบ coverglass ด้วยน้ำยาทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บและพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

นำตัวอย่างไรที่ทำสไลด์ถาวรแล้วมาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานภายใต้กล้อง compound microscope จำแนกชนิด จากตำราต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง วาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดพร้อมทั้งทำ คู่มือการจำแนกชนิด สำหรับใช้ในการจำแนกชนิดของไรขาวในวงศ์ Tarsonemidae ที่สำคัญของประเทศไทย ปิดป้ายบันทึกผลการจำแนกไว้ด้านซ้ายมือของแผ่นสไลด์ก่อนที่จะนำเข้าเก็บในพิพิธภัณฑ์



เวลาและสถานที่

1. กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
2. พื้นที่สำรวจได้แก่ จังหวัดปทุมธานี นครนายก กรุงเทพฯ ลพบุรี ชัยนาท นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี กำแพงเพชร นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ น่าน พิจิตร เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ชุมพร พัทลุง ระนอง ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี พังงา สตูล ภูเก็ต สงขลา ปัตตานี ชัยภูมิ เพชรบูรณ์ กาฬสินธุ์ นครราชสีมา สุรินทร์ ขอนแก่น อำนาจเจริญ สกลนคร ศรีสะเกษ มุกดาหาร หนองคาย อุตรธานี อุบลราชธานี ตราด ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และจันทบุรี

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสำรวจไรขาวในวงศ์ Tarsonemidae ในพื้นที่ 48 จังหวัด ได้แก่จังหวัด จังหวัดปทุมธานี นครนายก กรุงเทพฯ ลพบุรี ชัยนาท นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี กำแพงเพชร นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ น่าน พิจิตร เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ชุมพร พัทลุง ระนอง ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี พังงา สตูล ภูเก็ต สงขลา ปัตตานี ชัยภูมิ เพชรบูรณ์ กาฬสินธุ์ นครราชสีมา สุรินทร์ ขอนแก่น อำนาจเจริญ สกลนคร ศรีสะเกษ มุกดาหาร หนองคาย อุตรธานี อุบลราชธานี ตราด ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และจันทบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม 2561-เดือนธันวาคม 2564 พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 15 ชนิด เป็นไรศัตรูพืช 8 ชนิด ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นศัตรูพืชหรืออาจจะเป็นไรที่กินเชื้อราอีก 6 ชนิดและ ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ไรขาวที่พบทั้งที่เป็นศัตรูพืชและไม่ใช่ศัตรูพืชได้แก่ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), *Polyphagotarsonemus* sp., *Nasutitarsonemus onami* Lofego, Hountondji, Al-Shanfari&Moraes, *Nasutitarsonemus* sp. , *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, *Steneotarsonemus* sp., *Steneotarsonemus spinki* Smiley, *Fungitarsonemus setillus* Sousa, Lofego & Gondim, *Fungitarsonemus* sp. *Neotarsonemoides* sp., *Tarsonemus bilobatus* Suski *Tarsonemus* sp. และ *Steneotarsonemus* sp. (Table 1) สำหรับไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) โดยพบภายในข้าวผลมะพร้าวพบร่วมด้วยกับไร *S. furcatus* (Table 2)

จากการสำรวจพบว่าไรขาวชนิดที่มีความสำคัญเป็นศัตรูพืชเศรษฐกิจมี 3 ชนิด คือ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), *Steneotarsonemus furcatus* De Leon และ *Steneotarsonemus spinki* Smiley ไรขาวพริก *P. latus* เป็นไรขาวที่เข้าทำลายพืชได้หลากหลายชนิด ทำให้ยอดใบพริกหงิกม้วนงอ ลำตัวของไรมีสีขาวใส ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่า ตัวผู้ผอมเล็กกว่าดูแข็งแรง (Figure 8) ไรขาวที่พบบนผลมะพร้าวพบ 3 ชนิดได้แก่ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, *Steneotarsonemus* sp. และ *Nasutitarsonemus* sp. ชนิดที่สำคัญคือ *Steneotarsonemus furcatus* De พบมากกว่าไรขาวชนิดอื่นที่พบบนในข้าวผลมะพร้าว โดยตัวอ่อน



ไรจะมีสีขา (Figure 9b) ตัวแกมีสีขาอมน้ำตาล (Figure 9c) ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ ตัวผู้มีขนาดเล็ก เคลื่อนไหวว่องไว ทำให้เกิดแผลนูนแข็งสีน้ำตาล ปลายแผลเรียบเป็นเส้นตรง บางลูกอาจแสดงอาการผลิบดเบี้ยว (Figure 9A) ซึ่งแตกต่างกว่าอาการที่พบบนผลมะพร้าวที่เกิดจากอาการเข้าทำลายของไรสี ขามะพร้าว ที่ปลายแผลจะมีลักษณะปลายแผลแหลม ผลเล็กกึ่ง และ *Steneotarsonemus spinki* Smiley เป็นไรขาที่พบบนใบข้าว ระบาดเป็นครั้งคราวแต่หากระบาด ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง ลำตัวมีสีขาใสหรือน้ำตาล ระยะเริ่มแรกใบจะมีสีขาซีด ต่อมาบริเวณแผลจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

Key to Genera of Tarsonemidae

1. Adult, female and male: metapodosomal venter with 3 or usually 4 pairs of setae, leg I with membranous part of ambulacrum reduced or absent, and with large, nearly sessile claw or absent.....2
 - Adult, female and male: metapodosomal venter with 2 pairs of setae, leg I with membranous ambulacrum bearing usually moderately small or reduced claw3
2. Lava and adult: legs II and III with symmertrically vestigial claws or without claw, leg IV of female with 2 setae on tibiotarsus, legs IV of male with pointed, triangulara flange distally on posterolateral surface of femorogenu, and with reduced, buttonlike claw terminally.....*Polyphagotarsonemus*

One single genus and species known in Thailand:

***Polyphagotarosnemus latus* (Banks).**

-Lava and adult: legs II and III with claws well develop or asymmetrically reduce, the posterior member usually vestigial or absent on leg III, and sometimes on leg II, of adult female and leg IV with 3 setae on tibiotarsus , structure legs IV of male unknow.....*Nasuitarsonem*
3. Lava and adult: scapular setae very long, near stigmata and anterior to trichobothria; on anterior half of propodosoma, leg I-III with tarsi reatively long, such tat legII with tarsus usually exceeding combined length of tibia and genu.....*Fungitarsonemus*

- Lava and adult: scapular setae posterior to trichobothria; on posterior half of propodosoma, leg I-III with tarsi of moderated length or short, such that leg II with tarsus equal to or shorter than combined length o ftibia and genu.....4
4. Female adult: tegula triangular, its length about 1-1.5 time its basal width.....*Neotarsonemoides*



- Female adult: tegula short to moderately long, broadly rounded apically.....5
- . Female adult: setae *v1* close stigmata, apodeme 4 not extending to base of trochanter IV*Steneotarsonemus*-
- Female adult: setae *v1* not close stigmata, apodeme 4 not extending posterolaterad of base of setae *3b*.....*Tarsonemus*

Subfamily Pseudotarsonemoidinae Lindquist, 1986

Tribe Pseudotarsonemoidini Lindquist, 1986

Genus *Polyphagotarsonemus* Beer and Nucifora, 1965

Polyphagotarsonemus (Tarsonemus) latus Banks, 1904, p.56, fig.3.

Polyphagotarsonemus latus; Lindquist, 1986, p. 448, figs. 77, 78, pp. 449, 79-79a

Polyphagotarsonemus latus: Cho et al., 1993, p. 437, figs. 6-8, figs. 9, 10.

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ความยาวและความกว้างของส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงกัน ไม่พบขนที่ *plapcoxal*, ขนบนส่วนปาก gnathosoma ด้านหลังเรียบ, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็มยาวปานกลาง, ขนส่วนด้านหลัง idiosoma แตกเป็นแฉกเล็กน้อย, ส่วนของแผ่นแข็งด้านหลังส่วนบน (prodorsal shield) ปกติ ไม่ปกคลุมเลยไปถึงส่วนของปาก gnathosoma, รูเปิดหายใจ stigmata ไม่สูงเกินกว่าขอบของแผ่นด้านหลังส่วนบน (prodorsal shield) โดยตำแหน่งจะอยู่ด้านข้างใกล้เคียงกับขน *v1*, หลุมขน *v2* เฉียงเป็นแนวตรงกับขน *v1* และ *sc2* โดยตำแหน่งที่ตั้งของขน *v2* จะอยู่ระหว่างขนทั้งคู่, ปรากฏขน *sc1* เป็นขนกระบอง Bothridia, แผ่นแข็ง EF มีขน *e* และ *f* ตั้งอยู่ในแนวขวาง, ด้านล่าง ventral shield มีร่อง apodemes ลักษณะเป็นรูปตัว Y, apodeme III จะเชื่อมต่อด้านข้างกับ trochanter 3, apodeme IV ลากยาวไปด้านข้างของขน *3b* จนถึงฐานของ trochanter IV, บริเวณด้านล่างของ metapodosomal พบขน 4 คู่ ประกอบด้วยขน *3a*, *3b* *3c* และ *4b*, แผ่น teula ที่อยู่ระหว่างขาคู่ที่ 4 ในเพศเมียกว้างโค้งมน

Polyphagotarsonemus latus (Banks)

(Figs. 2)

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *Tarsonemus latus* Bank, 1904: 56 : f. 3.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพศเมียลำตัวเป็นรูปไข่ สีขาวเหลือง, ขนด้านหลังและบนแผ่นแข็งมีขนาดสั้น, มีขน Bothridia เป็นรูปกระบองอยู่ด้านหลังของขน *v1* โดยจะอยู่เหนือขน *sc2*, ความกว้างและความยาวของส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงกัน ระวังค์ปากมีขนาดเล็ก, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal



พบขน 4 คู่, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 1 มีเส้นขนาดใหญ่เห็นชัดเจน, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 2 และ 3 ไม่ปรากฏเส้น ปลายขาคู่ที่ 4 มีขนยาว 2 เส้นเช่นเดียวกับไรขาเพศเมียชนิดอื่นๆ เพศผู้มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย ลำตัวเรียวผอม ดูแข็งแรง เคลื่อนไหวว่องไว ส่วนของปลายขาในเพศผู้มีลักษณะเป็นกระเปราะ บริเวณส่วนปลายของ femur มีลักษณะเป็นแผ่นยื่นยาวออกเห็นชัดเจน

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host) เข้าทำลายยอดอ่อนของพืชผัก ไม้ดอก หลายชนิด โดยจะทำให้ยอดอ่อนม้วนหงิกงอ โดยมีมันลงด้านล่างอย่างชัดเจน

Genus *Nasuitarsonemus* Nucifora, 1964

Nasuitarsonemus Nucifora, 1964, p 12; nomen nudum.

Nasuitarsonemus Beer and Nucifora, 1965, pp 27, 38, 42.

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *Nasuitarsonemus brontispae* Beer and Nucifora, 1965; by original designation and monotype. Genus abased on adult female only

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ความยาวของส่วนหัวยาวมากกว่าความกว้างของส่วนหัว ส่วนปากยืดยาวไปด้านหน้า ไม่พบขนที่ plapcoxal, ขนบนส่วนปาก gnathosoma ด้านหลังยาว เรียบ, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็ม ยาวตรง, ส่วนของ pharynx ยาว เรียว ปานกลาง ผนังแข็ง, ขนส่วนด้านสันหลัง (idiosoma) แตกเป็นแฉก, ขน sc2 มีขนาดใกล้เคียงกับความยาวของขนบนแผ่นแข็งอื่นๆ ส่วนของแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน (prodorsal shield) ยืดยาวแคบ หรือปกคลุมส่วนของปาก gnathosoma และรูหายใจ stigmata, รูเปิดหายใจ stigmata ตั้งอยู่ด้านข้างหลังขน v1, หลุมขน v2 เนียงเป็นแนวยาวตรงกับขน v1 และ sc2 โดยตำแหน่งที่ตั้งของขน v2 จะอยู่หนึ่งในสามระหว่างขนทั้งคู่, ปรากฏขนกระบอง Bothridia, ขน sc2 ตั้งอยู่ส่วนท้ายของแผ่นแข็งด้านสันหลังหลังรูหายใจ โดยตำแหน่งที่ตั้งกว้างกว่าขนอื่น ๆ แผ่นแข็ง EF มีขน e และ f ตั้งอยู่ในแนวขวาง, ขน f ตั้งอยู่ระยะห่างกว่าขนอื่น ๆ บนแผ่นแข็ง D ด้านล่าง (ventral shield) มีร่อง apodemes แคบ ๆ ไม่ค่อยชัดเจนและไม่รวมกับ prosternal apodeme, apodeme II ชัดเจนเชื่อมต่อกับ prosternal apodeme, apodeme III ยืดออกไปทางด้านข้างของ trochanter III ยาวเลยขน 3a บางครั้งก็ไม่ชัดเจน, apodeme IV ยาวเลยไปกว่าขน 3b แต่ไม่ถึงฐานของ trochanter IV

Nasuitarsonemus onami Lofego, Hountondji, Al-Shanfari & Moraes

(Figs. 3)

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species) : *Nasuitarsonemus onami* Lofego, Hountondji, Al-Shanfari & Moraes, 2011: 463-473: f. 2-7

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ส่วนปาก gnathosoma ยืดยาวออก, ร่องด้านสันหลังชัดเจน, ไม่พบขน pp, ระวังคปาก palp ยาว, ส่วนของ pharynx ความกว้างปานกลาง ส่วนของแผ่นแข็งด้านสันหลังเรียบ ปกคลุมส่วน



ของ gnathosoma, ส่วนของ stigmata ตำแหน่งใกล้เคียงกับขน *sc1* โดยอยู่เหนือขน *sc1*, ขนด้านสันหลังเป็นแบบเรียบยาว setiform, ขน *1a* ใกล้กับร่อง apodeme I, apodeme II สั้น ไม่รวมกับ proteneral apodeme, apodeme IV ยึดยาวเฉียงไปส่วนท้ายของขน *3b*, ไม่พบ poststernal apodeme, coxisternal plates เรียบ, terula พัฒนาการส่วนท้ายโค้งมน, ขน *ps* แยกเป็นแฉก ขน solenidion ของขา tarsus I เป็นรูปกระบอก ปลายมน ส่วนของเล็บพัฒนาดี ในเพศผู้ พบขน 4 คู่ตรงตำแหน่ง metapodosomal, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 1 มีเล็บขนาดใหญ่ไม่ใหญ่มาก ขาคู่ที่ 2 และ 3 มีเล็บเป็น 2 แฉก และของปลายขาคู่ที่ 4 ปรากฏเป็นเล็บขนาดใหญ่ชัดเจน ส่วนของ femur พบขน 3 เส้น โดยขยายใหญ่ป่องออกพบขน 1 เส้นตรงบริเวณที่ขยายป่องออก อีกเส้นหนึ่งสั้น ๆ และอีกเส้นมีความยาวตั้งอยู่ตรงปลายของ femur

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host)

สามารถเจริญเติบโตได้บนยอดของต้นอ่อนมะพร้าว พบไรใต้ขั้วผลมะพร้าว ภายในเปลือกขั้วผล โดยเฉพาะผลอ่อน ทำให้ผลมะพร้าวเป็นแผลนูนแข็ง การแพร่ระบาดไม่มากเหมือนกับไรขาวมะพร้าวอีกชนิด *Steneotarsonemus furcatus* ที่พบการเข้าทำลายในผลมะพร้าวมากกว่า การกระจายตัวและการเข้าทำลายรุนแรงกว่า

Subfamily Tarsoeminae Canestrini and Fanzago, 1977

Tribe Steneotarsonemini Linndquist, 1986

Genus *Steneotarsonemus* Beer, 1954

Steneotarsonemus Beer, 1954, p. 1229.

Type species: *Steneotarsonemus hyaleos* Beer, 1954; by original designation.

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ความยาวและความกว้างของส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนใหญ่จะเป็นรูปทรงครึ่งวงกลม หรือกึ่งสี่เหลี่ยม ส่วนปากไม่ยึดยาวไปด้านหน้า พบขนที่ plapcoxal ด้านข้างในตัวเต็มวัย, ขนบนส่วนปาก gnathosoma ด้านหลังปกติ เรียบ แยกเป็นแฉกเล็กน้อย, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็มชัดเจน ส่วนฐานแข็งโค้งวางขวางตามความกว้างส่วนใหญ่หรือทั้งหมดของแคปซูล, ส่วนของ pharynx สั้นจนถึงยาวปานกลาง, ลำตัวเป็นรูปไข่ ขนส่วนด้านสันหลัง idiosoma เรียบแตกเป็นแฉกเล็กน้อย, ขนบนแผ่นแข็งสั้นโดยปกติสั้นกว่าขน *sc2*, ด้านหน้าของแผ่นแข็งด้านสันหลังนูนเล็กน้อย หรือเรียบ ไม่ยึดยาวออกปกคลุมส่วนของ gnathosoma, หลุมขน *v2* เฉียงเป็นแนวตรงกับขน *v1* และ *sc2* โดยตำแหน่งที่ตั้งของขน *v2* จะอยู่ระหว่างหนึ่งในสามหรือหนึ่งในสี่ของขน *v1* และ *sc2*, ตำแหน่งที่ตั้งของขน *sc2* อยู่ห่างกว่าระยะการตั้งของขนอื่น ๆ ขนยาวกว่าขน *v1* และตั้งอยู่หลัง stigmata, ปรากฏขนกระบอก Bothridia บนแผ่นแข็งด้านสันหลัง, แผ่นแข็ง EF มีขน *e* และ *f* ตั้งอยู่ในแนวขวาง, ขน *f* ตั้งอยู่ระยะแคบกว่าขนอื่น ๆ บนแผ่นแข็ง D, ร่อง apodemes ลักษณะเป็นรูปตัว Y เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme, apodeme II ชัดเจน หรือไม่ชัดเจน หรือไม่เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme และไม่เชื่อมต่อกัน sejugal apodeme, apodeme III ไม่ยึดยาวออกไปทาง



ด้านข้างของ trochanter III ตรงกลางไม่ชัดเจน, apodeme IV เชื่อมต่อกับ poststeral apodeme ไม่เลยเกินตำแหน่งของขน 3b บางครั้งยาวเลยถึงฐานของ trochanter III, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, แผ่น teula สั้นโค้งมน

Steneotarsonemus furcatus De Leon

(Figs. 4)

Steneotarsonemus furcatus De Leon, 1956, p. 107. f.2.

Steneotarsonemus furcatus: Jeppson et al., 1975. p. 294. f. f. 77b.

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, 1956, 107: f.2.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพศเมียมีลำตัวเป็นรูปไข่โดยมีขนาดความยาวของส่วนหัวและความกว้างใกล้เคียงกัน ขน ด้านสันหลังและบนแผ่นแข็งมีขนาดสั้น, รูหายใจอยู่ใกล้เคียงกับส่วนท้ายของขน v1, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, แผ่น teula สั้นโค้งมนกว้าง, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 1 มีเล็บแตกเป็น 2 แฉก ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 2 มีเล็บ 1 อันขนาดปานกลางและปลายขาคู่ที่ 3 ไม่ปรากฏเล็บ ปลายขาคู่ที่ 4 มีขนยาว 2 เส้นเช่นเดียวกับไรขาวเพศเมียชนิดอื่นๆ ในเพศผู้มีขน 4 คู่ บนแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน prodorsal shield โดยขนทั้ง 4 คู่มีขนาดความยาวใกล้เคียงกัน ยกเว้นขน v2 ที่มีขนาดสั้นกว่าขนคู่อื่น ๆ อย่างชัดเจน, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 1 มีเล็บเดียว ๆ, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 2 และ 3 มีลักษณะเป็นเล็บ 2 อันขนาดปานกลาง และ ปลายขาคู่ที่ 4 มีเล็บขนาดใหญ่ โดยส่วนของ femur ขยายใหญ่ มีขน 3 คู่ ขนคู่ที่อยู่บริเวณส่วนขยายของ femur มีลักษณะขนแตกเป็น 2 แฉกชัดเจน

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host)

ลักษณะผลมะพร้าวที่ถูกไรขาว *S. furcatus* ทำลายพบว่า มีลักษณะปลายผลที่เกิดจะตัดเป็นเส้นตรง เป็นแผลแข็งนูน ไรจะเข้าทำลายภายในหัวผลมะพร้าว ผลอ่อนขนาดเล็ก เมื่อผลโตขึ้นแผลจะขยายใหญ่มากขึ้น หากไรเข้าทำลายรุนแรง ผลจะบิดเบี้ยว

Steneotarsonemus spinki Smiley

(Figs. 5)

Steneotarsonemus spinki Smiley, 1967, p. 130, figs. 10-16.

Steneotarsonemus spinki: Cho et al., 1999, p. 159, figs. 1-2.

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *Steneotarsonemus spinki* Smiley, 1967: p 130: f. 10-16

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพศเมีย ลำตัวค่อนข้างยาว ความยาวของส่วนหัวมีความยาวมากกว่าความกว้างเล็กน้อย รูหายใจ stigmata ตั้งอยู่ตำแหน่งใกล้เคียงกับขน v1, ขน sc1 เป็นรูปกระบอกเรียวยาว อยู่เหนือขน



sc2 ไปทางด้านข้างเล็กน้อย, ขน sc2 มีความยาวมากกว่าขนด้านสันหลังบนแผ่นแข็งอื่น ๆ บริเวณด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, โดยขน 3c มีความยาวมากกว่าขน 3b สองถึงสามเท่า แผ่น teula สั้นโค้งมน ปลายขา tarsus เพศเมียมีเล็บ 1 เล็บขนาดไม่ชัดเจน ปลายขา 2 และ 3 เป็นเล็บแตกเป็น 2 แฉก ปลายขา 4 มีขนยาว 2 เส้นเช่นเดียวกับไรขาเพศเมียชนิดอื่นๆ เพศผู้มีขนด้านสันหลังตอนบน (prodorsal shield) 4 คู่, ขน v2 มีขนาดสั้นกว่าขนอื่นๆ ขน sc2 ตั้งอยู่ในตำแหน่งที่ห่างกว่าขนอื่นๆ พบขนบริเวณ metapodosomal 2 คู่, ปลายขา tarsus ในเพศผู้มีเล็บ 1 เล็บขนาดไม่ชัดเจน ปลายขา 2 และ 3 เป็นเล็บแตกเป็น 2 แฉก, ปลายขา 4 เป็นเล็บขนาดใหญ่ มี femur ป่องออกขยายใหญ่ชัดเจน

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host)

ไรเข้าทำลายช่อดอก เมล็ดข้าวและใบข้าว มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว ช่อดอกและเนื้อเยื่อแห้งเป็นสีน้ำตาล จำนวนช่อดอกลดลง เมล็ดข้าวเป็นจุดสีน้ำตาล สูญเสียคุณภาพของเมล็ดข้าว ถ้าเข้าทำลายใบ ใบจะห่อม้วนในแนวยาว ใบเป็นสีน้ำตาลโดยเฉพาะบริเวณกาบใบข้าว ไรจะอาศัยหลบซ่อนอยู่ภายในกาบใบข้าว ระบาดรุนแรงใบจะแห้งเป็นสีน้ำตาล

Subfamily Acaripinae Schaarschmidt, 1959

Tribe Tarsonemini Canestrini and Fanzago, 1877

Genus *Fungitarsonemus* Beer, 1954

Fungitarsonemus Cromroy, 1985, p. 113.

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *Hemitarsonemus peregrinus* Beer, 1954; by original designation

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ความยาวและความกว้างของส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงกัน พบขนที่ plapcoxal ตั้งอยู่ด้านข้าง ยาวและเห็นชัดเจนในตัวเต็มวัย, ขนบนด้านหลัง gnathosoma เรียบ, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็มสั้น, ส่วนของ pharynx ยาว เรียวเล็ก ผนังแข็ง ด้านสันหลังมีขนเรียบเรียวกเล็ก และแตกเป็นแฉกเล็กน้อย, ขนที่แผ่นแข็ง c, d, f มีขนาดสั้นลง หรือไม่สั้นลง, ขน sc2 มีความยาวกว่าขนที่แผ่นแข็ง ส่วนของแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน (prodorsal shield) ยึดออกปกคลุมเลยไปถึงส่วนของปาก gnathosoma คล้ายหมวก, รูเปิดหายใจ stigmata ไม่ตั้งอยู่ด้านข้างของขอบบนแข็ง (prodorsal shield) โดยตำแหน่งจะอยู่ชิดกับขน sc2, หลุมขน v2 หลังขน sc2 โดยตำแหน่งที่ตั้งจะอยู่ส่วนท้ายของแผ่นแข็งด้านสันหลัง, ตำแหน่งของขน sc2 ตั้งอยู่ระยะห่างกว่าตำแหน่งของขน v1 โดยจะตั้งอยู่ด้านบนประมาณครึ่งหนึ่งของแผ่นแข็ง หรือประมาณหนึ่งในสามของแผ่นแข็งด้านสันหลัง และอยู่ชิดกับรูหายใจ, ปรากฏขนกระบอง Bothridia บนแผ่นแข็งด้านสันหลัง, แผ่นแข็ง D มีขนาดใหญ่กว้างเชื่อมต่อกับแผ่นแข็ง EF, แผ่นแข็ง EF มีขน e และ f ตั้งอยู่ในแนวขวาง, ด้านล่าง ventral shield มีร่อง apodemes ลักษณะเป็นรูปตัว Y เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme, apodeme II



เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme และเชื่อมต่อกัน sejugal apodeme, apodeme III ยึดออกไปทางด้านข้างของ trochanter III และไม่เชื่อมต่อกัน ตรงกลางไม่ชัดเจน, apodeme IV เชื่อมต่อกับ poststernal apodeme บริเวณตรงกลาง ไม่เลยเกินตำแหน่งของขน 3b, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่ ประกอบด้วยขน 3a อยู่ด้านบนของ apodeme III, ปรากฏพบขน 3c หรือ 4a หรือไม่พบขนดังกล่าว ถ้าพบจะอยู่ระหว่างขาคู่ที่ 4, แผ่น teula สั้นโค้งมน

Fungitarsonemus setillus Sousa, Lofego & Gondim

(Figs.6)

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *Fungitarsonemus setillus* Sousa, Lofego & Gondim, 2014: 434-441, f. 7-18

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ความยาวและความกว้างของส่วนหัวมีขนาดใกล้เคียงกัน ลำตัวค่อนข้างกลม ลำตัวสีขาวใส ส่วนของแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน (prodorsal shield) ยึดออกปกคลุมเลยไปถึงส่วนของปาก gnathosoma คล้ายหมวก, ขน v1 ยาวแต่สั้นกว่าขน sc2 ขน sc2 อยู่ตรงกลางระหว่างขน v1 กับขน sc1 โดยขน sc 1 เป็นรูปกระบอกจะอยู่ส่วนท้ายสุด เยื้องไปด้านข้างบริเวณขอบของแผ่นแข็ง มีรูหายใจ sigma อยู่อยู่เหนือโดยใกล้หรือชิดกับขน sc2, ขน sc2 มีความยาวมากกว่าขนด้านสันหลังบนแผ่นแข็งอื่น ๆ, ขน h มีขนาดสั้นและเล็ก, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, tegula โค้งมน, ปลายขา tarsus เพศเมียมีเล็บ 1 เล็บขนาดไม่ชัดเจน ปลายขาคู่ 2 และ 3 เป็นเล็บขนาดเล็กแตกเป็น 2 แฉกบริเวณด้านข้าง, ปลายขาคู่ที่ 4 มีขนยาว 2 เส้นเช่นเดียวกับไรขาวเพศเมียชนิดอื่นๆ ในเพศผู้มีขน 4 คู่บนแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน prodorsal shield โดยขนทั้ง 4 คู่มีขนาดความยาวแตกต่างกัน, ขน v2 ที่มีขนาดสั้นกว่าขนคู่อื่น ๆ อย่างชัดเจน, ขน sc1 มีความยาวกว่าขนอื่นๆ ขน v1 และ sc1 มีความยาวใกล้เคียงกัน, ปลายขา tarsus ของขาคู่ที่ 1 และ 2 ไม่ปรากฏเล็บ, ปลายขา tarsus ของขาคู่ 3 มีลักษณะเป็นเล็บ 2 อันขนาดเล็ก, ปลายขาคู่ที่ 4 เรียวาวคล้ายเล็บปลายมน โดยส่วนของ femur ไม่ขยายใหญ่เรียวยาว มีขน 3 คู่ ขนคู่ที่อยู่บริเวณส่วนปลายของ femure มี 2 เส้น เส้นที่อยู่ปลายสุดมีขนาดสั้น และอีกเส้นมีความยาวชัดเจน

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host)

พบบนใบอ่อนของขนุน ไม่ชัดเจนว่าเป็นศัตรูพืชของขนุน คาดว่าจะเป็นไรขาวที่กินเชื้อราเป็นอาหาร

Genus *Neotarsonemoides* Kaliszewski, 1984

Neotarsonemoides Kaliszewski, 1984a, pp. 205-206; nomen nudum.

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *Neotarsonemoides adae* Kaliszewski, 1984b;

by original designation and monotype. Genus based on adult female only.

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):



ความยาวของส่วนหัวยาวมากกว่าความกว้างเล็กน้อย เป็นรูปไข่ ปากไม่ยื่นยาวไปด้านหน้า ขนที่ plapcoxal ไม่สามารถเห็นได้, ขนบนด้านหลังของ gnathosoma ปกติ เรียบ, ระวังคปาก palp ยื่นไปข้างหน้า สั้นและมีขนาดเล็ก, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็มสั้น, ส่วนของ pharynx ยาว เรียวปานกลาง, แผ่นแข็งด้านสันหลังเรียบ หรือเป็นริ้วเล็กน้อย, ขนด้านสันหลังสั้นหรือแตกเป็นแฉกเล็กน้อย, ขน sc2 มีความยาวใกล้เคียงกับขนบนแผ่นแข็ง, แผ่นแข็งด้านสันหลังปกคลุมคล้ายหมวก โดยคลุมอย่างน้อยครึ่งหนึ่งของฐานส่วนปาก gnathosoma, รูหายใจตั้งอยู่ส่วนท้าย ด้านข้างของขน v1, หลุมขน v2 เฉียงตรงด้านข้างกับขน v1 และ sc2 โดยตำแหน่งจะอยู่ที่กึ่งกลางระหว่างขนทั้งสอง, ระยะห่างของขน sc2 กว้างกว่าระยะห่างของขนคู่อื่น ๆ เล็กน้อย โดยความยาวไม่มากกว่าขน v1 และตั้งอยู่ส่วนท้ายของแผ่นแข็งด้านสันหลัง โดยแบ่งแผ่นแข็งเป็นสามส่วน ขนจะตั้งอยู่ในส่วนที่สามจากท้ายหลังรูหายใจ, ปรากฏขนกระบอง Bothridia บนแผ่นแข็งด้านสันหลัง, แผ่นแข็ง EF มีขน e และ f ตั้งอยู่ในแนวขวาง, apodeme I ไม่ชัดเจน apodeme II ไม่เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme, apodeme IV เป็นร่องแคบ ๆ เชื่อมต่อกับ poststernal apodeme ไม่เลยเกินตำแหน่งของขน 3b, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่ แผ่น teula เห็นเป็นรูปสามเหลี่ยมชัดเจน

Genus *Tarsonemus* Canestrini and Fanzago, 1877

Chironemus Canestrini and Fanzago, 1876a, p. 110; preoccupied name, Canestrini and Fanzago, 1876b.

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *Chironemus minusculus* Canestrini and Fanzago, 1876a; by monotype. *Tarsonemus* Canestrini and Fanzago, 1876b, p 141; replacement name for *Chironemus*.

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ลำตัวเป็นรูปไข่ ความยาวของส่วนหัวยาวมากกว่าความกว้างของส่วนหัว ส่วนปากไม่ยืดยาว, พบขนที่ plapcoxal ด้านข้างในตัวเต็มวัยหรือไม่พบ, ขนบนด้านหลังส่วนปาก gnathosoma ปกติ เรียบ, ขนระวังคปาก palp ยื่นไปด้านหน้ายาวปานกลางพบขนเล็ก ๆ สองเส้น, ส่วนของปาก chelicerae เป็นแท่งเข็ม สอนน้อยที่จะยาวปานกลาง, ส่วนของ pharynx มีหลากหลายแบบ, แผ่นแข็งด้านสันหลังเรียบ หรือเป็นริ้วเล็กน้อยพบขนด้านสันหลังเรียบเรียบหรือแตกเป็นแฉกเล็กน้อย, ขนบนแผ่นแข็ง tergite สั้นปานกลาง บางครั้งยาว โดยจะมีขนหนึ่งหรือสองคู่ที่ยาวกว่าขนอื่น ๆ, ขน sc2 ยาวเกินขนบนแผ่นแข็ง tergite อื่น ๆ, ส่วนของแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน (prodorsal shield) มีหลากหลายรูปแบบ ไม่ขยายออก ขยายออก หรือ ปกคลุมส่วนของปาก gnathosoma และรูหายใจ stigmata, รูเปิดหายใจ stigmata ตั้งอยู่ด้านข้างหลังขน v1, หลุมขน v2 เฉียงเป็นแนวยาวตรงกับขน v1 และ sc2 โดยตำแหน่งที่ตั้งของขน v2 จะอยู่ที่กึ่งกลางระหว่างขนทั้งคู่, ปรากฏขน Bothridia เป็นรูปกระบองหรือเป็นขนเรียวแหลม และอาจจะถูกปกคลุมหรือไม่ถูกปกคลุมด้วยแผ่นแข็งด้านสันหลัง prodorsal shield, แผ่นแข็ง EF มีขน e และ f ตั้งอยู่ในแนวขวาง, ขน f ตั้งอยู่ระยะห่างกว่าขนอื่น ๆ



บนแผ่นแข็ง D, ด้านล่าง ventral shield มีร่อง apodemes ลักษณะเป็นรูปตัว Y เชื่อมต่อกับ prosternal apodeme, apodeme II ชัดเจน หรือไม่ชัดเจน แต่โดยปกติไม่รวมกับ sejugal apodeme, apodeme III ยึดออกไปทางด้านข้างของ trochanter III และไม่เชื่อมต่อกัน โดยปกติไม่ยึดออกจนถึงตรงกลางของขน 3a, apodeme IV เชื่อมต่อกับ poststernal apodeme บริเวณตรงกลาง หรือไม่เชื่อมต่อแต่จะไม่เลยเกินตำแหน่งของขน 3b, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, แผ่น teula สั้นโค้งมน

Tarsonemus bilobatus Suski

Tarsonemus bilobatus Suski, 1965: 541-543: figs. 1-4.

Tarsonemus bilobatus: Cho et al., 1965, p. 128, figs. 1-2.

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *Tarsonemus bilobatus* Suski, 1965: 541-543: figs. 1-4.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เพศเมียลำตัวเป็นรูปไข่ ความยาวของส่วนหัวยาวมากกว่าความกว้างของส่วนหัว, ขน *sc1* เป็นรูปกระบอกอยู่ระหว่างขน *v1* และขน *sc2* โดยตำแหน่งอยู่ก่อนมาทางส่วนท้ายของแผ่นแข็ง ใกล้กับขน *sc2*, ขน *sc2* ยาวกว่าขนอื่น ๆ บนแผ่นแข็งไม่มาก, รูหายใจ stigmata อยู่ด้านหลังไม่ไกลจากขน *v1*, ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, แผ่น teula สั้นโค้งมน, ร่อง apodeme I, II และ sejugal apodeme เชื่อมต่อกัน, บริเวณ ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, แผ่น teula สั้นโค้งมน, ปลายขา tarsus มีเล็บขนาดใหญ่ชัดเจน ขาคู่ที่ 2 และ 3 ไม่ปรากฏเล็บ เพศผู้ มีขน 4 คู่บนแผ่นแข็งด้านสันหลังส่วนบน โดยขน *sc1* มีความยาวมากกว่าขน *v1*, *v2*, *sc2* และยาวมากกว่าขนบนแผ่นแข็งด้านหลังอื่น ๆ, ด้านล่างของ metapodosomal พบขน 2 คู่, ปลายขา tarsus มีเล็บขนาดใหญ่ ขาคู่ที่ 2 และ 3 มีเล็บแตกเป็น 2 แฉก ส่วนปลายขาคู่ที่ 4 ปรากฏเล็บโค้งงอขนาดใหญ่ชัดเจน, femur มีขน 3 คู่ ความยาวขนไม่แตกต่างกันมาก ส่วนของ femur ปกติ ไม่ขยายใหญ่

ความสัมพันธ์กับพืชอาศัย (Relation to host)

พบอยู่ภายในกาบใบสับปะรด โดยเฉพาะกาบใบที่ติดอยู่กับดิน ไม่ชัดเจนว่าเป็นศัตรูพืช

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจไรขาวในพื้นที่ 48 จังหวัด ได้แก่จังหวัด จังหวัดปทุมธานี นครนายก กรุงเทพมหานครบุรี ชัยนาท นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี กำแพงเพชร นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ น่าน พิจิตร เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน สมุทรสาคร สมุทรสงคราม เพชรบุรี ชุมพร พัทลุง ระนอง ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี พังงา สตูล ภูเก็ต สงขลา ปัตตานี ชัยภูมิ เพชรบูรณ์ กาฬสินธุ์ นครราชสีมา สุรินทร์ ขอนแก่น อำนาจเจริญ สกลนคร ศรีสะเกษ มุกดาหาร หนองคาย อุตรดิตถ์ อุบลราชธานี ตราด ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และจันทบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม 2561-เดือน ธันวาคม 2564 พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 15 ชนิด เป็นไรศัตรูพืช 8 ชนิด ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น



ศัตรูพืชหรืออาจจะเป็นไรที่กินเชื้อราอีก 6 ชนิดและ ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ไรขาศัตรูพืชที่พบได้แก่ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), *Polyphagotarsonemus* sp., *Nasutitarsonemus onami* Lofego, Hountondji, Al-Shanfari&Moraes, *Nasutitarsonemus* sp. , *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, *Steneotarsonemus* sp., *Steneotarsonemus spinki* Smiley และอีกชนิดไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ไรขาที่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นศัตรูพืชพบ 5 ชนิดได้แก่ *Fungitarsonemus setillus* Sousa, Lofego & Gondim, *Fungitarsonemus* sp. *Neotarsonemoides* sp., *Tarsonemus bilobatus* Suski *Tarsonemus* sp. และ *Steneotarsonemus* sp. สำหรับไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) จากการสำรวจพบว่าไรขาชนิดที่มีความสำคัญมี 3 ชนิดคือ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) เป็นไรขาที่เข้าทำลายพืชได้หลากหลายชนิด ทำให้ใบพืชมีวันหงิกงอ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon เป็นไรขาศัตรูสำคัญบนผลมะพร้าวทำให้มะพร้าวผิวผลเสียหาย ผลไม่ได้ขนาด และ *Steneotarsonemus spinki* Smiley เป็นไรขาที่พบบนใบข้าว ระบาดเป็นครั้งคราวแต่หากระบาดทำให้ผลผลิตข้าวลดลง

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ชื่อวิทยาศาสตร์นำไปใช้เป็นฐานข้อมูลงานวิจัยในการสืบค้นอ้างอิงทางหลักวิชาการ
2. สามารถนำข้อมูลวิชาการที่ได้ไปใช้ประโยชน์ เพื่อนำไปจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชในวงศ์นี้เพิ่มเติม จากที่ประเทศไทยยังไม่มีรายชื่อไรขาเป็นศัตรูพืชกักกันในประเทศ ดังนั้นการสำรวจในครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ในการเพิ่มข้อมูลศัตรูพืชกักกันให้สมบูรณ์ครบถ้วนยิ่งขึ้น
3. ได้ความสัมพันธ์อันดีระหว่างผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศในการช่วยยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร. Lofego ผู้เชี่ยวชาญด้านการจำแนกไรขา ที่ให้ความอนุเคราะห์แนะนำ และยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ไรขา

เอกสารอ้างอิง

- พิเชฐ เขาวรรณวัฒน์, มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และวัฒนา จารณศรี 2548. การศึกษาชนิดของไรเพื่อการส่งออก. หน้า 1373-1391. ใน รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ประจำปี 2548 เล่มที่ 1. กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม, กลุ่มกีฏและสัตววิทยา, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- วัฒนา จารณศรี, ฉัตรชัย ศฤงฆไพบุลย์ และเทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์. 2526. การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของไรศัตรูกล้วยไม้ในประเทศไทย. หน้า 1-7. ใน รายงานผลการค้าวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2526. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร, กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.



- วัฒนา จารณศรี และ มานิตา คงชื่นสิน. 2533. อนุกรมวิธานไรศัตรูส้มโอในประเทศไทย. หน้า 260-273. ใน รายงานผลงานวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2533. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร, กองกีฏ และสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- วัฒนา จารณศรี, มานิตา คงชื่นสิน, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และฉัตรชัย ศฤงฆไพบูลย์. 2535. การศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนมะม่วงในประเทศไทย. หน้า 201-233. ใน รายงานผลการค้นคว้า และวิจัยปี 2535. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร, กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- วัฒนา จารณศรี, มานิตา คงชื่นสิน, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และพิเชฐ เขาวนวัฒน์วงศ์. 2543. ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการของกองกีฏและสัตววิทยา ปี พ.ศ. 2544. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 192 น.
- Baker, E. W. 1975. Plant Feeding Mites of Thailand (Tetranychidae, Tenuipalpidae, and Tuckerellidae). Plant Protection Service Technical Bulletin No. 35. Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Co-operatives Bangkok, Thailand. 43 pp.
- CABI. 2018. Invasive Species Compendium. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/26876> (12 June 2018)
- Charanasri, V., A. Bhandhufalk and C. Saringkaphaibul. 1977. Mites associated with economic crops of Thailand. Thai J. Agric. Sci. 10: 81-89.
- Cho, Myoung-R. 2013. Acari: Prostigmata: Tarsonemidae. pp. 5-47. In Myoung-R. Cho and Jong-H. Lee., eds. Invertebrate Fauna of Korea. National Institute of Biological Resources Ministry of environmental. 157 pp.
- Fountain, M. T., A. L. Harris and J. V. Cross. 2010. The use of surfactants to enhance acaricide control of *Phytonemus pallidus* (Acari: Tarsonemidae) in strawberry. Crop Protection 29: 1286-1296.
- Jeppson, L. R., H. H. Keifer and E. W. Baker. 1975. Mite injurious to economic plant. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California. England. 614 p.
- Kongchuen, M., V. Charanasri and A. Takafuji. 2005. Geographical distribution of *Neoseiulus longispinosus* (Evans) and its habitat plants in Thailand. J. Acarol. Soc. Jpn., 14 (1):1-11.
- Lin, J. and Z-Q, Zhang. 1999. Tarsonemidae of China (Acari: Prostigmata): An Annotated and Illustrated Catalogue and Bibliography. Systematic and Applied Acarology Special Publications 3. Systematic and Applied Acarology Society President,



- Professor Zhi-Qiang Zhang c/o Department of Entomology, The Natural History Museum, London, UK. 73 p.
- Lin, J. and Z-Q, Zhang. 2002. Tarsonemidae of the world key to Genera, Geographical distribution, Systematic Catalogue and Annotated Bibliography. Systematic and Applied Acarology Society c/o Department of Entomology, The Natural History Museum, London, UK. 440 p.
- Lindquist, E. E. 1986. The world genera of Tarsonemidae (Acari: Heterostigmata): A morphological, Phylogenetic, and systematic revision, with a reclassification of family-Group Taxa in the Heterostigmata. The entomological society of Canada. 5165p.
- Lofego, A. C and M. G. C. Gondim Jr. 2006. A new species of *Steneotarsonemus* (Acari: Tarsonemidae) from Brazil. Systematic and Applied Acarology. 11: 195-203.
- Venzon, M., M. C. Rosado, A. J. Molina-Rugama, V. S. Duarte, R. Dias and A. Pallini. 2008. Acaricidal efficacy of neem against *Polyphagotarsonemus latus* (Banks)(Acari: Tarsonemidae).Crop Protection 27: 869-872.
- Wongsiri, N. 1991. List of insect, Mite and other zoological pests of Economic plants in Thailand. Entomology and Zoology Division Department of Agriculture Bangkok, Thailand. 168p.
- Zhang, Zhi-Q. 2003. Mites of Greenhouses identification, Biology and control. Cabi publishing, USA. 244pp.



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand.

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|--|-------------------------------------|--|-------------------|------------|--------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Fungitarsonemus setillus</i> Sousa, Lofego & Gondim | <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam | Tha Khun Ram Sub-district, Mueang District, Kamphaeng Phet Province | - | 16°26.169' | 099°27.649' |
| <i>Fungitarsonemus</i> sp. | <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam | Wang Wa Sub-district, Kleang District, Rayong Province | - | 12°44.895' | 101°37.442' |
| | | Phu Ngoen Sub-district, Kantharalak District, Sisaket Province | - | 14°44.732' | 104°31.589' |
| <i>Nasuitarsonemus</i> sp. | <i>Cocos nucifera</i> L. | Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province | - | 13°28.20' | 100°4.50' |
| <i>Nasuitarsonemus onami</i> Lofego, Hountondji, Al- Shanfari & Moraes | <i>Cocos nucifera</i> L. | Huai Sakae Sub-district, Mueang District, Phetchabun Province | - | 16°09.801' | 101°04.666' |
| | | Nong Sam Wang Sub-district, Nong Suea District, Pathum Thani Province | - | 16°10.770' | 101°05.519' |
| | | | - | 14°13.800' | 101°85.9434' |
| <i>Neotarsonemoides</i> sp. | <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. | Khao Kaew Sub-district, Tha Mai District, Chanthaburi Province | - | 12°51.097' | 101°57.329' |
| | | Wiang Sub-district, Chiang Saen District, Chiang Rai Province | - | 20°16.473' | 100°43.883' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|--|---------------------------|--|-------------------|------------|-------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Polyphagotarsonemus latus</i> (Banks) | <i>Capsicum annuum</i> L. | Tha Chang Sub-district, Mueang District, Nakhon Nayok Province | Leaf curl | 14°11.130' | 101°09.875' |
| | | Na Kham Sub-district, Ban Dung District, Udon Thani Province | | 17°38.588' | 103°06.464' |
| | | Hai Yong Sub-district, Phang Khon District, Sakon Nakhon Province | | 17°25.213' | 103°43.703' |
| | | Jumpon Sub-district, Phon Phisai District, Nong Khai Province | | 18°03.442' | 103°06.276' |
| | | Bong tai Sub-district, Sawang Daen Din District, Sakon Nakhon Province | | 17°24.632' | 103°22.318' |
| | | Rattaphum Sub-district, Khuan Niang District, Songkhla Province | | 07°09.584' | 100°20.076' |
| | | Tanotduan Sub-district, Khuan Khanun District, Phatthalung Province | | 07°44.047' | 100°01.403' |
| | | Bang Rieng Sub-district, Khuan Niang District, Songkhla Province | | 07°07.930' | 100°25.461' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|---|---------------------------|---|-------------------|------------|-------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Polyphagotarsonemus latus</i> (Banks) | <i>Capsicum annuum</i> L. | Bang Kaeo Sub-district, La-un District, Ranong Province | Leaf curl | 10°11.750' | 098°43.794' |
| | | Rong Chang Sub-district, Mueang District, Phichit Province | | 16°26.117' | 100°17.101 |
| | | Chakthong Building, Ladyao Sub-district, Chatuchak District, Bangkok Province | | 13°50.837' | 100°34.388' |
| | | Bang Non Sub-district, Mueang District, Ranong Province | | 10°00.760' | 098°38.679' |
| | | | | 10°25.881' | 098°47.872' |
| | | Chum Kho Sub-district, Pathio District, Chumphon Province | | 10°42.913' | 099°22.807' |
| | | Huai Rai Sub-district, Mueang District, Amnat Charoen Province | | 15°82.622' | 104°67.498' |
| | | Dunsat Sub-district, Kranuan District, Khon Kaen Province | | - | - |
| | | Huai Mek District, Kalasin Province | | 16°19.8' | 103°11.61' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|--|---------------------------------------|--|-------------------|---------------|----------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Polyphagotarsonemus latus</i> (Banks) | <i>Capsicum annuum</i> L. | Tha Luang Sub-district, Tha Luang District, Lopburi Province | Leaf curl | 15°03.665' | 101°09.708' |
| | <i>Solanum virginianum</i> L. | Lam Hoi Sub-district, Don Tum District, Nakhon Phathom Province | Leaf curl | 13°57.467' | 100°02.754' |
| | <i>Solanum virginianum</i> L. | Tha Luang Sub-district, Tha Luang District, Lopburi Province | - | 15°04.809' | 101°06.523' |
| | <i>Solanum tuberosum</i> L. | Ban Luang Sub-district, Chom Thong District, Chiang Mai Province | - | 18°44.463' | 98°55.022' |
| | <i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC. | Ladprao Road, Khlong Chan Sub-district, Bang Kapi District, Bangkok Province | - | - | - |
| | Weed | Mae Faek Sub-district, San Sai District, Chiang Mai Province | - | - | - |
| | <i>Jasminum abyssinicum</i> Hochs | Khao Saming District, Trat Province | - | - | - |
| | <i>Cannabis sativa</i> L. | Department of Agriculture Bangkok | - | 13°51.07.289' | 100°34.31.662' |
| <i>Polyphagotarsonemus</i> sp. | <i>Morus alba</i> L. | Chakthong Building, Bangkok Province | - | - | - |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|---|---------------------------|--|--|-------------|---------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Polyphagotarsonemus</i> sp. | <i>Cucumis sativus</i> L. | Khao Yai Sub-district, Cha-am District, Phetchaburi Province | - | 12°45.108' | 099°55.083' |
| <i>Steneotarsonemus</i> <i>furcatus</i> De Leon | <i>Cocos nucifera</i> L. | Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province | Scanty squarely brown patches of | 13°61.1874' | 100° 12.2446' |
| | | Nong Sam Wang Sub-district, Nong Suea District, Pathum Thani Province | damaged tissue on the fruit surface | 13°62.4772' | 100°11.2743' |
| | | Lumpum Sub-district, Mueang District, Phatthalung Province | | 14°13.800' | 100°85.9434' |
| | | Chumpon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province | | 07°41.739' | 100°08.634' |
| | | Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province | | 07°36.007' | 100°24.096' |
| | | Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province | | 13°28.20' | 100°4.50' |
| | | Takian Tia Sub-district, Bang Lamung District, Chon Buri Province | | 13°37.100' | 100°07.452' |
| Lak Song Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province | | 13°00.681' | 100°58.512' | | |
| | | | | 13°38.298' | 100°07.138' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|--|--------------------------|--|--|------------|-------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon | <i>Cocos nucifera</i> L. | Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province | Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface | 13°36.645' | 100°05.850' |
| | | Wang Nam Khiao Sub-district, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province | | 13°50.874' | 100°01.328' |
| | | Don Khoi Sub-district, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province | | 14°00.259' | 100°02.624' |
| | | Bang Talat Sub-district, Khlong Khuean District, Chachoengsao Province | | 13°43.160' | 101°10.567' |
| | | Jom Pluak Sub-district, Bang Khonthi District, Samut Songkhram Province | | 13°28.50' | 99°58.28' |
| | | Klong Khon Sub-district, Mueang District, Samut Songkhram Province | | 13°21.316' | 099°56.704' |
| | | Wat Keaw Sub-district, Bang Phae District, Ratchaburi Province | | 13°38.621' | 099°55.164' |
| | | | | | 13°38.589' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|--|--------------------------|--|--|-------------|-------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon | <i>Cocos nucifera</i> L. | Khok Mo Sub-district, Mueang District, Ratchaburi Province | Scanty squarely brown patches of | 13°33.693' | 099°50.520' |
| | | Ta Som Sub-district, Khao Saming District, Trat Province | damaged tissue on the fruit surface | 12°16.582' | 102°18.333' |
| | | Chong Kham Sub-district, Mueang District, Mae Hong Son Province | | 19°29.7268' | 97°97.1424' |
| | | Non Sung Sub-district, Non Sung District, Nakhon Ratchasima Province | | 15°11.892' | 102°15.249' |
| | | Nai Mueang Sub-district, Phi mai District, Nakhon Ratchasima Province | | 15°15.044' | 102°29.003' |
| | | Chak Don Sub-district, Klaeng District, Rayong Province | | 12°41.898' | 101°38.068' |
| | | Bang Luang Sub-district, Sapphaya District, Chai Nat Province | | 15°15.371' | 100°18.397' |
| | | Ta Wang Sub-district, Buachet District, Surin Province | | 14°38.569' | 104°00.741' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|--|--------------------------|--|--|------------|-------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon | <i>Cocos nucifera</i> L. | Thung Kha Sub-district, Mueang District, Chumphon Province | Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface | 10°25.651' | 99°09.258' |
| | | Mai Khao Sub-district, Thalang District, Phuket Province | | 08°04.303' | 098°20.590' |
| | | La-Ngu Sub-district, La-Ngu District, Satun Province | | 06°48.858' | 099°48.333' |
| | | Province | | 06°46.964' | 099°49.611' |
| | | Khon Klan Sub-district, Thung Wa District, Satun Province | | 06°59.548' | 099°40.584' |
| | | Province | | 06°58.892' | 099°40.770' |
| | | Thung Bulang Sub-district, Thung Wa District, Satun Province | | 07°01.831' | 099°40.477' |
| | | Province | | 07°01.864' | 099°40.467' |
| | | Pak Nam Sub-district, La-ngu District, Satun Province | | 06°52.760' | 099°41.501' |
| | | Province | | 06°52.774' | 099°41.527' |
| | | Laem Son Sub-district, La-ngu District, Satun Province | | 06°54.705' | 099°41.678' |
| | | Province | | 06°54.707' | 099°41.706' |
| | | Bang Talat Sub-district, Khlong Khuean District, Chachoengsao Province | | 13°43.160' | 101°10.561' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|--|----------------------------------|--|--|------------|-------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon | <i>Cocos nucifera</i> L. | Ko Pa-ngan Sub-district, Ko Pha-ngan District, Surat Thani Province | Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface | 09°43.250' | 099°59.291' |
| | | | | 09°42.966' | 099°59.641' |
| | | | | 09°43.811' | 099°59.119' |
| | | | | 09°43.089' | 100°00.443' |
| | | | | 09°44.390' | 100°00.223' |
| | | Bang Bor Sub-district, <i>Ta Kua Pa</i> District, Phang-Nga Province | | 08°46.611' | 098°15.884' |
| | | Kui Nuea Sub-district, Kui Buri District, Pachaup Khiri Khan | | 12°00.165' | 099°54.435' |
| <i>Steneotarsonemus sp.</i> | <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. | Chum Pon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province | | 07°36.159' | 100°23.789' |
| | | | | 07°36.071' | 100°22.881' |
| | | Rueso Sub-district, Mae Lan District, Pattani Province | | 06°33.249' | 101°09.637' |
| | | Huai Yang Thon Sub-district, Pak Tho District, Ratchaburi Province | - | 13°18.621' | 099°39.713' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|-----------------------------|----------------------------------|--|--|-------------|---------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Steneotarsonemus</i> sp. | <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. | Bo Ploy Sub-district, Bo Rai District, Trat Province | - | 12°32.954' | 102°32.851' |
| | | Wang Chan Sub-district, Kaeng Krachan District, Phetchaburi Province | - | 12°57.526' | 99°44.606' |
| | <i>Solanum virginianum</i> L. | Ainalai Sub-district, Wiang Sa District, Nan Province | - | 18°36.223' | 100°31.469' |
| | <i>Solanum tuberosum</i> L. | Nong Kwai Sub-district, Hang Dong District, Chiang Mai Province | - | 18°74.620' | 98°91.672' |
| <i>Cocos nucifera</i> L. | | Wa Ta Baek Sub-district, Thep Sathit District, Chaiyaphum Province | Scanty squarely brown patches of damaged | 15°23.106' | 101°25.886' |
| | | Chum pon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province | tissue on the fruit surface | 07°36.159' | 100°23.789' |
| | | | | 07°36.071' | 100°22.881' |
| | | | | 07°36.007' | 100°24.096' |
| | | Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province | | 13°62.4772' | 100° 11.2743' |
| | | | | 13°28.20' | 100°4.50' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|-----------------------------|--------------------------|---|---|------------|-------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Steneotarsonemus</i> sp. | <i>Cocos nucifera</i> L. | Sapphaya Sub-district, Sapphaya District, Chainat Province | Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface | 15°07.353' | 120°14.245' |
| | | Phu Nam Yod Sub-district, Wichian Buri District, Phetchabun Province | | 15°30.798' | 100°59.946' |
| | | Phi Kul Thong Sub-district, Mueang District, Ratchaburi Province | | 13°35.216' | 099°53.065' |
| | | Jompluak Sub-district, Bang Khonthi District, Samut Songkhram Province | | 13°28.50' | 099°58.28' |
| | | Huai Sakae Sub-district Mueang District, Petchabun Province | | 16°10.603' | 101°05.831' |
| | | Non Sung Sub-district, Nonsung District, Nakhon Ratchasima Province | | 15°11.836' | 102°15.324' |
| | | Klong Noi Sub-district, Pak Phanang District, Nakhon Si thammarat Province | | 08°22.384' | 100°06.146' |
| | | Thung Kha Sub-district, Muang District, Chumphon Province | | 10°25.165' | 099°09.254' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|---|-------------------------------------|--|--|------------|-------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Steneotarsonemus</i> sp. | <i>Cocos nucifera</i> L. | Khuk Khak Sub-district, Ta Kua Pa Distric, Phang- nga Province | Scanty squarely brown patches of damaged | 08°43.761' | 098°14.386' |
| | | Huai Yang Sub-district, Thap Sakae District, Prachuap khiri khan Province | tissue on the fruit surface | 11°37.051' | 099°38.335' |
| <i>Steneotarsonemus</i> sp. | <i>Musa acuminata</i> Co lla | Nam Chuet Noi Subdistrict, Kraburi District, Ranong Province | - | 10°25.884' | 098°47.856' |
| <i>Steneotarsonemus spinki</i> Smiley | <i>Oryza sativa</i> L. | Nong Khon Sub-district, Mueang District, Ubon Ratchathani Province | The surface of leaf sheath browning and decaying | 13°49.297' | 100°36.049' |
| <i>Tarsonemus bilobatus</i> <i>Suski</i> | <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. | Huai Yang Thon Sub-district, Pak Tho District, Ratchaburi Province | - | 13°18.621' | 099°39.713' |
| | | Khao Yai Sub-district, Cha-am District, Phetchaburi Province | - | 12°47.555' | 099°55.603' |
| | | Bowin Sub-district, Si Racha District, Chonburi Province | - | 13°01.383' | 101°04.170' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|-----------------------------|----------------------------|--|-------------------------------------|--------------|---------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Tarsonemus bilobatus</i> | <i>Ananas comosus</i> (L.) | Nong Krang Sub-district, Bo Ploy District, Kanchanaburi Province | - | 14°31.412' | 99°31.596' |
| <i>Suski</i> | Merr. | Thung Bencha Sub-district, Tha Mai District, Chanthaburi Province | - | 12°46.141' | 101°57.868' |
| | | Rahaeng Sub-district, Lat Lum Kaeo District, Pathum Thani Province | - | - | - |
| | | Aow Noi Sub-district, Mueang District, Prachuap Khiri Khan Province | - | 11°55.487' | 99°48.428' |
| Tarsonemidae | <i>Cocos nucifera</i> L. | Pho Pitak Sub-district, Sapphaya District, Chai Nat Province | Scanty squarely brown patches of | 15°04.451' | 100°17.286' |
| | | Mueang District, Phitsanulok Province | damaged tissue on | 16°749.9513' | 100°306.4575' |
| | | Huai Sakae Sub-district, Mueang District, Phetchabun Province | the fruit surface | 16°09.801' | 101°05.666' |
| | | Ta Chan Sub-district, Khong District, Nkhon Ratchasima Province | | 16°10.603' | 101°05.831' |
| | | Rueso Sub-district, Mae Lan District, Pattani Province | | 15°19.175' | 102°26.641' |
| | | | | 06°33.249' | 101°09.637' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|-----------------------|------------------------------------|--|--|------------|-------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| Tarsonemidae | <i>Cocos nucifera</i> L. | Khan Thuli Sub-district, Tha Chana District, Surat Thani Province | Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface | 09°40.235' | 099°05.100' |
| | | Chom Pluak Sub-district, Bang Khonthi District, Samut Songkhram Province | | 13°28.050' | 99°58.28' |
| | | Chumphon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province | | 07°36.007' | 100°24.096' |
| | | Thung Kha Sub-district, Mueang District, Chumphon Province | | 10°25.651' | 99°09.258' |
| | | Bang Pra Sub-district, Si Racha District, Chon buri Province | | 13°14.352' | 100°52.292' |
| | | Ta Khian Tia Sub-district, Bang Lamung District, Chon buri Province | | 13°00.190' | 100°59.575' |
| | | | | 13°00.681' | 100°58.512' |
| <i>Tarsonemus</i> sp. | <i>Pithecellobiumdulce</i> (Roxb.) | Samrongchai Sub-district, Paisali District, Nakhon Sawan Province | - | - | - |
| | <i>Allium sativum</i> L. | Nampat District, Uttaradit Province | - | 17°44.597' | 100°42.304' |
| | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Wang Hin District, Sisaket Province | - | 14°55.914' | 104°16.177' |



Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand. (continued)

| Specific name of mite | Host plant | Location | Symptom of injury | GPS | |
|---|---|--|-------------------|------------|-------------|
| | | | | Lat (N) | Long (E) |
| <i>Tarsonemus</i> sp. | <i>Azima sarmentosa</i> (Blume) | Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province | - | 14°00.746' | 99°97.162' |
| | | Huai Mon Thong Sub-district, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province | - | 13°59.268' | 099°51.864' |
| | | Huai Mon Thong Sub-district, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province | - | 13°57.264' | 99°52.534' |
| | <i>Ruellia tuberosa</i> L. | Chakthong Building, Department of Agriculture Bangkok | - | - | - |
| | <i>Ficus carica</i> L. | Pathum Thani Province | - | - | - |
| | <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam | Nam Thiang Sub-district, Kham Cha-i District, Mukdahan Province | - | 16°34.736' | 104°25.118' |
| <i>Lagerstroemiaspeciosa</i> (L.) Pers. | Muang District, Kamphaeng Phet Province | - | - | - | |

Table 2. Predatory mite associated with mite on Tarsonemid mites in Thailand.

| Scientific name of predatory mite | Associated mite pest | Location | GPS | |
|-------------------------------------|-------------------------|---|---------|----------|
| | | | Lat (N) | Long (E) |
| Family Phytoseiidae | <i>Steneotarsonemus</i> | Pangpuay Sub-district, Damnoen Saduak District, | - | - |
| <i>Amblyseius largoensis</i> (Muma) | <i>furcatus</i> De Leon | Ratcha Buri Province | | |



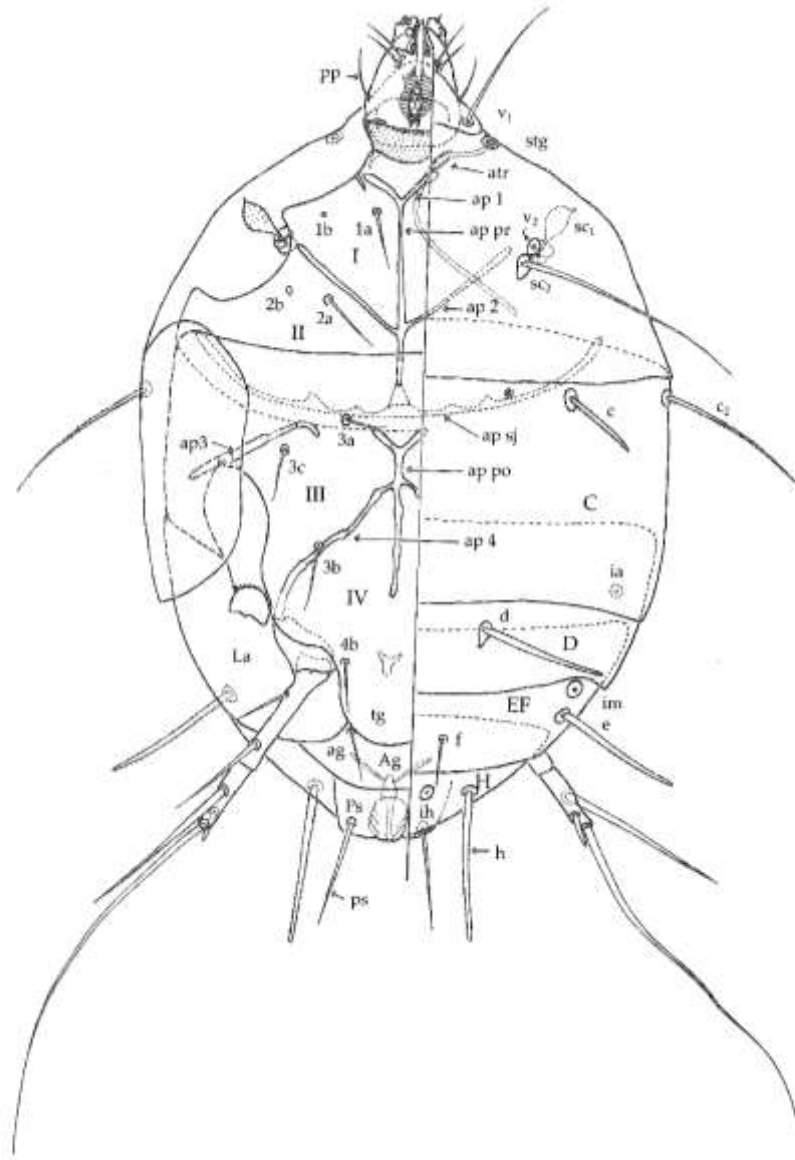


Figure 1 *Ununguiarsonemus beameri* (Beer), ตัวเต็มวัยเพศเมีย, ด้านซ้ายภาพส่วนด้านล่าง ด้านขวาภาพส่วนด้านบน; ap 1-4, ร่อง apodeme; ap po, poststernal apodeme; ap pr, prosternal apodeme; ap aj, sejugal apodeme; atr, atrium; pp, plapcoxal seta; stg stigmata; tg, tegula (Lindquist, 1986)

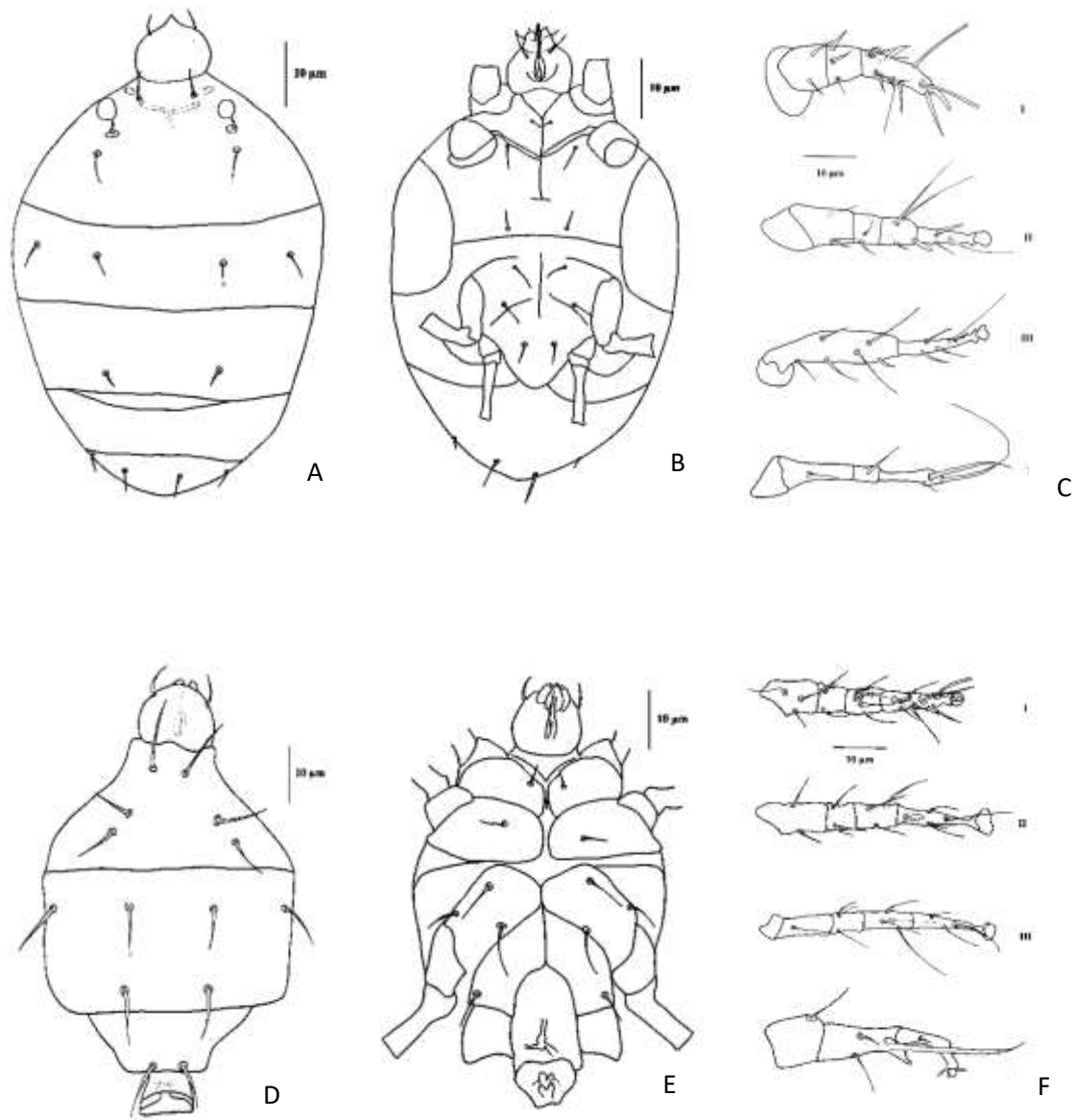


Figure 2 *Polyphagotarsonemus latus* (Banks), เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C.ขา I-IV., เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV

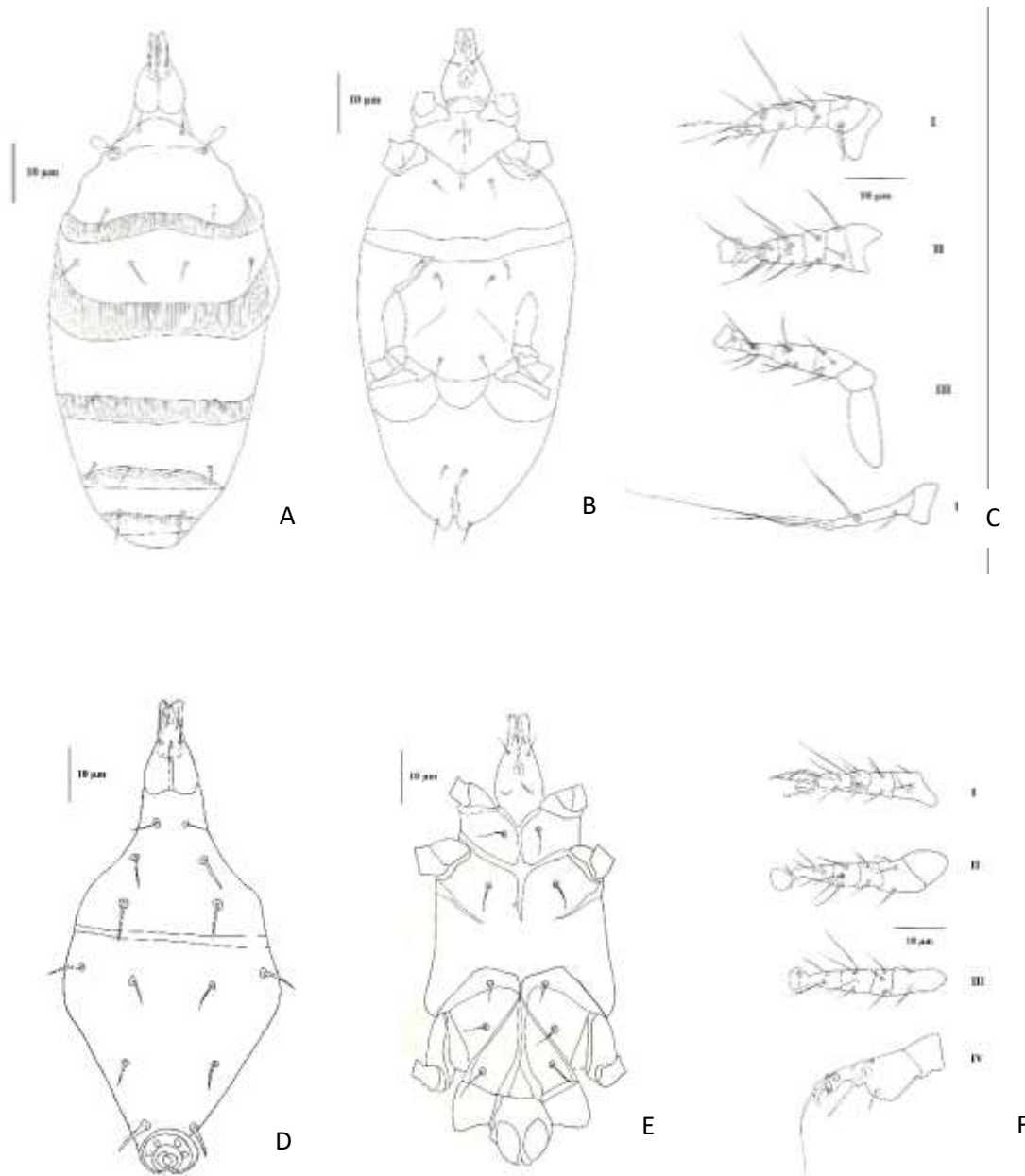


Figure 3 *Nasuitarsonemus onami* Lofego, Hountondji, Al-Shanfari & Moraes เพศเมีย;

A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV., เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV

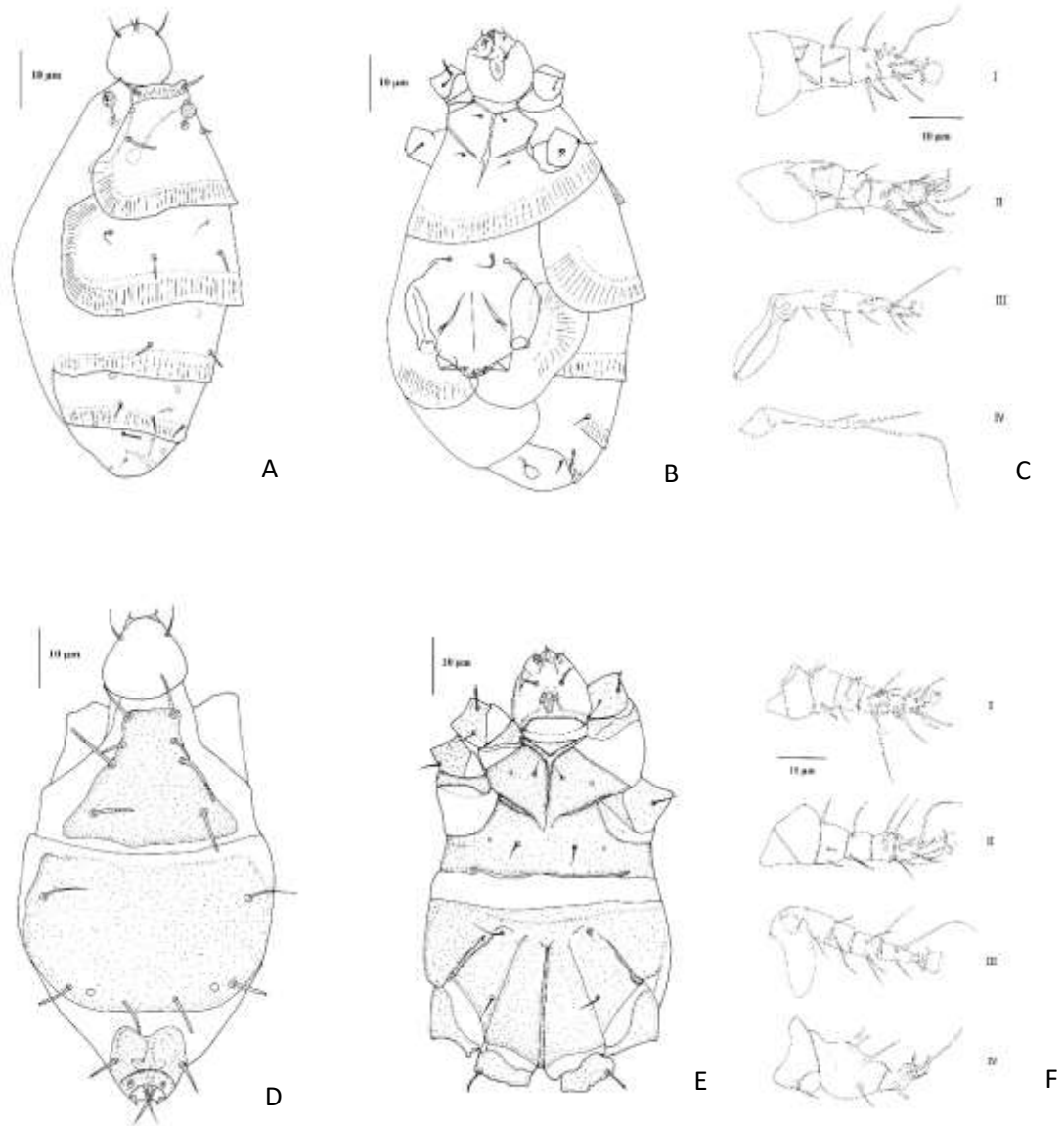


Figure 4 *Steneotarsonemus furcatus* De Leon. , เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV. , เพศผู้; D. ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV

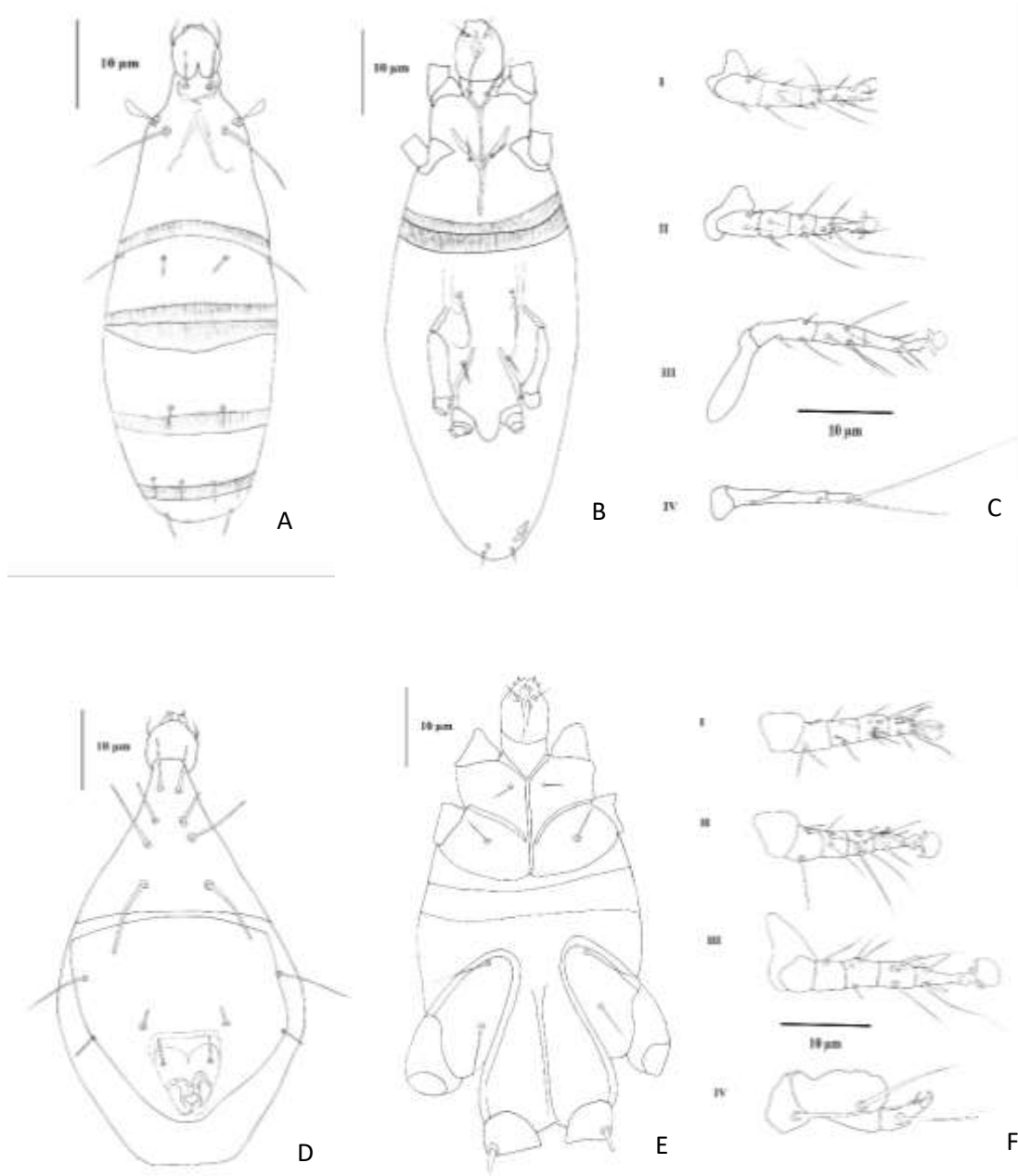


Figure 5 *Steneotarsonemus spinki* Smiley ,เทศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV

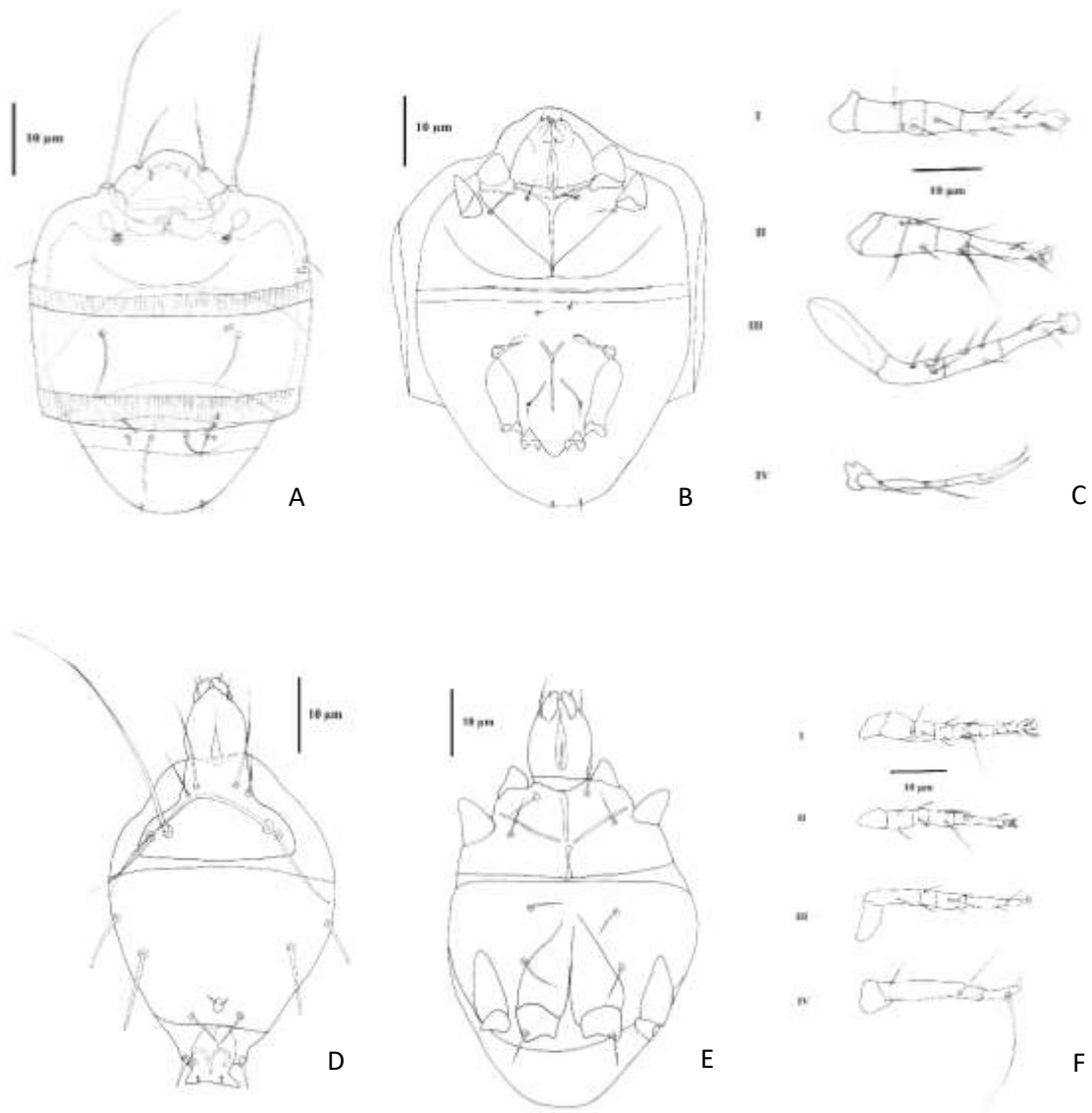


Figure 6 *Fungitarsonemus setillus* Sousa, Lofego & Gondim. , เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV. , เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV

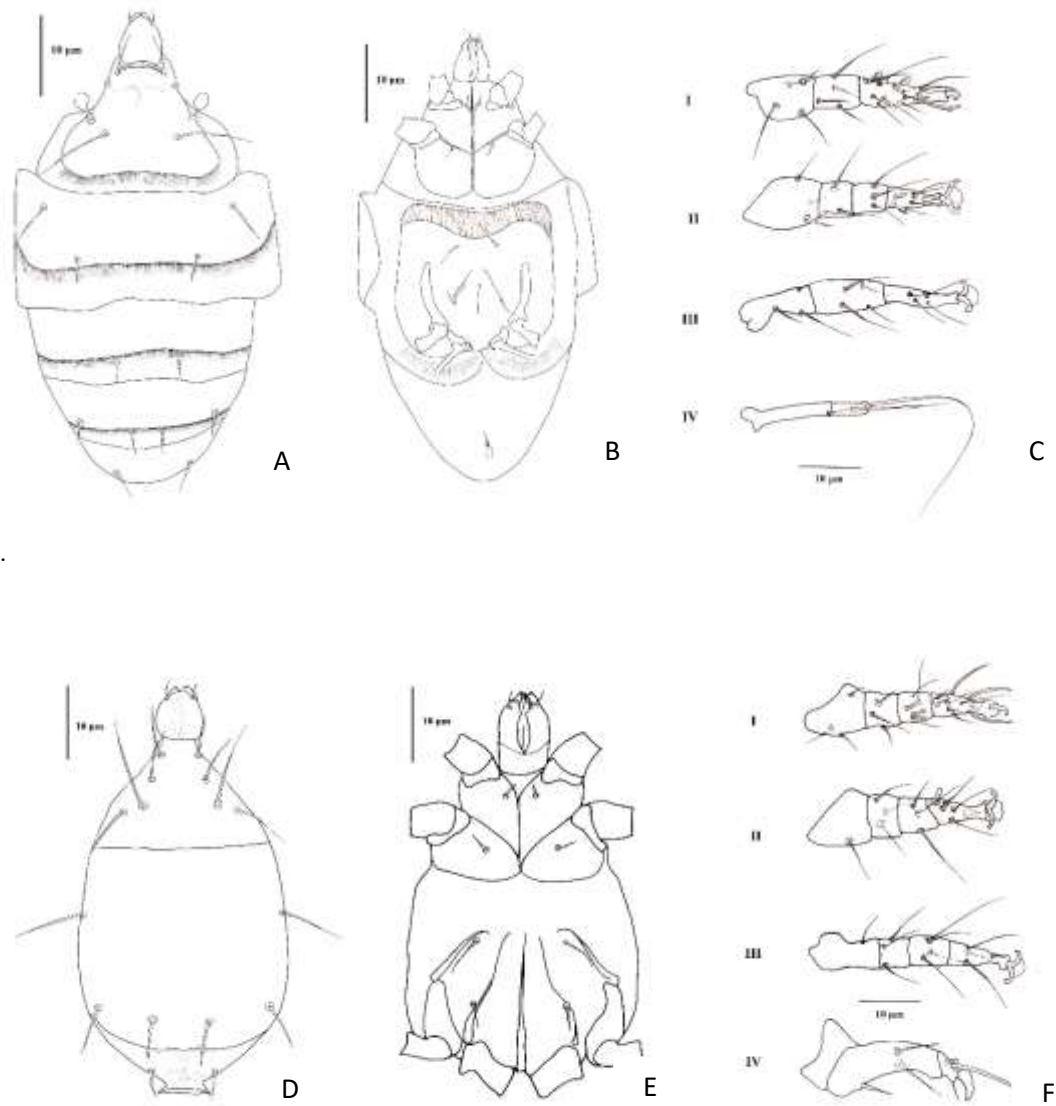


Figure 7 *Tarsonemus bilobatus* Suski. , เพศเมีย; A. ด้านสันหลัง, B ด้านล่าง, C. ขา I-IV.

เพศผู้; D, ด้านสันหลัง, E. ด้านล่าง, F. ขา I-IV

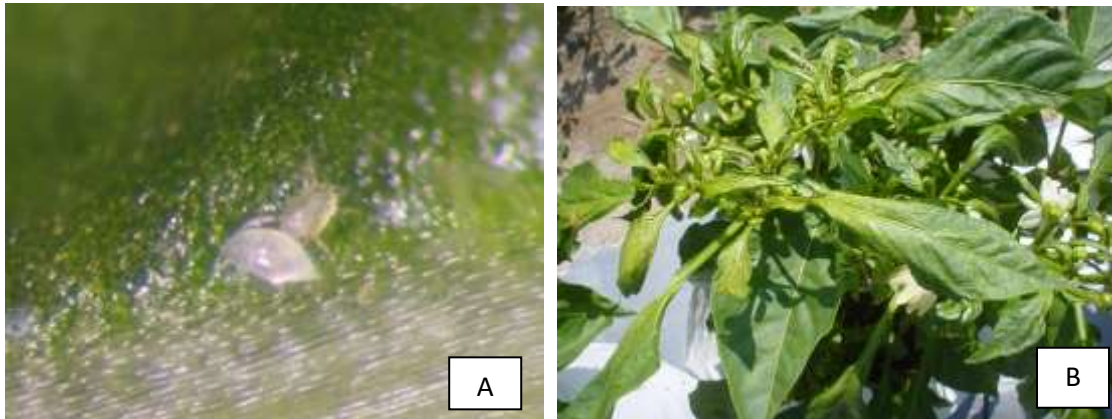


Figure 8 A. ไชขาวพริก เพศผู้ด้านบน และเพศเมีย *Polyphagotarsonemus latus* (Banks)
B. อาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไรในพริก

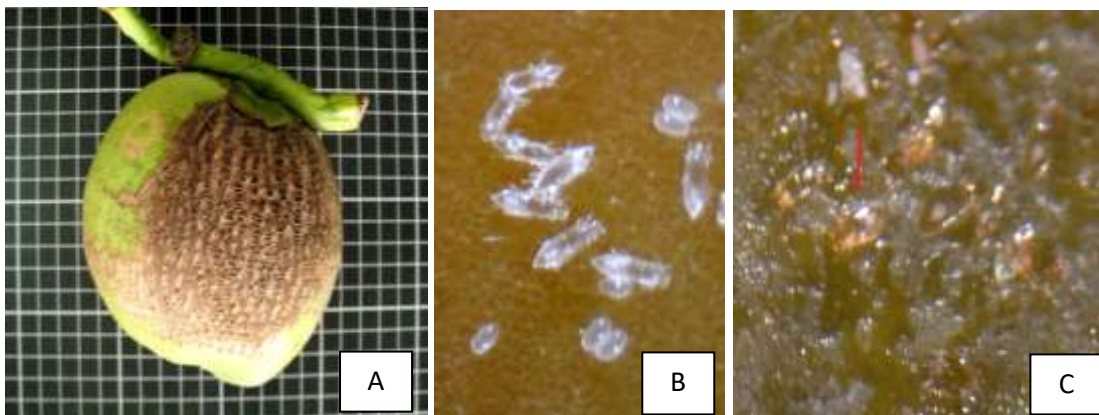


Figure 9 *Steneotarsonemus furcatus* De Leon; A. ลักษณะอาการเข้าทำลายบนผล
B, ตัวอ่อน, C, ตัวเต็มวัยขณะมีชีวิต



Figure 10 *Steneotarsonemus spinki* Smiley A. ลักษณะอาการเข้าทำลายบนใบข้าว
B, ตัวอ่อนและเต็มวัยขณะมีชีวิต

การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย
 Identification of Entomopathogenic Nematodes in Eastern Thailand

พัชรวิวรรณ จงจิตเมตต์ อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข รัชชัย ประดับวงศ์ อุณากุล จันทร์ภู
 กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Identification of entomopathogenic nematodes (EPN) in the Eastern Thailand. Soil samples were collected in 7 provinces; Chon Buri, Chachoengsao, Rayong, Chanthaburi, Trat, Prachin Buri and Sa Kaeo. Collected the soil sample to a depth of about 15-20 cm. for 2 kilograms of soil, the total of 76 soil samples were obtained and brought them back for classification of EPN at the laboratory, Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office. During October 2018 to September 2021. The entomopathogenic nematodes were isolated by wax worms. EPNs were found from 3 soil samples. Two samples of EPNs, PC52 and PC53 were collected from soil in Ban Chang sub-district, Ban Chang district, Rayong province, and a sample, PC64 was recovered in Ban Laem Klat sub-district, Muang Trat district, Trat province. Two EPNs were described as *Steinernema*, PC52 and PC 64, when PC52 infect to wax worms showed that the worms turned pale yellow, and PC64 showed the worms turned brownish-black color. As for PC53, it is belong to genus *Heterorhabditis*, it can be recognized by red color of cadavers. The infective juvenile of PC52 and PC64, both of them had a body length about 500 microns, as for PC53 had about 700 microns in body length. The analyzed and classified entomopathogenic nematodes by molecular technic. It was found that the nucleotide analysis results of the observed EPNs were incomplete and the DNA sequencing could not be analyzed. Further work is required to ensure the integrity of the samples prior to analysis.

Keywords : Entomopathogenic Nematodes, Eastern Thailand, Wax moth

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-22-62



บทคัดย่อ

การจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และสระแก้ว ทำการสุ่มเลือกสภาพพื้นที่ดินในป่าที่ยังไม่เคยมีการบุกรุก จากนั้นชุดดินลึกประมาณ 15-20 เซนติเมตร เก็บดินจำนวน 2 กิโลกรัม ได้ตัวอย่างดินรวมจำนวน 76 ตัวอย่าง นำกลับมากัดแยกและจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ได้ ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 ผลการคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยหนอนกินรังผึ้ง ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินในพื้นที่ที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง โดยในพื้นที่ตำบลบ้านฉาง อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง พบจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ PC52 และ PC53 และในพื้นที่ตำบลบ้านแหลมก๊าด อำเภอเมืองตราด จังหวัดตราด พบจำนวน 1 ตัวอย่าง คือ PC64 เมื่อนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง PC52 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน และ PC64 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ทั้ง 2 ตัวอย่างจัดอยู่ในสกุล *Steinemema* สำหรับ PC53 จัดอยู่ในสกุล *Heterorhabditis* เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง และลักษณะโครงสร้างของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinemema* คือ PC52 และ PC64 มีขนาดลำตัวสั้นความยาวประมาณ 500 ไมครอน ส่วน PC53 ขนาดความยาวลำตัวจะยาวประมาณ 700 ไมครอน เมื่อนำไปวิเคราะห์จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล พบว่าผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่สำรวจพบยังไม่สมบูรณ์ ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอได้ จำเป็นต้องทำเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์

คำหลัก: ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หนอนกินรังผึ้ง

คำนำ

การควบคุมกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี เป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมี โดยเน้นความปลอดภัยของเกษตรกร ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นสิ่งที่ทุกคนตระหนักถึงอยู่ตลอดเวลา และงานวิจัยเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เป็นงานอีกด้านหนึ่งที่มีการศึกษาและพัฒนาศักยภาพ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในทางการเกษตร ซึ่งเป็นที่ยอมรับและนำไปใช้กันอย่างกว้างขวางในประเทศต่างๆ ทั่วโลก ลักษณะเด่นที่สำคัญในการเลือกใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงคือการมีชีวิตอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสภาพแวดล้อมเพื่อรอเข้าทำลายแมลง และความเฉพาะเจาะจงในการเลือกทำลายแมลงศัตรูพืชเป็นลักษณะที่บ่งชี้ได้ว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีความสามารถแตกต่างจากการใช้จุลินทรีย์และศัตรูธรรมชาติอื่นๆ ดังนั้นการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดใหม่ๆ เพื่อนำมาพัฒนาศักยภาพและนำไปใช้ประโยชน์ จึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

สำหรับการใช้ประโยชน์จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในต่างประเทศประสบความสำเร็จและมีการศึกษาค้นคว้าตั้งแต่ ปี ค.ศ. 1923 และพัฒนาขึ้นมาอย่างต่อเนื่องโดยนักวิจัยประเทศต่างๆ ทั่วโลก ตั้งแต่การค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดใหม่ๆ จนถึงการผลิตขยายและนำไส้เดือนฝอยไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ การใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในต่างประเทศเป็นที่ยอมรับจากเกษตรกรเป็นอย่างมาก มีบริษัทเอกชนหลายบริษัทที่ผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและจัดจำหน่ายในรูปแบบชีวภัณฑ์ เช่น บริษัท Andermatt Biocontrol AG, สวิสเซอร์แลนด์; CropKing Inc, สหรัฐอเมริกา; Natural Insect Control, แคนาดา; E-nema, เยอรมันนี; Ecowin Co. Ltd., เกาหลีใต้ สำหรับในประเทศไทย เคยมีบริษัทเอกชนได้แก่ บริษัทแอฟลายเค็ม และบริษัทยูนิซีตส์ ผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและจำหน่ายแก่เกษตรกรในช่วงปี 2539-2550 แต่ปัจจุบันทั้งสองบริษัทได้เลิกผลิตแล้ว เนื่องจากขาดการส่งเสริมและเผยแพร่สู่เกษตรกรอย่างต่อเนื่อง

สำหรับพืชเศรษฐกิจหลายชนิดที่ประสบปัญหาจากแมลงศัตรูพืช จนทำให้ผลผลิตเสียหายสามารถควบคุมและกำจัดได้โดยการใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* เช่น เห็ด (Jess *et al.*, 2005) พริกต่างๆ เช่น แครอท กะหล่ำปลี มันฝรั่ง แตงกวา (Belair *et al.*, 2005) รวมทั้งธัญพืชชนิดต่างๆ และพืชน้ำมัน (Cabanillas *et al.*, 2005)

ในประเทศไทยการนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไปใช้ควบคุมแมลงยังไม่แพร่หลายนัก เนื่องจากงานวิจัยเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ยังมีข้อมูลและรายงานไม่มากนัก งานทดลองส่วนใหญ่จะเน้นไปกับการใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูพืช เช่น หนอนกินใต้ผิวเปลือกไม้สกุลกลางสาด หนอนกระทู้หอมในดาวเรือง หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย (วัชรีและคณะ, 2529; 2537) และทดสอบกับด้วงหมัดผัก ด้วงงวงมันเทศ (วัชรีและคณะ, 2534ก; ข)

เมื่อมองในแง่ของการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพแล้ว ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก โดยมีจำนวนสิ่งมีชีวิตอยู่ประมาณร้อยละ 7 เมื่อเทียบสัดส่วนกับจำนวนประชากรสิ่งมีชีวิตในโลกซึ่งมีประมาณ 5 ล้านชนิด ทั้งนี้เนื่องด้วยประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นสภาพทางภูมิศาสตร์ที่มีความหลากหลายในแต่ละพื้นที่ล้วนเป็นปัจจัยที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของสิ่งมีชีวิต ประเทศไทยมีภูมิประเทศเป็นที่ราบลุ่มแม่น้ำ ที่ราบลอนคลื่น มีแถบชายฝั่งทะเล และมีภูเขาที่มีความสูงหลากหลายตั้งแต่เนินเขา จนถึงภูเขาที่สูงชันถึง 2,400 เมตรจากระดับน้ำทะเล ทำให้ที่ผ่านมาสามารถสำรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้จากพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ *Steinernema siamkayai* Stock, Somsook and Reid พบที่สวนมะขาม อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ และ *Steinernema minutum* Maneesakorn, Grewal and Chandrapatya พบในป่าที่อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร และ *Heterorhabditis somsookae*, Maneesakorn, An, Grewal and Chandrapatya (Stock *et al.*, 1998; Maneesakorn *et al.*, 2010; Maneesakorn *et al.*, 2015) โดยทั้ง 3 ชนิดนี้พบเป็นครั้งแรกในประเทศไทย และมีรายงานว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. siamkayai* สามารถพบได้ที่จังหวัดกาญจนบุรีด้วย นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* สามารถพบได้อีกตามพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศ ได้แก่ *Heterorhabditis indica* พบที่จังหวัดขอนแก่น

กระบี่ กาญจนบุรี สุราษฎร์ธานี และยังมีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอีกหลาย isolate จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ซึ่งอาจเป็นชนิดเดียวกับที่ทราบชนิดแล้ว หรืออาจเป็นชนิดใหม่ที่ค้นพบได้ครั้งแรกในประเทศไทย แต่ยังไม่ได้ทำการจัดจำแนกชนิด ทั้งนี้ทางภาคตะวันออกของประเทศไทยมีความหลากหลายทางสภาพภูมิศาสตร์คือมีทั้งภูเขาสูงและมีชายฝั่งทะเล สันนิษฐานว่าอาจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยเพื่อจำแนกชนิดโดยลักษณะทางพันธุกรรมและสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่สำรวจพบได้ในภาคตะวันออกของประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องบอกพิกัดตำแหน่ง GPS
2. เครื่องวัดอุณหภูมิดิน และความเป็นกรดต่างดิน
3. เสียมขุดดิน ถุงพลาสติก หนัวยางวง ปากกา
4. กล่องพลาสติก ถ้วยพลาสติก งานทดลอง กระจาดกรอง กระจาดขอลูมิเนียม
5. หนอนกินรังผึ้ง Wax moth, *Galleria mellonella* L.
6. 0.1% พอร์มาลีน น้ำกลั่น
7. สารละลาย buffer Primer agarose gel Abs. ethanol
8. auto pipette เข็มเขี่ย Eppendorf spin column
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง เครื่อง thermocycler
10. เครื่อง Biorad Chemidoc Touch Imaging System เครื่อง Electrophoresis

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และการคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินตัวอย่าง

ทำการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย 7 จังหวัด ประกอบด้วยจังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และสระแก้ว กำหนดการเก็บตัวอย่างจังหวัดละอย่างน้อย 3 จุดพื้นที่ แต่ละจุดห่างกันอย่างน้อย 5 กิโลเมตร ทำการจับพิกัดตำแหน่งพื้นที่ของตัวอย่างดินด้วยเครื่องมือ GPS บันทึกลักษณะดิน ความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิดิน แต่ละจุดที่เก็บตัวอย่างดิน

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เก็บตัวอย่างดินในแต่ละจุดโดยใช้พลั่วมือขุดดินลึกลงไป 15-20 เซนติเมตร จากผิวหน้าดิน ในแต่ละพื้นที่เก็บดิน 5 จุด โดยให้แต่ละจุดห่างกัน 1 เมตรจากจุดกลาง จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างดินจุดละ 400 กรัม รวมเป็นปริมาณ 2 กิโลกรัม ใส่ลงถุงพลาสติก มัดปากถุงเพื่อรักษาความชื้น และเก็บรักษาตัวอย่างดินในตู้เย็น 15-20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดินตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

นำดินจำนวน 2 กิโลกรัม ที่ได้จากแต่ละจุดเก็บตัวอย่างมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และแบ่งใส่กล่องพลาสติกขนาด 5x7x9 เซนติเมตร กล่องละ 150 กรัม จากนั้นปล่อยหนอนกินรังผึ้งวัย 5 ลงไปกล่องละ 20 ตัว ปิดฝากล่องให้สนิท นำกล่องทดสอบเก็บที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำกล่องออกมาตรวจผลการทดสอบ เมื่อพบหนอนกินรังผึ้งตาย ทำการเก็บรวบรวมหนอนที่ตายออกจากดิน และทำความสะอาดผิวลำตัวภายนอกของหนอนด้วยสารละลาย 0.1% ฟออร์มาลิน อย่างน้อย 3 ครั้ง จากนั้นทำการดักไล่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงตามวิธีการของ White (1927) โดยนำหนอนที่ตายและทำความสะอาดแล้ววางบนผ้ากรองที่ปูบนจานแก้วในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดมิดชิด เติมน้ำลงในกล่องจำนวน 20 มิลลิลิตร ก่อนจะนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-12 วัน เมื่อครบกำหนดจึงทำการตรวจหาไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง ซึ่งจะเคลื่อนตัวออกจากซากหนอนลงมาอยู่ในน้ำ ทำการเก็บไล่ไส้เดือนฝอยโดยเทออกจากกล่องแล้วล้างเศษซากหนอนออก จากนั้นเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในชั้นฟองน้ำหรือบรรจุในขวดพลาสติกเก็บรักษาต้นเชื้อ (culture flask) ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกพิกัดตำแหน่ง GPS พื้นที่จุดที่เก็บตัวอย่าง
- บันทึกลักษณะของดินตัวอย่าง ค่าความเป็นกรดต่างของดิน อุณหภูมิ และความชื้นของดินตัวอย่าง

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ทำการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่คัดแยกได้จากดินตัวอย่างในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทย ให้ได้เป็นปริมาณมากเพื่อนำมาใช้ทดสอบในขั้นตอนนี้

การสกัด DNA ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

เตรียมไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) จำนวน 200 ตัวผสมน้ำ 10 มิลลิลิตร ใช้ auto pipette ดูดไส้เดือนฝอยหยดลงบนกระดาษกรองซึ่งวางในจานทดลองเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ปล่อยหนอนกินรังผึ้งลงไปในจาน จานละ 10 ตัว จากนั้นหยดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* ไว้ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ *Heterorhabditis* เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

คัดเลือกหนอนที่ถูกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าทำลายแล้ว โดยใช้เข็มเขี่ยตัวหนอนให้แตกแล้วแยกเอาไส้เดือนฝอยเพศเมียออกมา โดยใช้ไม้ปลายแหลมเขี่ยไส้เดือนฝอยเพศเมียลงใน eppendorf ที่มี buffer ATL 180 ไมโครลิตร และ proteinase K 20 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่องบดที่ 56 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที และที่ 700 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม buffer AL 200 ไมโครลิตร บดที่ 56 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงที่ 1,800 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Abs. ethanol 200 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายทั้งหมดที่ได้ใส่ใน spin column นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

นำสารละลายส่วนล่างของ spin column ที่ทิ้ง แล้วนำสารละลายส่วนบนไปใส่ใน spin column ใหม่ จากนั้นเติม buffer AW1 500 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนล่างของ spin column ที่ทิ้ง แล้วนำสารละลายส่วนบนไปใส่ใน spin column ใหม่ แล้วเติม buffer AW2 500 ไมโครลิตร เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนล่างของ spin column ที่ทิ้ง แล้วนำสารละลายส่วนบนไปใส่ใน spin column ใหม่ แล้วเติม buffer AE 100 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ จะได้ตัวอย่างดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง นำเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยกระบวนการ PCR

เตรียม greentaq จำนวน 62.5 ไมโครลิตร ใส่หลอด eppendorf จากนั้นหยด Primer D2F: 5'-CCT TAG TAA CGG CGA GTG AAA-3' (forward) และ 536 : 5'-CAG CTA TCC TGA GGA AAC-3' (reverse) อย่างละ 5 ไมโครลิตร และน้ำ 37.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารใส่หลอด PCR หลอดละ 22 ไมโครลิตร โดยมีหลอด positive (+) เติม DNA template และหลอด nagative (-) เติมน้ำกลั่น จากนั้นผสมสารให้เข้ากันในแต่ละหลอดด้วยเครื่อง vortex จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตะกอนตกสู่ด้านล่างหลอด PCR จากนั้นนำเข้าเครื่อง thermocycler โดยกำหนดให้เครื่องทำงาน 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และรอบ 40 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป หรือนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทดสอบเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมสารละลาย 0.5X TBE 1 ลิตร จาก 10X TBE 50 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร สำหรับเตรียม 1.5% agarose gel โดยใช้ agarose 1.5 กรัม และ 0.5X TBE 100 มิลลิลิตร ผสมให้สารละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียวแล้วนำเข้าเครื่องไมโครเวฟตั้งอุณหภูมิ 360 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำการดูด agarose gel มาใช้ครั้งละ 20 มิลลิลิตร ใส่สีย้อมเรืองแสง 1 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าให้ผสมกัน จากนั้นจึงนำไปเทลงในถาดเจล รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 10-15 นาที นำเจลออกจากถาดไปวางบนเครื่อง เทสารละลาย 0.5X TBE buffer ลงในเครื่องจนท่วมแผ่นเจล พยายามไม่ให้เกิดฟอง นำ marker หยดลงในหลุมแรก 3 ไมโครลิตร จากนั้นหยดตัวอย่างดีเอ็นเอตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เตรียมได้ลงหลุมละ 8 ไมโครลิตร และหลุมสุดท้ายหยด marker 3 ไมโครลิตร เปิดเครื่อง Electrophoresis ที่แรงดันไฟฟ้า 100 โวลต์, ความจุไฟฟ้า 100 มิลลิแอมแปร์, กำลังไฟฟ้า 10 วัตต์ เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นนำเจลไปส่องในเครื่อง Biorad Chemidoc Touch Imaging System

การทำ Purification

นำตัวอย่างดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงใน spin column เติม buffer BP จำนวน 85 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 30-60 วินาที ล้างด้วย buffer PE จำนวน 150 ไมโครลิตร

แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 30-60 วินาที จากนั้นจึงย้าย column วางลงใน eppendorf แล้วเติม buffer EB จำนวน 50 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เวลาและสถานที่: ระยะเวลาดำเนินการ: ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2564

สถานที่ดำเนินการ: - ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ
- พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง
จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และสระแก้ว

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการสำรวจเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จากพื้นที่ 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และสระแก้ว โดยเก็บตัวอย่างดินได้ 11 3 12 16 9 13 และ 12 ตัวอย่าง ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 76 ตัวอย่าง (Fig. 1-2) จะเห็นได้ว่าบางจังหวัดเก็บตัวอย่างได้เพียง 3 หรือ 9 ตัวอย่างเท่านั้น เนื่องจากช่วงที่เดินทางไปเก็บตัวอย่างยังอยู่ในช่วงฤดูแล้ง พื้นที่ที่คาดว่าจะพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีน้อยมาก เพราะพื้นดินยังมีความแห้ง ความชื้นน้อย โอกาสที่จะพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินที่ไม่มีความชื้นหรือแห้งจึงเป็นไปได้ยาก ทำให้เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ป่าของจังหวัดฉะเชิงเทราได้น้อย หลังจากนั้นปริมาณฝนเริ่มมากขึ้น ดินมีความชุ่มชื้นมากขึ้น ดินในบริเวณผืนป่ามีความร่วนซุยมีโอกาสที่จะพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามบางครั้งสามารถพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้จากดินที่มีลักษณะเป็นดินทราย หรือดินที่อยู่แถบชายฝั่งทะเลได้เช่นกัน (Hominick *et al.*, 1996; Hominick, 2002) ผลการคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินตัวอย่างด้วยหนอนกินรังผึ้ง ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง ในพื้นที่ตำบลบ้านฉาง อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน PC52 ตำแหน่งพิกัดที่ x,y : 12.7520240, 101.0836820 ดินมีลักษณะนึ่ม ร่วน สีดำ อุณหภูมิดิน 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 4.69 ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC (ds m⁻¹)) 0.08 ค่าอินทรีย์วัตถุในดิน (OM (%)) 0.91 และตัวอย่างดิน PC53 ตำแหน่งพิกัดที่ x,y : 12.7519270, 101.0836850 ดินมีลักษณะนึ่ม ร่วน สีดำ อุณหภูมิดิน 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 4.89 ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC (ds m⁻¹)) 0.06 ค่าอินทรีย์วัตถุในดิน (OM (%)) 0.94 และในพื้นที่ตำบลบ้านแหลมกลัด อำเภอมืองตราด จังหวัดตราด จำนวน 1 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน PC64 ตำแหน่งพิกัดที่ x,y : 12.1139200, 102.7034070 ดินมีลักษณะนึ่ม ร่วน สีดำ อุณหภูมิดิน 27 องศาเซลเซียส โดยดินตัวอย่างนี้ไม่มีเพียงพอจึงไม่สามารถวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง ค่าการนำไฟฟ้าของดิน และค่าอินทรีย์วัตถุในดินได้ จากการคัดแยกดินตัวอย่างด้วยหนอนกินรังผึ้งในภาชนะ ที่ปล่อยให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าทำลายและเจริญเติบโตขยายเพิ่มปริมาณในนั้น เมื่ออาหารในตัวหนอนหมดไส้เดือนฝอย

ศัตรูแมลงจะออกจากซากหนอนมาอยู่ในดินทำให้เห็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวนมากเกาะที่ดินข้างภาชนะ (Fig. 3) จากนั้นทำการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงให้ได้เป็นปริมาณมากด้วยหนอนกินรังผึ้งเดือนละ 1 ครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่พบในประเทศไทย (Maneesakorn *et al.*, 2010) เมื่อนำตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง PC52 และ PC64 จัดอยู่ในสกุล *Steinernema* สำหรับ PC53 จัดอยู่ในสกุล *Heterorhabditis* ตามลำดับ โดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง PC 52 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน แต่สำหรับ PC64 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ส่วน PC53 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง (Fig. 4) เมื่อนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไปตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ จะพบลักษณะโครงสร้างของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* คือ PC52 และ PC64 มีขนาดลำตัวสั้นความยาวประมาณ 500 ไมครอน และปลายหางไม่ยาวแหลม ส่วน PC53 ขนาดความยาวลำตัวจะยาวกว่าประมาณ 700 ไมครอน และปลายหางแหลมเรียวยาว ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะอย่างหนึ่งของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* (Nguyen and Hunt, 2007) (Fig. 5) จากนั้นได้นำไปวิเคราะห์จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทางชีวโมเลกุล ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่สำรวจพบยังไม่สมบูรณ์ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอได้ เนื่องจากยังพบความบกพร่องอย่างต่อเนื่องในขั้นตอนการจัดเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำเป็นต้องทำเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการสำรวจเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และสระแก้ว ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง โดยในพื้นที่ตำบลบ้านฉาง อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง พบจำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน PC52 และ PC53 และในพื้นที่ตำบลบ้านแหลมก๊อต อำเภอมืองตราด จังหวัดตราด พบจำนวน 1 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน PC64 โดยทั้ง 3 ตัวอย่างดินมีลักษณะนิ่มร่วน สีดำ เมื่อนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง PC52 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน และ PC64 เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ทั้ง 2 ตัวอย่างจัดอยู่ในสกุล *Steinernema* สำหรับ PC53 จัดอยู่ในสกุล *Heterorhabditis* เมื่อเข้าทำลายหนอนทำให้หนอนเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง และลักษณะโครงสร้างของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* คือ PC52 และ PC64 มีขนาดลำตัวสั้นความยาวประมาณ 500 ไมครอน และปลายหางไม่ยาวแหลม ส่วน PC53 ขนาดความยาวลำตัวจะยาวกว่าประมาณ 700 ไมครอน และปลายหางแหลมเรียวยาว ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะอย่างหนึ่งของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabditis* เมื่อนำไปวิเคราะห์จัดจำแนกชนิดไส้เดือน

ฝอยศัตรูแมลงด้วยเทคนิควิธีทางชีวโมเลกุล พบว่าผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่สำรวจพบยังไม่สมบูรณ์ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอได้ จำเป็นต้องทำเพิ่มเติมเพื่อความสมบูรณ์ของตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนายอำนาจ แต่งตั้ง เจ้าพนักงานการเกษตร ที่ช่วยปฏิบัติงานการทดลองครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- วัชรีย์ สมสุข อัจฉรา ตันติโชค และอุทัย เกตุญาติ. 2529. ไส้เดือนฝอยควบคุมหนอนกินใต้ผิวเปลือกไม้สกุลกลางสาด. วารสารกสิกรรมและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 8: 115-119.
- วัชรีย์ สมสุข วินัย รัชตปกรณชัย และพิมลพร นันทะ. 2534ก. การใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ควบคุมด้วงหมัดผักในผักกาดหัว. วารสารกสิกรรมและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 13: 183-188.
- วัชรีย์ สมสุข สุชน สุวรรณบุตร และพิมลพร นันทะ. 2534ข. ศึกษาการใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ในการควบคุมด้วงงวงมันเทศในสภาพธรรมชาติ. รายงานผลวิจัยประจำปี 2534 กองกสิกรรมและสัตววิทยา. 10 หน้า.
- วัชรีย์ สมสุข พิมลพร นันทะ และเอนก บุตรรักษ์. 2537. การควบคุมหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* ในดาวเรืองด้วยไส้เดือนฝอย ผลงานแผ่นภาพในการประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 9 กองกสิกรรมและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 55-62.
- Belair, G., D.J. Wright and G. Curto. 2005. Vegetable and tuber crop applications, pp. 255-264. In : Grewal, P.S., R.U. Ehlers and D.I. Shapiro-Ilan, eds. Nematodes and Biological Control Agents. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Cabanillas, H.E., R.J. Wright and R.V. Vyas. 2005. Cereal, fibre, oilseed and medicinal Crop applications, pp. 265-279. In : Grewal, P.S., R.U. Ehlers and D.I. Shapiro-Ilan, eds. Nematodes and Biological Control Agents. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Hominick, W.M., A.P. Reid, D.A. Bohan and B.R. Briscoe. 1996. Entomopathogenic nematodes-biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. Biocontr. Sci. Technol. 6: 317-331.
- Hominick, W.M. 2002. Biogeography, pp. 115-143. In : R. Gaugler, ed. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.

- Jess, S., H. Schweuzer and M. Kilpatrick. 2005. Mushroom applications, pp. 191-213. In Grewal, P.S., R.U. Ehlers and D.I. Shapiro-Ilan, eds. Nematodes and Biological Control Agents. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Maneesakorn, P., P.S. Grewal and A. Chandrapatya. 2010. *Steinernema minutum* sp. nov. (Rhabditida: Steinernematidae): a new entomopathogenic nematode from Thailand. *Int. J. Nematol.* 20: 19-34.
- Maneesakorn, P, R. An, P.S. Grewal and A. Chandrapatya. 2015. *Heterorhabditis somsookae* sp. nov. (Rhabditida: Heterorhabditidae): a new entomopathogenic nematode from Thailand. *Int. J. Nematol.* 25: 1-11.
- Nguyen, K.B. and D.J. Hunt. 2007. Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacteria Symbionts. Brill Academic Publishers. 816 pp.
- Stock, S.P., V. Somsook and A.P. Reid. 1998. *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. *Syst. Parasitol.* 41: 105-113.
- White, G.F. 1927. A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science.* 66: 302-303.

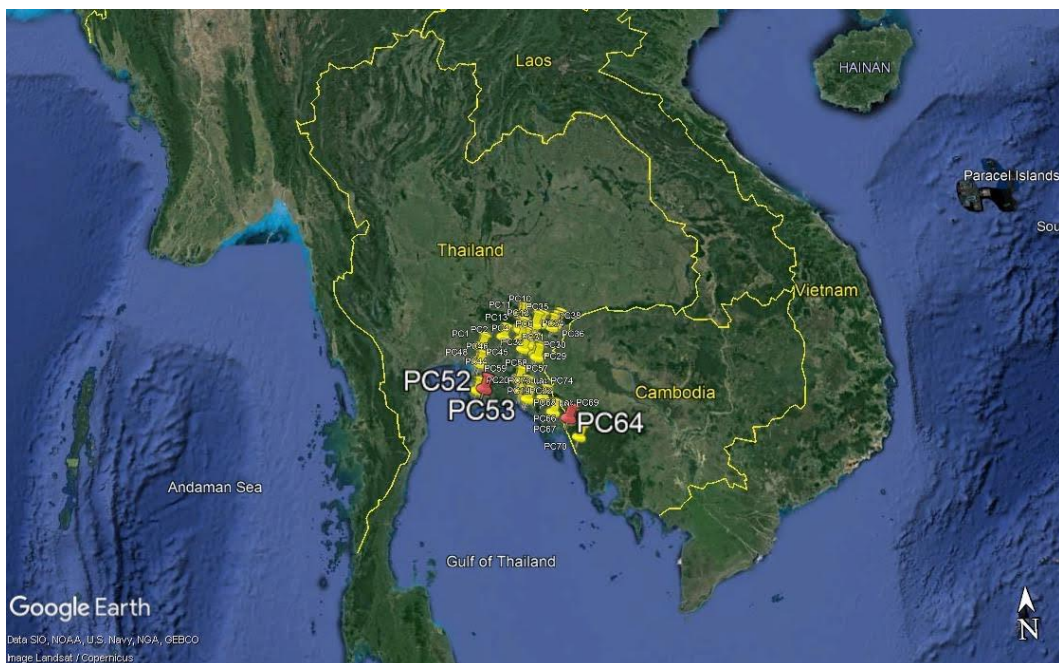


Figure 1 The sampling sites of collected 76 soil samples in Thailand



Figure 2 The sampling sites of collected 76 soil samples in eastern Thailand



Figure 3 The entomopathogenic nematodes were found in soil samples



Figure 4 The cadavers of wax moth after infected by different entomopathogenic nematodes

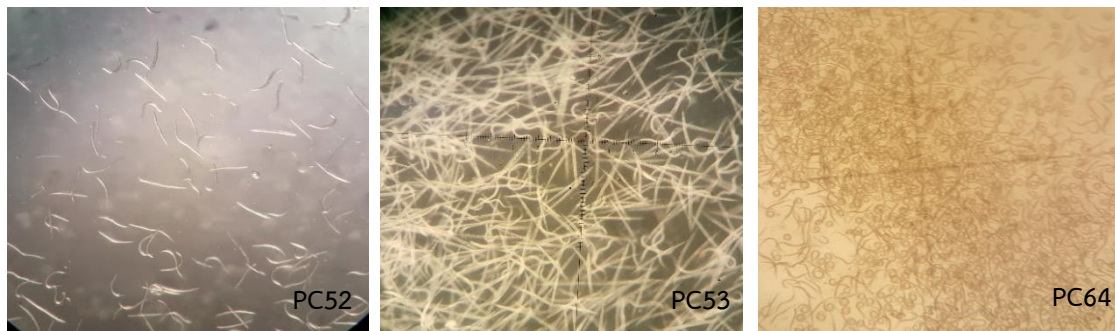


Figure 5 The characteristic of three different entomopathogenic nematodes

PC52 : *Steiernema* sp.

PC53 : *Heterorhabditis* sp.

PC64 : *Steiernema* sp.

อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัยของแมลงวันหนอนชอนใบใน
วงศ์ Agromyzidae (Order : Diptera) ในพืชผัก
Taxonomy, Distribution and Host Plants of Leafminer Flies in Family
Agromyzidae (Order: Diptera) in vegetable crops

ยุวรินทร์ บุญทบ สุนัดดา เชาวลิต ชัยพร บัวมาศ ลิทธิศิริโรตม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Agromyzid leafminers comprise a pest group that causes both considerable economic losses and serious quarantine problems. In this study, morphological studies were performed to assist in species identification of pest species of Agromyzidae leafminers in vegetable crops in Thailand. The discriminative ability of some traditional morphological characters, such as wing ratio, abdominal color patterns and male genitalia, was evaluated. Five *Liriomyza* spp. were found: *Liriomyza brassicae* (Riley, 1884), *L. chinensis* (Kato, 1949), *L. huidobrensis* (Blanchard, 1926), *L. sativae* Blanchard, 1938. and *L. trifolii* (Burgess 1880). Morphological characters of male genitalia should be examined to prevent misidentifications. A key for the discrimination of these five species is provided.

Distribution and host plant data were compiled for each species. Four species of leaf miner: *L. brassicae*, *L. chinensis*, *L. sativae* and *L. trifolii* are widespread in lowland, except *L. huidobrensis* which can be found only the highlands in the northern part of Thailand. *Liriomyza sativae* has the most diverse range of host plants, being recorded from 21 vegetable crops in Thailand. Further DNA barcode and phylogenetic analysis are needed to clarify the distinction among other species of Agromyzidae present in Thailand and nearby countries.

Keywords : Taxonomy, Distribution, Host Plants and Leaf miner Flies

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-23-62



บทคัดย่อ

แมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae เป็นศัตรูพืชที่ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ และปัญหาด้านการกักกันพืชเป็นอย่างยิ่ง การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อช่วยในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae ที่เป็นศัตรูพืชผักที่สำคัญ ในประเทศไทย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดั้งเดิม เช่น อัตราส่วนของเส้นปีก รูปแบบสีท้อง และ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ โดยสำรวจพบแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae* (Riley, 1884), *L. chinensis* (Kato, 1949), *L. huidobrensis* (Blanchard, 1926), *L. sativae* Blanchard, 1938 และ *L. trifolii* (Burgess 1880) การศึกษาครั้งนี้พบว่า ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เป็นสิ่งสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิด และได้จัดทำแนวทางวินิจฉัย แมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด นอกจากนี้ได้ทำการรวบรวมข้อมูลการกระจายตัวและพืชอาหารของ แมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิด พบแมลงวันหนอนชอนใบ *L. brassicae*, *L. chinensis*, *L. sativae* และ *L. trifolii* แพร่กระจายในทุกภูมิภาค แต่พบ *L. huidobrensis* เฉพาะที่ราบสูงในภาคเหนือของ ประเทศไทย และพบ *L. sativae* เข้าทำลายพืชผักหลากหลายที่สุด โดยพบทำลายพืชผัก 21 ชนิด ใน อนาคตมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อยืนยัน ชี้แจงความแตกต่างระหว่างชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae ในประเทศไทยและ ประเทศใกล้เคียง

คำหลัก : อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัย และ แมลงวันหนอนชอนใบ

คำนำ

แมลงวันหนอนชอนใบในอดีตจัดเป็นแมลงศัตรูพืชชนิดรอง (minor pests) แต่ปัจจุบันพบว่า แมลงวันหนอนชอนใบได้เข้าทำลายพืชได้มากมายหลากหลายชนิด และสามารถเพิ่มจำนวนประชากร อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังเกิดความต้านทานยาฆ่าแมลงในการเพาะปลูกพืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับ หลายชนิด (Parrella *et al.*, 1985) และพบว่าในปัจจุบันแมลงวันหนอนชอนใบเริ่มเป็นแมลงศัตรูพืชที่ ก่อให้เกิดปัญหาทางการเกษตรขึ้นทั่วโลก จากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่ามนุษย์เป็นตัวกลาง สำคัญที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของแมลงวันหนอนชอนใบจากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่ง (Minkenber, 1988) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันมีการค้าขายผลผลิตทางการเกษตรกันอย่างเสรี ทั่วโลก และในประเทศไทยนั้นมีการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของไทยไปสู่ประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในพืชผัก จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าแมลงวันหนอนชอนใบนั้นก่อให้เกิดการกีดกัน ทางการค้า และเป็นปัญหาสำคัญต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตร เนื่องจากแมลงวันหนอนชอนใบ สามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากให้กับพืชผักหลากหลายชนิด แต่มักพบเข้า ทำลายพืชในวงศ์ (Family) Cucurbitaceae ได้แก่ พืชตระกูลแตงชนิดต่าง ๆ (Spencer, 1973) พืชตระกูลถั่ว ในวงศ์ (Family) Leguminosae เช่น ถั่วชนิดต่าง ๆ ในวงศ์ Solanaceae เช่น พืชตระกูลมะเขือ และในวงศ์ Cruciferaeae เช่น กะหล่ำปลี ผักกวางตุ้ง (Stegmaier, 1966) และจาก



การแพร่กระจายตัวอย่างรวดเร็วของแมลงวันหนอนชอนใบรวมทั้งความหลากหลายของพืชอาหารนั้น ทำให้แมลงวันหนอนชอนใบสามารถสร้างความเสียหาย ส่งผลให้ผลผลิตลดลงและพืชอาจตายได้ในที่สุด ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเร่งทำการศึกษานุกรมวิธาน การแพร่กระจายของแมลงวันหนอนชอนใบที่เข้าทำลายพืชผักสวนครัว โดยเฉพาะพืชผักที่มีความสำคัญต่อการส่งออก เพราะข้อมูลชนิด การแพร่กระจาย รวมทั้งพืชอาหารของแมลงวันหนอนชอนใบนั้น สามารถนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่สนับสนุนการศึกษาค้นคว้าวิจัยด้านอื่น ๆ เช่นการพยากรณ์การแพร่ระบาด และการแปรผันของรูปร่าง แมลงวันหนอนชอนใบ ซึ่งความรู้ด้านต่าง ๆ เหล่านี้จะเป็นฐานข้อมูลในการวางยุทธศาสตร์ในการบริหารจัดการแมลงวันหนอนชอนใบอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง เช่น ขวดดอง เอทิลอาซีเตด กล่องพลาสติก และถุงพลาสติก
- อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงแมลงวันหนอนชอนใบ เช่น ทิชชู สำลี และพลาสติกใสในกรงผ้า
- กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope
- กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- อุปกรณ์ใช้ในการวาดภาพ
- สารเคมีในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ Canada balsam
- ตู้อบ / เครื่องอุ่นสไลด์
- แผ่นสไลด์แก้ว cover glass และกล่องเก็บสไลด์ถาวร

วิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae

ทำการสำรวจแปลงเพาะปลูกพืชผักต่าง ๆ ทั่วประเทศ ที่พบลักษณะแมลงวันหนอนชอนใบเข้าทำลายเก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้) โดยเลือกจังหวัดที่เป็นตัวแทนของพื้นที่ทำการเกษตรของภูมิภาคนั้น ๆ ดังนี้

- ภาคกลาง: จังหวัดกรุงเทพมหานคร นครปฐม สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี และเพชรบุรี
- ภาคตะวันตก: จังหวัดกาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และตาก
- ภาคเหนือ: จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และน่าน
- ภาคตะวันออก: จังหวัดจันทบุรี และระยอง



- ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ: จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น อุรธานี อุบลราชธานี หนองคาย และมหาสารคาม

- ภาคใต้: จังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร ระนอง ตรัง พัทลุง สงขลา นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา และภูเก็ต

โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแปลงพืชผักสวนครัว เช่น แตงกวา ฟักทอง ถั่วฝักยาว บวบ ฟักและอื่น ๆ จากนั้นใส่ถุงหรือกล่องพลาสติก เพื่อให้ระบายอากาศได้ดี บันทึก วันที่ เดือน ปี และสถานที่เก็บ นำกลับมาเลี้ยงยังห้องปฏิบัติการจนเป็นตัวเต็มวัย เก็บรักษาไว้ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีป้ายเล็ก ๆ บอก สถานที่ วันเดือนปี ผู้เก็บ ชื่อพืชที่เก็บ

2. ศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันหนอนซอนใบวงศ์ Agromyzidae

2.1 ศึกษาอนุกรมวิธานจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

- นำตัวอย่างแมลงวันหนอนซอนใบมาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd, Switzerland) โดยใช้ตัวอย่างแมลงวันหนอนซอนใบแต่ละชนิดที่นำมาศึกษาจำนวน 20 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนในการศึกษา การศึกษาอนุกรมวิธานจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกโดยศึกษาลักษณะสำคัญ เช่น ขนาดความยาว ความกว้างของปีก และอัตราส่วนของเซลล์ปีก และรูปแบบของส่วนท้อง (tergite pattern) โดยการใช้เอกสารประกอบเป็นแนวทางการวินิจฉัยการจำแนกชนิด: New records of *Liriomyza* Mik (Agromyzidae: Diptera) leafminers from Indonesia (Malipatil, et al., 2004) และ Workshop on leafminers of vegetables in Southeast Asia (Lim et al., 1999) ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

- บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาโดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของแมลงวันหนอนซอนใบแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบตัวอย่าง พืชอาหาร และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

- จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) ชนิดของแมลงวันหนอนซอนใบวงศ์ Agromyzidae ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia)

แมลงวันหนอนซอนใบบางชนิดที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงกันมาก และยากในการตรวจวินิจฉัยชนิดนั้น ต้องมีการศึกษาอวัยวะเพศผู้ โดยมีวิธีการทำสไลด์ถาวรของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปร่าง และขนาด ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

- ตัดส่วนท้องของแมลงวันหนอนซอนใบแช่ในน้ำยาโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ผนังส่วนท้องและไขมันที่ไม่ต้องการย่อยสลาย

- นำชิ้นส่วนออกจากน้ำยา แช่ในน้ำกลั่น เชื้อเอาไขมันและส่วนที่ไม่ใช่อวัยวะเพศออก โดยใช้เข็มแหลมเชื้อเอาเฉพาะอวัยวะเพศออกมาจากส่วนของท้อง และแช่ในแอลกอฮอล์ (alcohol) 75% และ 95% ตามลำดับ นานครั้งละ 5 นาที เพื่อดึงน้ำที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อให้ออกไปจนหมด เนื่องจาก



หากดึงน้ำออกไม่หมดจะทำให้อวัยวะเพศที่อยู่ในสไลด์หดตัวเมื่อนำไปอบภายใต้อุณหภูมิสูง 40 - 45°C เกิดความเสียหาย ไม่สามารถเก็บรักษาสไลด์ไว้ได้เป็นเวลานาน

- นำส่วนของอวัยวะเพศแช่ในกรดซิตริก (citric acid) ประมาณ 3 นาที
- เชี่ยวอวัยวะเพศมาวางบนสไลด์ที่หยดน้ำยา Canada balsam แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์
- นำไปอบให้แห้งเป็นระยะเวลา 2 - 3 สัปดาห์ ในตู้อบอุณหภูมิ 40 - 45°C จึงนำออกมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- บันทึกรายละเอียดของแผ่นสไลด์ เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์แมลงวันหนอนขนอนใบ วัน/เดือน/ปี ที่ทำสไลด์ และชื่อผู้ทำสไลด์

2.3 จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของแมลงวันหนอนขนอนใบที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

2.4 จัดเก็บตัวอย่างที่ได้จากศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง (แมลงวันหนอนขนอนใบทุกชนิดที่รายงานไว้ต้องเก็บรักษาตัวอย่างจริงไว้เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง)

3. ศึกษาการแพร่กระจายตัวของแมลงวันหนอนขนอนใบวงศ์ Agromyzidae

4. ศึกษาพืชอาศัยของแมลงวันหนอนขนอนใบแต่ละชนิดวงศ์ Agromyzidae

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2561 - กันยายน 2564

สถานที่ : 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่าง ๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนขนอนใบวงศ์ Agromyzidae

จากการสำรวจแมลงวันหนอนขนอนใบจากพื้นที่การปลูกผักในภูมิภาคต่าง ๆ ในประเทศไทย (Figure 1) (Table 1) และนำใบพืชผักที่มีลักษณะการเข้าทำลายของแมลงวันหนอนขนอนใบมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Figure 2) เพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยมาใช้ในการจำแนกชนิด โดยทำการสำรวจในพืชผักต่าง ๆ จำนวน 34 ชนิด ได้แก่ กวางตุ้ง กวางตุ้งฮ่องเต้ คื่นช่าย ผักกาดขาว ผักกาดเขียว มะเขือเปราะ กระเทียม กุยช่าย หอมแดง หอมใหญ่ มันฝรั่ง กระเจี๊ยบเขียว กะหล่ำดอก จิงจูฉ่าย แตงกวา แตงโม แตงไทย ตำลึง ถั่วฝักยาว ถั่วหวาน ถั่วเหลือง บวบ บวบหอม บวบเหลี่ยม ผักชีฝรั่ง ฟักทอง ฟักทองญี่ปุ่น ฟักทองบัตเตอร์นัท มะเขือม่วง มะเขือเทศ มะเขือเทศสีดา ขึ้นฉ่าย และโหระพา



2. การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae

2.1 การศึกษาอนุกรมวิธานจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

จากการนำตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบมาตรวจจำแนกชนิดด้วยจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบลักษณะแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae (Figure 3) มีลักษณะดังนี้

ความยาวของลำตัว : ระยะตัวเต็มวัยเป็นแมลงวันขนาดเล็กมีขนาดลำตัวยาว 1-3 มิลลิเมตร

ความกว้างของลำตัว : 1.4 – 1.5 มิลลิเมตร

ส่วนหัว : มีตาเดี่ยว (ocellus) ขนาดเล็ก 3 ตา เรียงเป็นรูปสามเหลี่ยม (ocellar triangle) ที่บริเวณกลางหน้าผาก (vertex) มีขนที่บริเวณด้านหลังของตาเดี่ยว (postvertical bristle) ที่มุมฐานของรูปสามเหลี่ยม 1 คู่ โดยปลายขนแยกห่างจากกัน และอีก 1 คู่ ที่บริเวณยอดของรูปสามเหลี่ยม (ocellar bristle) บริเวณหน้า (fron) มีเส้นตะเข็บส่วนหน้า (frontal suture) เป็นรูปตัวยูหัวกลับ มีขนแข็งสั้นที่ด้านข้างของปีก (oval vibrissae) 1 คู่ หนวดมี 3 ปล้อง ปล้องที่ 3 มีขนแข็ง (arista) 1 เส้น

ส่วนอก: แผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอก (scutellum) ที่บริเวณส่วนปลายมีขน (apical bristle) 2 เส้น และมีอีก 2 เส้นที่บริเวณด้านข้างของส่วนฐาน (lateral bristle) มีขนจำนวนมากบนส่วนหัวและลำตัว ส่วนท้องมี 6 ปล้อง

ปีกมีเส้นใต้ขอบปีก (sub costa หรือ Sc) ไม่สมบูรณ์โดยปลายเส้นไม่รวมกับฐาน ของเส้นรัศมี (radius) แต่อยู่ติดกับเส้นรัศมี เส้นขอบปีก (costa) ขาดที่บริเวณใกล้กับส่วนปลายของ เส้นรัศมี 1 (R1) เส้นกลางปีก 1+2 (M1+2) ยาวไปสิ้นสุดที่ส่วนปลายสุดของปีก

แนวทางวินิจฉัย (key) ชนิดแมลงวันหนอนชอนใบตัวเต็มวัยวงศ์ Agromyzidae

(Morphological identification of adult leaf miner flies Key)

1. Scutellum largely black, sometimes brownish or greyish, never yellow. First antennal flagellomere angulate dorsoapically; mesoscutum grayish-black; head largely yellow (host plant: *Allium* spp.).....(*L. chinensis*)
 - Scutellum distinctly yellow, at least centrally. First antennal flagellomere round; mesoscutum partly and scutellum largely (bright yellow).....2
2. Mesonotum (presctum and scutum) shiny. Femora yellow, without dark striations3
 - Mesonotum (presctum and scutum) not shiny. Femora yellow, with dark striations4
3. Fron and vertex of head yellow brown .under inner and outer vertical bristles standing on black ground; shining black mesonotum]. Anepisternum predominantly yellow, with dark area along ventral margin in variable length..... *L. sativae*



- Fron and vertex of head yellow brown under inner and outer vertical bristles standing on yellow ground. Anepisternum with dark area filling ventral third
.....*L. brassicae*
4. Vertex of head yellow under outer vertical bristles. Inner setae standing on yellow ground; presctum and scutum black with grey bloom..... *L. trifolii*
- Vertex of head black under outer vertical bristles. Inner setae standing usually standing on dark ground (yellow mixed with black); presctum and scutum shiny black
..... *L. huidobrensis*

1. *Liriomyza brassicae* (Riley,1884)

(Figure 4 และ 5)

ชื่ออื่น (synonym) *Oscinis brassicae* Riley,1884

Oscinis brassicae Riley 1885

Liriomyza cruciferarum Hering 1927

Phytomyza mitis Curran 1931

Liriomyza hawaiiensis Frick 1952

Liriomyza bulnesiae Spencer 1963

Liriomyza ornephila Garg 1971

ชื่อสามัญ (common name): cabbage leaf miner, cabbage serpentine leaf miner, serpentine leaf miner และ north American cabbage leaf miner

ความยาวปีก (wing length): 1.25 - 1.7 mm

รูปร่างลักษณะ

ส่วนหัว: หน้ามีสีเหลืองอมน้ำตาลและมีสีดำบริเวณมุม บริเวณหลังตารวมมีสีดำ กระทบมุม บริเวณด้านข้างมีสีเหลืองอมน้ำตาล มีขนบนกระท่อมอยู่ติดกับด้านข้างของตารวมที่ตาซ้าย 1 คู่และ ตาขวา 1 คู่ โดยขนบนกระท่อมแต่ละคู่จะตั้งอยู่ทางด้านนอก 1 เส้นและอยู่ทางด้าน ใน 1 เส้น ซึ่ง ขนบนกระท่อมเส้นนอก และขนบนกระท่อมเส้นในอยู่บนพื้นสีเหลืองอมน้ำตาล หนวดปล้องที่ 3 มีขนาดเล็กสีเหลือง ส่วนยอดของปล้องมีลักษณะกลม

ส่วนอก: สันหลังอกปล้องที่สอง (mesonotum) มีสีดำมันวาว และมีขนสั้นเรียงเป็นแถวที่ กลางปล้องระหว่างแถวของขนด้านสันหลัง แผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอกมีสีเหลืองใส ปล้องฐานขา (coxa) และต้นขา (femur) มีสีเหลืองออกน้ำตาลอ่อน ส่วนหน้าแข้ง (tibia) และฝ่าเท้า (tarsi) มีสี น้ำตาลดำ ปีกมี discal cell เล็ก มี anal cell เส้นขอบปีกสิ้นสุดที่ปลายของเส้นกลางปีก1+2

ส่วนท้อง: มี 6 ปล้อง แผ่นแข็งที่ด้านหลังของปล้องท้องมีสีดำมันวาว โดยปล้องท้องแต่ละ ปล้องมีสีเหลืองบริเวณขอบ ยกเว้นปล้องท้องที่ 2 ที่มีร่องสีเหลืองตรงกลางปล้อง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา: EMBT.LM 0101 – EMBT.LM 0120 (20 ตัวอย่าง)



*แมลงวันหนอนชอนใบชนิดนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *L. sativae* และ *L. bryoniae* (Spencer, 1981) แต่รูปร่างของ *Distiphallus* นั้นมีความแตกต่างจากแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด

2. *Liriomyza chinensis* (Kato, 1949)

(Figure 6 และ 7)

ชื่ออื่น (synonym) *Liriomyza chinensis* (Kato 1949)

Dizygomyza cepae ssp. *chinensis* Kato 1949

Liriomyza chinensis (Kato 1949) comb. and stat. nov. Spencer (1973)

ชื่อสามัญ (common name): onion leaf miner และ stone leek leafminer

ความยาวปีก (wing length): 1.3 - 2.0 mm

รูปร่างลักษณะ

ส่วนหัว: หน้ามีสีเหลือง บริเวณหลังตารวมมีสีเหลือง กระทบอมบริเวณด้านข้างมีสีเหลือง มีขนบนกระท่อมอยู่ติดกับด้านข้างของตารวมที่ตาซ้าย 1 คู่ และตาขวา 1 คู่ โดยขนบนกระท่อมแต่ละคู่จะตั้งอยู่ทางด้าน นอก 1 เส้นและอยู่ทางด้าน ใน 1 เส้น ซึ่งขนบนกระท่อมเส้นนอกตั้งอยู่บนพื้นสีดำขนาดเล็ก และขนบนกระท่อมเส้นในตั้งอยู่บนพื้นสีเหลือง หนวดปล้องที่ 3 มีขนาดเล็กสีเหลืองส่วนยอดของปล้องมีลักษณะเป็นมุม (angulate) เส้นขน arista มีสีน้ำตาล

ส่วนอก: สันหลังอกปล้องที่สอง (mesonotum) มีสีเทาดำไม่มันวาว และมีขนสั้นเรียงเป็นแถวที่กลางปล้อง ระหว่างแถวของขนด้านสันหลัง แผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอก (scutellum) มีสีเทาดำขาส่วนของปล้องฐานขา (coxa) และต้นขา (femur) มีสีเหลืองใส หน้าแข้ง (tibia) และฝ่าเท้า (tarsi) มีสีน้ำตาลดำ ปีกมี discal cell ขนาดเล็ก มี anal cell เส้น ขอบปีกสิ้นสุดที่ปลายของเส้นกลางปีก 1+2

ส่วนท้อง: มี 6 ปล้อง มีสีเทาดำ และมีสีเหลืองบริเวณมุมส่วนท้อง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา: EMBT.LM 0201 – EMBT.LM 0220 (20 ตัวอย่าง)

3. *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard, 1926)

(Figure 8 และ 9)

ชื่ออื่น (synonym) *Liriomyza orbona* Meigen 1830

Agromyza huidobrensis Blanchard 1926

Liriomyza cucumifoliae Blanchard 1938

Liriomyza langei Frick 1951

Liriomyza decora Blanchard 1954

Liriomyza dianthi Frick 1958

ชื่อสามัญ (common name): serpentine leafminer, pea leafminer, South American leafminer และ potato leafminer fly

ความยาวปีก (wing length): 1.7 - 2.3 mm

รูปร่างลักษณะ ตัวสีเทาดำ และมีรูปร่างอ้วนป้อม



ส่วนหัว: หน้ามีสีเหลืองส้ม บริเวณหลังตารวมมีสีดำ กระทบอมบริเวณด้านข้างมีสีเหลือง มีขนบนกระทบอมอยู่ติดกับด้านข้างของตารวมที่ตาซ้าย 1 คู่และตาขวา 1 คู่ โดยขนบนกระทบอม แต่ละคู่จะตั้งอยู่ทางด้านนอก 1 เส้นและอยู่ทางด้าน ใน 1 เส้น ซึ่งขนบนกระทบอมเส้นนอกและขนบนกระทบอมเส้นในตั้งอยู่บนพื้นสีดำ หนวดปล้องที่ 3 ขยายใหญ่ และบริเวณปลายหนวดปล้องที่สามมีสีเข้มมากบางครั้งเกือบเป็นสีดำ

ส่วนอก: สันหลังอกปล้องที่สอง (mesonotum) มีสีดำด้าน ไม่มันวาว และมีขนสั้นเรียงเป็นแถวที่กลางปล้อง scutellum สีเหลืองสดใส Anepisternum มีสีเหลือง ขาหลัง บริเวณ femur มีสีเหลือง หรือเหลืองเข้ม และมีเส้นสีดำพาด

แถวของขนด้านสันหลังแผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอกมีสีเหลืองใสที่บริเวณด้านข้างทั้งสองข้างมีแถบใหญ่สีดำ ปล้องฐานขาไม่มีสีด้ามสีเหลือง ต้นขาไม่มีสีเหลืองและมีแถบลายสีน้ำตาลดำ หน้าแข้งและฝ่าเท้ามีสีดำ ปีกมี discal cell ขนาดใหญ่ มี anal cell เส้นขอบปีกสิ้นสุดที่ปลายของเส้นกลางปีก 1+2

ส่วนท้อง: มี 6 ปล้อง แผ่นแข็งที่ด้านหลังของปล้องท้องมีสีน้ำตาลอมดำ Tergite ปล้องที่ 2 แยกออกจากกัน

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา: EMBT.LM 0301 – EMBT.LM 0320 (20 ตัวอย่าง)

4. *Liriomyza sativae* Blanchard, 1938

(Figure 10 และ 11)

ชื่ออื่น (synonym) *Liriomyza sativae* Blanchard 1938

Agromyza subpusilla Frost 1943

Liriomyza verbenicola Hering 1951

Liriomyza pullata Frick 1952

Liriomyza canomarginis Frick 1952

Liriomyza minutiseta Frick 1952

Liriomyza propepusilla Frost 1954

Liriomyza munda Frick 1957

Liriomyza guytona Freeman 1958

Lemurimyza lycopersicae Pla & de la Cruz 1981

ชื่อสามัญ (common name) vegetable leafminer, American leafminer, chrysanthemum leafminer, serpentine vegetable leafminer และ melon leafminer

ความยาวปีก (wing length): 1.25 - 1.9 mm

รูปร่างลักษณะ

ส่วนหัว: หน้ามีสีเหลือง orbit สีเหลืองและมีริ้วสีน้ำตาลเล็กน้อย บริเวณด้านหลังตารวมเป็นสีดำ กระทบอมบริเวณด้านข้างมีสีเหลือง มีขนบนกระทบอมอยู่ติดกับด้านข้างของตารวมที่ตาซ้าย 1 คู่และตาขวา 1 คู่ โดยขนบนกระทบอมเส้นนอก (outer vertical bristle) ตั้งอยู่บนพื้นสีดำ และขนบน



กระหม่อมเส้นใน (inner vertical bristle) อยู่บนพื้นสีเหลือง หนวดปล้องที่ 3 มีขนาดเล็กสีเหลืองใส ส่วนปลายปล้องมีลักษณะกลม

ส่วนนอก: สันหลังอกปล้องที่สอง (mesonotum) มีสีดำ ลักษณะเป็นมันวาว และมีขนสั้นเรียงเป็นแถวที่ กลางปล้องระหว่าง แถวของขนด้านสันหลัง แผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอกมีสีเหลืองใสยกเว้น ด้านข้าง บริเวณส่วนฐานมีจุดสีน้ำตาลข้างละจุด Anepisternum มีสีเหลืองและมีบางส่วนเป็นสีทึบซึ่งมีแถบเล็ก ๆ บริเวณขอบด้านล่าง

ขามีสีเหลืองใส ส่วนหน้าแข้งและฝ่าเท้ามีสีน้ำตาล ปีก มี discal cell เล็ก มี anal cell เส้นขอบปีกสิ้นสุดที่ปลายของเส้นกลางปีก 1+2 (M 1+2)

ส่วนท้อง: มี 6 ปล้อง แผ่นแข็งด้านบนของปล้องท้องมีสีดำ Tergite ปล้องที่ 2 แยกออกจากกัน ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา: EMBT.LM 0401 – EMBT.LM 0420 (20 ตัวอย่าง)

5. *Liriomyza trifolii* (Burgess 1880)

(Figure 12 และ 13)

Oscinis trifolii Burgess 1880

Agromyza phaseolunulata Frost 1943

Liriomyza alliovora Frick 1955

ชื่อสามัญ (Common name): American serpentine leafminer, serpentine leafminer, broad bean leafminer, Californian leafminer, celery leafminer และ chrysanthemum leaf miner

ความยาวปีก (wing length): 1.2 - 1.8 mm

รูปร่างลักษณะ

ส่วนหัว: หน้ามีสีเหลือง บริเวณมุมด้านหลังตารวมเป็นสีเหลืองอ่อนและมีแถบสีน้ำตาลเป็นริ้ว และตรงกลางมีสีเข้มขึ้น กระหม่อมบริเวณด้านข้างมีสีเหลือง มีขนบนกระหม่อมอยู่ติดกับด้านข้างของตารวมที่ตาซ้าย 1 คู่ และตาขวา 1 คู่ โดยขนบนกระหม่อม แต่ละคู่จะตั้งอยู่ทางด้าน นอก 1 เส้น และอยู่ทางด้านใน 1 เส้น ซึ่งขนบนกระหม่อมเส้นนอก (outer vertical bristle) และขนบนกระหม่อมเส้นใน (inner vertical bristle) อยู่บนพื้นสีเหลือง หนวดปล้องที่ 3 มีขนาดเล็กสีเหลืองใส น้ำตาล ส่วนยอดของปล้องมีลักษณะกลม

ส่วนนอก: สันหลังอกปล้องที่สอง (mesonotum) มีสีดำด้านและเทาเข้ม และมีขนสั้นเรียงเป็นแถวที่ กลางปล้องระหว่าง แถวของขนด้านสันหลัง แผ่นสามเหลี่ยมสันหลังอกมีสีเหลืองใสยกเว้น ด้านข้าง บริเวณส่วนฐานมีจุดสีน้ำตาลข้างละจุด ขามีสีเหลืองใส โดย coxa มีสีเหลือง femora ส่วนใหญ่มีสีเหลือง แต่บางตัวอย่างมีแถบสีน้ำตาลเล็กน้อย tibia และ tarsi จะมีสีน้ำตาลเข้ม ปีกมี discal cell เล็ก มี anal cell เส้นขอบปีกสิ้นสุดที่ปลายของเส้นกลางปีก 1+2 (M 1+2) Anepisternum มีสีเหลืองมีจุดสีดำบริเวณขอบด้านล่าง

ส่วนท้อง: มี 6 ปล้อง แผ่นแข็งที่ด้านหลังของปล้องท้องมีสีดำ



ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา: EMBT.LM 0501 – EMBT.LM 0520 (20 ตัวอย่าง)

*สัญญาณภายนอกคล้ายกับ *L. katoi* และ *L. yasumatsui* จำเป็นต้องมีการศึกษาอวัยวะเพศของผู้ (Malipatil *et al.*, 2004 และ Shiao, 2004)

ถึงแม้ Sasakawa (2013) นั้นสำรวจแมลงวันหนอนชอนใบในป่าไม้ในประเทศไทย พบแมลงวันหนอนชอนใบวงศ์ Agromyzidae จำนวน 10 สกุล 28 ชนิด แต่จากการศึกษาครั้งนี้ทำการสำรวจพบแมลงวันหนอนชอนใบที่เข้าทำลายพืชผักที่มีความสำคัญทางการเกษตรนั้นพบเฉพาะสกุล *Liriomyza* จำนวน 5 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับ Shiao (2004) ที่รายงานว่าแมลงวันหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* ที่มีความสำคัญต่องานด้านกักกันพืชในประเทศไต้หวันนั้น มีจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae*, *L. bryoniae*, *L. chinensis*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* และ *L. trifolii* แต่ Sasakawa (2013) รายงานว่า สำรวจพบแมลงวันหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* ในประเทศไทย 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae*, *L. chinensis*, *L. sativae*, *L. compositella* และ *L. subpusilla* แต่ *L. compositella* และ *L. subpusilla* นั้น เข้าทำลายพืชในตระกูล Asteraceae ซึ่งเป็นกลุ่มไม้ดอกและไม้ประดับ

อัตราส่วนของเส้นปีกแมลงวันหนอนชอนใบที่ใช้ประกอบการจำแนกชนิด

การจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบพบว่า ความยาวและความกว้างของปีก ในแมลงวันหนอนชอนใบมีความใกล้เคียงกัน ดังนี้ *L. brassicae*, *L. sativae* และ *L. trifolii* มีความยาวปีก 1.45, 1.42 และ 1.44 มิลลิเมตร และ มีความกว้างปีก 0.62, 0.60 และ 0.60 (Figure 15) (Table 2) และศึกษาอัตราส่วนของเส้นปีกบริเวณ Last section of vein CuA1 (A) ต่อ Penultimate section of vein (B) ของปีก (Figure 16) โดยพบว่าอัตราส่วนรูปแบบปีกคำนวณจากความยาว (A) ทหารด้วยส่วน penultimate section (B) พบว่ามีความแตกต่างกัน (Figure 16 และ Table 2) ดังนี้

L. brassicae นั้น a เป็น 2.99 เท่า ของ b (Figure 16A)

L. chinensis นั้น a เป็น 3.13 เท่า ของ b (Figure 16B)

L. huidobrensis นั้น a เป็น 2.31 เท่า ของ b (Figure 16C)

L. sativae นั้น a เป็น 3.32 เท่า ของ b (Figure 16D)

L. trifolii นั้น a เป็น 3.23 เท่า ของ b (Figure 16E)

การศึกษาอัตราส่วนของเส้นปีกบริเวณส่วน Last section of vein CuA1 (A) ต่อ Penultimate section of vein (B) ของปีก พบว่าอัตราส่วนของเส้นปีก *L. huidobrensis* นั้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ นอกจากนั้นพบว่ามีตัวอย่าง *L. trifolii* หลาย ๆ ตัวอย่างนั้น เส้น dm-cu cross veins นั้นหายไป

ลักษณะรูปแบบของส่วนท้อง (abdomen pattern)

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษารูปแบบปล้องท้องด้านบน (tergites) ของแมลงวันหนอนชอนใบ จากลักษณะของรูปแบบของแถบสีเหลืองตรงกลางด้านบนของท้องปล้องที่ 5 (Tergite 5) (Figure



17 - 18) ใช้เป็นส่วนประกอบในการจำแนกชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด โดยพบว่ารูปแบบของปล้องท้องด้านบน สามารถแบ่งออกได้ดังนี้

1. กลุ่มแมลงวันหนอนชอนใบที่พบร่องสีเหลืองตรงกลางบริเวณด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 2 ซึ่งได้แก่ *L. brassicae*, *L. huidobrensis*, และ *L. sativae* (Figure 17A, C และ E, 18A, C และ E)
2. กลุ่มแมลงวันหนอนชอนใบที่พบร่องสีเหลืองตรงกลางบริเวณปล้องท้องด้านบนปล้องที่ 2 และยาวลงมา ได้แก่ *L. trifolii* (Figure 17E และ 18E)
3. กลุ่มแมลงวันหนอนชอนใบที่พบร่องสีเหลืองตรงกลางบริเวณปล้องท้อง ได้แก่ *L. chinensis* (Figure 17B และ 18B)

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถใช้รูปแบบของด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 5 ประกอบการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ ซึ่งสอดคล้องกับ Sasakawa (1960, 1961) ที่ได้ศึกษารูปแบบของสีบริเวณส่วนท้องของแมลงวันหนอนชอนใบ และการบรรยายลักษณะจากบริเวณด้านข้างและส่วนปลายท้อง แต่ไม่มีการวาดภาพหรือบรรยายลักษณะพื้นฐานโดยละเอียด ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเป็นครั้งแรกที่ใช้การถ่ายภาพ และวาดภาพรูปแบบด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 5 ซึ่งพบว่าแมลงวันหนอนชอนใบทั้ง 5 ชนิด นั้นมีรูปแบบของปล้องท้องด้านบนที่แตกต่างกันออกไป แต่ *L. trifolii* นั้นมีลักษณะแปลกแตกต่างจากแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ ซึ่งผลการศึกษาค้นคว้าสอดคล้องกับ Shiao (2004) ที่ได้ทำการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบในประเทศไต้หวันจากการศึกษาลักษณะรูปแบบของส่วนท้อง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารูปแบบของส่วนท้องนี้เป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถนำมาใช้ประกอบการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบได้

2.2 การศึกษาอนุกรมวิธานจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia)

ปัจจุบันการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบในสกุล *Liriomyza* spp. พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกนั้นมีข้อจำกัดมากมาย จึงได้มีการนำเอาลักษณะทางสัณฐานของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) มาช่วยในการจำแนกชนิดซึ่งประกอบด้วย epandrium, aedeagal apodeme, aedeagal และ distiphallus มาใช้ในการจำแนกชนิด (Figure 19) และส่วนของ distiphallus (aedeagus) นั้นเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบได้ดีที่สุด สามารถจัดทำแนวทางวินิจฉัยการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบด้วยอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ดังนี้

แนวทางวินิจฉัยการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบด้วยอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้

(Diagnostic key for identification of *Liriomyza* spp. using the male distiphallus)

1. With one distal bulb2
- With a pair of distal bulbs, the distiphallus is paired and sac-shaped as seen from the ventral side.....*L. huidobrensis*
2. The distiphallus is stronger pigmented..... 3



- The distiphallus is pale pigmented..... 4
- 3. The distiphallus seems constricted at the midlength (barrel shaped)
.....*L. brassicae*
- Aedeagus with distiphallus enlarged.....*L. chinensis*
- 4. With marked constriction between the apical and basal parts of the bulb: basal section strongly curved. The distiphallus is distinctly constricted apically,–the neck behind adjoining and relatively long, a little shorter than the distiphallus proper.....*L. trifolii*
- With slight constriction only between the apical and basal parts of the bulb: basal section not strongly curved. The distiphallus with slight constriction between lower and upper halves.....*L. sativae*

ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของแมลงวันหนอนชอนใบชนิดต่าง ๆ

การศึกษาครั้งนี้ใช้อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ โดยเฉพาะรูปร่างและลักษณะของ distiphallus ในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ ซึ่งพบลักษณะแตกต่างกันดังนี้

- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. brassicae* ลักษณะของ distiphallus มี distal bulb 1 อัน และมีลักษณะคล้ายถึงรูปทรงกระบอกมีสี่เหลี่ยม มีลักษณะคอดตรงกลาง (Figure 20)

- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. chinensis* ลักษณะของ distiphallus มี distal bulb 1 อัน มีขนาดใหญ่สี่เหลี่ยม ลักษณะเหมือนกลีบดอกไม้ซ้อนกัน แตกต่างจากแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด (Figure 21)

- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. huidobrensis* ลักษณะของ distiphallus มี distal bulb 2 อัน แตกต่างแมลงวันหนอนชอนใบชนิดอื่น ๆ ที่มีเพียงหนึ่งอัน และ distiphallus มีลักษณะคล้ายถุงน้ำ (Figure 22)

- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. sativae* ลักษณะของ distiphallus มี distal bulb หนึ่งอัน มีการหดตัวเล็กน้อยระหว่างส่วนปลายและส่วนฐานของกระเปาะ (Figure 23)

- แมลงวันหนอนชอนใบ *L. trifolii* ลักษณะของ distiphallus มี distal bulb หนึ่งอัน มีลักษณะโค้งมน และตีบคอดอย่างชัดเจน (Figure 24)

การศึกษาครั้งนี้สามารถใช้อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ โดยเฉพาะจำนวน และลักษณะรูปร่างของ distiphallus มาประกอบการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ เช่นเดียวกับ Spencer (1973); Shiao, (2004) ที่ใช้ลักษณะของ distiphallus ในการตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบสกุล *Liriomyza* โดยพบว่าแมลงวันหนอนชอนใบ 2 ชนิด คือ *L. trifolii* และ *L. sativae* มีลักษณะรูปร่างของ distiphallus ที่คล้ายคลึงกันมาก แต่พบว่า *L. sativae* มี distiphallus ที่มีขนาดใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *L. trifolii* ซึ่งมีขนาดเล็ก และบริเวณแผ่นแข็ง (sclerotization) ของ distiphallus



มีความแตกต่างกัน โดย phallus ของ *L. sativae* นั้นมีลักษณะคอดเว้าเข้ามา (Figure 23) ในขณะที่ *L. trifolii* นั้นโค้งมน (Figure 24)

3. ศึกษาการแพร่กระจายของแมลงวันหนอนซอนใบวงศ์ Agromyzidae

จากการศึกษาเขตการแพร่กระจายของแมลงวันหนอนซอนใบทั้ง 5 ชนิด (Figure 25 - 26) พบแมลงวันหนอนซอนใบแพร่กระจายในพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย ดังนี้

- แมลงวันหนอนซอนใบ *L. brassicae* เข้าทำลายพืชผักในพื้นที่ กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ชลบุรี เชียงใหม่ นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา เพชรบุรี ยโสธร ศรีสะเกษ และอ่างทอง
- แมลงวันหนอนซอนใบ *L. chinensis* เข้าทำลายพืชในพื้นที่ กาญจนบุรี เชียงใหม่ นครปฐม เพชรบูรณ์ ยโสธร และศรีสะเกษ
- แมลงวันหนอนซอนใบ *L. huidobrensis* เข้าทำลายพืชในพื้นที่ เชียงใหม่
- แมลงวันหนอนซอนใบ *L. sativae* เข้าทำลายพืชในพื้นที่ กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ขอนแก่น จันทบุรี ชุมพร เชียงใหม่ ตาก นครปฐม นครศรีธรรมราช ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี แพร่ราชบุรี ลำพูน สระแก้ว สุพรรณบุรี สุรินทร์ ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี
- แมลงวันหนอนซอนใบ *L. trifolii* เข้าทำลายพืชในพื้นที่ เชียงใหม่ และนครปฐม

จากการศึกษาการแพร่กระจายตัวของแมลงวันหนอนซอนใบทั้ง 5 ชนิด พบว่า แมลงวันหนอนซอนใบ *L. brassicae*, *L. chinensis*, *L. sativae* และ *L. trifolii* นั้น พบกระจายทั่วไปในพื้นที่ราบ ในภูมิภาคต่าง ๆ ของไทย แต่พบว่า *L. huidobrensis* เป็นศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการทำการเกษตรในพื้นที่สูงทางภาคเหนือเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับ Rauf *et al.*, (2000) ที่รายงานว่า *L. huidobrensis* นั้น เป็นศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับการทำการเกษตรในพื้นที่สูงในประเทศอินโดนีเซีย

4. ศึกษาพืชอาศัยของแมลงวันหนอนซอนใบวงศ์ Agromyzidae

จากการสำรวจแมลงวันหนอนซอนใบที่เข้าทำลายพืชผัก พบแมลงวันหนอนซอนใบเข้าทำลายพืชมากมายหลากหลายชนิด (Table 2) ดังนี้

- แมลงวันหนอนซอน *L. brassicae* เข้าทำลายพืชผักได้ 6 ชนิด ได้แก่ กวางตุ้ง กวางตุ้งฮ่องเต้ คะน้า ผักกาดขาว ผักกาดเขียว และมะเขือเปราะ
- แมลงวันหนอนซอน *L. chinensis* เข้าทำลายพืชผักได้ 4 ชนิด ได้แก่ กระเทียม กุยช่าย หอมแดง และหอมใหญ่
- แมลงวันหนอนซอน *L. huidobrensis* เข้าทำลายพืชผักได้ 1 ชนิด ได้แก่ มันฝรั่ง
- แมลงวันหนอนซอน *L. sativae* เข้าทำลายพืชผักได้ 21 ได้แก่ กระเจี๊ยบเขียว กะหล่ำดอก จิงจูฉ่าย แตงกวา แตงโม แตงไทย ตำลึง ถั่วฝักยาว ถั่วหวาน ถั่วเหลือง บวบ บวบหอม บวบเหลี่ยม ผักชีฝรั่ง ฟักทอง ฟักทองญี่ปุ่น ฟักทองบัตเตอร์นัท มะเขือม่วง มะเขือเทศ มะเขือเทศสีดา และโหระพา



- แมลงวันหนอนซอน *L. trifolii* เข้าทำลายพืชได้ 3 ชนิด ได้แก่ ขึ้นฉ่าย มะเขือเทศ และ โหระพา

การศึกษาครั้งนี้พบแมลงวันหนอนซอนใบ 5 ชนิด เข้าทำลายพืชผักมากมายหลายชนิด ซึ่งสอดคล้องกับ Spencer (1973) ที่รายงานว่า *L. huidobrensis*, *L. sativae* และ *L. trifolii* นั้น เข้าทำลายพืชได้มากมายหลากหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชผักและไม้ดอก และสอดคล้องกับกอบเกียรติและอัมพร (2544) ที่รายงานว่าแมลงวันหนอนซอนใบสกุล *Liriomyza* จัดเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เป็นปัญหาทั้งในพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับมาตั้งแต่ปี 2529 พบการระบาดของเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจ จำพวกพืชผักและไม้ดอกได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย พบทำลายพืชเศรษฐกิจมากมาย เช่น พืชผัก ตระกูลแตง ตระกูลกะหล่ำ พืชตระกูลถั่ว ไม้ดอก เช่น เยอบีร่า แอสเตอร์ กุหลาบ ดาวเรือง เบญจมาศ เป็นต้น ซึ่งพืชในกลุ่มนี้เป็นพืชผักที่มีระยะการเพาะปลูกสั้น และสามารถปลูกได้ทั้งปี ดังนั้นแมลงวันหนอนซอนใบจึงเป็นศัตรูพืชที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างยิ่ง

และการศึกษาครั้งนี้พบว่าแมลงวันหนอนซอนใบ *L. chinensis* มีความเจาะจงกับพืชอาหาร (host specific) โดยพบว่า เข้าทำลายเฉพาะพืชในสกุล *Allium* spp. ซึ่งได้แก่ หอมและกระเทียม สอดคล้องกับ Sasakawa (2013) ที่ทำการสำรวจพบ *L. chinensis* จากพืชสกุล *Allium* spp. เท่านั้น และ *L. brassicae* นั้น เข้าทำลายพืชผักในวงศ์ Brassicaceae, Capparidaceae แต่พบว่า *L. sativae* เข้าทำลายพืชผักสวนครัวหลากหลายมากที่สุด เช่นเดียวกับ Bhuiya et al., (2010) พบว่า *L. sativae* ในประเทศบังคลาเทศ พบทำลายพืชผักมากกว่า 45 ชนิด

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจแมลงวันหนอนซอนใบจากพื้นที่การปลูกผักจากภูมิภาคต่าง ๆ ในประเทศไทย และศึกษาด้านอนุกรมวิธานแมลง อัตราส่วนของเส้นปีก ลักษณะรูปแบบของส่วนท้อง และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ โดยเฉพาะส่วนของ distiphallus (หรือ aedeagus) นั้นเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนซอนใบได้ดีที่สุดและสามารถจัดทำแนวทางวินิจฉัยการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนซอนใบที่ทำลายพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza brassicae*, *L. chinensis*, *L. huidobrensis*, *L. sativae* และ *L. trifolii* นอกจากนี้การเตรียมสไลด์อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้นั้นทำได้ยากต้องอาศัยความชำนาญ และในการศึกษาความแตกต่างของ distiphallus ของแมลงวันหนอนซอนใบแต่ละชนิดมีความละเอียดอ่อน ต้องใช้ประสบการณ์และความชำนาญอย่างยิ่งในการตรวจสอบอย่างรอบคอบ ดังนั้นลักษณะของ distiphallus ที่แตกต่างกันควรนำมาประกอบการวินิจฉัยร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกอื่น ๆ เพื่อให้แน่ใจว่าการจำแนกชนิดนั้นถูกต้อง

และจากการศึกษาเขตการแพร่กระจายและพืชอาหารของแมลงวันหนอนซอนใบทั้ง 5 ชนิด พบว่า *Liriomyza brassicae*, *L. chinensis*, *L. sativae* และ *L. trifolii* นั้นเข้าทำลายพืชผักในภูมิภาคต่าง ๆ ของไทย แต่ *L. huidobrensis* ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชผักในพื้นที่สูงทาง



ภาคเหนือเท่านั้น แต่การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาชนิดแมลงวันหนอนชอนใบที่เข้าทำลายพืชผักเศรษฐกิจเพียงเท่านั้น ดังนั้นจึงควรมีการสำรวจเพิ่มเติมชนิดแมลงวันหนอนชอนใบที่เข้าทำลายสร้างความเสียหายให้กับไม้ดอกและไม้ประดับในอนาคตอีกด้วย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณศิริชัย สารวิจารณ์สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ผู้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ และอัมพร วิโนทัย. 2544. การแก้ไขปัญหาการระบาดของหนอนชอนใบบนพื้นที่สูงภาคเหนือ. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 42 หน้า.
- Bhuiya, B.A., S. Mazumdar, M.K. Pasha, W. Islam, M.I. Miah and M.S. Hossain. 2010. A preliminary report on the agromyzid leaf miner pest attack on some agricultural crops and weeds in Bangladesh. *J. Taxon. Biodiv. Res.* 4: 47-50
- Lim G.S, S.S. Sastroutomo and W.H. Loke.1999. Workshop on leafminers of vegetables in Southeast Asia. CABI-SEARC.
- Malipatil, M. B., Ridland, P. M., Rauf, A., Watung, J., & Kandowanko, D. (2004). New records of *Liriomyza* Mik (Agromyzidae: Diptera) leafminers from Indonesia. *Formosan Entomol.* 24: 287-292.
- Minkenberq OPJM. 1988. Dispersal of *Liriomyza trifolii*. Bulletin of the. European and Mediterranean. *Plant Protection Organisation.* 18: 173–182.
- Parrella, M.P., Jones, V.P., Youngman, R.R. and L.M. Lebeck. 1985. Effect of leaf mining and leaf stippling of *Liriomyza* spp. on photosynthetic rates of chrysanthemum. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78: 90-93.
- Parrella M.P. 1987. Biology of *Liriomyza*. *Ann. Rev. Entomol.* 32: 201 – 224.
- Parrella, M.P., Keil, C.B. and J.G. Morse, 1984. Insecticide resistance in *Liriomyza trifolii*. *California Agriculture.* 38: 22-33.
- Rauf, A., Shepard, B. M., and M. W. Johnson. 2000. Leafminers in vegetables, ornamental plants and weeds in Indonesia: surveys of host crops, species composition and parasitoids. *Int. J. Pest Manag.* 46(4): 257-266.
- Sasakawa, M. 1960. A study of the Japanese Agromyzidae (Diptera) Part 1. *Sci. Rep. Saikyo Univ. Agric.* 12: 76-82.



- Sasakawa, M. 1961. A study of the Japanese Agromyzidae (Diptera). Part 2. *Pac. Insect.* 3: 307–472.
- Sasakawa, M. 2013. Thailand Agromyzidae (Diptera) - 2. *Zootaxa.* 3746(4): 501–528.
- Shiao, S. F. 2004. Morphological diagnosis of six *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) of quarantine importance in Taiwan. *Appl. Entomol.* 39(1): 27-39.
- Spencer, K.A. 1973. *Agromyzidae (Diptera) of economic importance.* The Hague. Netherlands. 418 p.
- Stegmaier, C.E. 1966. Host plants and parasites of *Liriomyza trifolii* in Florida (Diptera: Agromyzidae). *Fla. Entomol.* 49: 75-80.



Table 1 Collecting date, latitude, longitude, comon name, scientific name of host plant, Family location and number of Agromyzid leafminer

| No. | Date | Latitude | Longitude | Common Name | Scientific Name | Family | Location | Quantity | | | leafminer |
|-----|------------|--------------|---------------|-------------------|---|----------------|--|----------|--------|-------|---------------------|
| | | | | | | | | Male | Female | Total | |
| 1 | 21.03.2018 | 13° 57'49" | 99° 38'27" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Tha Muang, Tha Muang, Kanchanaburi | 10 | 33 | 43 | <i>L. chinensis</i> |
| 2 | 21.03.2018 | 13° 58'32" | 99° 37'25" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> | Fabaceae | Tha Muang, Tha Muang, Kanchanaburi | 8 | 12 | 20 | <i>L. sativae</i> |
| 3 | 08.05.2018 | 13° 52'3" | 100° 10'53" | Sweet Basil | <i>Ocimum basilicum</i> L. | Labiatae | Si Maha Pho, Nakhon Chai Si, Nakhon Path | 16 | 16 | 32 | <i>L. trifolii</i> |
| 4 | 23.05.2018 | 13° 59'56" | 99° 39'56" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Thung Thongi, Tha Muang, Kanchanaburi | 15 | 6 | 21 | <i>L. sativae</i> |
| 5 | 19.06.2018 | 14° 18'27" | 99° 51'37" | Pumpkin | <i>Cucurbita moschata</i> Decne. | Cucurbitaceae | Chorakhe Sam Phan, U Thong, Suphan Buri | 1 | 5 | 6 | <i>L. sativae</i> |
| 6 | 25.07.2018 | 14° 00'32" | 99° 43'26" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Takhram En, Tha Maka, Kanchanaburi | 25 | 90 | 115 | <i>L. sativae</i> |
| 7 | 13.09.2018 | 13° 58'23" | 99° 47'40" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> . | Fabaceae | Don Cha-em, Tha Maka, Kanchanaburi | 16 | 0 | 16 | <i>L. sativae</i> |
| 8 | 13.09.2018 | 13° 59'48" | 99° 43'44" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> . | Fabaceae | Takhram En, Tha Maka, Kanchanaburi | 12 | 17 | 29 | <i>L. sativae</i> |
| 9 | 21.09.2018 | 13° 59'40" | 99° 43'33" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> . | Fabaceae | Takhram En, Tha Maka, Kanchanaburi | 72 | 89 | 161 | <i>L. sativae</i> |
| 10 | 28.09.2018 | 13° 59'30" | 99° 38'47" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> . | Fabaceae | Thung Thongi, Tha Muang, Kanchanaburi | 38 | 98 | 136 | <i>L. sativae</i> |
| 11 | 03.10.2018 | 18° 08'47.9" | 98° 20'47.1" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Bo Luang, Hot, Chiang Mai (1) | 1 | 5 | 6 | <i>L. sativae</i> |
| 12 | 03.10.2018 | 18° 09'08.9" | 98° 20'38.6" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Bo Luang, Hot, Chiang Mai (2) | 14 | 16 | 30 | <i>L. sativae</i> |
| 13 | 03.10.2018 | 18° 09'22.3" | 98° 20'35.8" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Bo Luang, Hot, Chiang Mai (3) | 2 | 3 | 5 | <i>L. sativae</i> |
| 14 | 03.10.2018 | 18° 09'00.1" | 98° 14'49.7" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Bo Sali, Hot, Chiang Mai (4) | 1 | 1 | 2 | <i>L. sativae</i> |
| 15 | 03.10.2018 | 18° 08'58.1" | 98° 15'04.3" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Bo Sali, Hot, Chiang Mai (5) | 4 | 1 | 5 | <i>L. sativae</i> |
| 16 | 03.10.2018 | 18° 08'34.1" | 98° 15'16.9" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Bo Sali, Hot, Chiang Mai (6) | 13 | 6 | 19 | <i>L. sativae</i> |
| 17 | 03.10.2018 | 18° 08'44.4" | 98° 15'12.3" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Bo Sali, Hot, Chiang Mai (7) | 14 | 0 | 14 | <i>L. sativae</i> |
| 18 | 09.10.2018 | 12° 56'21.9" | 100° 54'18.0" | Flowering cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Brassicaceae | Nong Prue, Bang Lamung, Chon Buri | 5 | 0 | 5 | <i>L. brassicae</i> |
| 19 | 06.12.2018 | 14° 18'27" | 99° 51'37" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Chorakhe Sam Phan, U Thong, Suphan Buri | 2 | 3 | 5 | <i>L. sativae</i> |
| 20 | 06.12.2018 | 14° 18'27" | 99° 51'37" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> . | Fabaceae | Chorakhe Sam Phan, U Thong, Suphan Buri | 1 | 1 | 2 | <i>L. sativae</i> |



Table 1 Collecting date, latitude, longitude, common name, scientific name of host plant, Family location and number of Agromyzid leafminer (continue)

| No. | Date | Latitude | Longitude | Common Name | Scientific Name | Family | Location | Quantity | | | leafminer |
|-----|------------|--------------|--------------|------------------|---|---------------|---|----------|--------|-------|---------------------|
| | | | | | | | | Male | Female | Total | |
| 22 | 06.01.2019 | 12°56'23.0" | 102°16'20.9" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Thap Sai, Pong Nam Ron, Chanthaburi | 20 | 32 | 52 | <i>L. sativae</i> |
| 23 | 07.01.2019 | 14°25'59" | 100°57'47" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 7 | 2 | 9 | <i>L. sativae</i> |
| 24 | 31.01.2019 | 14°48'18.2" | 103°20'39.5" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Sawai, Mueang Surin, Surin | 53 | 60 | 113 | <i>L. sativae</i> |
| 25 | 31.01.2019 | 14°48'18.2" | 103°20'39.5" | Angled Loofah | <i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb. | Cucurbitaceae | Sawai, Mueang Surin, Surin | 209 | 200 | 409 | <i>L. sativae</i> |
| 26 | 22.01.2019 | 13°51'18.9" | 100°07'08.9" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Pathc | 38 | 38 | 76 | <i>L. sativae</i> |
| 27 | 22.01.2019 | 13°51'18.9" | 100°07'08.9" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Pathc | 44 | 54 | 98 | <i>L. sativae</i> |
| 28 | 22.01.2019 | 13°46'10.9" | 99°34'07.2" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Nong Tak Ya, Tha Muang, Kanchanaburi | 14 | 19 | 33 | <i>L. sativae</i> |
| 29 | 28.01.2019 | 13°50'50" | 100°34'23" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | DOA, Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 12 | 13 | 25 | <i>L. sativae</i> |
| 30 | 28.01.2019 | 13°50'50" | 100°34'23" | Chinese cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Brassicaceae | DOA, Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 1 | 0 | 1 | <i>L. brassicae</i> |
| 31 | 12.02.2019 | 14°25'59" | 100°57'47" | Chinese cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Brassicaceae | Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 17 | 19 | 36 | <i>L. brassicae</i> |
| 32 | 13.02.2019 | 13°23'40.15" | 102°7'26.57" | Pumpkin | <i>Cucurbita moschata</i> Decne. | Cucurbitaceae | Wang Thong, Wang Sombun, Sa Kaeo | 30 | 13 | 43 | <i>L. sativae</i> |
| 33 | 14.02.2019 | 14°25'59" | 100°57'47" | Leaf mustard | <i>Brassica juncea</i> (L.) Czern. | Brassicaceae | Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 1 | 2 | 3 | <i>L. brassicae</i> |
| 34 | 14.02.2019 | 13°50'50" | 100°34'23" | Chinese broccoli | <i>Brassica oleracea</i> L. | Brassicaceae | Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 15 | 12 | 27 | <i>L. brassicae</i> |
| 35 | 14.03.2019 | 13°50'58" | 100°34'23" | Smooth loofah | <i>Luffa cylindrica</i> (L.) M.Roem. | Cucurbitaceae | Rice Department, Lad yao, Chatuchak, Ban | 39 | 133 | 172 | <i>L. sativae</i> |
| 36 | 20.03.2019 | 10°40'29" | 99°10'14" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Tha Sae, Tha Sae, Chumphon | 3 | 2 | 5 | <i>L. sativae</i> |
| 37 | 10.04.2019 | 14°1'53" | 99°58'16" | White mugwort | <i>Artemisia lactiflora</i> Wall. | Asteraceae | Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom | 7 | 5 | 12 | <i>L. sativae</i> |
| 38 | 18.04.2019 | 14°34'09.7" | 100°28'53.2" | Chinese cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Brassicaceae | Mueang Ang Thong, Ang Thong | 7 | 3 | 10 | <i>L. brassicae</i> |
| 39 | 18.04.2019 | 14°34'09.7" | 100°28'53.2" | Chinese cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Brassicaceae | Tha To, Maha Rat, Phra Nakhon Si Ayutthay | 8 | 5 | 13 | <i>L. brassicae</i> |
| 40 | 19.04.2019 | 13°55'3" | 99°56'47" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Nong Ngu Lueam, Mueang, Nakhon Pathor | 362 | 405 | 767 | <i>L. sativae</i> |



Table 1 Collecting date, latitude, longitude, common name, scientific name of host plant, Family location and number of Agromyzid leafminer (continue)

| No. | Date | Latitude | Longitude | Common Name | Scientific Name | Family | Location | Quantity | | | leafminer |
|-----|------------|--------------|--------------|------------------|---|---------------|---|----------|--------|-------|---------------------|
| | | | | | | | | Male | Female | Total | |
| 22 | 06.01.2019 | 12°56'23.0" | 102°16'20.9" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Thap Sai, Pong Nam Ron, Chanthaburi | 20 | 32 | 52 | <i>L. sativae</i> |
| 23 | 07.01.2019 | 14°25'59" | 100°57'47" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 7 | 2 | 9 | <i>L. sativae</i> |
| 24 | 31.01.2019 | 14°48'18.2" | 103°20'39.5" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Sawai, Mueang Surin, Surin | 53 | 60 | 113 | <i>L. sativae</i> |
| 25 | 31.01.2019 | 14°48'18.2" | 103°20'39.5" | Angled Loofah | <i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb. | Cucurbitaceae | Sawai, Mueang Surin, Surin | 209 | 200 | 409 | <i>L. sativae</i> |
| 26 | 22.01.2019 | 13°51'18.9" | 100°07'08.9" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Pathc | 38 | 38 | 76 | <i>L. sativae</i> |
| 27 | 22.01.2019 | 13°51'18.9" | 100°07'08.9" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Pathc | 44 | 54 | 98 | <i>L. sativae</i> |
| 28 | 22.01.2019 | 13°46'10.9" | 99°34'07.2" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Nong Tak Ya, Tha Muang, Kanchanaburi | 14 | 19 | 33 | <i>L. sativae</i> |
| 29 | 28.01.2019 | 13°50'50" | 100°34'23" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | DOA, Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 12 | 13 | 25 | <i>L. sativae</i> |
| 30 | 28.01.2019 | 13°50'50" | 100°34'23" | Chinese cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Brassicaceae | DOA, Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 1 | 0 | 1 | <i>L. brassicae</i> |
| 31 | 12.02.2019 | 14°25'59" | 100°57'47" | Chinese cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Brassicaceae | Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 17 | 19 | 36 | <i>L. brassicae</i> |
| 32 | 13.02.2019 | 13°23'40.15" | 102°7'26.57" | Pumpkin | <i>Cucurbita moschata</i> Decne. | Cucurbitaceae | Wang Thong, Wang Sombun, Sa Kaeo | 30 | 13 | 43 | <i>L. sativae</i> |
| 33 | 14.02.2019 | 14°25'59" | 100°57'47" | Leaf mustard | <i>Brassica juncea</i> (L.) Czern. | Brassicaceae | Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 1 | 2 | 3 | <i>L. brassicae</i> |
| 34 | 14.02.2019 | 13°50'50" | 100°34'23" | Chinese broccoli | <i>Brassica oleracea</i> L. | Brassicaceae | Lad yao, Chatuchak, Bangkok | 15 | 12 | 27 | <i>L. brassicae</i> |
| 35 | 14.03.2019 | 13°50'58" | 100°34'23" | Smooth loofah | <i>Luffa cylindrica</i> (L.) M.Roem. | Cucurbitaceae | Rice Department, Lad yao, Chatuchak, Ban | 39 | 133 | 172 | <i>L. sativae</i> |
| 36 | 20.03.2019 | 10°40'29" | 99°10'14" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Tha Sae, Tha Sae, Chumphon | 3 | 2 | 5 | <i>L. sativae</i> |
| 37 | 10.04.2019 | 14°1'53" | 99°58'16" | White mugwort | <i>Artemisia lactiflora</i> Wall. | Asteraceae | Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom | 7 | 5 | 12 | <i>L. sativae</i> |
| 38 | 18.04.2019 | 14°34'09.7" | 100°28'53.2" | Chinese cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Brassicaceae | Mueang Ang Thong, Ang Thong | 7 | 3 | 10 | <i>L. brassicae</i> |
| 39 | 18.04.2019 | 14°34'09.7" | 100°28'53.2" | Chinese cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Brassicaceae | Tha To, Maha Rat, Phra Nakhon Si Ayutthay | 8 | 5 | 13 | <i>L. brassicae</i> |
| 40 | 19.04.2019 | 13°55'3" | 99°56'47" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Nong Ngu Lueam, Mueang, Nakhon Pathor | 362 | 405 | 767 | <i>L. sativae</i> |



Table 1 Collecting date, latitude, longitude, common name, scientific name of host plant, Family location and number of Agromyzid leafminer (continue)

| No. | Date | Latitude | Longitude | Common Name | Scientific Name | Family | Location | Quantity | | | leafminer |
|-----|------------|---------------|----------------|------------------|---|----------------|---|----------|--------|-------|---------------------|
| | | | | | | | | Male | Female | Total | |
| 41 | 22.05.2019 | 8° 18'47.9" | 99° 45'42.4" | No.E49 | <i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb. | Cucurbitaceae | Lan Saka, Lan Saka, Nakhon Si Thammarat | 7 | 10 | 17 | <i>L. sativae</i> |
| 42 | 25.05.2019 | 12° 44'51.1" | 99° 42'27.1" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Khao Krapuk, Tha Yang, Phetchaburi | 28 | 41 | 69 | <i>L. sativae</i> |
| 43 | 25.05.2019 | 12° 44'51.1" | 99° 42'27.1" | Chinese cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Brassicaceae | Khao Krapuk, Tha Yang, Phetchaburi | 2 | 3 | 5 | <i>L. brassicae</i> |
| 44 | 25.05.2019 | 12° 44'51.1" | 99° 42'27.1" | Smooth Loofah | <i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb. | Cucurbitaceae | Khao Krapuk, Tha Yang, Phetchaburi | 9 | 23 | 32 | <i>L. sativae</i> |
| 45 | 25.05.2019 | 12° 43'26.1" | 99° 53'35.2" | Smooth Loofah | <i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb. | Cucurbitaceae | Sam Phraya, Cha-am, Phetchaburi | 123 | 124 | 247 | <i>L. sativae</i> |
| 46 | 25.05.2019 | 12° 43'26.1" | 99° 53'35.2" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Sam Phraya, Cha-am, Phetchaburi | 47 | 35 | 82 | <i>L. sativae</i> |
| 47 | 31.05.2019 | 13° 32'38.8" | 99° 56'30.8" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Tha Nat, Damnoen Saduak, Ratchaburi | 1 | 1 | 2 | <i>L. sativae</i> |
| 48 | 31.05.2019 | 13° 50'14.0" | 100° 07'37.6" | Smooth Loofah | uf+A47u.fa acutangula (L.) Roxb. | Cucurbitaceae | Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Pathc | 9 | 16 | 25 | <i>L. sativae</i> |
| 49 | 05.06.2019 | 14° 07'04.66" | 100° 01'06.49" | Celery | <i>Aqium graveolens</i> L. | Apiaceae | Sam Khwai Phueak, Mueang, Nakhon Pathc | 1 | 2 | 3 | <i>L. trifolii</i> |
| 50 | 11.06.2019 | 18° 32'41.5" | 98° 58'14.0" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Ton Thong, Mueang, Lamphun | 12 | 0 | 12 | <i>L. sativae</i> |
| 51 | 18.06.2019 | 18° 22'46.32 | 100° 9'47.53" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Daen Chumphon, Song, Phrae | 8 | 8 | 16 | <i>L. sativae</i> |
| 52 | 24.06.2019 | 13° 57'00.0" | 99° 56'52.9" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Thung Khwang, Kamphaeng Saen, Nakhon | 2 | 6 | 8 | <i>L. sativae</i> |
| 53 | 23.11.2019 | 14° 32'51.4" | 100° 11'07.6" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Don Masang, Mueang, Suphan Buri | 9 | 13 | 22 | <i>L. sativae</i> |
| 54 | 02.12.2019 | 14° 58'03.6" | 104° 12'29.1" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Bu Sung, Wang Hin, Si Sa Ket | 8 | 8 | 16 | <i>L. chinensis</i> |
| 55 | 02.12.2019 | 14° 58'03.6" | 104° 12'29.1" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Bu Sung, Wang Hin, Si Sa Ket | 2 | 3 | 5 | <i>L. chinensis</i> |
| 56 | 03.12.2019 | 15° 14'05.5" | 104° 31'10.0" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | I Pat, Kanthararom, Si Sa Ket | 5 | 11 | 16 | <i>L. chinensis</i> |
| 57 | 03.12.2019 | 15° 12'25.4" | 104° 08'47.9" | Muskmelon | <i>Cucumis melo</i> | Cucurbitaceae | Khaem, Uthumphon Phisai, Si Sa Ket | 3 | 9 | 12 | <i>L. sativae</i> |
| 58 | 03.12.2019 | 15° 14'30.6" | 104° 24'01.8" | Chinese broccoli | <i>Brassica oleracea</i> L. | Brassicaceae | Yang Chum Noi, Yang Chum Noi, Si Sa Ket | 13 | 24 | 37 | <i>L. brassicae</i> |
| 59 | 03.12.2019 | 15° 09'00.1" | 104° 13'00.0" | Garlic | <i>Allium sativum</i> L. | Alliaceae | Ta Ket, Uthumphon Phisai, Si Sa Ket | 5 | 9 | 14 | <i>L. chinensis</i> |
| 60 | 03.12.2019 | 15° 13'13.4" | 104° 31'58.5" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Mueang Noi, Kanthararom, Si Sa Ket | 0 | 1 | 1 | <i>L. chinensis</i> |
| 61 | 03.12.2019 | 15° 13'50.1" | 104° 24'44.5" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Bueng Bon, Yang Chum Noi, Si Sa Ket | 8 | 12 | 20 | <i>L. chinensis</i> |
| 62 | 03.12.2019 | 15° 14'13.2" | 104° 24'53.3" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Bueng Bon, Yang Chum Noi, Si Sa Ket | 6 | 13 | 19 | <i>L. chinensis</i> |
| 63 | 03.12.2019 | 15° 09'00.1" | 104° 13'00.0" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Ta Ket, Uthumphon Phisai, Si Sa Ket | 4 | 1 | 5 | <i>L. chinensis</i> |
| 64 | 03.12.2019 | 15° 09'47.6" | 104° 35'05.2" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Lathai, Kanthararom, Si Sa Ket | 2 | 3 | 5 | <i>L. chinensis</i> |
| 65 | 03.12.2019 | 15° 15'12.9" | 104° 25'29.0" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Bueng Bon, Yang Chum Noi, Si Sa Ket | 0 | 2 | 2 | <i>L. chinensis</i> |
| 66 | 03.12.2019 | 15° 14'30.6" | 104° 24'01.8" | Thai Eggplant | <i>Solanum virginianum</i> L. | Solanaceae | Yang Chum Noi, Yang Chum Noi, Si Sa Ket | 1 | 4 | 5 | <i>L. brassicae</i> |
| 67 | 03.12.2019 | 15° 14'30.6" | 104° 24'01.8" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Yang Chum Noi, Yang Chum Noi, Si Sa Ket | 1 | 4 | 5 | <i>L. sativae</i> |
| 68 | 03.12.2019 | 14° 51'55.0" | 104° 11'12.4" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Samrong Ta Chen, Khukhan, Si Sa Ket | 12 | 21 | 33 | <i>L. sativae</i> |
| 69 | 03.12.2019 | 15° 06'26.4" | 104° 19'54.6" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Mueang Tai, Mueang, Si Sa Ket | 21 | 23 | 44 | <i>L. sativae</i> |
| 70 | 03.12.2019 | 15° 05'58.5" | 104° 27'28.7" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Nong Kaeo, Mueang, Si Sa Ket | 4 | 1 | 5 | <i>L. sativae</i> |



Table 1 Collecting date, latitude, longitude, common name, scientific name of host plant, Family location and number of Agromyzid leafminer (continue)

| No. | Date | Latitude | Longitude | Common Name | Scientific Name | Family | Location | Quantity | | | leafminer |
|-----|------------|----------------|-----------------|------------------|---|----------------|--------------------------------------|----------|--------|-------|------------------------|
| | | | | | | | | Male | Female | Total | |
| 71 | 03.12.2019 | 15° 15' 12.9" | 104° 25' 29.0" | Pumpkin | <i>Cucurbita moschata</i> Decne. | Cucurbitaceae | Bueng Bon, Yang Chum Noi, Si Sa Ket | 2 | 2 | 4 | <i>L. sativae</i> |
| 72 | 03.12.2019 | 15° 13' 13.4" | 104° 31' 58.5" | Chinese cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Brassicaceae | Mueang Noi, Kanthararom, Si Sa Ket | 10 | 5 | 15 | <i>L. brassicae</i> |
| 73 | 03.12.2019 | 15° 21' 40.6" | 104° 23' 07.8" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Fa Huan, Kho Wang, Yasothon | 2 | 5 | 6 | <i>L. chinensis</i> |
| 74 | 04.12.2019 | 16° 16' 23.3" | 104° 30' 53.0" | Garlic | <i>Allium sativum</i> L. | Alliaceae | Kut Hae, Loeng Nok Tha, Yasothon | 1 | 5 | 6 | <i>L. chinensis</i> |
| 75 | 04.12.2019 | 16° 16' 23.3" | 104° 30' 53.0" | Chinese cabbage | <i>Brassica Chinensis</i> L. | Cruciferae | Kut Hae, Loeng Nok Tha, Yasothon | 4 | 1 | 5 | <i>L. brassicae</i> |
| 76 | 04.12.2019 | 16° 16' 23.3" | 104° 30' 53.0" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Kut Hae, Loeng Nok Tha, Yasothon | 2 | 3 | 5 | <i>L. chinensis</i> |
| 77 | 15.12.2019 | 13° 58' 57" | 99° 39' 0" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Tha Muang, Kanchanaburi | 8 | 11 | 19 | <i>L. chinensis</i> |
| 78 | 18.12.2019 | 12° 43' 27.5" | 99° 53' 35.6" | Chinese kale | <i>Brassica oleracea</i> L. | Brassicaceae | Mueang, Nonthaburi | 1 | 1 | 2 | <i>L. brassicae</i> |
| 79 | 18.12.2019 | 12° 43' 27.5" | 99° 53' 35.6" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Sam Phraya, Cha-am, Phetchaburi | 3 | 7 | | <i>L. sativae</i> |
| 80 | 18.12.2019 | 12° 43' 27.5" | 99° 53' 35.6" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Sam Phraya, Cha-am, Phetchaburi | 2 | 0 | 2 | <i>L. sativae</i> |
| 81 | 23.12.2019 | 13° 44' 19.60" | 100° 21' 40.45" | Butternut squash | <i>Cucurbita moschata</i> | Cucurbitaceae | Bangkok | 9 | 9 | 18 | <i>L. sativae</i> |
| 82 | 03.01.2020 | 16° 3' 56" | 105° 21' 40.45" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Khemarat, Khemarat, Ubon Ratchathani | 2 | 3 | 5 | <i>L. sativae</i> |
| 83 | 03.01.2020 | 16° 3' 56" | 105° 21' 40.45" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Khemarat, Khemarat, Ubon Ratchathani | 4 | 3 | 7 | <i>L. sativae</i> |
| 84 | 06.01.2020 | 16° 38' 29" | 102° 54' 42" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Nam Phong, Khon Kaen | 11 | 6 | 17 | <i>L. sativae</i> |
| 85 | 07.01.2020 | 18° 19' 37.85" | 98° 21' 42.90" | Potato | <i>Solanum tuberosum</i> L. | Solanaceae | Kong Khaek, Mae Chaem, Chiang Mai | 17 | 6 | 23 | <i>L. huidobrensis</i> |
| 86 | 08.01.2020 | 18° 33' 35.15" | 98° 19' 56.10" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Mae Suek, Mae Chaem, Chiang Mai | 9 | 7 | 16 | <i>L. sativae</i> |
| 87 | 08.01.2020 | 18° 33' 37.6" | 98° 31' 26.77" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Ban Luang, Chom Thong, Chiang Mai | 13 | 10 | 23 | <i>L. sativae</i> |
| 88 | 09.01.2020 | 18° 37' 31.83" | 98° 31' 47.14" | Chinese Cabbage | <i>Brassica rapa</i> L. | Brassicaceae | Mae Win, Mae Wang, Chiang Mai | 2 | 2 | 4 | <i>L. brassicae</i> |
| 89 | 10.01.2020 | 18° 47' 0.31" | 98° 57' 26.3" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Suthep, Mueang, Chiang Mai | 1 | 4 | 5 | <i>L. sativae</i> |
| 90 | 13.01.2020 | 16° 8' 35" | 101° 3' 20" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Nong Phai, Phetchabun | 6 | 9 | 15 | <i>L. chinensis</i> |



Table 1 Collecting date, latitude, longitude, common name, scientific name of host plant, Family location and number of Agromyzid leafminer (continue)

| No. | Date | Latitude | Longitude | Common Name | Scientific Name | Family | Location | Quantity | | | leafminer |
|-----|------------|---------------|---------------|------------------|---|----------------|-------------------------------|----------|--------|-------|------------------------|
| | | | | | | | | Male | Female | Total | |
| 91 | 13.01.2020 | 16° 23'13" | 101° 7'36" | Garlic | <i>Allium sativum</i> L. | Alliaceae | Mueang, Phetchabun | 0 | 1 | 1 | <i>L. chinensis</i> |
| 92 | 27.01.2020 | 14° 1'33" | 99° 52'22" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom | 33 | 9 | 42 | <i>L. sativae</i> |
| 93 | 27.01.2020 | 14° 0'42" | 99° 38'40" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Tha Muang, Kanchanaburi | 0 | 3 | 3 | <i>L. chinensis</i> |
| 94 | 29.01.2020 | 18° 58'5" | 98° 59'1" | Potato | <i>Solanum tuberosum</i> L. | Solanaceae | San Sai, Chiang Mai | 1 | 1 | 2 | <i>L. Huidobrensis</i> |
| 95 | 29.01.2020 | 19° 5'30" | 99° 10'26" | Potato | <i>Solanum tuberosum</i> L. | Solanaceae | Phrao, Chiang Mai | 2 | 7 | 9 | <i>L. huidobrensis</i> |
| 96 | 12.02.2020 | 18° 37'20.81" | 98° 31'17.60" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom | 13 | 24 | 37 | <i>L. sativae</i> |
| 97 | 14.02.2020 | 16° 35'52" | 102° 6'48" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Tha Muang, Kanchanaburi | 4 | 10 | 14 | <i>L. sativae</i> |
| 98 | 14.02.2020 | 16° 36'53" | 101° 9'34" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | San Sai, Chiang Mai | 6 | 9 | 15 | <i>L. chinensis</i> |
| 99 | 21.02.2020 | 14° 0'34" | 99° 38'32" | Onion | <i>Allium cepa</i> L. | Amaryllidaceae | Phrao, Chiang Mai | 11 | 11 | 22 | <i>L. chinensis</i> |
| 100 | 26.02.2020 | 19° 5'30" | 99° 10'57" | Soybean | <i>Glycine max</i> (L.) Merr. | Fabaceae | Phrao, Chiang Mai | 10 | 15 | 25 | <i>L. sativae</i> |
| 101 | 26.02.2020 | 19° 2'45" | 98° 57'56" | Garlic | <i>Allium sativum</i> L. | Alliaceae | San Sai, Chiang Mai | 4 | 10 | 14 | <i>L. chinensis</i> |
| 102 | 02.03.2020 | 14° 2'46" | 99° 42'55" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Phanom Thuan, Kanchanaburi | 5 | 5 | 10 | <i>L. chinensis</i> |
| 103 | 02.03.2020 | 14° 4'47" | 99° 44'46" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Phanom Thuan, Kanchanaburi | 3 | 21 | 24 | <i>L. sativae</i> |
| 104 | 09.03.2020 | 13° 26'53" | 102° 8'8" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Wang Nam Yen, Sa Kaeo | 0 | 3 | 3 | <i>L. sativae</i> |
| 105 | 09.03.2020 | 13° 29'29" | 102° 10'51" | Culantro | <i>Eryngium foetidum</i> L. | Apiaceae | Wang Nam Yen, Sa Kaeo | 0 | 2 | 2 | <i>L. sativae</i> |
| 106 | 17.03.2020 | 13° 55'34" | 99° 57'9" | Sweet Basil | <i>Ocimum basilicum</i> L. | Labiatae | Mueang, Nakhon Pathom | 3 | 11 | 14 | <i>L. sativae</i> |
| 107 | 17.03.2020 | 13° 57'45" | 99° 56'53" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom | 0 | 2 | 2 | <i>L. chinensis</i> |
| 108 | 17.03.2020 | 13° 54'24" | 99° 58'5" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Mueang, Nakhon Pathom | 2 | 6 | 8 | <i>L. sativae</i> |
| 109 | 17.03.2020 | 13° 55'50" | 99° 57'20" | Chinese Chives | <i>Allium tuberosum</i> Rottl. ex Spreng | Amaryllidaceae | Mueang, Nakhon Pathom | 0 | 5 | 5 | <i>L. chinensis</i> |
| 110 | 24.03.2020 | 14° 0'43" | 99° 39'51" | Chinese broccoli | <i>Brassica oleracea</i> L. | Brassicaceae | Tha Muang, Kanchanaburi | 0 | 1 | 1 | <i>L. brassicae</i> |



Table 1 Collecting date, latitude, longitude, comon name, scientific name of host plant, Family location and number of Agromyzid leafminer (continue)

| No. | Date | Latitude | Longitude | Common Name | Scientific Name | Family | Location | Quantity | | | leafminer |
|-----|------------|--------------|---------------|---------------|--|----------------|--------------------------------------|----------|--------|-------|------------------------|
| | | | | | | | | Male | Female | Total | |
| 111 | 24.03.2020 | 14° 1'55" | 99° 49'55" | Okra | <i>Abelmoschus esculentus</i> L. | Malvaceae | Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom | 3 | 5 | 8 | <i>L. sativae</i> |
| 112 | 24.03.2020 | 14° 4'25" | 99° 49'19" | Onion | <i>Allium cepa</i> L. | Amaryllidaceae | Phanom Thuan, Kanchanaburi | 10 | 3 | 13 | <i>L. chinensis</i> |
| 113 | 24.03.2020 | 14° 14'37" | 99° 49'25" | Angled Loofah | <i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb. | Cucurbitaceae | Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom | 1 | 0 | 1 | <i>L. sativae</i> |
| 114 | 24.03.2020 | 14° 14'37" | 99° 49'25" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Phanom Thuan, Kanchanaburi | 2 | 5 | 7 | <i>L. sativae</i> |
| 115 | 24.03.2020 | 14° 0'7" | 99° 37'52" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Tha Muang, Kanchanaburi | 4 | 2 | 6 | <i>L. sativae</i> |
| 116 | 02.12.2020 | 18° 19'29.8" | 98° 22'10.4" | Potato | <i>Solanum tuberosum</i> L. | Solanaceae | Kong Khaek, Mae Chaem, Chiang Mai | 3 | 2 | 5 | <i>L. huidobrensis</i> |
| 117 | 30.12.2020 | 14° 47'33" | 98° 21'40.2" | Watermelon | <i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. & N | Cucurbitaceae | Nong Ya Sai, Suphan Buri | 1 | 9 | 10 | <i>L. sativae</i> |
| 118 | 31.12.2020 | 14° 14'51" | 99° 49'17" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | U Thong, Suphan Buri | 16 | 5 | 21 | <i>L. sativae</i> |
| 119 | 14.01.2021 | 16° 46'03" | 98° 34'15" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Mae Sot, Tak | 1 | 11 | 12 | <i>L. sativae</i> |
| 120 | 02.02.2021 | 18° 29'18.4" | 98° 13'29.14" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Pang Hin Fon, Mae Chaem, Chiang Mai | 0 | 18 | 18 | <i>L. trifolii</i> |
| 121 | 19.02.2021 | 14° 39'15" | 99° 57'4" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> Fabaceae | | Si Prachan, Suphan Buri | 1 | 3 | 4 | <i>L. sativae</i> |
| 122 | 19.03.2021 | 14° 00'28" | 99° 39'30" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Thung Thong, Tha Muang, Kanchanaburi | 3 | 5 | 8 | <i>L. chinensis</i> |
| 123 | 23.03.2021 | 18° 51'55" | 99° 21'2" | Ivy gourd | <i>Coccinia grandis</i> L. | Cucurbitaceae | Huai Kaeo, Mae On, Chiang Mai | 5 | 5 | 10 | <i>L. sativae</i> |
| 124 | 23.03.2021 | 18° 52'3" | 99° 19'20.1" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Huai Kaeo, Mae On, Chiang Mai | 6 | 5 | 11 | <i>L. sativae</i> |
| 125 | 24.03.2021 | 18° 52'2" | 99° 16'13" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> Fabaceae | | Huai Kaeo, Mae On, Chiang Mai | 13 | 8 | 21 | <i>L. sativae</i> |
| 126 | 24.03.2021 | 18° 32'30" | 98° 31'19" | Potato | <i>Solanum tuberosum</i> L. | Solanaceae | Ban Luang, Chom Thong, Chiang Mai | 13 | 70 | 83 | <i>L. huidobrensis</i> |
| 127 | 24.03.2021 | 18° 32'29" | 98° 32'57" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Ban Luang, Chom Thong, Chiang Mai | 47 | 51 | 98 | <i>L. sativae</i> |
| 128 | 24.03.2021 | 18° 52'2" | 99° 16'13" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Huai Kaeo, Mae On, Chiang Mai | 0 | 1 | 1 | <i>L. sativae</i> |
| 129 | 25.03.2021 | 18° 19'27" | 98° 21'45" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Mae Chaem, Chiang Mai | 0 | 2 | 2 | <i>L. chinensis</i> |
| 130 | 25.03.2021 | 18° 30' 4" | 98° 21'25" | Shallot | <i>Allium ascalonicum</i> L. | Amaryllidaceae | Chang Khoeng, Mae Chaem, Chiang Mai | 3 | 8 | 11 | <i>L. chinensis</i> |



Table 1 Collecting date, latitude, longitude, comon name, scientific name of host plant, Family location and number of Agromyzid leafminer (continue)

| No. | Date | Latitude | Longitude | Common Name | Scientific Name | Family | Location | Quantity | | | leafminer |
|-----|------------|--------------|--------------|------------------|---|---------------|--|----------|--------|-------|---------------------|
| | | | | | | | | Male | Female | Total | |
| 131 | 25.03.2021 | 18°29'43" | 98°22'23" | Chinese broccoli | <i>Brassica oleracea</i> L. | Brassicaceae | Chang Khoeng, Mae Chaem, Chiang Mai | 1 | 0 | 1 | <i>L. brassicae</i> |
| 132 | 25.03.2021 | 18°30'11" | 98°21'40" | Ivy gourd | <i>Coccinia grandis</i> L. | Cucurbitaceae | Chang Khoeng, Mae Chaem, Chiang Mai | 0 | 1 | 1 | <i>L. sativae</i> |
| 133 | 25.03.2021 | 18°29'43" | 98°22'23" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> | Fabaceae | Chang Khoeng, Mae Chaem, Chiang Mai | 12 | 10 | 22 | <i>L. sativae</i> |
| 134 | 25.03.2021 | 18°32'20" | 98°20'54" | Japanese Pumpkin | <i>Cucurbita moschata</i> | Cucurbitaceae | Chang Khoeng, Mae Chaem, Chiang Mai | 5 | 7 | 12 | <i>L. sativae</i> |
| 135 | 25.03.2021 | 18°19'27" | 98°22'23" | Sugar snap pea | <i>Pisum sativum</i> L. | Fabaceae | Kong Khaek, Mae Chaem, Chiang Mai | 2 | 3 | 5 | <i>L. sativae</i> |
| 136 | 29.03.2021 | 13°0'11.01" | 99°51'39.25" | Cucumber | <i>Sucumis sativus</i> L. | Cucurbitaceae | Tha Laeng, Tha Yang, Phetchaburi | 12 | 22 | 34 | <i>L. sativae</i> |
| 137 | 29.03.2021 | 11°46'8.51" | 99°46'12.89" | Tomato | <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. | Solanaceae | Khlong Wan, Mueang, Prachuap Khiri Khan | 10 | 12 | 22 | <i>L. sativae</i> |
| 138 | 29.03.2021 | 12°57'25.04" | 99°54'0.31" | Cauliflower | <i>Brassica oleracea</i> L. | Brassicaceae | Tha Yang, Tha Yang, Phetchaburi | 13 | 8 | 21 | <i>L. sativae</i> |
| 139 | 29.03.2021 | 12°57'25.04" | 99°54'25.04" | Chinese broccoli | <i>Brassica oleracea</i> L. | Brassicaceae | Tha Yang, Tha Yang, Phetchaburi | 11 | 20 | 31 | <i>L. brassicae</i> |
| 140 | 30.03.2021 | 12°31'48.63" | 99°32'40.9" | Eggplant | <i>Solanum melongena</i> L. | Solanaceae | Huai Sat Yai, Hua Hin, Prachuap Khiri Khan | 1 | 0 | 1 | <i>L. sativae</i> |
| 141 | 30.03.2021 | 12°2'43.91" | 99°51'42.90" | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>sesquipedali</i> | Fabaceae | Kui Buri, Kui Buri, Prachuap Khiri Khan | 2 | 0 | 2 | <i>L. sativae</i> |



Table 2 The data of wing length and width of Agromyzid leafminer.

| Scientific name | Number of samples | Wing length (mm) | Wing width (mm) |
|---------------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| 1. <i>L. brassicae</i> | 20 | 1.45 ± 0.03 | 0.62 ± 0.01 |
| 2. <i>L. chinensis</i> | 20 | 1.82 ± 0.02 | 0.712 ± 0.01 |
| 3. <i>L. huidobrensis</i> | 20 | 1.95 ± 0.03 | 0.82 ± 0.01 |
| 4. <i>L. sativae</i> | 20 | 1.42 ± 0.01 | 0.60 ± 0.04 |
| 5. <i>L. trifolii</i> | 20 | 1.44 ± 0.02 | 0.60 ± 0.01 |

Table 3 The ration of Agromyzid venation (Penultimate section of vein (b) and Last section of vein (a).

| Scientific name | Number of samples | Vein Cu 1A | | a -times length of b |
|---------------------------|-------------------|---------------|---------------|----------------------|
| | | a(mm) | b(mm) | |
| 1. <i>L. brassicae</i> | 20 | 0.520 ± 0.010 | 0.176 ± 0.013 | 2.990 (3-4 times) |
| 2. <i>L. chinensis</i> | 20 | 0.607 ± 0.009 | 0.195 ± 0.004 | 3.129 (3-4 times) |
| 3. <i>L. huidobrensis</i> | 20 | 0.679 ± 0.015 | 0.293 ± 0.007 | 2.309 (2-2.5 times) |
| 4. <i>L. sativae</i> | 20 | 0.530 ± 0.005 | 0.159 ± 0.003 | 3.316 (3-4 times) |
| 5. <i>L. trifolii</i> | 20 | 0.505 ± 0.009 | 0.158 ± 0.004 | 3.231 (3-4 times) |





Figure 1 Samples of Agromyzid leafminer collected from host plants in Thailand

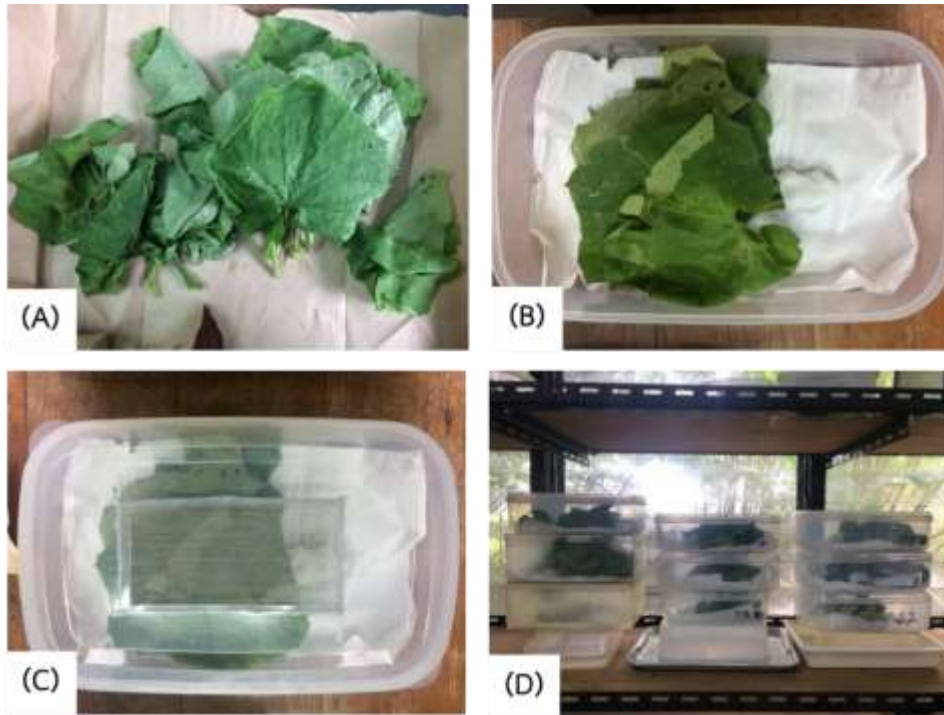


Figure 2 Agromyzid leafminer larvae reared on vegetable leaflets: (A) leaflets collected from vegetable farms, leaflets with mines containing agromyzid larvae; (B-D) larval rearing containers with leaflets on moisturized paper towels

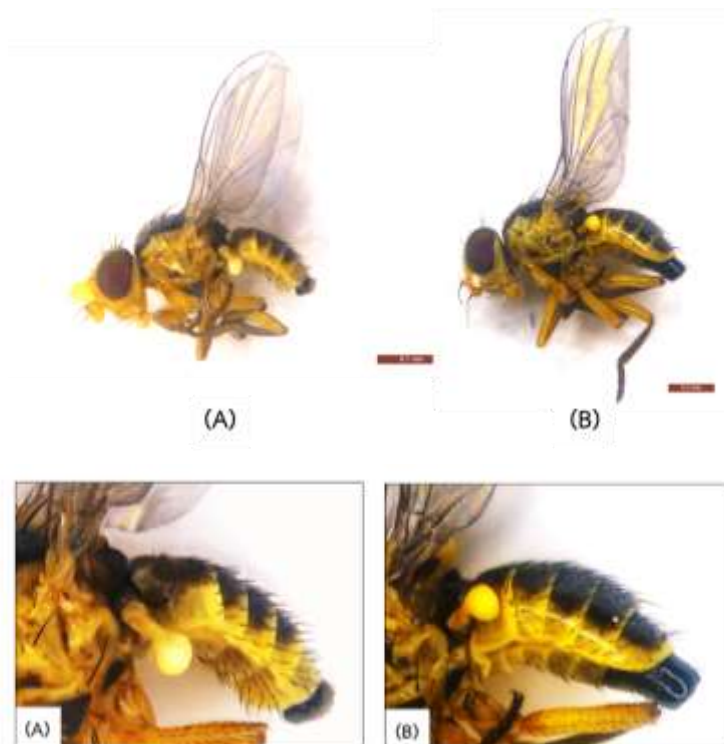


Figure 3 Abdomen in adult of Agromyzid leafminer
(A) Female of leafminer (B) Male of leafminer

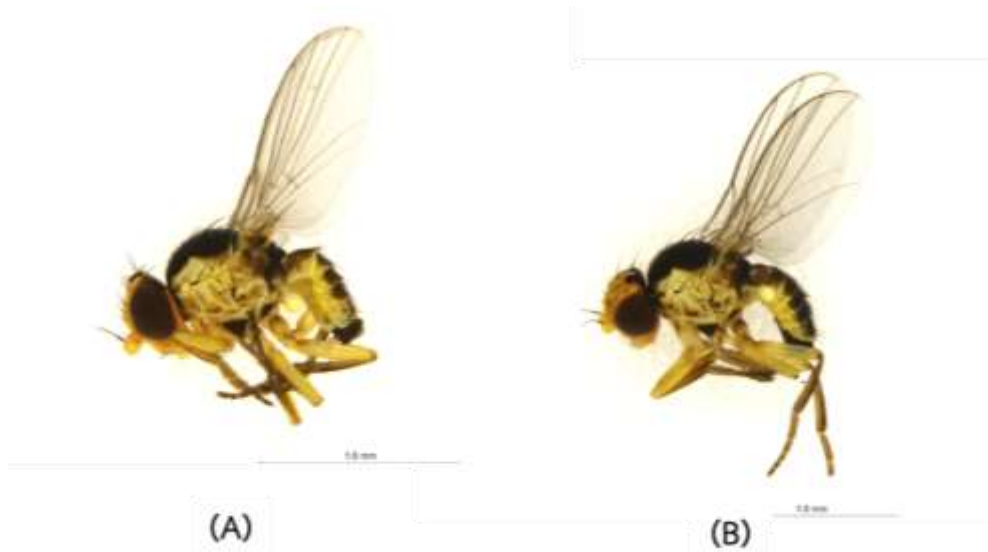


Figure 4 Adult of *Liriomyza brassicae* (Riley) (side view of typical)

(A) Male (B) Female

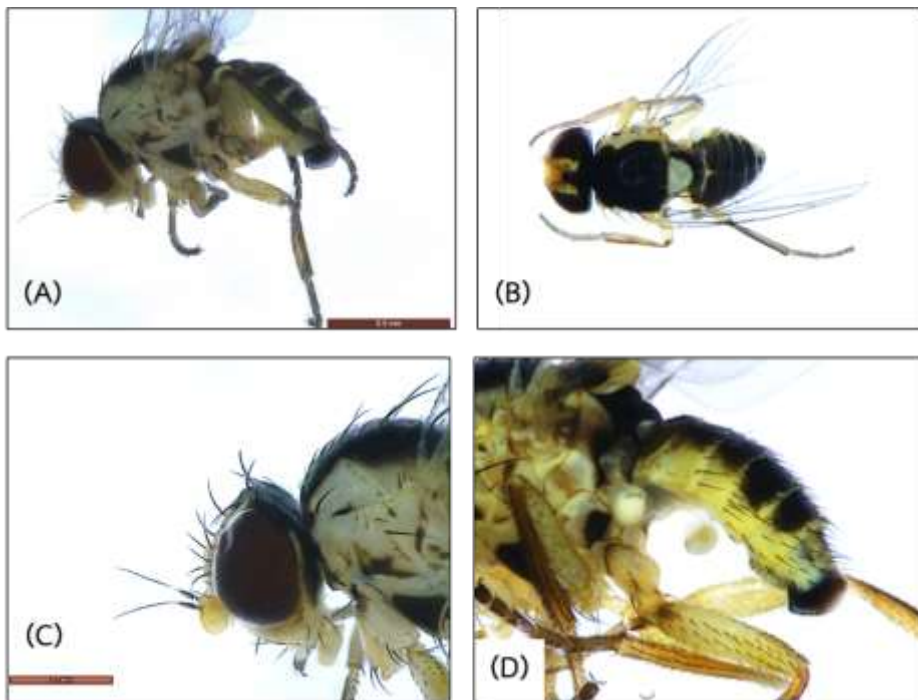


Figure 5 Adult of *Liriomyza brassicae* (Riley)

(A) head (B) thorax
(C) pronotum (D) abdomen



Figure 6 Adult of *Liriomyza chinensis* (side view of typical)
 (B) Male (B) Female

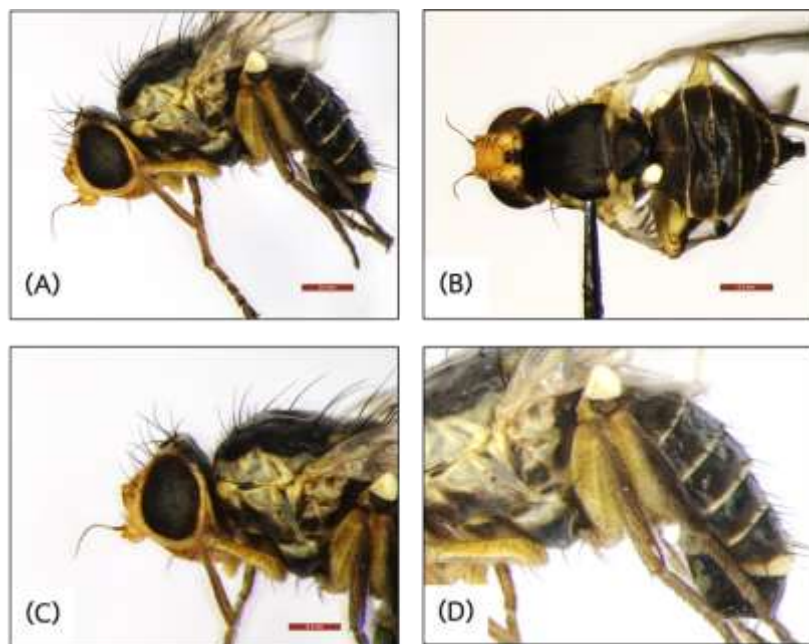


Figure 7 Adult of *Liriomyza chinensis*
 (A) head (B) thorax
 (C) pronotum (D) abdomen

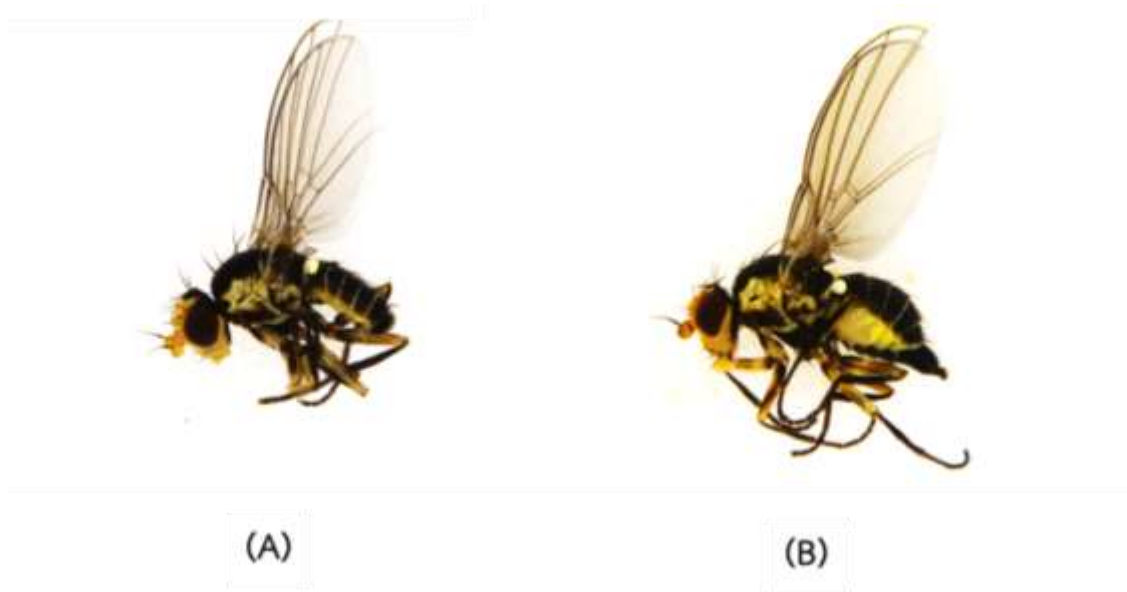


Figure 8 Adult of *Liriomyza huidrobrensis* (side view of typical)

(A) Male (B) Female

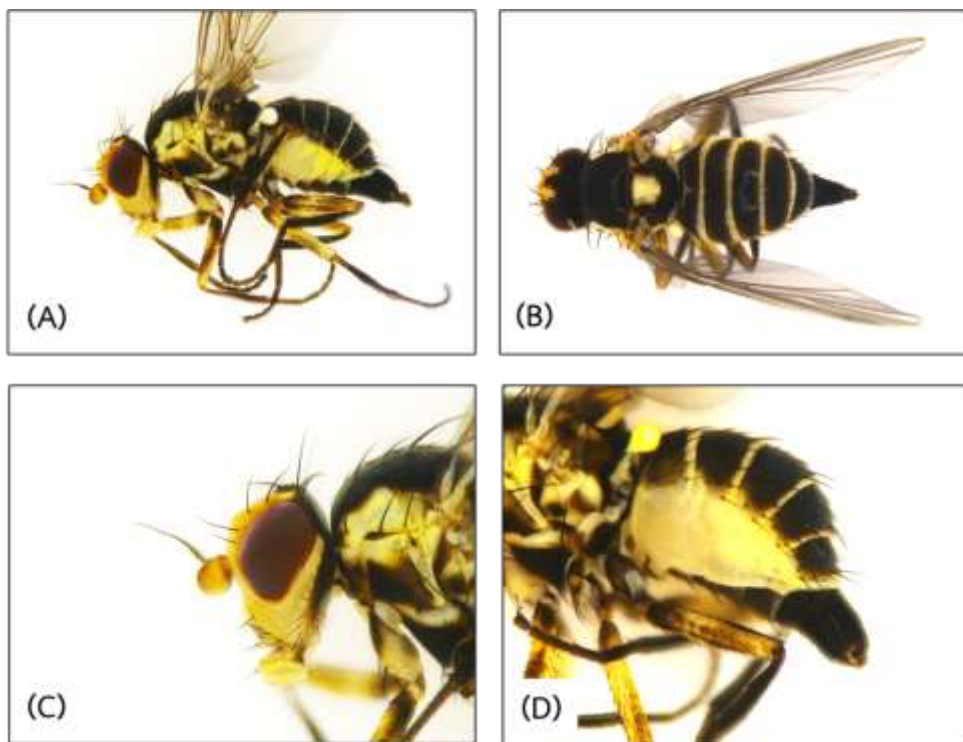


Figure 9 Adult of *Liriomyza huidrobrensis*

(A) head (B) thorax
(C) pronotum (D) abdomen

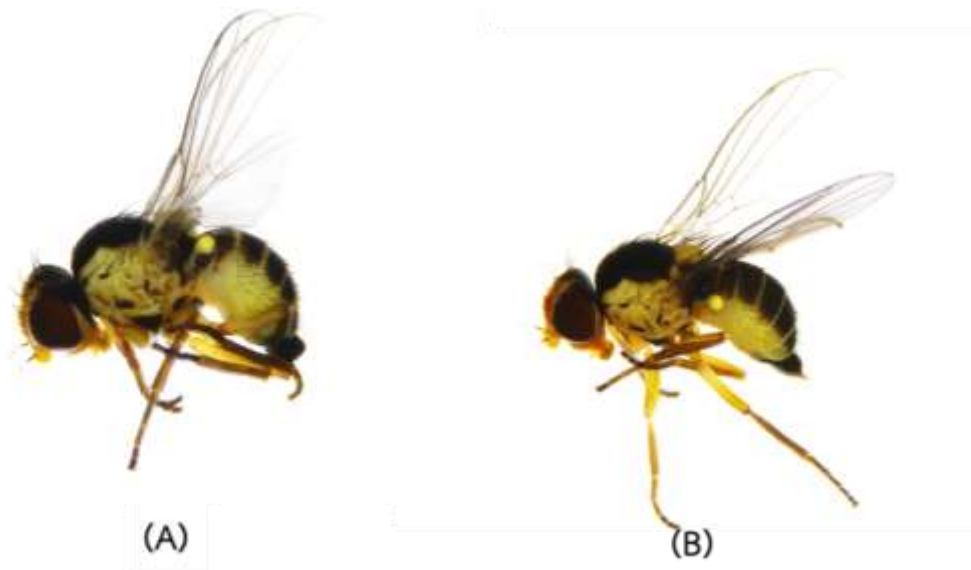


Figure 10 Adult of *Liriomyza sativae* (side view of typical)

(A) Male

(B) Female

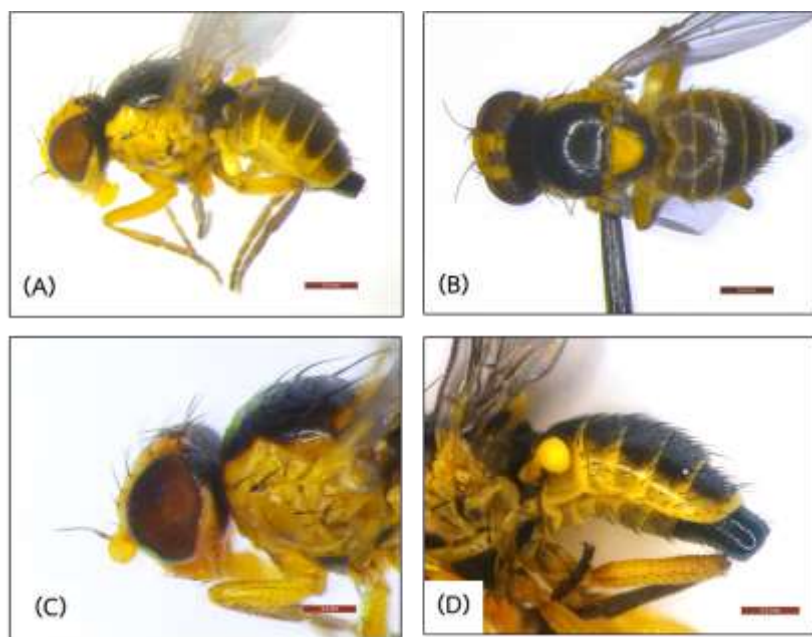


Figure 11 Adult of *Liriomyza sativae*

(A) head

(B) thorax

(C) pronotum

(D) abdomen

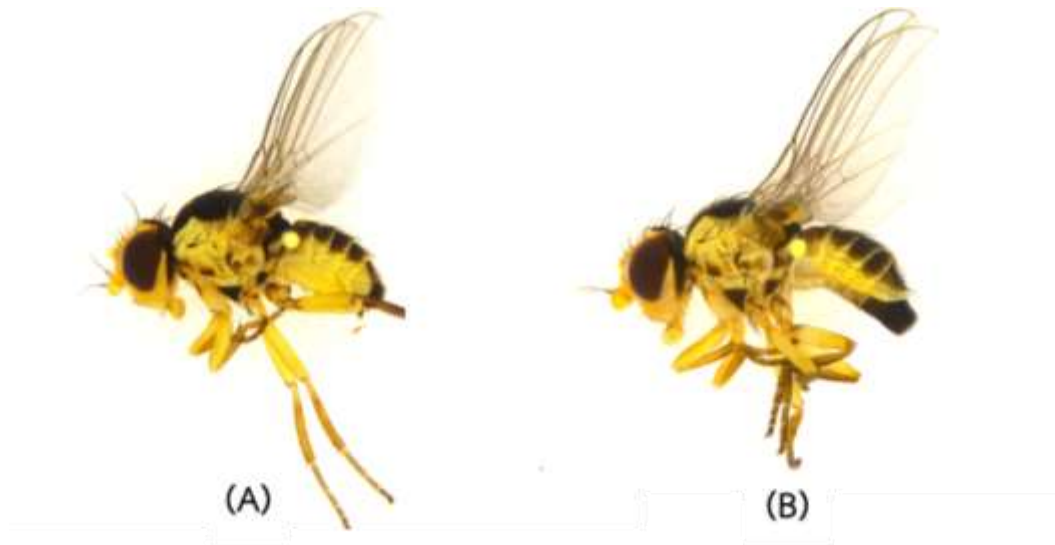


Figure 12 Adult of *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880) (side view of typical)

(A) Male

(B) Female

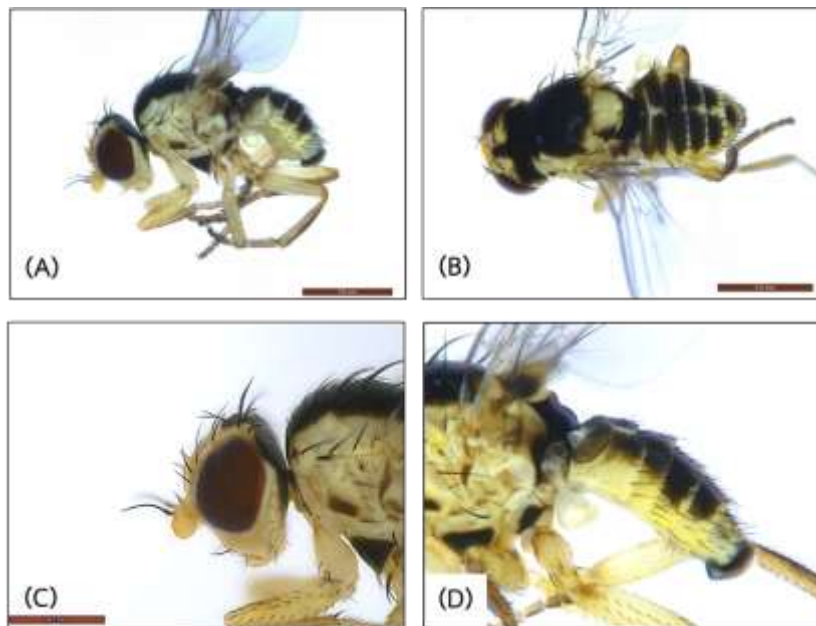


Figure 13 Adult of *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880)

(A) head

(B) thorax

(C) pronotum

(D) abdomen

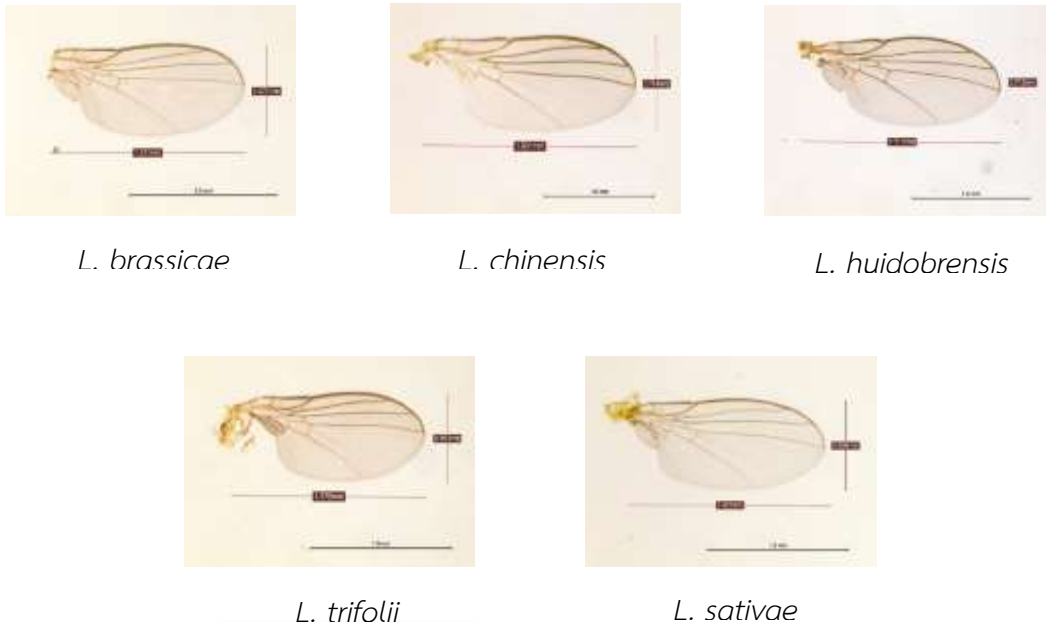


Figure 14 Wing length and width of five *Liriomyza* species

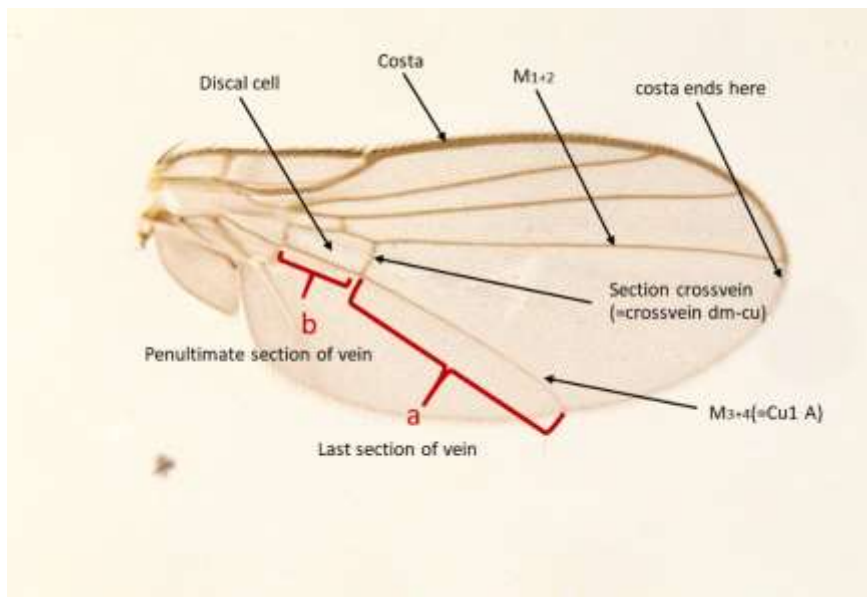


Figure 15 Wing venation of leafminer. Comparison of the wing patterns of *Liriomyza* species. The length of ultimate section of vein CuA₁ divided by penultimate section (a and b sections)

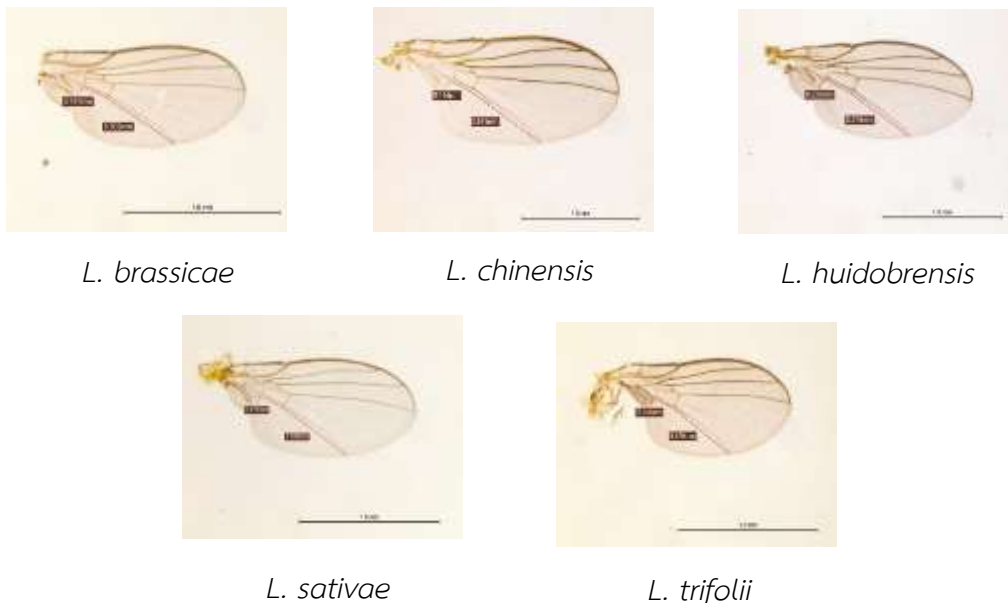


Figure 16 Comparison of the wing patterns of five *Liriomyza* species. The length of ultimate section of vein CuA_1 divided by penultimate section (a and b sections). Scale bar= 1 mm

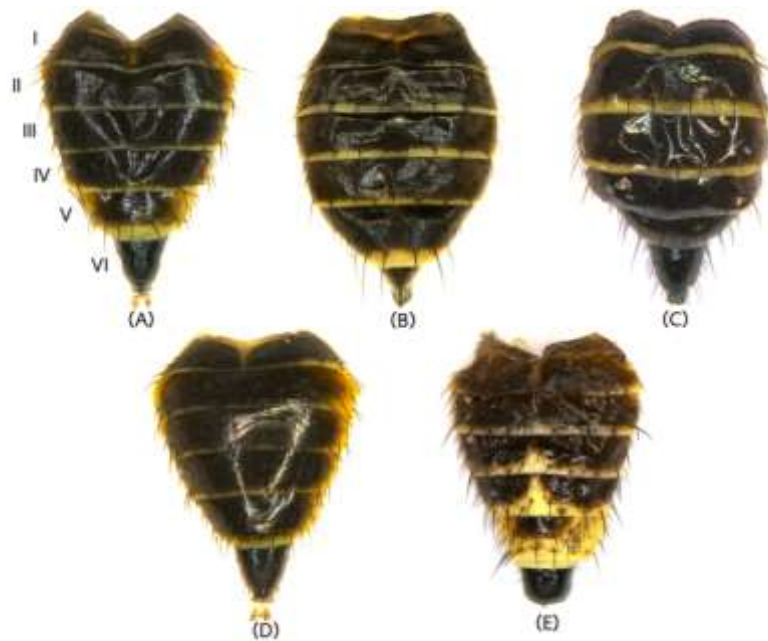


Figure 17 Diagrams of abdominal color patterns of five *Liriomyza* species. I to VI indicate the first to sixth visible abdominal tergites

- A) *L. brassicae* B) *L. chinensis*
 C) *L. huidobrensis* D) *L. sativae* E) *L. trifolii*

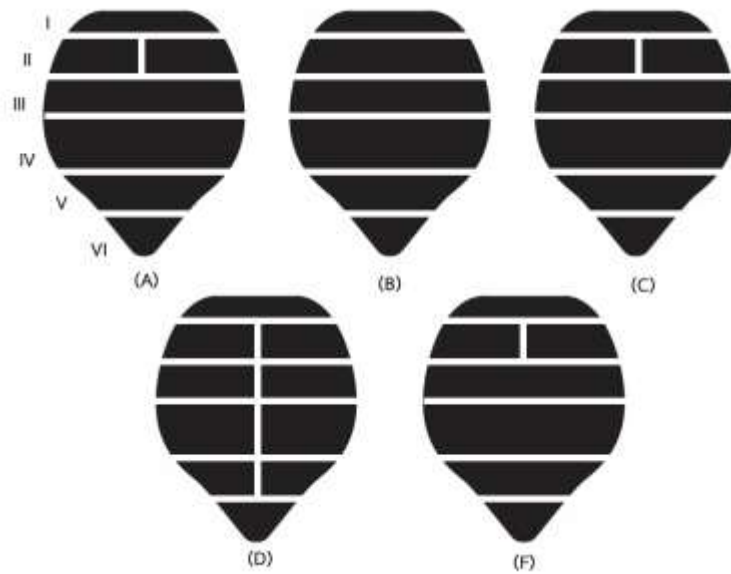


Figure 18 Diagrams of abdominal color patterns of five *Liriomyza* species. I to VI indicate the first to sixth visible abdominal tergites

(A) *L. brassicae*

(B) *L. chinensis*

(C) *L. huidobrensis*

(D) *L. trifolii*

(E) *L. sativae*

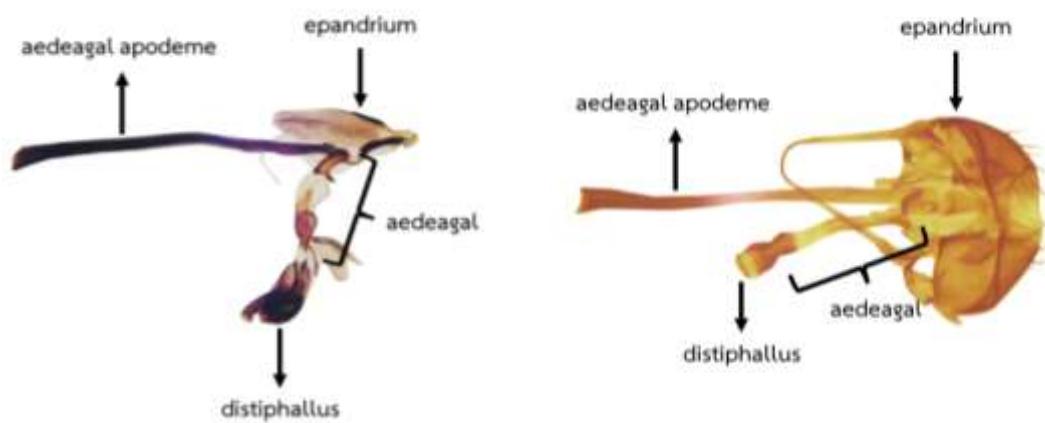


Figure 19 Male genitalia of leafminer

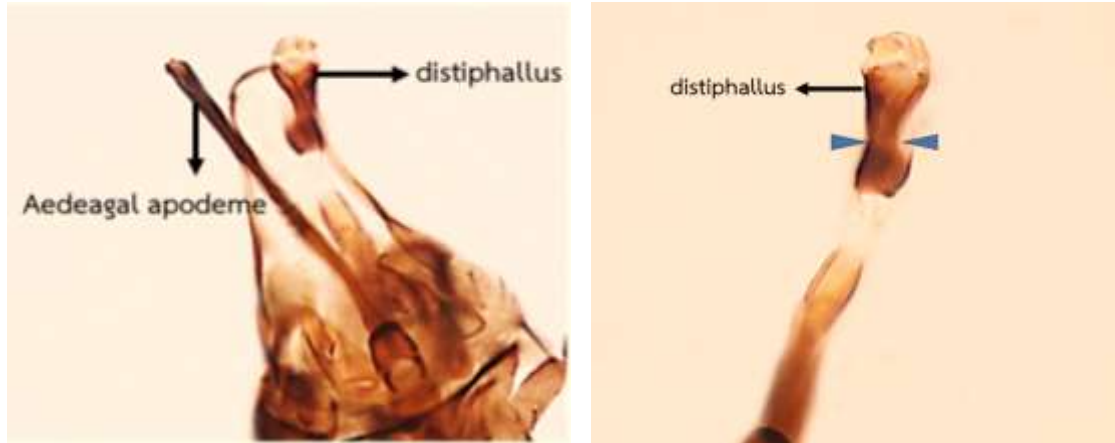


Figure 20 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza brassicae* (Riley) (lateral view). Arrows indicate the distiphallus

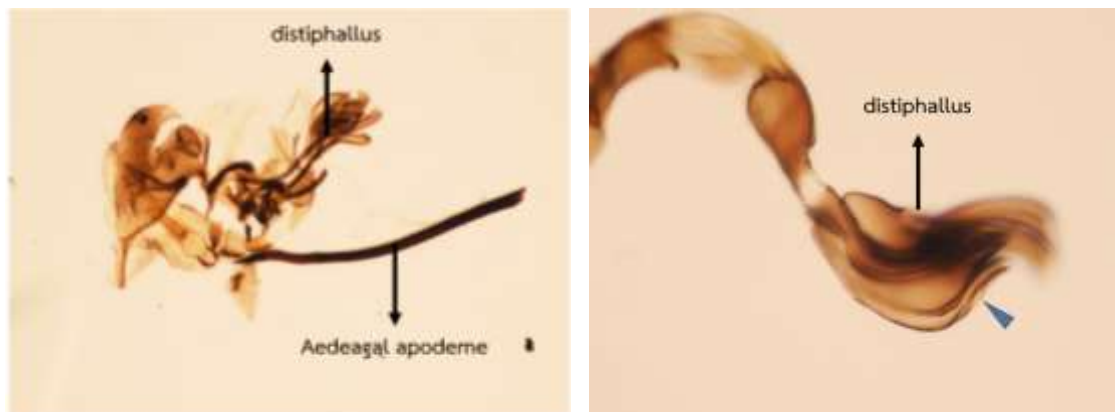


Figure 21 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza chinensis* (lateral view). Arrows indicate the distiphallus

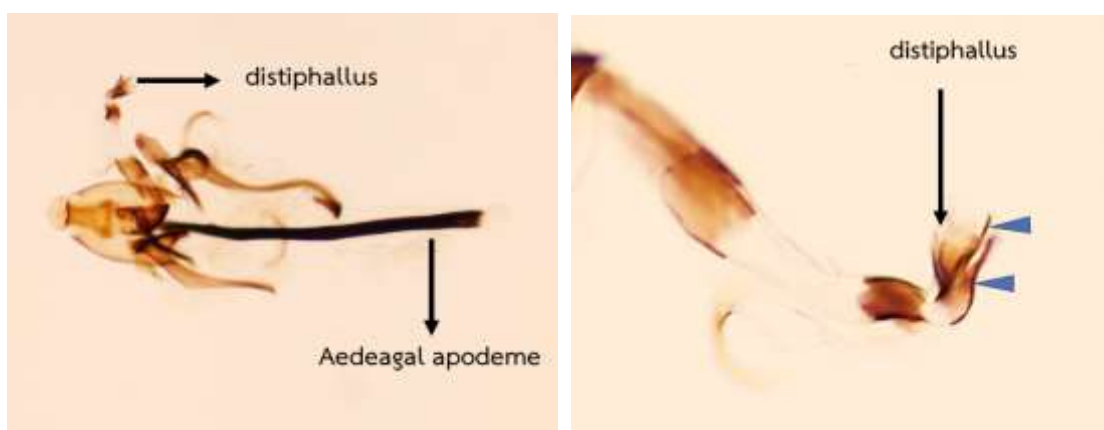


Figure 22 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza huidrobrensis* (lateral view). Arrows indicate the distiphallus



Figure 23 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza sativae* (lateral view).
Arrows indicate the distiphallus

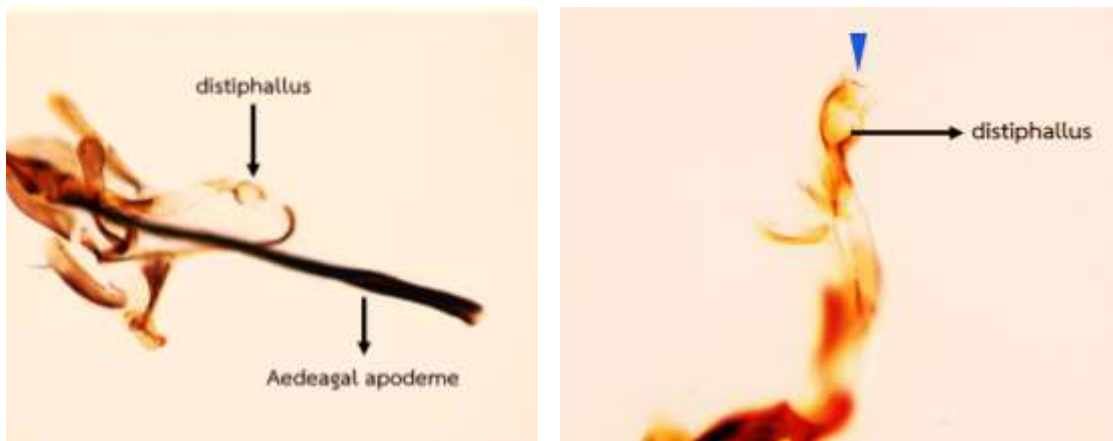


Figure 24 Male genitalia and phalluses of *Liriomyza trifolii* (lateral view).
Arrows indicate the distiphallus

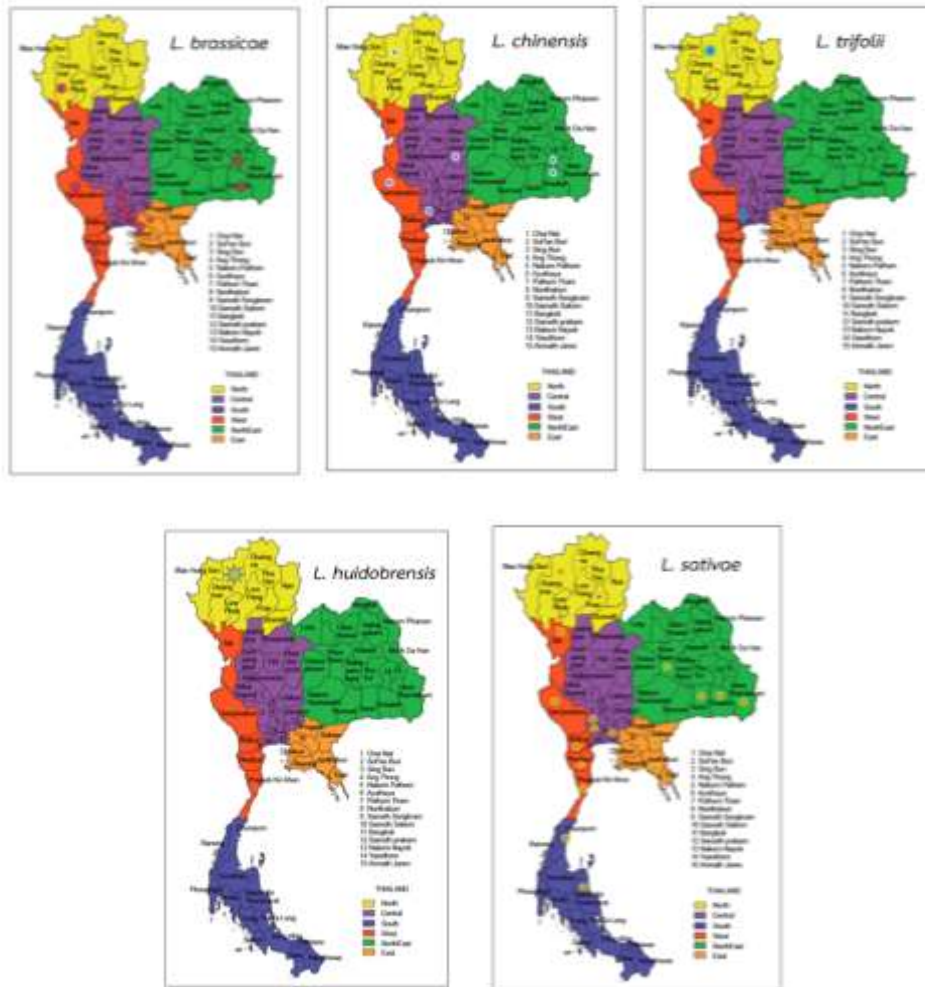


Figure 25 The distribution of leafminers in Thailand

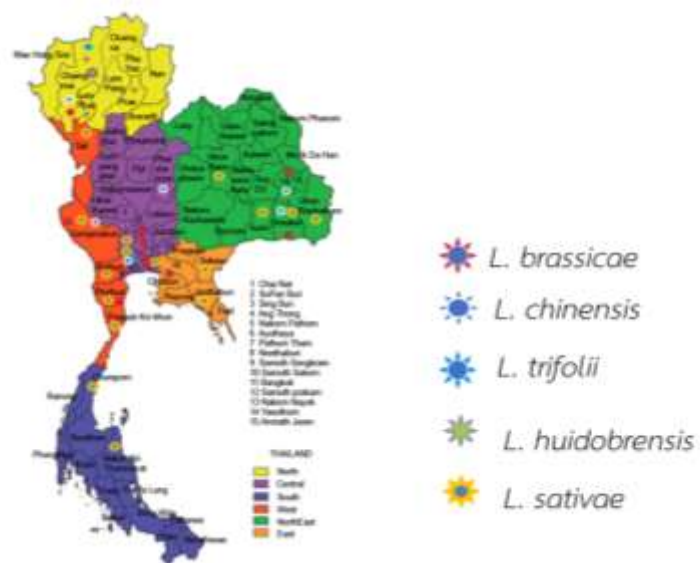


Figure 26 The distribution of leaf miners in Thailand

อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Oxyopidae

Taxonomic Study of Spider Fauna in Family Oxyopidae

วิมลวรรณ โชติวงศ์ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง อติติยา แก้วประดิษฐ์

ณพชกร ธโรชัย วีระชัย สมศรี

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Survey of spider in Family Oxyopidae from 9 provinces in Thailand from October, 2019 to September, 2021 was conducted. The results of identification revealed that there were 4 genera 6 species of including *Hamadruas* sp. *Hamataliwa* sp. *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) *Oxyopes javanus* Thorell, 1887 *Oxyopes shweta* Tikader, 1970 and *Peucetia viridana* (Stoliczka, 1869). The taxonomic character are used for identification such as eyes arrangement, endite, tooth arrangement and number on chelicerae, hair arrangement on legs, length legs, shape, pattern and marking on abdomen, the shape of palpus and epigyne etc.

Keywords : lynx spider, morphology, taxonomy

บทคัดย่อ

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ของประเทศไทยตั้งแต่วันที่ ๑ ตุลาคม ๒๕๖๒ ถึงสิ้นฤดูกันยายน ๒๕๖๔ บนพื้นที่ ๙ จังหวัด เพื่อนำมาศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะการจัดเรียงของตา ลักษณะของ endite ลักษณะการจัดเรียงของฟันและจำนวนฟันบน chelicerae การจัดเรียงของเส้นขนบนขา ความยาวของขา ลักษณะรูปร่างและลวดลายบนส่วนหลัง ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ฯลฯ ผลจากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานพบแมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ทั้งหมด ๔ สกุล ๖ ชนิดได้แก่ *Hamadruas* sp. *Hamataliwa* sp. *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) *Oxyopes javanus* Thorell, 1887 *Oxyopes shweta* Tikader, 1970 และ *Peucetia viridana* (Stoliczka, 1869)

คำหลัก : แมงมุมตาหกเหลี่ยม สัตววิทยา อนุกรมวิธาน

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-24-63



คำนำ

แมงมุมตาหกเหลี่ยม (lynx spider) เป็นแมงมุมที่อยู่ในวงศ์ Oxyopidae พบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1870 ลักษณะเด่นของแมงมุมวงศ์นี้คือมีลักษณะการจัดเรียงตาเป็นรูป 6 เหลี่ยมโดยตากลางคู่หน้ามีขนาดเล็กอยู่ด้านหน้า และ 6 ตาที่เหลือจะเรียงเป็นรูป 6 เหลี่ยม ขาวาว ผอม มีหนามยาวทั่วไป หากินกลางวันและกลางคืน เป็นแมงมุมที่มีสายตาดิบมาก เคลื่อนไหวได้ว่องไว สามารถตะครุบจับเหยื่อได้รวดเร็ว และกระโดดได้ไกลถึง 2-3 เซนติเมตร หรือมากกว่าเพื่อจับแมลงที่บิน ปัจจุบันจำแนกได้ 9 สกุล 456 ชนิด ซึ่ง 3 สกุลที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดประกอบด้วย *Oxyopes* Latreille, 1804 *Hamataliwa* Keyserling, 1887 และ *Peucetia* Thorell, 1869 ตามลำดับ (NMBE, 2021) และพบในประเทศไทยเพียง 3 ชนิด (Platnick, 2013)

การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมงมุมตาหกเหลี่ยมได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เช่น ทางตะวันออกของเท็กซัสได้ศึกษาประสิทธิภาพของแมงมุมตาหกเหลี่ยม *Peucetia viridans* (Hentz) ในฝ้ายและ woolly croton พบว่าสามารถควบคุม *Heliothis zea* (Boddie), *Alabama argillacea* (Hübner) และ cotton fleahopper, *Pseudatomoscelis seriatus* (Reuter) (Nyffeler et al., 1987) สำหรับในประเทศไทย *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) เป็นตัวห้ำที่มีความสำคัญและมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงวันผลไม้ ในสวนมะม่วงและพบมากบนวัชพืชริมท้องร่อง (วิภาดาและคณะ, 2551) นอกจากนี้ยังพบอาศัยหากินตามพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ เช่น นาข้าว และบริเวณคันนา พืชไร่ พืชสวน ไม้ดอกไม้ประดับต่าง ๆ บริเวณที่พบมากที่สุดคือ วัชพืชไต้หวันผลไม้ โดยเฉพาะหญ้าขน หญ้าไทร (วิภาดาและอัมพร, 2544)

วิมลวรรณและคณะ 2556 ได้ศึกษาอัตราการกินแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis*) (Hendel) ของแมงมุมตาหกเหลี่ยม: *O. lineatipes* (C. L. Koch, 1847) ในห้องปฏิบัติการและพบว่าแมงมุมตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศเมียและตัวเต็มวัยเพศผู้มีอัตราการกินสูงสุดเฉลี่ย 7.78 7.67 และ 6.53 ตัวต่อวันที่ระดับความหนาแน่นของแมลงวันผลไม้ 17 16 และ 16 ตัวต่อแมงมุม 1 ตัว ตามลำดับ ดังนั้นการศึกษานุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Oxyopidae จึงนับว่ามีความสำคัญที่ควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงจำนวนชนิดที่พบในประเทศไทย ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นพื้นฐานของการบริหารจัดการศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีจุดมุ่งหมายในการลดใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อความปลอดภัย ประหยัดและไม่เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ประกอบกับปัจจุบันไม่มีผู้ที่ศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของแมงมุมทางการเกษตรในประเทศไทย และการศึกษานุกรมวิธานของแมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ในประเทศไทยยังทำน้อยมาก สมควรศึกษานุกรมวิธานของแมงมุมวงศ์นี้เพื่อทราบจำนวนชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ เขตการแพร่กระจาย พืชอาศัย เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อเป็นแหล่งสืบค้นและเปรียบเทียบตัวอย่างต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง หลอดแก้วทดลอง ขวดดองตัวอย่างแมงมุม ขนาดต่าง ๆ กัน กล่องพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กัน กระดาษทิชชู ปากคีบ พู่กัน ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กัน

- อุปกรณ์ในการจำแนกชนิด ได้แก่ จานแก้ว petridish silica-gel สำหรับ column chromatography กล้องจุลทรรศน์ (stereomicroscope) tube ขนาดเล็ก ดินสอ ปากกา rotring เบอร์ 1, 2, 3 เอกสารด้านอนุกรมวิธานแมงมุมที่เกี่ยวข้อง สารเคมี ได้แก่ alcohol 95%, proteinase K, 10% KOH, chloroform, ethyl acetate

- อุปกรณ์ในการเขียนผลงานวิจัยและเผยแพร่ ได้แก่ อุปกรณ์ในการถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์ ติดตั้งด้วยกล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ วัสดุสำนักงาน

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2562-2564)

วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยแมงมุมตาหกเหลี่ยมเพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมงมุมตาหกเหลี่ยมจากพื้นที่แปลงมันสำปะหลัง สวนชมพู่ แปลงเกษตรกร และป่าในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างหลายวิธีการดังนี้

- การมองหาและจับโดยตรง (visual search) วิธีนี้เหมาะสำหรับจับแมงมุมทุกเวลาและสถานที่ จับแมงมุมโดยใช้หลอดทดลอง ฆ่าแมงมุมโดยใส่ก้อนสำลีในกล่องพลาสติกที่เลี้ยงแมงมุมหยุดเอทิลอะซิเตต 2-3 หยดลงบนก้อนสำลีเพื่อให้แมงมุมสลบ ดองแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75% เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างและนำไปจำแนกชนิดต่อไป

- การใช้ Beating tray โดยเขย่ากิ่งไม้ที่มีขนาดเล็กลงบนตัวถาดสำหรับรองรับแมงมุมจากนั้นแมงมุมจะตกลงในถาด โดย ถาดที่ใช้ทำมาจากผ้าดิบสีขาว รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 80x80 ซม. โดยนำไม้ไผ่ หรือท่ออลูมิเนียม ทำเป็นโครงรูปกากบาท นอกจากผ้าดิบที่นำมาทำถาดแล้วอาจจะใช้ร่มแทน ฆ่าและรักษาตัวอย่างแมงมุมดังข้อ 1

- การใช้สวิงโฉบ (Sweep net) ใช้สวิงจับแมลงโฉบแมงมุมที่อาศัยตามวัชพืช แมงมุมจะติดในสวิง จากนั้นเทแมงมุมบนกระดาษขาวที่ปูบนพื้นดิน ใช้หลอดแก้วค่อย ๆ จับแมงมุมใส่ในหลอดแก้วที่เตรียมไว้ ฆ่าและเก็บตัวอย่างแมงมุมเพื่อนำไปรักษาตัวอย่างดังข้อ 1

1.1 นำตัวอย่างที่ได้มาฆ่าด้วยขวดน็อกแมลงที่บรรจุด้วยสารเอทิลอะซิเตต จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75% เพื่อเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ต่อไป

1.2 บันทึกชื่อแมงมุม วันที่จับ สถานที่จับ ชื่อผู้เก็บ ลงในป้ายกระดาษแผ่นเล็ก ๆ แล้วใส่ลงในหลอดแก้วที่ดองแมงมุม

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน (ดำเนินการปี 2562-2564)

- วิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างออกจากขวดจากนั้นโดยใช้พู่กัน forceps และ needles ยึดขาแมงมุมให้กางออกให้ตรงจากนั้นนำตัวอย่างมาวางไว้ในจาน petridish ที่มี silica-gel สำหรับ column chromatography ที่ถูกแช่ด้วยแอลกอฮอล์ให้เต็ม นำไปตั้งไว้ใต้กล้อง Olympus SZH-ILLD stereomicroscope สำหรับ epigynum (อวัยวะเพศเมีย) จะใช้ needles เจาะรอบ ๆ epigynum จากนั้นจึงดึงออกมาแล้วนำไปแช่ใน proteinase K ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ต้องการออกไป แล้วจึงนำไปล้างในน้ำสะอาด เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจึงนำไปใส่ในสไลด์หลุมแล้วปิดด้วย cover slip แล้วนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม ส่วน pedipalps (อวัยวะเพศผู้) จะถูกดึงออกทางด้านซ้าย จากนั้นจึงนำไปต้มด้วย 10% KOH ที่อุณหภูมิ 60°C ประมาณ 5-10 นาที จนกระทั่ง pedipalp ขยายออก จึงนำไปศึกษาดูรายละเอียดใต้กล้อง stereomicroscope เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจะนำ pedipalps (อวัยวะเพศผู้) ใส่ใน tube ขนาดเล็กแล้วนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม

- การจำแนกชนิด

นำตัวอย่างแมงมุม epigynum (อวัยวะเพศเมีย) และ pedipalps (อวัยวะเพศผู้) มาเปรียบเทียบกับตำราต่าง ๆ โดยเฉพาะจากเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ The Spiders of China (Song *et al.*, 1999) และ Description of the lynx spiders of a canopy fogging project in northern Borneo (Araneae: Oxyopidae), with description of a new genus and six new species of *Hamataliwa* (Deeleman, 2009) จากนั้นบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน วัดความยาวของทั้งลำตัว ความยาวและความกว้างของ carapace (ส่วนหัวรวมกับส่วนอก) จำนวนฟัน ระยะห่างระหว่างตา ความยาวและความกว้างของ abdomen (ส่วนท้อง) ความยาวของขาทั้งหมด femur, patella, tibia, metatarsus, tarsus ถ่ายรูปและบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน จากนั้นทำคู่มือการจัดจำแนกชนิด (key) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจำแนก เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2562-กันยายน 2564

สถานที่ : 1) พื้นที่ 9 จังหวัด ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดกำแพงเพชร ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิ และอุบลราชธานี ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรี ราชบุรี ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมตาหกเหลี่ยม

ผลจากการสำรวจชนิดแมงมุมตาหกเหลี่ยมในประเทศไทยตามพื้นที่การเกษตร ได้แก่ สวนชมพู่ สวนมะม่วง สวนยางพารา พื้นที่ป่าธรรมชาติ เช่น ป่าข้างทาง ขอบชายป่า วัชพืช และน้ำตก (table 1) ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2562 ถึงสิ้นกันยายน 2564 ในพื้นที่ 9 จังหวัด พบแมงมุมตาหกเหลี่ยมในประเทศไทย 4 สกุล 6 ชนิด ได้แก่สกุล *Hamadruas* จำนวน 1 ชนิด คือ *Hamadruas* sp. สกุล *Hamataliwa* จำนวน 1 ชนิด คือ *Hamataliwa* sp. สกุล *Oxyopes* จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Oxyopes lineatipes* *Oxyopes javanus* และ *Oxyopes shweta* สกุล *Peucetia* จำนวน 1 ชนิด คือ *Peucetia viridana*

แมงมุมวงศ์ Oxyopidae หากินในเวลากลางวัน ส่วนมากมีพฤติกรรมซุ่มรอตกเหยื่อ ซึ่งแมงมุมตาหกเหลี่ยมสกุล *Oxyopes* ส่วนใหญ่ชอบอาศัยในบริเวณที่มีแหล่งหญ้าสูง ไม้พุ่มเตี้ย และพืชล้มลุกดังนั้นเมื่อใช้สวิงโฉบสามารถพบแมงมุมตาหกเหลี่ยมในสวิง 95% ซึ่งเมื่อพิจารณาจากปริมาณที่พบอาจสรุปได้ว่าแมงมุมชนิดนี้เป็นตัวทำที่สำคัญของแมลงตามแหล่งอาศัยดังกล่าว แต่สกุล *Hamataliwa* บางชนิดอาศัยอยู่กับเปลือกต้นไม้ กิ่งไม้และบางครั้งก็พบวิ่งตามพื้นดิน (Brady, 1970)

จากการสำรวจพบว่าประชากรของแมงมุมมีปริมาณและจำนวนชนิดลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจเน โดยสาเหตุเกิดมาจากแหล่งอาศัยเดิมได้มีการเปลี่ยนแปลงไป การใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชเพิ่มขึ้น และผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ (climate change)

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมตาหกเหลี่ยมในประเทศไทยเพื่อจำแนกชนิดตัวอย่างแมงมุมทั้งหมดที่เก็บได้ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะการจัดเรียงของตา ระยะห่างระหว่างตา ลักษณะของ carapace endite fovea sternum labium maxillae ความยาวของขา ลักษณะรูปร่างและลวดลายบนด้านหลังของส่วนท้อง อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย และแหล่งที่อยู่อาศัย พบแมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ทั้งหมด 4 สกุล 6 ชนิด สามารถจำแนกชนิดได้ 6 ชนิด ได้แก่ *Hamataliwa* sp. *Hamadruas* sp. *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) *Oxyopes javanus* Thorell, 1887 *Oxyopes shweta* Tikader, 1970 และ *Peucetia viridana* (Stoliczka, 1869) จากการศึกษาลักษณะการจัดเรียงของตา ระยะห่างระหว่างตาของแมงมุมวงศ์นี้ พบว่าตาแถวหน้ามีลักษณะโค้งลงยกเว้นในสกุล *Hamataliwa* โดยตากกลางคู่หน้า (anterior median eyes: AME) มีขนาดเล็กที่สุดและเล็กกว่าตาข้างคู่หน้า (anterior lateral eyes: ALE) ในขณะที่ตาแถวหลังมีลักษณะโค้งขึ้นโดยตากกลางคู่หลัง (posterior median eyes: PME) มีขนาดเท่ากับตาข้างคู่หลัง (posterior lateral eyes (PLE) แถวของตากกลางคู่หน้า (anterior lateral eyes: ALE) จะมีความกว้างน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแถวตาข้างคู่หน้า (anterior lateral eyes: ALE) ซึ่งแถวตาข้างคู่หน้ามีขนาดใกล้เคียงกับความกว้างของแถวตากกลางคู่หลัง (posterior median eyes: PME) ยกเว้นในสกุล *Hamataliwa* และ *Peucetia* จากการนับ

จำนวนฟันบนฐานเขี้ยว (chelicerae) พบฟันจำนวน 1 ซี่ ในสกุล *Hamadruas Hamataliwa* และ *Oxyopes* โดยไม่พบฟันในสกุล *Peucetia* เมื่อพิจารณาลักษณะของแผ่นแข็งด้านบน (carapace) พบว่าสกุล *Oxyopes* มีลักษณะนูนสูงและลาดเอียงลงมาที่ส่วนนอก ซึ่งสกุล *Hamataliwa* มีลักษณะนูนสูงกว่าทุกชนิดในขณะที่สกุล *Peucetia* มีลักษณะแบนกว่าทุกชนิด

ซึ่งแมงมุมสกุล *Oxyopes* ชนิด *O. shweta* และสกุล *Hamadruas* นับว่าเป็นสกุลที่ยังไม่มีตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์มาก่อน

สำหรับคู่มือการวินิจฉัยชนิดที่ใช้ในการจำแนกและลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมตาหกเหลี่ยมในวงศ์ Oxyopidae แต่ละสกุลมีดังนี้

1. Posterior row of eyes slightly procurved. Posterior lateral eyes further from the anterior lateral than from the posterior medians. The row of anterior lateral eyes wider than the row of posterior medians. Retromargin of cheliceral fang furrow without teeth. (Body bright green in life)..... *Peucetia*
- Posterior row of eyes strongly procurved; posterior lateral eyes about as far from the anterior laterals as from the posterior medians. The row of anterior lateral eyes subequal in length to the row of posterior medians or else narrower. Retromargin of cheliceral fang furrow with one tooth. (Body in life not green)..... 2
2. Distance between PME subequal to distance between PME and PLE on each side. Leg IV robust, obviously longer than leg III *Oxyopes*
- Distance between PME much greater than distance from PME to PLE on each side. Leg IV small, subequal in size to leg III. 3
3. Carapace dorsally straight in lateral view rectangular, spider length 3-9 mm, abdomen rarely with geometric color pattern.....*Hamataliwa*
- carapace dorsally with saddle, spider length 7-15 mm, abdomen dorsally often with geometric color pattern..... *Hamadruas*

วงศ์ Oxyopidae Thorell, 1869 (แมงมุมตาหกเหลี่ยม, lynx spiders)

แมงมุมวงศ์ Oxyopidae มาจากภาษากรีกแปลว่ามีสายตาที่เฉียบคม พบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1869 โดยเขาได้จำแนกออกเป็น 2 สกุล ได้แก่ สกุล *Peucetia* และ สกุล *Oxyopes* ต่อมาปี 1894 Urquhart ได้ย้ายไปอยู่ในวงศ์ Toxopidae สกุล *Laestrygones* แมงมุมวงศ์นี้มีการจัดเรียงตาที่เป็นเอกลักษณ์ที่มีลักษณะโดดเด่นที่ไม่เหมือนกับแมงมุมวงศ์อื่น โดยมีการจัดเรียงเป็น 4 แถว (2-2-2-2) เป็นรูปหกเหลี่ยมโดยตากลางคู่หน้า (anterior median eyes: AME) มีขนาดเล็กที่สุดอยู่ด้านหน้า และอีก 6 ตาที่เหลือจะเรียงเป็นรูป 6 เหลี่ยม พื้นที่ระหว่างตาแถวหน้าและฐานเขี้ยว (clypeus) มีความกว้างมากกว่าระยะห่างของตากลางคู่หน้าเป็นอย่างมากจึงทำให้เห็นว่าพื้นที่ส่วน

clypeus มีความสูง ฐานเขี้ยว (chelicerae) มี boss และมีขนที่มีลักษณะเป็นปุยอัดแน่น (scopula) ไม่มีฟันหรือมีฟันจำนวน 1 ซี่ labium ยาวและเคลื่อนไหวได้ maxillae ขนานกันและมี scopulae ไม่มีแผ่นแข็งลักษณะคล้ายตะแกรงอยู่ด้านหน้าอวัยวะปั่นเส้นใย (cribellum) มีขนลักษณะโค้งเรียงเป็นแถวลักษณะคล้ายหวี (calamistrum) และมี colulus มีอวัยวะสร้างเส้นใย (spinneret) จำนวน 6 อัน นอกจากการจัดเรียงตาที่เป็นเอกลักษณ์แล้วการที่มีขนแข็งลักษณะเกือบตั้งตรงที่บริเวณขาจำนวน มากจัดว่าเป็นลักษณะเด่นอีกประการหนึ่งของแมงมุมวงศ์นี้ ขาลักษณะยาว ผอม มีหนามยาวกระจาย ทั่วทุกขา และมีเกล็ดขนที่มีลักษณะแบน มีขนที่มีลักษณะคล้ายเส้นตรง (trichobotria) จำนวน 2 แถวที่ขาปล้องที่ 5-7 (tibia metatarsus และ tarsus) มีเล็บ (claw) จำนวน 3 เล็บ tracheal spiracle ตั้งอยู่ใกล้กับอวัยวะสร้างเส้นใย (spinneret) ปลายท้องเรียวยาวแหลม แมงมุมวงศ์นี้มีสายตาดี มากและมีนิสัยว่องไว Gajbe (2008) รายงานว่าแมงมุมวงศ์นี้มีขาหลังแข็งแรงได้รับการพัฒนามาอย่าง ดีจึงทำให้สามารถกระโดดได้ไกลและเคลื่อนไหวรวดเร็ว แมงมุมตาหกเหลี่ยมมหากินโดยการกระโดด ตะครุบเหยื่อและไม่สร้างเส้นใยดักเหยื่อ มีนิสัยออกหากินเวลากลางวัน ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ตามหญ้า และพุ่มไม้ สามารถพบได้ทั่วไป โดยทั่วไปมีลำตัวขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ (5-23 มิลลิเมตร) เพศผู้ และเพศเมียมีขนาดลำตัวใกล้เคียงกัน แมงมุมมีกวางไข่อันบริเวณกึ่งไม้และถักเส้นใยสีขาวคลุมกลุ่มไข่ แม่ แมงมุมจะเฝ้ากลุ่มไข่จนกว่าไข่จะฟักออกมาเป็นตัวอ่อน ปัจจุบัน World Spider Catalog (2021) รายงานว่าเป็นวงศ์ที่ประกอบด้วยสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วจำนวน 9 สกุล 442 ชนิด

สกุล *Hamadruas* Deeleman-Reinhold, 2009

Type: *Oxyopes hieroglyphicus* Thorell, 1887 เพศเมีย

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

แมงมุมสกุลนี้มีลำตัวขนาดใหญ่ โดยทั่วไปเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ แมงมุมสกุลนี้ แตกต่างจากสกุล *Hamataliwa* โดยส่วนหัวรวมกับส่วนอก (cephalothorax) มีลักษณะลาดชันหรือ มีลักษณะคล้ายอานม้า เมื่อก่อนเคยจัดจำแนกอยู่ในสกุล *Oxyopes* หรือ *Tapponia* มาก่อน ขามีลักษณะยาวกว่า สกุล *Hamataliwa* มีความยาวของขาเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 1234 และมีรูปร่างส่วนท้องแตกต่างจากสกุล *Hamataliwa* ปัจจุบันมีสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้ว ทั้งหมด 9 ชนิด

Hamadruas sp. (Figure 2)

ชื่อสามัญ: Lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: ตัวอ่อนเพศเมีย 15 มิลลิเมตร

หัวและอก (Cephalothorax): เพศเมีย; สีน้ำตาลเข้ม ลักษณะนูน มีความยาวมากกว่า ความกว้างเล็กน้อย พื้นที่ส่วนหัวยกสูงขึ้นและถูกปกคลุมด้วยขนสั้น ๆ สีน้ำตาลออกดำและสีน้ำตาล ตาจำนวน 8 ตา (รูป 2 B) สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes ตากลางคู่หน้า (anterior median eyes: AME) มีขนาดเล็กที่สุด มีการจัดเรียงตา 4 แถว (2-2-2-2) โดยตาแถวด้านหน้าเรียงตัว



โค้งงอ (recurved) เล็กน้อย ตาแถวด้านหลังเรียงตัวโค้งขึ้น (procurved) เล็กน้อย ตาแต่ละข้างมีระยะห่างระหว่างตาเท่ากัน พื้นที่ระหว่างตาแถวหน้าและฐานเขี้ยว (clypeus) ยาวและกว้าง มีเส้นขนสีดำ 2 เส้นลากจากตากลางคู่หน้าจนถึงฐานของเขี้ยวตัวรูป 2 B แผ่นแข็งด้านล่าง (sternum) ลักษณะเป็นรูปหัวใจตัวรูป 2E และมีด้วยขนและหนามที่มีขนาดเล็กกระจายอยู่เล็กน้อย ฐานเขี้ยว (chelicerae) มีฟันแถวหน้าจำนวน 1 ซี่ แถวหลังจำนวน 1 ซี่ ขาลักษณะยาวแข็งแรงมีสีน้ำตาลเข้มถูกปกคลุมไปด้วยขนและหนามขนาดยาวเห็นอย่างเด่นชัดกระจายอยู่ทั่วทุกขา ความยาวของขาเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 1234

ท้อง (Abdomen): เพศเมีย; สีน้ำตาลเข้มออกดำ และมีลวดลายด้านบนของส่วนท้องมีความยาวมากกว่าความกว้างและเรียวแคบลงไปทางด้านปลายของส่วนท้องและถูกปกคลุมไปด้วยเส้นขนสีน้ำตาลเข้มออกดำ ตัวรูป 2 A epigynum และ vulva ตัวรูป 2 D

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): ในประเทศไทยสามารถพบได้ที่จังหวัดสระบุรี

สกุล *Hamataliwa* Keyserling, 1887

Type: *Hamataliwa grisea* Keyserling, 1887 เพศเมีย

ชื่อพ้อง :

ถูกจำแนกชนิดและพิจารณาให้เป็น senior synonym ของสกุล *Oxyopeidon* โดย Bryant ในปี 1948 และ Simon ในปี 1898 และเคยถูกเปลี่ยนเป็นสกุล *Megullia* โดย Thorell ในปี 1897 และมีสมาชิกในสกุลนี้จำนวน 1 ชนิด คือ *Hamataliwa sikkimensis* (Tikader, 1970) ต่อมาถูกย้ายไปอยู่ในสกุล *Hamadruas* ซึ่งปัจจุบันมีสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วทั้งหมด 83 ชนิด

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

โดยทั่วไปแมงมุมสกุลนี้มีลำตัวขนาดเล็กกว่าสกุล *Hamadruas* และ *Oxyopes* ลักษณะยกสูงและนูนกลมด้านข้างจะเห็นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส แผ่นแข็งด้านบน (carapace) ถูกปกคลุมไปด้วยขนยาวสีน้ำตาลเข้มและมีขนปุยฟูลักษณะคล้ายผมทรงโมฮอกที่บริเวณพื้นที่ตาโดยอยู่ระหว่างตาข้างคู่หน้าและตาข้างคู่หลัง ตามีสีดำ ตากลางคู่หน้า (anterior median eyes: AME) มีขนาดเล็กที่สุดและอยู่ใกล้กันมากกว่าสกุล *Oxyopes* ตากลางคู่หลัง (posterior median eyes: PME) และตาข้างคู่หลัง (posterior lateral eyes: PLE) มีขนาดเกือบเท่ากันและมีขนาดใหญ่กว่าตากลางคู่หน้า แถวของตาข้างคู่หน้า (anterior lateral eyes: ALE) มีความกว้างมากกว่าแถวของตากลางคู่หลัง แถวของตาข้างคู่หลังมีความกว้างมากที่สุด maxillae มีขนาดยาวกว่า labium มีเส้นสีดำตรงด้านหลังของขาปล้องที่สาม (femur) ขาปล้องที่สี่ (patella) ห้า (tibia) และหก (metatarsus) ถูกปกคลุมด้วยขนยาวจำนวนมากและมีขนตั้งตรงบริเวณด้านหลังและด้านข้าง ความยาวของขาเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 1234 โดยขาคู่ที่หนึ่งมีลักษณะยาวและแข็งแรง ขาคู่ที่สามมีขนาดเกือบเท่ากับหรือใหญ่กว่าขาคู่ที่สี่ ส่วนใหญ่มีขนยาวที่บริเวณด้านข้างของขาแต่ละข้าง ส่วนท้องมีลักษณะเป็นรูปไข่มากกว่าสกุล *Oxyopes* และ *Peuceitia* หรือด้านบนของส่วนท้องมีลักษณะกว้างและมีปลายตัดที่ด้านปลายของส่วนท้องและมีขนยาวบริเวณด้านข้างของส่วนท้อง

Hamataliwa sp. (Figure 3)

ชื่อสามัญ: Lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: ตัวอ่อนเพศเมีย 8 มิลลิเมตร

หัวและอก (Cephalothorax): เพศเมีย; สีน้ำตาลเข้มออกดำ ส่วนหัวมีแต้มขนสีขาว 3 จุดที่บริเวณตรงกลาง ด้านซ้ายและด้านขวา มีเส้นสีขาวที่ขอบด้านท้ายของหัวและส่วนอก ส่วนหัวและส่วนอกมีความยาวมากกว่าความกว้างเล็กน้อย แผ่นแข็งด้านบน (carapace) มีลักษณะนูน ตาจำนวน 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 4 แถว (2-2-2-2) โดยตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยมดังรูป 3 F มีเส้นสีดำ 2 เส้นลากจากตากลางคู่หน้าจนถึงฐานเขี้ยว (chelicerae) ไม่มีฟันบนฐานเขี้ยว (chelicerae) ขาสีน้ำตาล มีจุดสีดำ และมีหนามขนาดยาวกระจายอยู่ทั่วทุกขา ดังรูป 3 A และ 3B ความยาวของขาเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ 1234

ท้อง (Abdomen): เพศเมีย; สีน้ำตาลเข้มออกดำ มีความยาวมากกว่าความกว้าง ปลายท้องแหลม มีลายสีเนื้อด้านบนของส่วนท้องดังรูป 3 A epigynum และ vulva ดังรูป 3 E

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อเมริกากลางและอเมริกาเหนือ แคริบเบียน และเวเนซุเอล่า ในประเทศไทยสามารถพบได้ที่จังหวัด นครราชสีมา สระบุรี ขอนแก่น กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี สุราษฎร์ธานี

สกุล *Oxyopes* Latreille, 1804

Type: *Aranea heterophthalma* Latreille, 1804 เพศผู้

ชื่อพ้อง :

เดิมถูกตั้งชื่อเป็น *Oxyopes* โดย Latreille ในปี 1804 พบสมาชิกจำนวน 14 ชนิดได้ถูกย้ายไปอยู่ในวงศ์ *Hamataliwa* และมีเพียง 2 ชนิดที่ถูกย้ายไปอยู่ในวงศ์ *Hamadruas* ตัวอย่างแมงมุมที่ถูกย้ายไปอยู่วงศ์ *Hamataliwa* เช่น *Oxyopes banksi* Mello-Leitão, 1928 ย้ายไปเป็น *Hamataliwa banksi*, *Oxyopes clypeatus* F. O. Pickard-Cambridge, 1902 ย้ายไปเป็น *Hamataliwa tricuspadata* สำหรับตัวอย่างแมงมุมที่ถูกย้ายไปอยู่ในวงศ์ *Hamadruas* เช่น *Oxyopes pupulus* Thorell, 1890 ย้ายไปเป็น *Hamadruas pupulus*, *Oxyopes sikkimensis* Tikader, 1970 ถูกย้ายไปเป็น *Hamadruas sikkimensis* และมีสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วทั้งหมด 291 ชนิด

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

ส่วนหัวรวมกับส่วนอก (cephalothorax) มีลักษณะนูนและยกสูง พื้นที่ส่วนหัวยกสูงขึ้นเล็กน้อยและลาดเทลงไปทางพื้นที่ส่วนอก ตามีสีดำ ตากลางคู่หน้า (anterior median eyes: AME) และตาข้างคู่หลัง (posterior lateral eyes: PLE) มีขนาดเกือบเท่ากันโดยตาข้างคู่หน้า (anterior lateral eyes: ALE) มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม พื้นที่ระหว่างตาแถวหน้าและฐานเขี้ยว (clypeus) มีลักษณะยาวและมีเส้นสี

คำ 2 เส้นลากจากตากกลางคู่หน้าจนถึงฐานของเขี้ยว ฐานเขี้ยว (chelicerae) มีลักษณะยาวมากและเรียวเล็กไปทางส่วนปลาย เขี้ยว (fangs) มีลักษณะสั้น ฐานเขี้ยว (chelicerae) มีฟันที่ขอบด้านหน้า 1 ซี่ ด้านหลัง 1 ซี่ labium ยาวมากกว่ากว้าง maxillae ยาวมากกว่า labium ส่วนท้องมีขนาดยาวและเรียวเล็กไปทางส่วนปลาย ขายาวและมีหนามขนาดสั้นกระจายทั่วทุกขา

Oxyopes javanus Thorell, 1887 (Figure 4)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Eugène Louis Simon ในปี 1885 โดยจำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็น *Oxyopes lineatipes* ต่อมา Thorell (1887) ได้ทำการสำรวจแมงมุมที่ประเทศพม่าและได้พบแมงมุมตาหกเหลี่ยมจึงได้ศึกษาอนุกรมวิธานและจำแนกชนิดใหม่โดยศึกษาจากแมงมุมเพศเมียและพบว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนจึงได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Oxyopes javanus* จากนั้นก็ได้มีการพบแมงมุมชนิดนี้ในอีกหลายประเทศ เช่น มาเลเซีย (Workman, 1896) ไทย (Okuma, 1968) จีน (Hu, 1980) อินเดีย (Tikader and Biswas, 1981) บังคลาเทศ (Biswas and Raychaudhuri, 2015)

ชื่อพ้อง :

Oxyopes lineatipes Simon, 1885

Oxyopes javanus Thorell, 1887

Oxyopes javanus Nentwig et al., 2019

ชื่อสามัญ: Lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศเมีย 7-8 มิลลิเมตร

หัวและอก (Cephalothorax): เพศเมีย; สีเหลืองแกมเขียว มีความยาวมากกว่าความกว้าง พื้นที่ของส่วนหัวยกขึ้นเล็กน้อยโดยไม่มีเส้น fovea ตาจำนวน 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes ตาแถวด้านหน้าเรียงตัวโค้งลง (recurved) ตาแถวด้านหลังเรียงตัวโค้งขึ้น (procurved) มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 2-4-4 โดยตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยมดังรูป 4 B พื้นที่ระหว่างตาแถวหน้าและฐานเขี้ยว (clypeus) ลักษณะยาวมีเส้นสีดำ 2 เส้นลากจากตากกลางคู่หน้าจนถึงฐานของเขี้ยวดังรูป 4 C และมีเส้นสีน้ำตาลแดง 2 เส้นลากจากตาข้างคู่หลังไปจนถึงขอบด้านหลังของ cephalothorax มีเส้นรอยร้าวสีน้ำตาลเข้มที่ด้านข้างของ cephalothorax ทั้ง 2 ด้านดังรูป 4 B ฐานเขี้ยว (chelicerae) มีสีน้ำตาล มีฟันแถวหน้าจำนวน 1 ซี่ แถวหลังจำนวน 1 ซี่ maxillae สีน้ำตาลอ่อนมีความยาวมากกว่าความกว้าง labium สีน้ำตาลอ่อนแผ่นแข็งด้านล่าง (sternum) มีความยาวมากกว่าความกว้างและมีรูปร่างคล้ายรูปหัวใจ ขาสีเหลืองทอง มีหนามแข็งแรงสีดำกระจายอยู่ทั่วทุกขา ดังรูป 4 A โดยเรียงลำดับความยาวของขาจากมากที่สุดไปน้อยที่สุดดังนี้ 1423

ท้อง (Abdomen): เพศเมีย; รูปร่างคล้ายทรงกระบอก สีเหลืองแกมเขียว มีความยาวมากกว่าความกว้าง ด้านหลังมีสัญลักษณ์คล้ายปลายหอกบริเวณด้านหน้าของส่วนท้องจนถึงกึ่งกลางของส่วนท้อง มีริ้วสีน้ำตาลเข้มที่ด้านข้างของส่วนท้อง epigynum และ vulva ลักษณะคล้ายรูปตัว V ดังรูป 4 D

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย บังคลาเทศ อินโดนีเซีย (จาวา) ฟิลิปปินส์ จีน ในประเทศไทยสามารถพบที่จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิ อุบลราชธานี ระยอง กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี

Oxyopes lineatipes (C. L. Koch, 1847) (Figure 5)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Carl Ludwig Koch ในปี 1847 โดยจำแนกชนิดเป็น *Sphasus lineatipes* ต่อมา Simon (1864) ได้จำแนกชนิดใหม่และเปลี่ยนชื่อเป็น *Oxyopes lineatipes* Chamberlin (1924) สำรวจแมงมุมจากประเทศจีนและพบแมงมุมตาหกเหลี่ยมเพศผู้และได้จำแนกชนิดผิดเป็น *Argiope viabilior* ตั้งแต่ปี 1951 จนกระทั่งถึงปัจจุบันก็ได้ใช้ชื่อ *Oxyopes lineatipes* ชื่อพ้อง :

Sphasus lineatipes C. L. Koch, 1847

Oxyopes lineatipes Simon, 1864

Argiope viabilior Chamberlin, 1924

Oxyopes lineatipes Yin et al., 2012

ชื่อสามัญ: Lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศเมีย 11 มิลลิเมตร

หัวและอก (Cephalothorax): เพศเมีย; สีเหลืองแกมเขียว มีความยาวมากกว่าความกว้าง พื้นที่ของส่วนหัวยกขึ้นเล็กน้อยโดยไม่มีเส้น fovea ตาจำนวน 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes ตาแถวด้านหน้าเรียงตัวโค้งลง (recurved) ตาแถวด้านหลังเรียงตัวโค้งขึ้น (procurved) มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 2-4-4 โดยตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยมดังรูป 5 A พื้นที่ระหว่างตาแถวหน้าและฐานเขี้ยว (clypeus) ลักษณะยาวมีเส้นสีดำ 2 เส้นลากจากตากกลางคู่หน้าจนถึงฐานของเขี้ยวดังรูป 5 B และมีเส้นสีน้ำตาลดำ 2 เส้นลากจากตาข้างคู่หลังไปจนถึงขอบด้านหลังของ cephalothorax มีเส้นรอยริ้วสีน้ำตาลเข้มที่ด้านข้างของ cephalothorax ทั้ง 2 ด้านดังรูป 5 A และ B ฐานเขี้ยว (chelicerae) มีสีน้ำตาล มีฟันแถวหน้าจำนวน 1 ซี่ แถวหลังจำนวน 1 ซี่ maxillae สีน้ำตาลอ่อนมีความยาวมากกว่าความกว้าง labium สีน้ำตาลอ่อน แผ่นแข็งด้านล่าง (sternum) รูปร่างคล้ายรูปหัวใจมีความยาวมากกว่าความกว้างและมีขนยาวตั้งตรงกระจายอยู่เล็กน้อย ขาสีเหลืองทอง มีหนามแข็งแรงสีดำกระจายอยู่ทั่วทุกขา ดังรูป 5 A โดยเรียงลำดับความยาวของขาจากมากที่สุดไปน้อยที่สุดดังนี้ 1423

ท้อง (Abdomen): เพศเมีย; รูปร่างคล้ายทรงกระบอก สีเหลืองแกมเขียว มีความยาวมากกว่าความกว้าง ด้านหลังมีสัญลักษณ์คล้ายปลายหอกบริเวณด้านหน้าของส่วนท้องจนถึงกึ่งกลางของส่วนท้อง มีริ้วสีน้ำตาลดำสลับสีขาวที่ด้านข้างของส่วนท้อง epigynum และ vulva มีลักษณะคล้ายรูปเกือกม้าดังรูป 5 D

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): จีน ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย (สุมาตรา จาวา) และไทย ในประเทศไทยสามารถพบที่จังหวัดกำแพงเพชร นครราชสีมา ระยอง กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และสุราษฎร์ธานี

Oxyopes shweta Tikader, 1970 (Figure 6)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกในประเทศอินเดียโดย Tikader, B.K. ในปี 1970 โดยจำแนกชนิดเป็น *Oxyopes shweta* และใช้ชื่อนี้ต่อเนื่องจนกระทั่งถึงปัจจุบัน

ชื่อสามัญ: White lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศเมีย 12 มิลลิเมตร

หัวและอก (Cephalothorax): เพศเมีย; ลักษณะนูน มีความยาวมากกว่าความกว้าง มีแถบสีขาวปกคลุมตั้งแต่ตาข้างด้านหน้าไปจนกระทั่งถึงด้านปลายของแผ่นแข็งด้านบน (carapace) และมีขอบสีเหลืองส้มออกสีน้ำตาลล้อมรอบ พื้นที่ส่วนหัวยกสูงขึ้นและถูกปกคลุมด้วยขนละเอียด fovea มีลักษณะเด่นชัด ตาจำนวน 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes ตาข้างคู่หน้า (anterior lateral eyes: ALE) มีขนาดใหญ่ที่สุดและตากกลางคู่หน้า (anterior median eyes: AME) มีขนาดเล็กที่สุด มีมีการจัดเรียงตา 4 แถว (2-2-2-2) โดยตาแถวด้านหน้าเรียงตัวโค้งลง (recurved) ตาแถวด้านหลังเรียงตัวโค้งขึ้น (procurved) และมีระยะห่างเท่ากัน โดยตาแถวแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แถวที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยมดังรูป 6 C พื้นที่ระหว่างตาแถวหน้าและฐานเขี้ยว (clypeus) มีลักษณะยาวและมีเส้นสีดำ 2 เส้นลากจากตากกลางคู่หน้าจนถึงฐานของเขี้ยวดังรูป 6 A แผ่นแข็งด้านล่าง (sternum) ลักษณะเป็นรูปไข่และถูกปกคลุมไปด้วยขนละเอียดดังรูป 6 D ฐานเขี้ยว (chelicerae) มีฟันแถวหน้าจำนวน 1 ซี่ แถวหลังจำนวน 1 ซี่ ขาลักษณะยาวแข็งแรงมีสีน้ำตาลอ่อนออกเขียว ปกคลุมไปด้วยขนละเอียดและหนามขนาดยาวอย่างเด่นชัดกระจายอยู่ทั่วทุกขาดังรูป 6 A ด้านท้องของขาปล้องที่สาม (femur) ของทุกขามีเส้นสีดำลากยาวลงมาตั้งแต่ด้านบนของปล้องจนถึงด้านล่างของปล้อง

ท้อง (Abdomen): เพศเมีย; ลักษณะยาว มีแถบสีขาวปกคลุมด้านหลังตั้งแต่ด้านหน้าของส่วนท้องจนกระทั่งถึงด้านปลายของส่วนท้อง (รูป 6 A B และ E) ทางด้านข้างของส่วนท้องมีเส้นสีดำ 2 เส้นลากยาวจากด้านบนไปจนถึงอวัยวะปั่นเส้นใย (spinneret) ดังรูป 6 B epigynum และ vulva ดังรูป 6 F

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): ปากีสถาน อินเดีย จีน และไทย ในประเทศไทย สามารถพบได้ที่จังหวัดนครราชสีมา

สกุล *Peucetia* Thorell, 1869

Type: *Pasithea viridis* Blackwall, 1858 เพศเมีย

ชื่อพ้อง :

เดิมถูกตั้งชื่อเป็น *Pasithea viridis* โดย Blackwall ในปี 1858 และเคยถูกย้ายไปอยู่ในสกุล *Tapinillus* ซึ่งชนิดที่ถูกย้ายคือ *Peucetia caldensis* Garcia-Neto, 1989 ปัจจุบันมีสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วทั้งหมด 47 ชนิด

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

แมงมุมสกุลนี้มีลำตัวขนาดใหญ่ยาวและแคบเรียวยาวไปทางด้านปลายอวัยวะปั่นเส้นใย (spinneret) โดยทั่วไปสีเขียวยาว อวัยวะปั่นเส้นใย (spinnerets) มีจำนวน 3 คู่ มี colulus ขนาดเล็ก มีเล็บ (claw) จำนวน 3 เล็บ ส่วนหัวรวมกับส่วนอก (cephalothorax) มีความยาวมากกว่าความกว้าง ลักษณะไม่ยกสูงและนูนเหมือนกับสกุล *Oxyopes* พื้นที่ส่วนอกกว้างกว่าพื้นที่ส่วนหัวและโค้งมนทางด้านข้าง fovea มักจะมีรอยสีน้ำตาลเข้มทั้งสองข้าง ตามีสีดำ ตาข้างคู่หน้า (anterior lateral eyes: ALE) กว้างกว่าตากกลางคู่หลัง (posterior median eyes: PME) อย่างชัดเจน ตากกลางคู่หน้า (anterior median eyes: AME) มีขนาดเล็กที่สุด ตาข้างคู่หน้า (anterior lateral eyes: ALE) มีขนาดใหญ่ที่สุด ตากกลางคู่หลัง (posterior median eyes: PME) มีขนาดเท่ากับตาข้างคู่หลัง (posterior lateral eyes: PLE) ตาข้างคู่หลังมีการเรียงตัวโค้งขึ้น (procurved) เล็กน้อย ไม่เหมือนกับสกุล *Oxyopes* ที่เรียงตัวโค้งขึ้น (procurve) อย่างชัดเจน แฉกของตาข้างคู่หลังมีความกว้างมากกว่าแฉกของตากกลางคู่หน้า โดยตาแฉกด้านหน้าเรียงตัวโค้งลง (recurved) อย่างชัดเจน ตาแฉกด้านหลังเรียงตัวโค้งขึ้น (procurve) เล็กน้อย ตาแฉกแรกมีขนาดตาที่เล็กที่สุดจำนวน 1 คู่ แฉกที่ 2 และ 3 เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม มีเส้นสีดำ น้ำตาลดำ หรือน้ำตาลจำนวน 2 เส้นหรือ 4 เส้นลากจากตากกลางคู่หน้าจนถึงฐานเขี้ยว ฐานเขี้ยว (chelicerae) มีลักษณะยาวและเป็นรูปกรวย และไม่พบฟันบนฐานเขี้ยว (chelicerae) แผ่นแข็งด้านล่าง (sternum) มีรูปร่างคล้ายโล่ maxillae มีขนาดยาวกว่า labium

Peucetia viridana (Stoliczka, 1869) (Figure 7)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Ferdinand Stoliczka ในปี 1869 โดยจำแนกอยู่ในวงศ์ Salticidae และจำแนกชนิดเป็น *Sphasus viridanus* ต่อมา Simon (1884) ได้จำแนกตัวอย่างแมงมุมเพศเมียจากประเทศอินเดียและได้ย้ายจากสกุล *Sphasus* เป็น สกุล *Peucetia* และได้ตั้งชื่อเป็น *Peucetia viridana* และได้จำแนกตัวอย่างเพศผู้และจำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงได้ตั้งชื่อใหม่ว่า *Peucetia nigropunctata* ต่อมาในปี 1887 Thorell จำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงได้

ตั้งชื่อใหม่ว่า *Peucetia prasina* ตั้งแต่ปี 1900 Pocock และ Tikader & Biswas (1981) ได้จำแนกชนิดแมงมุมจากประเทศอินเดียและศรีลังกา และพบว่าเป็นชนิด *Peucetia viridana*

ชื่อพ้อง :

Sphasus viridanus Stoliczka, 1869:

Peucetia viridana Simon, 1884

Peucetia nigropunctata Simon, 1884

Peucetia prasina Thorell, 1887

Peucetia viridana Pocock, 1900

Peucetia viridana Tikader & Biswas, 1981

ชื่อสามัญ: green lynx spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศเมีย 15 มิลลิเมตร

หัวและอก (Cephalothorax): เพศเมีย; สีน้ำตาลเขียวส่วนหัวและอกมีความยาวมากกว่าความกว้าง ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 4 แถว (2-2-2-2) โดยตาแถวด้านหน้า (anterior row) เรียงตัวโค้งลง (recurved) อย่างชัดเจน ตาแถวด้านหลัง (posterior row) เรียงตัวโค้งขึ้น (procurved) เล็กน้อย ตาคู่กลางมีขนาดเล็กที่สุดและตาด้านข้างมีขนาดใหญ่ที่สุด พื้นที่ระหว่างตาแถวหน้าและฐานเขี้ยว (clypeus) ยาวมีเส้นสีน้ำตาลแดงจำนวน 2 เส้นลากจากตากลางคู่หน้าจนถึงฐานเขี้ยว (chelicerae) โดยฐานเขี้ยว (chelicerae) ไม่มีฟัน แผ่นแข็งด้านล่าง (sternum) มีลักษณะรูปร่างคล้ายรูปหัวใจมีขนและหนามกระจายเล็กน้อย ขายาวสีเขียวอ่อนมีจุดสีน้ำตาลแดงกระจายอยู่และมีหนามขนาดยาวกระจายอยู่ทั่วทุกขาดังรูป 7 A B และ C

ท้อง (Abdomen): เพศเมีย; สีเขียวแกมเหลือง มีความยาวมากกว่าความกว้าง ปลายท้องแหลม มีจุดสีขาวกระจายที่ด้านบนของส่วนท้อง (รูป 7 A) และมีแถบสีแดงเลือดหมูหนึ่งแถบลากยาวจากบริเวณอวัยวะเพศเมียไปจนกระทั่งถึงขอบด้านบนของอวัยวะปั่นเส้นใย (spinneret) ดังรูป 7 C และ 7 E epigynum และ vulva ดังรูป 7 F

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): ปากีสถาน อินเดีย ศรีลังกา บังคลาเทศ และ พม่า ในประเทศไทยสามารถพบได้ที่จังหวัดสระบุรี เพชรบุรี ขอนแก่น ระยอง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมตาหกเหลี่ยมวงศ์ Oxyopidae ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากแปลงมันสำปะหลัง สวนชมพู แปลงเกษตรกร และขอบชายป่า ในประเทศไทย จากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้ พบแมงมุมตาหกเหลี่ยมวงศ์ Oxyopidae จำนวน 40 ตัวอย่าง นำไปศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น การจัดเรียงตัวของตา ระยะห่างระหว่างตา เส้นขนที่

ตา ลักษณะรูปร่าง และลวดลายบนส่วนหลัง ความยาวและความกว้างของส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ความยาวของขา จำนวนขนและหนามที่ขา ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ผลจากการจำแนกพบแมงมุมตาหกเหลี่ยม 4 สกุล 6 ชนิด ได้แก่ *Hamadruas* sp. จำนวน 2 ตัวอย่าง *Hamataliwa* sp. จำนวน 3 ตัวอย่าง *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) จำนวน 20 ตัวอย่าง *Oxyopes javanus* Thorell, 1887 จำนวน 5 ตัวอย่าง *Oxyopes shweta* Tikader, 1970 จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Peucetia viridana* (Stoliczka, 1869) จำนวน 10 ตัวอย่าง ซึ่งสกุล *Hamadruas* และ *Oxyopes shweta* นับว่าเป็นชนิดที่ยังไม่มีตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์

เนื่องจากการปรับลดงบประมาณการดำเนินการวิจัยในปี 2563 จึงมีความจำเป็นต้องลดจำนวนสถานที่การดำเนินการจากเดิม รวมถึงมีความจำเป็นต้องปรับลดจำนวนตัวอย่างแมงมุม ตาม KPIs รวมทั้งปีเดิม จากเก็บรวบรวมแมงมุมได้ 60 ตัวอย่าง เป็นเก็บรวบรวมแมงมุมได้ 40 ตัวอย่าง เพื่อให้มีการสอดคล้องกับงบประมาณการวิจัยในปี 2563 อีกทั้งประสบปัญหาโรคระบาด Covid 19 ที่ทำให้ไม่สามารถออกพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนายพงศ์พัฒนา วิวรรณนาวิน ช่วยอนุเคราะห์ถ่ายภาพ และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุมที่ทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- วิภาดา วงศ์ลาบัตร์ และอัมพร วิโนทัย. 2544. การศึกษาอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และประสิทธิภาพการกินแมลงวันผลไม้ *Bactrocera correcta* (Saunders) ของแมงมุมตาหกเหลี่ยม *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch) (Araneae: Oxyopidae). 23(4): 241-252.
- วิภาดา วงศ์ลาบัตร์. 2551. การศึกษาชนิด ชีววิทยา และประสิทธิภาพการกินของแมงมุมตัวห้ำต่อแมลงวันผลไม้ในสวนมะม่วง. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 356-388.
- วิมลวรรณ โชติวงศ์ วิภาดา วงศ์ลาบัตร์ เกรียงไกร จำเริญมา พิเชฐ เซาว์นวัฒนวงศ์ และวิภาดา ปลอดภัยบุรี. 2556. ศึกษาอัตราการกินแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis*) (Hendel) ของแมงมุมตาหกเหลี่ยม: *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) ในห้องปฏิบัติการ. วารสารกสิกรรมและสัตววิทยา. ปีที่ 31 ฉบับที่ 1 หน้า 29-35.
- Biswas, V. and D. Raychaudhuri. 2015. Lynx spiders of Khulna District of Bangladesh: genus *Oxyopes* Latreille (Araneae[sic]: Oxyopidae). Bangladesh Journal of Zoology. 43(2): 221-238.

- Blackwall, J. 1858. Descriptions of six newly discovered species and characters of a new genus of Araneida. *Annals and Magazine of Natural History*. (3) 1: 426-434. doi:10.1080/00222935808696953
- Brady, A.R. 1970. The lynx spider genus *Hamataliwa* in Mexico and Central America (Araneae: Oxyopidae). *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 140, 75-128.
- Bryant, E.B. 1948. The spiders of Hispaniola. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*. 100: 329-447.
- Chamberlin, R.V. 1924. Descriptions of new American and Chinese spiders, with notes on other Chinese species. *Proceedings of the United States National Museum*. 63(13): 1-38.
- Deeleman-Reinhold, C.L. 2009. Description of the lynx spiders of a canopy fogging project in northern Borneo (Araneae: Oxyopidae), with description of a new genus and six new species of *Hamataliwa*. *Zoologische Mededelingen*. 83 : 673-700.
- Gajbe, U.A. 2008. Fauna of India and the adjacent countries-Spider (Arachnida: Araneae: Oxyopidae) Volume-III: 1-117 (Published by the Director, Zool. Surv. India, Kolkata).
- Hu, Y.J. 1980. [On some common species of the genus *Oxyopes* from China]. *Journal of Hunan Normal University, Natural Sciences*. 1980(1): 67-75.
- Koch, C.L. 1847. Die Arachniden. J.L. Lotzbeck, Nürnberg, Vierzehnter Band, pp. 89-210, pl. 481-504 (f. 1343-1412); Fünftehnter Band, pp. 1-136, pl. 505-540 (f. 1413-1504); Sechszehnter und letzter Band, pp. 1-80, pl. 541-563 (f. 1505-1550), Index 64 pp. [for the correct year of publication see Brignoli, 1985b] doi:10.5962/bhl.title.43744
- Latreille, P.A. 1804. Tableau methodique des Insectes. *Nouveau Dictionnaire d'Histoire Naturelle*, Paris. 24: 129-295.
- Nyffeler, M., D.A. Dean and W.L. Sterling. 1987. Predation by Green Lynx Spider, *Peucetia viridans* (Araneae: Oxyopidae), Inhabiting Cotton and Woolly Croton Plants in East Texas. *Environmental Entomology*. Vol. 16, No. 2, pp. 355-359(5).
- Okuma, C. 1968. Preliminary survey on the spider-fauna of the paddy fields in Thailand. *Mushi*. 42: 89-117.

- Platnick, N.I. 2013. The world spider catalog, version 14.5 American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/BIB1.html>
- Pocock, R.I. 1900. The fauna of British India, including Ceylon and Burma. Arachnida. Taylor and Francis, London. 279 pp. doi:10.5962/bhl.title.48423
- Simon, E. 1864. Histoire naturelle des araignées (aranéides). Paris, 540 pp. doi:10.5962/bhl.title.47654
- Simon, E. 1884. Arachnides recueillis en Birmanie par M. le chevalier J.B. Comotto et appartenant au Musée civique d'histoire naturelle de Gènes. Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Genova. 20: 325-372.
- Simon, E. 1885. Matériaux pour servir à la faune arachnologiques de l'Asie méridionale. III. Arachnides recueillis en 1884 dans la presqu'île de Malacca, par M.J. Morgan. IV. Arachnides recueillis à Collegal, district de Coimbatore, par M.A. Theobald G.R. Bulletin de la Société Zoologique de France. 10: 436-462.
- Song, D.X., Z. Mingsheng and C. Jun. 1999. The Spiders of China. Hebei Science and Technology Publishing House. p. 398-401.
- Stoliczka, F. 1869. Contribution towards the knowledge of Indian Arachnoidea. Journal of the Asiatic Society of Bengal, part II (Physical Science). 38(4): 201-251.
- Thorell, T. 1869. On European spiders. Part I. Review of the European genera of spiders, preceded by some observations on zoological nomenclature. Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis. (3) 7: 1-108.
- Thorell, T. 1887. Viaggio di L. Fea in Birmania e regioni vicine. II. Primo saggio sui ragani birmani. Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Genova. 25: 5-417.
- Tikader, B.K. 1970. Spider fauna of Sikkim. Records of the Zoological Survey of India 64: 1-83.
- Tikader, B.K. and B. Biswas. 1981. Spider fauna of Calcutta and vicinity: Part-I. Records of the Zoological Survey of India, Occasional Paper. 30: 1-149.
- Urquhart, A.T. 1894. Description of new species of Araneae. Transactions of the New Zealand Institute. 26: 204-218.
- Workman, T. 1896. Malaysian spiders. Belfast, pp. 25-104.
- World Spider Catalog. 2021. World Spider Catalog, Version 23. Natural History Museum Bern. Available at URL <http://wsc.nmbe.ch> (Accessed on 10/05/2021).

Table 1 Spider Fauna in Family Oxyopidae found in Thailand between 2017 until 2020.

| Scientific name | Habitus | Location | GPS | Reference |
|---|----------------------|------------------|-------------------------------------|--------------------|
| <i>Hamadruas</i> sp. | forest | Saraburi | 14°47'28.41", 101°16'71.14" | W. Pongpatthana |
| <i>Hamataliwa</i> sp. | dry evergreen forest | Nakron Rachasima | 14°40.065", 101°26.630" | W. Pongpatthana |
| | forest | Saraburi | 14°47'28.41", 101°16'71.14" | W. Pongpatthana |
| | forest | Kanchanaburi | 14°2'21.4614", 99°30'44.6466" | W. Chotwong |
| | forest | Rachaburi | 13°35'12.5442", 99°23'33.7992" | J. Bangtha |
| | forest | Phetchaburi | 12°53'45.0", 99°50'57.8" | W. Chotwong |
| | forest | Surat Thani | 09° 44'18.2724", 100° 0'5.5476" | J. Bangtha |
| | forest | Khon Kaen | 16°28'59.5344", 102°20'30.2274" | J. Bangtha |
| <i>Oxyopes javanus</i> Thorell, 1887 | forest | Nakron Rachasima | 14°40.065", 101°26.630" | W. Pongpatthana |
| | grass | Khon Kaen | 16°31'31.69922", 102°53'54.4524" | W. Chotwong |
| | pomelo orchard | Chaiyaphum | 16°22'52.0314", 102°18'6.1740" | W. Chotwong |
| | waterfall | Ubon Ratchathani | 14°27'4.2546", 104°55'17.0472" | J. Bangtha |
| | cassava | Rayong | 14°30'26.6580", 101°55'39.3312" | W. Chotwong |
| | forest | Kanchanaburi | 14° 2' 21.4614", 99°30'44.6466" | J. Bangtha |
| | Rose apple orchard | Rachaburi | 13°33'40.8990", 100°3'33.3498" | J. Bangtha |
| | Rose apple orchard | Phetchaburi | 12°53'45.0", 99°50'57.8" | W. Chotwong |
| <i>Oxyopes lineatipes</i> (C. L. Koch, 1847) | forest | Nakron Rachasima | 14°40.065", 101°26.630" | J. Bangtha |
| | cassava | Rayong | 14°30'26.6580", 101°55'39.3312" | W. Chotwong |
| | grass | Kanchanaburi | 14°10'31.7892", 99°7'42.4200" | J. Bangtha |
| | grass | Rachaburi | 13°35'12.5442", 99°23'33.7992" | J. Bangtha |
| | Rose apple orchard | Phetchaburi | 12°53'45.0", 99°50'57.8" | W. Chotwong |
| | Cassava field | Kamphaeng Phet | 16°28'9.4146", 99°31'38.8050" | W. Chotwong |
| | forest | Surat Thani | 09° 44'18.2724", 100° 0'5.5476" | W. Chotwong |
| <i>Oxyopes shweta</i> Tikader, 1970 | forest | Nakron Rachasima | 14°40.065", 101°26.630" | W. Pongpatthana |
| <i>Peucetia viridana</i> (Stoliczka, 1869) | forest | Saraburi | 14°47'28.41", 101°16'71.14" | W. Pongpatthana |
| | grass | Khon Kaen | 16°31'31.69922", 102°53'54.4524" | J. Bangtha |
| | cassava | Rayong | 14°30'26.6580", 101°55'39.3312" | W. Chotwong |
| | Rose apple orchard | Phetchaburi | 12°53'45.0", 99°50'57.8" | W. Chotwong |

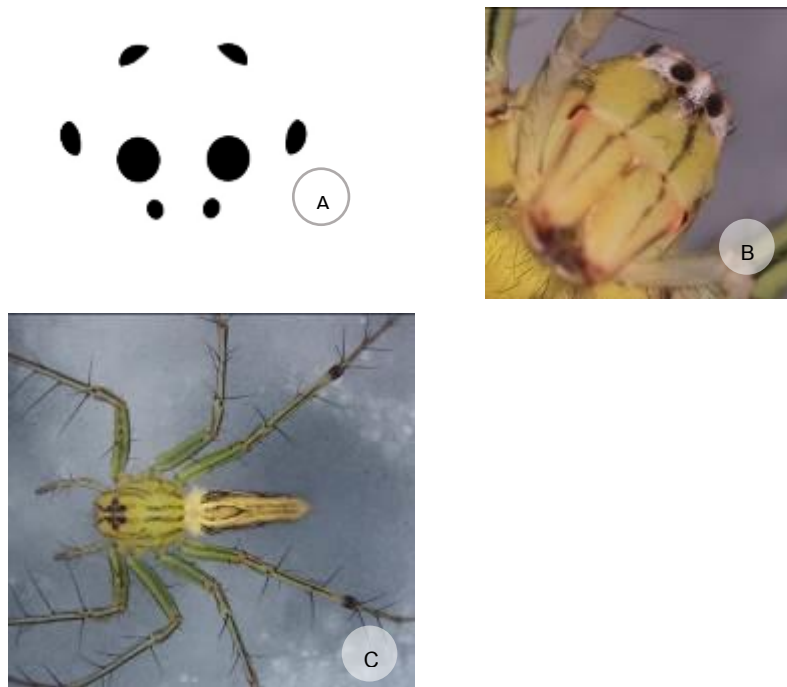


Figure 1 General morphology A. eyes arrangement B. clypeus C. spiny legs

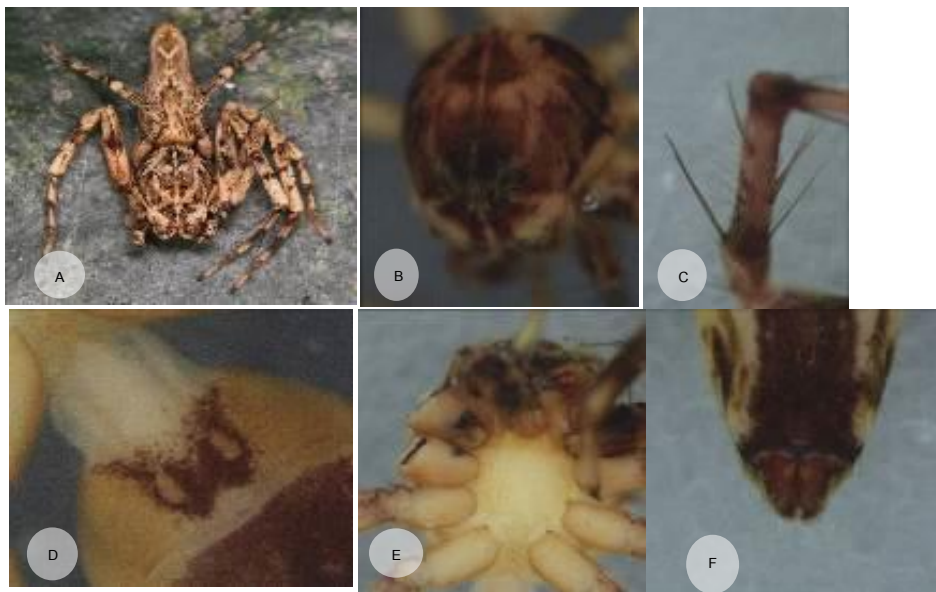


Figure 2 *Hamadruas* sp.; female abdomen dorsal view (A), Eye arrangement (B), trichobotria (C), epigyne; ventral view (D), sternum (E), spinneret (F)



Figure 3 *Hamataliwa* sp.; female abdomen dorsal view (A), female abdomen ventral view (B), labium and sternum (C), claws (D), epigyne; ventral view (E), eye arrangement and tuft hairs

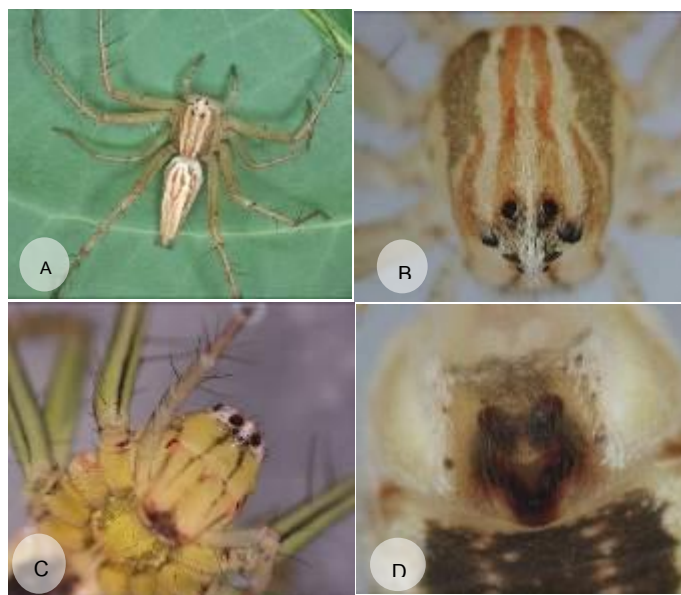


Figure 4 *Oxyopes javanus* Thorell, 1887; female abdomen dorsal view (A), eye arrangement and carapace (B), face (C), epigyne; ventral view (D)

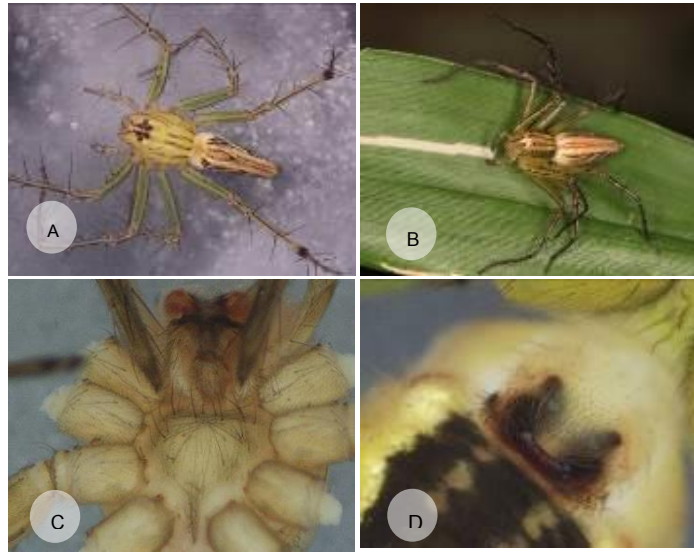


Figure 5 *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847); female abdomen dorsal view in alcohol (A), habitat (B), labium and sternum (C), epigyne; ventral view (D)



Figure 6 *Oxyopes shweta* Tikader, 1970; female habitat (A), female abdomen dorsal view (B), eye arrangement and carapace (C), labium and sternum (D), in alcohol (E), epigyne; ventral view (F)



Figure 7 *Peuceitia viridana* (Stoliczka, 1869); female life view (A), female abdomen dorsal view in alcohol (B), female abdomen ventral view (C), labium and sternum (D), spinneret (E), epigyne; ventral view (F)

อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของเชื้อรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช
Taxonomy and phylogeny of Cercosporoid fungi in Thailand

ชนิทร ดวงสอด^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} สุณีรัตน์ สีมะเต็อ^{1/}

มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{3/}

^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

Abstract

Leaf spot disease samples caused by cercosporoid fungi were collected from various plantations located in Thailand during October 2019 – September 2021 in order to study the relationships of cercosporoid fungi with the host plant data. The cercosporoid fungi collected from this study namely, *Cercospora apii*, *Cer. beticola*, *Cer. citrulina*, *Cer. arachidicola* (syn. *Passalora arachidicola*), *Cercospora* sp.1, *Cercospora* sp.2, *Corynespora torulosa*, *Cory. cassicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. Abelmoschi* และ *Mycosphaerella* sp.1. The phylogenetic reconstruction showed that *Cercospora* and *Corynespora* contained complex species for which genealogical concordance was required for resolving the complex. The phylogeny of some *Cercospora* and *Corynespora* was considered with the host plant data. It was found that the host range of some cercosporoid fungi could be considered. Further studies targeting the fungal species on their host plant could provide information for predicting disease progression. Data on the classification of cercosporoid fungi reported in Thailand were also gathered.

Keywords : cercosporoid, phylogeny

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-13-63



บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะพ้องกับอาการจุดที่เกิดจากเชื้อรา cercosporoid จากแปลงปลูกพืชในประเทศไทย ระหว่าง ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 เพื่อจำแนกชนิด พิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและพืชอาศัย เพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาขอบเขตของพืชอาศัย ได้เชื้อราในกลุ่ม cercosporoid ได้แก่ *Cercospora apii*, *Cer. beticola*, *Cer. citrulina*, *Cer. arachidicola* (syn. *Passalora arachidicola*), *Cercospora* sp.1, *Cercospora* sp.2, *Corynespora torulosa*, *Cory. cassicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. Abelmoschi* และ *Mycosphaerella* sp.1 จากความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่าเชื้อรา *Cercospora* และ *Corynespora* หลายชนิดเป็นกลุ่ม complex จึงมีความจำเป็นที่การจำแนกชนิดต้องอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมที่เพียงพอ และเมื่อพิจารณาข้อมูลของพืชอาศัยประกอบ พบว่ามีแนวโน้มที่สามารถพิจารณาขอบเขตของพืชอาศัยของเชื้อรา cercosporoid บางชนิดหากมีศึกษาที่มีกำหนดเป้าหมายของชนิดเชื้อราต่อพืชตระกูลเป่าหมายจะเป็นจุดเริ่มต้นที่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคาดการณ์การเกิดโรคได้ และได้รับรวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกเชื้อรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย

คำหลัก : cercosporoid ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

คำนำ

Cercosporoid เป็นกลุ่มของเชื้อราที่จัดอยู่ใน order Capnodiales family Mycosphaerellaceae โดยเชื้อราในกลุ่มนี้สามารถทำความเสียหายให้แก่พืชหลายชนิด ทั้งในกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ รวมถึงพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยลักษณะการเข้าทำลายที่พบได้โดยทั่วไปคือจะพบอาการใบจุด (leaf spot) และสามารถพบว่าทำให้เกิดแผล (necrotic lesion) บนดอกไม้ ผล และส่วนอื่นๆของพืช

การจำแนกเชื้อราในกลุ่มนี้ค่อนข้างสับสนและมีปัญหา เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่าง genus ค่อนข้างน้อย ปัจจุบันลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อราในจีนัส *Cercospora* และ *Pseudocercospora* ได้แก่การพบหรือไม่พบ ลักษณะของ scar ที่มีความหนา (thickening) บน conidiophore หลังจาก that conidia หลุดไป โดยลักษณะความแตกต่างของความหนาของ scar นี้ ใช้เป็นลักษณะในการจำแนกชนิดของเชื้อราทั้งสอง genera โดย *Pseudocercospora* จะมี unthickened scars แต่มีเชื้อราหลายชนิดที่ถูกจำแนกให้เป็น *Pseudocercospora* แม้จะมีลักษณะของ scar ที่หนา ทั้งนี้เพราะลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ค่อนข้างที่จะเข้าลักษณะของรา *Pseudocercospora* มากกว่าที่จะเป็นเชื้อรา *Cercospora* เช่น *P. mississippiensis*, *P. madhuliensis* (Ruiz and Braun, 1989) และยังพบอีกว่าลักษณะ scar ของ *Pseudocercospora* มีความคล้ายคลึง (synapomorphy) กับเชื้อรา *Parapithomyces clitoriae* (Alcorn, 1992)

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การจำแนกเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid โดยเฉพาะ *Pseudocercospora* และ *Cercospora* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน ประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่น ๆ เช่น ลักษณะสีของ conidia ทำให้การจำแนกชนิดค่อนข้างมีความสับสน อีกทั้งข้อจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ในการวินิจฉัยเช่น ความคมชัด ความเข้มแสง กล้องจุลทรรศน์ ยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการพิจารณาลักษณะความหนาของ scar ในระดับที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะศึกษาลักษณะความหนาของ scar ในแต่ละ genus เพื่อให้ได้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แม่นยำเพื่อการวินิจฉัย แต่ยังคงพบว่าเชื้อรา *Cercospora* ในบางสปีชีส์ ถูกจัดเป็นกลุ่มสปีชีส์ที่อาจประกอบด้วยสมาชิกมากกว่า 1 สปีชีส์ แต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยายังไม่เพียงพอต่อการจำแนกความแตกต่าง เชื้อราในกลุ่มนี้จึงยังถูกจัดอยู่ใน สปีชีส์เดียวกันและจัดเป็น complex species เช่น *Cercospora apii* เป็นราที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงกับอุตสาหกรรมการผลิตพริกของบราซิล พบว่ามีเชื้อราที่ถูกจำแนกเป็น *C. apii* มากกว่า 280 ไอโซเลท โดยทุกไอโซเลทมีความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ลักษณะความแตกต่างดังกล่าวไม่เพียงพอในการจำแนกเชื้อราไอโซเลทนั้น ๆ ออกจาก *C. apii* (Crous and Braun, 2003; Nicoli *et al.*, 2011) ลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ อาจเกิดจากการที่เชื้อราและพืชอาศัยมีวิวัฒนาการร่วมกัน ทำให้เชื้อราเกิดมีวิวัฒนาการ หรือลักษณะทางของเชื้อราที่สามารถวัดค่าหรือนำมาใช้ในการจำแนกยังไม่เพียงพอ จึงยังคงจัดอยู่ใน complex species

การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะการขยายพันธุ์ของเชื้อ (teleomorph, anamorph) ตามวิธีการจำแนกชนิดตามแบบที่ปฏิบัติกันมานั้น ทำให้เชื้อรา *Pseudocercospora*, *Cercospora* และเชื้อราอื่น ๆ อีกหลายชนิด ถูกวินิจฉัย ให้มีความเชื่อมโยงกับเชื้อรา *Mycosphaerella* โดยจัดเป็นระยะ teleomorph ของเชื้อราดังกล่าวข้างต้น การเชื่อมโยงของเชื้อรา *Mycosphaerella* กับเชื้อราในสกุลอื่น ๆ กว่า 40 genera เพื่อให้เข้าใจวิวัฒนาการของเชื้อรา หรือช่วยในการวินิจฉัยเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเฉพาะ complex species ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยบ่งชี้ หรือ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์และวิวัฒนาการ (phylogeny) ของเชื้อราในหลายสกุลหรือสปีชีส์ ที่มีความใกล้เคียงกัน บนพืชอาศัยต่าง ๆ กัน หรือพืชอาศัยที่มีความใกล้เคียงกัน โดยนำข้อมูลจากหลาย ๆ ด้าน เช่น ข้อมูลชีวโมเลกุลจากหลายตำแหน่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย ลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่เก็บตัวอย่าง มาวิเคราะห์รวมกันอย่างเป็นระบบ (systematics study) ทำให้พบว่า เชื้อราที่จัดว่าเป็น *Mycosphaerella* ที่แท้จริงนั้น มีเพียงเชื้อรา *Ramularia* (Braun, 1998) เพียงชนิดเดียว อีกทั้งการศึกษาที่ใช้ลักษณะของข้อมูลทางพันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา cercosporoid อื่นๆ ก็มีความจำเพาะในระดับ genus นั้น ๆ โดยไม่มีความเกี่ยวข้องใด ๆ กับ genus อื่น ๆ ในแง่ของลักษณะการสืบพันธุ์ของวงจรชีวิต ดังนั้นในการจำแนกชนิดของเชื้อราแต่ละชนิดจะมีเพียง 1 ชื่อ ทั้งสองระยะของการสืบพันธุ์ โดยลักษณะของ teleomorph และ anamorph จะเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อราชนิดนั้น ๆ ตามข้อกำหนดของการ

กำหนดชื่อตามหลักสากล (Article 59 of the International Code for Nomenclature of algae, fungi and plants (ICN) (Hawksworth, 2011; Norvell, 2011; Taylor, 2011)

ในประเทศไทยมีการศึกษาเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid มาแล้วในระดับหนึ่ง แต่การจัดจำแนกชนิดส่วนใหญ่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ถึงแม้ว่า การจัดจำแนกเชื้อรา *Cercospora* จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ค่อนข้างเด่นชัด แต่ก็ยังพบว่ายังมีเชื้อราในกลุ่มนี้ที่มีรายงานว่าเป็น complex species ที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนก หรือ บางครั้งเชื้อราไม่สร้างโครงสร้างที่เพียงพอต่อการจัดจำแนก อีกทั้งด้วยเทคโนโลยีที่พัฒนาและนำมาช่วยในการศึกษาและเพื่อการจัดจำแนก ทำให้พบว่า การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรม สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราหลายชนิดที่มีปัญหาในการวินิจฉัย ซึ่งรวมถึงเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid ด้วย

ถึงแม้เชื้อรา cercosporoid ส่วนใหญ่จะทำให้เกิดความเสียหายแก่พืช แต่ก็มีเชื้อราบางชนิดในกลุ่มของ cercosporoid ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ดังนั้นนอกจากนี้ การศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อราควบคู่กับพืชอาศัย ทำให้สามารถเข้าใจวิวัฒนาการระหว่างเชื้อราและพืชอาศัย (phylogenetic relationship) ซึ่งสามารถนำไปสู่การคาดหมายหรือการทำนายการเกิดโรคในพืช (pattern of pathogenicity) อีกทั้งเชื้อรา cercosporoid เป็นเชื้อรากลุ่มใหญ่ที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดในประเทศไทย รวมถึงทั่วโลก ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของเชื้อรา cercosporoid จึงมีความสำคัญ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษา นอกจากจะทำให้เข้าใจวิวัฒนาการเชื้อรา cercosporoid แล้ว ยังสามารถประเมินการเข้าทำลายพืชอาศัยหรือโอกาสการเกิดโรคข้ามพืชอาศัย (host jump) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคาดการณ์การเกิดโรคได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชอีกทางหนึ่ง ซึ่งสามารถสนับสนุนการการค้าระหว่างประเทศในการนำเข้าและส่งออกสินค้าทางการเกษตร ดังนั้นการศึกษาดังนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานและวิวัฒนาการของเชื้อรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทาบตัวอย่างกระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Microcentrifuge, Thermal cyclers, Vortex, Tissue Lyser, Gel electrophoresis, เครื่องถ่ายภาพเจล, microwave, micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร, กล้องจุลทรรศน์แบบ compound, กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo, Dry heat block

3. วัสดุในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดตุรกรน กระจกบอทวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate

5. สารเคมี ได้แก่ Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™), Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Glucanex®), Lithium Borate buffer (LB), PureDireX Genomic DNA Isolation Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, SERVA HiSens Stain G, Nuclease-Free Water

- ไพรเมอร์ ได้แก่

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell *et al.*, 1998)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012)

วิธีการ

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรากลุ่ม cercosporoid

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรากลุ่ม cercosporoid จากพืชต่าง ๆ ที่แสดงอาการใบจุด โดยเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยจะเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรคและเก็บใบของพืชที่ปกติ ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของผลอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุมเนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียดของการเก็บตัวอย่าง วันที่ พิกัด สถานที่ ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ในห้องปฏิบัติการ จัดเก็บตัวอย่างแห้งในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอภิศรีการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรากลุ่ม cercosporoid ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของเชื้อรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา



ศึกษาลักษณะอาการของโรค และเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรค และจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เมื่อพบราสร้างเส้นใยหรือ conidia นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เข็มเขี่ย ส่วนของเชื้อราวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืช (cross section) ให้บาง ๆ และนำมาตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

แยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

- แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมามาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

- แยกราโดยวิธี dilution plate technique โดยใช้ปลายมีดผ่าตัดเบอร์ 11 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตักเอาส่วนขยายพันธุ์ (fruiting body) ของราที่เจริญอยู่กลางแผล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope จากนั้นนำมาวางบนอาหาร PDA ที่หยดน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ เอียงจานเลี้ยงเชื้อโดยวนเป็นลักษณะวงกลมนานประมาณ 1-3 นาที จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ ลงบน PDA จานใหม่ หากผิวหน้าอาหาร PDA เริ่มแห้ง ให้เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อประมาณอีกประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำซ้ำแบบเดิมอีก จนได้จานเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 3 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน หากพบเชื้อราเจริญขึ้นก่อนเวลา 10 วัน ให้ทำการคัดทิ้ง เนื่องจากเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid เจริญช้า ซึ่งจะใช้เวลาเกินกว่า 10 วัน จึงจะพบ colony

จำแนกชนิดเชื้อรา cercosporoid สาเหตุโรคพืช

โดยเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อรา cercosporoid ที่ศึกษากับคู่มือของ Deighton (1967, 1974, 1976 และ 1979) Ellis (1971) Braun (1995) และ Crous and Braun (2003)

3. จำแนกชนิดของเชื้อรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตัด และย้ายเส้นใย conidia ของเชื้อรา cercosporoid ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White et al., 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell et al., 1998)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง ITS EF1- α และ LSU ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 μ l และ 1 μ l ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบด้วย type sequence

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) ที่ได้จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูล มาจัดเรียง (align) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Kato and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (Kumar et al., 2016) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำการรวมชุดข้อมูลของดีเอ็นเอ

เป็น combined dataset บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ nexus หรือ nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดโดยวิเคราะห์จาก combined dataset วิเคราะห์ด้วย phylogenetic criteria 2 แบบคือ

1. Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ phy และวิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command -f a) เริ่มจาก random starting tree และ กำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง

2. Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ nexus วิเคราะห์โดยโปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ กำหนด 4 runs แต่ละ run ประกอบด้วย 4 chains วิเคราะห์จำนวน 10 ล้าน generations ตั้งค่า cold chain ที่ temperature 0.25 สุ่มตัวอย่าง substitution model parameters และบันทึก trees ทุก 500 generations ตรวจสอบความเชื่อมั่นของ topology ด้วย cumulative and compare functions ด้วย AWTY (Nylander *et al.*, 2008)

4. บันทึกข้อมูลเชื้อรา cercosporoid ที่รายงานพบในประเทศไทย

รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกเชื้อรา cercosporoid ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มีการจัดจำแนกด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลของเชื้อรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาประเมินความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิด เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง

5. การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรากลุ่ม cercosporoid

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะพ้องกับอาการจุดที่เกิดจากเชื้อรา cercosporoid จากพืช 22 ชนิด ได้แก่ กระจับปี่เขียว กล้วย กล้วยไม้ กวางตุ้ง กัญชา ขึ้นฉ่าย ตำลึง แตงโม ถั่วเขียว ถั่วแปบ ถั่วฝักยาว ถั่วลิสง บัว บานชื่น บานไม่รู้โรย ปีทูท ผักคอส พริก มะระขึ้นก มะละกอ มันสำปะหลัง

และ ยาสูบ จากพื้นที่ปลูกพืชในประเทศไทย (Table 1) ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอภิศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้จำนวน 65 ไอโซเลท จำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา พบเชื้อราที่มีลักษณะพ้องกับเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid และ helminthosporoid (Figure 1-18)

3. จำแนกชนิดของราในกลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

ทำการคัดเลือกตัวแทนเชื้อราที่จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานชนิดเดียวกัน จำนวน 40 ไอโซเลท มาสกัดดีเอ็นเอและทำ PCR ตำแหน่ง ITS เพื่อวิเคราะห์ชนิดเบื้องต้น พบว่าเป็นเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid จำนวน 28 ไอโซเลท ใน 4 genera ได้แก่ *Cercospora*, *Pseudocercospora*, *Corynespora* และ *Mycosphaerella* จากนั้นจำแนกชนิดด้วยวิธี multi-locus phylogenetic reconstruction โดยเปรียบเทียบกับ type sequences (Table 2) สามารถจำแนกได้ ดังนี้

***Cercospora*:** *Cer. apii* (ขึ้นฉ่าย), *Cer. beticola* (ปีบรุท), *Cer. citrulina* (แตงโม มะระ ขึ้นก ตำลึง), *Cer. arachidicola* (syn. *Passalora arachidicola*) (ถั่วลิสง), *Cercospora* sp.1 (คะน้า ผักคอส หรือ ผักกาดหวาน), *Cercospora* sp.2 (ถั่วเขียว)

***Corynespora*:** *Cory. torulosa* (กล้วย) และ *Cory. cassicola* (มะละกอ กวางตุ้ง ถั่วฝักยาว พริก กล้วย และกล้วยชา)

***Pseudocercospora*:** *Pseu. dendrobii* (กล้วยไม้) และ *Pseu. abelmoschi* (กระเจี๊ยบเขียว)

***Mycosphaerellaceae*:** *Mycosphaerella* sp.1 (มันสำปะหลัง)

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Cercospora* จะพบว่า เชื้อราในกลุ่มนี้มีความหลากหลายและเป็นกลุ่ม complex เมื่อพิจารณาเพื่อการจำแนกในกลุ่มหรือ clade ที่มีความซับซ้อน อาจต้องเพิ่มตำแหน่งของยีนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป (Figure 19) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่า มีเชื้อรา *Cercospora* ที่ไม่ตรงกับชนิดใดที่เคยมีรายงาน โดยเฉพาะ *Cercospora* sp.1 ที่พบในตัวอย่างของผักคอสและผักคะน้า ซึ่งพืชอาศัยทั้งสองอยู่ในพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งคล้ายกับกรณีของเชื้อรา *Cer. citrulina* ที่พบในตัวอย่างจากพืชตระกูลแตง เช่นแตงโม มะระขึ้นก ตำลึง

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Corynespora* จะพบว่าเชื้อราในกลุ่มนี้มีความ complex น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราใน genus *Cercospora* ซึ่งจากการศึกษานี้พบ *Cory. torulosa* และ *Cory. cassicola* บนพืชอาศัยตามที่เคยมีรายงานในประเทศไทย อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาใน clade หรือกลุ่มของเชื้อรา *Cory. cassicola* (Figure 20) จะพบว่ามีความหลากหลายในเชื้อรากลุ่มนี้ ซึ่งมีแนวโน้มว่า เชื้อราที่พบบนกล้วยชา จะเป็นเชื้อรา *Corynespora* ที่แตกต่างจาก *Cory. cassicola* หรือเชื้อรา *Corynespora* อื่นๆ ที่มีรายงานในปัจจุบัน ซึ่งต้องศึกษาและเพิ่มตำแหน่งของยีนเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

4. บันทึกข้อมูลเชื้อรา cercosporoid ที่รายงานพบในประเทศไทย

รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกเชื้อรา cercosporoid ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มีการจัดจำแนกด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลของเชื้อรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาประเมินความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิด เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับ การตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง (Table 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำให้เกิดข้อจำกัดในการจำแนกชนิดให้ชัดเจน อันเนื่องจากจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะบางอย่าง เช่น สี รูปร่าง และขนาดของ conidia เมื่อจำแนกชนิดเบื้องต้นว่าเป็นเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid เมื่อจำแนกชนิดเพิ่มเติมด้วยข้อมูลพันธุกรรมเบื้องต้นด้วย กลับพบว่าประกอบไปด้วยเชื้อราในกลุ่ม cercosporoid และ helminthosporoid ดังนั้นเพื่อให้เกิดความชัดเจนในการจำแนกชนิด ควรพิจารณาการจำแนกชนิดด้วยข้อมูลพันธุกรรมประกอบการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจากการศึกษาข้อมูลวิวัฒนาการของเชื้อ *Cercospora* และ *Corynespora* จะพบว่ามีความซับซ้อนหรือประกอบไปด้วยกลุ่ม complex ต่างๆ ในแต่ละ genus ซึ่งต้องมีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบในเชิงลึกมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะเมื่อจำแนกเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเชื้อราที่มีการจำแนกในปัจจุบัน จะพบว่าการแยกกลุ่มหรือจัดตั้งรายงานเป็นชนิดใหม่ขึ้นมา ทำให้ข้อมูลเดิมที่เคยใช้ในการจำแนกไม่เพียงพอ ดังที่พบในตัวอย่างเชื้อรา *Mycosphaerella* บนใบมันสำปะหลังที่พบในการศึกษานี้ รวมถึงพบว่า เชื้อราบางไอโซเลท เช่น *Cercospora* sp. 1 และ *Cercospora* sp. 2 ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากมีความแตกต่างจากชนิดที่เคยมีรายงานในปัจจุบัน

ทั้งนี้เมื่อสามารถจำแนกชนิดได้อย่างละเอียด และนำมาพิจารณาข้อมูลพีชออคัยประกอบ จะสามารถวิเคราะห์ขอบเขตของพีชออคัยได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เช่น การศึกษาครั้งนี้เชื้อราไอโซเลท ที่สามารถจำแนกได้เป็น *Cer. citrulina* พบได้ในพีชตระกูลแตง ขอบเขตพีชออคัยของเชื้อรา *Cer. citrulina* อาจจำเพาะต่อพีชในตระกูลแตง หรือ บางชนิดในตระกูลแตงเท่านั้น เพื่อยืนยันสมมติฐาน ต้องมีการศึกษาที่มีกำหนดเป้าหมายของชนิดเชื้อราต่อพีชตระกูลเป้าหมาย เพื่อให้เกิดความชัดเจนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ ยังพบว่า เชื้อรา *Cer. cassiicola* พบบนพีชออคัยที่หลากหลาย แต่เมื่อพิจารณาจากข้อมูลวิวัฒนาการกลับพบว่า มีความหลากหลายของชนิดแฝงอยู่ ซึ่งหากศึกษาเพิ่มจะสามารถจำแนกและแยกชนิดที่มีความแตกต่างออกมาได้ ชนิดที่สามารถระบุความแตกต่างออกมาได้นี้ จะบ่งบอกถึงขอบเขตของพีชออคัยได้ด้วย ดังนั้น เชื้อรา *Cer. cassiicola* อาจไม่ได้มีพีชออคัยที่มีขอบเขตกว้างอย่างที่มียรายงานในปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการจึงมีความสำคัญ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษานอกจากจะทำให้เข้าใจวิวัฒนาการของเชื้อราแล้ว ยังสามารถประเมินการเข้าทำลายพีชออคัยหรือโอกาสการเกิดโรคข้ามพีชออคัยหรืออาจเกิดจากข้อจำกัดของการจำแนกชนิด ทำให้ไม่สามารถบ่งบอกชนิดในเชิงลึก ส่งผลให้การรายงานการพบบนพีชออคัยที่กว้าง การศึกษาความสัมพันธ์

และวิวัฒนาการที่สามารถช่วยกำหนดขอบเขตของพืชอาศัย เป็นจุดเริ่มต้นที่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคาดการณ์การเกิดโรคได้ นอกจากนี้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืช ซึ่งสามารถสนับสนุนการค้าระหว่างประเทศในการนำเข้าและส่งออกสินค้าทางการเกษตร

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร.พรพิมล อธิปัญญาคม คุณศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืชสมาชิกเพื่อน พี่น้อง ในกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- กรรณิการ์ เพ็ญภักตร์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2529. รวบรวมและจำแนกเชื้อราต่างๆ ที่เป็นสาเหตุโรคมะละกอ. น. 26-37. ใน : รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2529. กลุ่มงานวิทยาไมโค. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.
- กรรณิการ์ เพ็ญภักตร์ กัญญา โป๊ะเงิน อุบล คือประโคน และ วิรัช ชูบำรุง. 2530. โรคมะละกอที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. น. 7-16. ใน : รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2530. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- กุลฉวี กำจายภัย. 2526. โรคและแมลงศัตรูกล้วยไม้. บริษัทบางกอกฟลาวเวอร์เซนเตอร์ จำกัด. กรุงเทพฯ. 113 หน้า.
- ขวัญไทย วัງอุตม. 2509. การทดสอบยาบางชนิดและวิธีการเพาะปลูกเพื่อป้องกันโรคราน้ำค้างของแตงเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 42 น.
- ขจรศักดิ์ ภากุล พิพัฒน์ เชียงหลิว สุชาติ คูอาริยะกุล สุพัตรา อินทวิมลศรี สมสิทธิ์ ชำนาญศิลป์ และ สุชาติ วิจิตรานนท์. 2522. โรคของฝรั่งเวียดนาม. น. 372-373. ใน : รายงานประจำปี 2522. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.
- เฉลิมชัย ปราสาทศรี สุทิน ราชธา และ W.M. Brown Jr. 2513. การทดลองสารเคมีต่าง ๆ เพื่อป้องกันกำจัดโรคใบจุดและโรคราสนิมของถั่วลิสง. น. 35. ใน : รายงานประจำปี 2513. ศูนย์เกษตรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ขอนแก่น.
- ชนินทร์ ดวงสอด. 2552. โรคของพืชตระกูลแตง. น. 59 - 60. ใน คู่มือโรคของผัก พิมพ์ครั้งที่ 1. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด นนทบุรี.
- ชุตินันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา ทวี เก้าศิริ สมภาค สิทธิพงศ์ และ ชัยวัฒน์ จันทศรีวงศ์. 2524. ใบจุด : โรคระบาดใหม่ของฝ้าย. น. 109. ใน : รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 19 สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. (บทคัดย่อ)



- ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา เพลินพิศ สงสังข์ นลินี ศิวาภรณ์ และ ปรีชา สุรินทร์. 2536. โรคของถั่วเหลือง. น. 836-837. ใน : *กำหนดการและบทความคัดย่อการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 19*. โรงแรมดุสิต เจ.บี. หาดใหญ่ สงขลา.
- ทองพูน ศรีวรรณ. 2502. *การทดลองใช้ Fungicides บางชนิดกับโรคตากบของยาสูบ*. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 39 หน้า.
- ทะนง พงษ์พานิช. 2508. *การสำรวจโรคของนุ่นขึ้นต้นในบางท้องที่ของประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 61 หน้า.
- ทัศนาวพร ทศคร และ สุรภี กীরติยะอังกูร. 2548. โรคของกล้วยไม้. น. 1 - 31. ใน : *โรคไม้ดอก*. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด นนทบุรี.
- ทัศนาวพร ทศคร ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และ สุรภี กীরติยะอังกูร. 2553. โรคของกล้วยไม้. น. 3-44. ใน : *โรคไม้ดอกไม้ประดับ*. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.
- ธรรมศักดิ์ สมมาตย์ และ M.K. Beute. 2529. ลักษณะรูปร่างและการงอกของเชื้อ *Phaeoisariopsis personata* (Berk. & Curt.) von Arx. *วารสารโรคพืช* 6: 7-11.
- ธารทิพย์ ภาสบุตร. 2553. โรคของเยอร์ปีร่า. น. 86 - 93. ใน : *โรคไม้ดอกไม้ประดับ*. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ.
- นิรนาม. 2501. การตรวจโรคพืชให้แก่ประชาชนและหน่วยราชการ. น. 83-86. ใน : *รายงานประจำปี 2501*. แผนกโรควิทยา. กองพืชพันธุ์. กรมกสิกรรม.
- นิรนาม. 2508. โรคพืชที่ตรวจพบเป็นครั้งคราว. น. 299-312. ใน : *รายงานประจำปี 2508*. แผนกโรคพืชวิทยา. กองพืชพันธุ์. กรมกสิกรรม.
- นิยมรัฐ ไตรศรี ลักษณะา วรณภีร์ สิริลักษณ์ โล่ห์สวัสดิ์ และ พัฒนา สนธิรัตน์. 2531. ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดต่อโรคใบจุดของกระเจี๊ยบเขียว. น. 112-116. ใน : *รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2531*. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- นลินี ศิวาภรณ์ ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และ ปรีชา สุรินทร์. 2537. โรคทานตะวัน. *ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา*. 4: 21
- นิวัฒน์ เสนาะเมือง และ พิศาล ศิริธร. 2529. โรคงาและการป้องกันกำจัด. *แก่นเกษตร* 14: 296-298.
- นุชนารถ จงเลขา. 2525. โรคที่สำคัญของพืชบางชนิดในภาคเหนือ. *วารสารโรคพืช* 2: 1 -6.
- ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร และ ประวิทย์ กฤตยานวัช. 2514. *การศึกษาเรื่องถั่วเหลือง*. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์. กรุงเทพฯ. 71 หน้า.

- ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ พัฒนา สนธิรัตน์ วิรัช ชูบำรุง ปิยะ เกียรติก้อง และ อภิชัย อยู่เอี่ยม. 2525. รวบรวมและจำแนกเชื้อราชนิดต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุโรคกล้วย. ไม่มีเลขหน้า. ใน *รายงานผลการทดลอง พ.ศ. 2525* เล่มที่ 1. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ วิรัช ชูบำรุง อภิชัย อยู่เอี่ยม และ สัญชัย ตันตยาภรณ์. 2526. โรคราน้ำค้างของพืชตระกูลแตงบางชนิด. ไม่มีเลขหน้า. ใน : *รายงานผลการทดลอง พ.ศ. 2526* เล่มที่ 1. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ศิริพงษ์ คุ่มภัย วิรัช ชูบำรุง และ พัฒนา สนธิรัตน์. 2527. ศึกษาเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับถั่วไร่รับประทานฝักสด. น. 39-49. ใน : *รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2527* เล่มที่ 3. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ศิริพงษ์ คุ่มภัย วิรัช ชูบำรุง และ พัฒนา สนธิรัตน์. 2528. ศึกษาเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับถั่วไร่รับประทานฝักสด. น. 95-101. ใน : *รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2528*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- ปราณีต ศิริวัลลภ ทศพล วิสุทธารมณณ์ สุรสิทธิ์ บุญทวี และ ลักษณะ วรณภีร์. 2528. ศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดเพื่อป้องกันกำจัดโรคดอกเน่าของบวบและฟักทอง. น. 858-867. ใน : *รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2528* เล่มที่ 2. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- พรพิมล อธิปัญญาคม และศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2550. สำรวจ รวบรวมและจำแนกราดำ. หน้า 1050-1057. ใน : *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549* เล่ม 2. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- พรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. โรคของผักตระกูลกะหล่ำและตระกูลผักกาด. น. 91 - 102. ใน : *คู่มือโรคผัก*. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด นนทบุรี.
- พรพิมล อธิปัญญาคม. 2553. โรคของกวนอิม. น.140 - 149. ใน : *โรคไม้ดอกไม้ประดับ*. กลุ่มวิจัยโรคพืชสำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ.
- พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2554. สำรวจรวบรวมและจำแนกราสกุล *Cercosporoid* fungi และ teleomorph Surveying, Collecting, and Identification of *Cercosporoid* fungi and their teleomorph. หน้า 1746 – 761. ใน : *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553* เล่ม 3. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- พงษ์เทพ ขจรไชยกูล และ กาญจนสินธุ์ มีศุข. 2530. โรคใบจุดก้ำปลาของยางพารา. *วารสารยางพารา* 8: 92-98.

- พัฒนา สนธิรัตน์ เกษม ชมภูษประภา สมชาย กันหลง วิไล ปราสาทศรี สืบศักดิ์ สนธิรัตน์ และ อาทิตย์ พุ่งเกียรติไพบูลย์. 2520. การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชชนิดต่าง ๆ ในภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ. น. 154-161. ใน : *รายงานประจำปี 2520*. สำนักงานเกษตรภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ ขอนแก่น.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ วิรัช ชูบำรุง และ ปิยะ เกียรติก้อง. 2522. การศึกษาสัณฐานวิทยาอนุกรมวิธาน และวงจรชีวิตของเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพืชสำคัญ ทางเศรษฐกิจ. น. 1 - 13. ใน : *รายงานประจำปี 2522*. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ วิรัช ชูบำรุง และ ปิยะ เกียรติก้อง. 2523. การศึกษา สัณฐานวิทยาอนุกรมวิธาน และวงจรชีวิตของเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดของ พืช. น. 1 - 10. ใน : *รายงานประจำปี 2523 เล่มที่ 1*. กองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ วิรัช ชูบำรุง และ ปิยะ เกียรติก้อง. 2523. การศึกษา สัณฐานวิทยาอนุกรมวิธาน และวงจรชีวิตของเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพืช. น. 1 - 9. ใน : *รายงานประจำปี 2523 เล่มที่ 2*. กองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.
- พัฒนา สนธิรัตน์ วิรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ และ ลักษณะ วงศ์หิรัญญิกัญญา. 2532. ศึกษา เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนางพาราในประเทศไทย. น. 87 - 88. ใน : *รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2532*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ และ วิรัช ชูบำรุง. 2534. รายงานโรคพืชเกิดจากเชื้อรา ชุดที่ 2. *วารสารโรคพืช* 11: 65-72.
- พัฒนา สนธิรัตน์. 2534. รายงานโรคพืชเกิดจากเชื้อรา ชุดที่ 1. *วารสารโรคพืช* 11: 52-55.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ โคน. 2523. *Cercospora* สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 51 หน้า.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ โคน. 2537. *ดรรรชนีโรคพืชในประเทศไทย*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.
- มานพ แก้วกำเนิด. 2508. โรคของยาสูบเวอร์จิเนียในภาคเหนือของประเทศไทย. น. 281 - 283. ใน : *รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ครั้งที่ 4 สาขาพืชและชีววิทยากับ สาขาสัตว*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และธารทิพย์ ภาสบุตร. 2550. สำรวจ รวบรวม และจำแนกชนิด เชื้อราสนิมสาเหตุโนตพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับและวัชพืชในแปลงปลูก. น. 993 - 1003. ใน : *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549 เล่ม 2*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- วสันต์ เพชรรัตน์ และ มานะ กาญจนมณีเสถียร. 2532. เชื้อรา *Cercospora* สาเหตุโรคพืชในภาคใต้ ของประเทศไทย. *วารสารโรคพืช* 9: 23 - 27.

- วันทนีย์ อุ้วาณิชย์ อับสร เปลี่ยนสินไชย สุณี ศรีสิงห์ และ อนุสรณ์ กุศลวงค์. 2537. ความก้าวหน้าในงานวิจัยโรคใบจุดเหลืองของอ้อย. น. 25. ใน : *บทความวิจัยประชุมวิชาการประจำปี 2537*. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.
- วิจิตร ขจรมาลี. 2501. *การตรวจโรคข้าวบางท้องที่ในภาคกลาง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 75 หน้า.
- วิรัช ชูบำรุง อาภรณ์ ธรรมเขต ประไพศรี พิทักษ์ไพรวิน และ พัฒนา สนธิรัตน์. 2529. การจำแนกชนิดเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของชา. น. 171 -178. ใน : *รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2529*. กลุ่มงานวิทยาไมโค. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.
- วีรศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ อุดม ภูพิพัฒน์. 2525. การสำรวจโรคของถั่วพู. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 15: 225-239.
- วุฒิศักดิ์ บุตรธนู ไมตรี พรหมมินทร์ ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การศึกษาชนิดโรคของส้มเพื่อการนำเข้า. น. 763 – 772. ใน : *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา กรมวิชาการเกษตร.
- ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช พรพิมล อธิปัญญาคม ธารทิพย์ ภาสบุตร ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี ศรีสุข พูนผลกุล วุฒิศักดิ์ บุตรธนู พจนา ตระกูลสุขรัตน์ และ เพลินพิศ สงสังข์. 2549. สำรวจรวบรวม ตัวอย่างโรคพืชในประเทศไทย. น. 1108–1126. ใน : *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549 เล่ม 2*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- สมคิด ดิสถาพร. 2524. การแพร่ระบาดและผลงานวิจัยใหม่ล่าสุดของโรคข้าวที่สำคัญในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2523. *ข่าวสารโรคพืช* 1: 1 -6.
- สมชัย เบญจาทิกุล จุมพล สารนาคนิ นียมรัฐ ไตรศรี วิชิต แซ่เฮง และ ศุภชัย ลีจรรย์เนียร. 2522. การศึกษาทดลองและสำรวจโรคบางชนิดของมะเขือเทศ. น. 476-483. ใน : *รายงานประจำปี 2522*. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.
- โสภณ วงศ์แก้ว. 2528. *โรคของถั่วลิสงในประเทศไทย*. เอกสารเผยแพร่ของกลุ่มนักวิจัยโรคถั่วลิสง โครงการร่วมถั่วลิสง ฉบับที่ 1 ประเทศไทย. 76 หน้า.
- อมรรัตน์ ภูไพบูลย์ พิระวรรณ พัฒนวิภาส และ เพ็ญพิศ สงสังข์. 2550. สำรวจ รวบรวม เชื้อราโรคราน้ำค้างของพืชผักและไม้ผล. น. 1063 - 1070. ใน : *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549 เล่ม 2*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- อนงค์ จันท์ศรีกุล. 2515. โรคและศัตรูที่สำคัญของกุหลาบ. *กสิกร* 45: 277-282.
- อภิรัชต์ สมฤทธิ์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี ธารทิพย์ ภาสบุตร และ สุณิรัตน์ สีมะเดื่อ. 2554. สำรวจรวบรวม และจำแนกราก *Fusarium* สาเหตุโรคพืช (Sureying, Collecting and Identification of Plant Pathogenic *Fusarium*). น. 1762 – 1781. ใน : *รายงานผลการวิจัยประจำปี 2553*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

- อารีย์ ศรีพิจิตต์. 2516. *การศึกษาโรคของพริกและการป้องกันกำจัด*. ปัญหาพิเศษ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 21 หน้า.
- อุดม ภูพิพัฒน์. 2516. โรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ก. โรคที่มีความร้ายแรง ข. โรคที่ยังไม่มีความร้ายแรง. น. 90. ใน : *คำบรรยายการฝึกอบรมวิธีใช้อ้อยตามคุณภาพ*. สำนักงานอ้อยและน้ำตาล กระทรวงอุตสาหกรรม.
- อุดม ภูพิพัฒน์ กิตติ ชุณหวงค์ ประพันธ์ โอสถาพันธ์ ชุตินันต์ พาณิชศักดิ์พัฒนา และ สมศักดิ์ หัตถเลขา. 2525. โรคต่าง ๆ ของถั่วเหลืองในประเทศไทย. น. 20-21. ใน : *รายงานค้นคว้าวิจัยประจำปี 2525*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant pathology*. New York: Elsevier Academic Press. 922 p.
- Aime, M.C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47: 112-122.
- Alcorn, J. 1992. *Parapithomyces clitoriae* sp. nov. (Fungi: Hyphomycetes) and its *Pseudocercospora* synanamorph. *Australian Systematic Botany* 5: 711-715.
- Beenken, L., Zoller, S. and R. Berndt. 2012. Rust fungi on Annonaceae II: the genus *Dasyscypha* Berk. & M.A. Curtis. *Mycologia* 104: 659-81.
- Bennett, C., Aime, M.C. and G. Newcombe. 2011. Molecular and pathogenic variation within *Melampsora* on *Salix* in western North America reveals numerous cryptic species. *Mycologia* 103: 1004-1018.
- Braun, U. 1995. A monograph of *Cercospora*, *Ramularia* and allied genera (phytopathogenic hyphomycetes). Vol. 1. IHW-Verlag, Eching, Germany. 333 p.
- Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- Chandrasikul, A. 1962. *A preliminary host list of plant disease in Thailand*. Tech. Bull. No.6, Dept. of Agr., Bangkok. 23 p.
- Chandrasikul, A. 1962. *A supplementary host list of plant disease in Thailand*. Tech. Bull. No.6, Dept. of Agr., Bangkok. 14 p.
- Charleston, M. A. and D. L. Robertson. 2002. Preferential Host Switching by Primate Lentiviruses Can Account for Phylogenetic Similarity with the Primate Phylogeny. *Systematic Biology* 51, 528-535.
- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y. and S. Zhou. 2016. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources* 16 (1): 138-149. doi: 10.1111/1755-0998.

- Conow, C., Fielder, D., Ovadia, Y. and R. Libeskind-Hadas. 2010. Jane: a new tool for the cophylogeny reconstruction problem. *Algorithms for Molecular Biology* 5: 16.
- Cräutlein, M., Korpelainen, H., Pietiläinen, M. and J. Rikkinen. 2011. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodivers Conserv* 20: 373-389.
- Crous, P.W. and U. Braun. 2003. *Mycosphaerella* and its Anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. In *CBS Biodiversity Series 1*. Utrecht, Netherland. 571 p.
- Crous, P.W., Braun, U. and J.Z. Groenewald. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in mycology* 58: 1-32.
- Crous, P.W., Schoch, C.L., Hyde, K.D., Wood, A.R., Gueidan, C., de Hoog, G.S. and J.Z. Groenewald. 2009. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Studies in Mycology* 64: 17-47.
- Deighton, F.C. 1967. Studies on *Cercospora* and allied genera. II. *Passalora*, *Cercosporidium*, and some species of *Fusicladium* on *Euphorbia*. *Mycological Papers* 112: 1-80.
- Deighton, F.C. 1974. Studies on *Cercospora* and allied genera. V. *Mycovellosiella* Rangel, and a new species of *Ramulariopsis*. *Mycological Paper* 137: 1-76.
- Deighton, F.C. 1976. Studies on *Cercospora* and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Speg., *Pantospora* Cif. and *Cercoseptoria* Petr. *Mycological Paper* 140: 1-168.
- Deighton, F.C. 1979. Studies on *Cercospora* and allied genera VII. New species and redispersions. *Mycological Paper* 137: 1-56.
- Dixon, L.J., Castlebury, L.A., Aime, C.A., Glynn, N.C. and J.C. Comstock. 2010. Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. *Mycological Progress* 9: 459-468.
- Doungsa-ard, C., McTaggart, A.R., Geering, A.D.W., Dalisay, T.U., Ray, J. and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology* 44: 25-30.
- Goodwin, S.B., Dunkle, L.D. and V.L. Zismann. 2001. Phylogenetic Analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* Based on the Internal Transcribed Spacer Region of Ribosomal DNA. *Phytopathology* 91: 648-658.
- Groenewald, J. Z., Nakashima, C., Nishikawa, J., Shin, H. D., Park, J. H., Jama, A. N., Groenewald, M., Braun, U. and P. W., Crous. 2013. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology* 75: 115-170.



- Hawksworth, D. L. 2011. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2: 155-162.
- de Hoog, G.S. and A.H.G. Gerrits van den Ende. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. *Mycosciences* 41: 183-189.
- Katoh, K. and H. Toh. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9: 286-298.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28 (12): 1647-1649.
- Kumar, S., Stecher, G. and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Liu, K.L., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C.R., Eichorst, S.A. and G. Xie. 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 78: 1523-1533.
- Minnis, A.M., McTaggart, A.R., Rossman, A.Y. and M.C. Aime. 2012. Taxonomy of mayapple rust: the genus *Allodus* resurrected. *Mycologia* 104: 942-950.
- Nakashima, C., Meeboon, J., Motohashi, K. and C. To-anun. 2007. Studies on *Cercospora* and allied genera in northern Thailand. *Fungal Diversity* 26: 257-270.
- Nguanhom, J., Wongsopa, K., Cheewangkoon R. and C. To-anun. 2017. New Species *Pseudocercospora* and New Records from Thailand. Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University 44 : 29-38
- Nicoli, A., Zambolim, L., Nasu, E. G. C., Pinho, D. B., Pereira, O. L., Cabral, P. G. C. and E. M. Zambolim. 2011. First Report of *Cercospora apii* Leaf Spot on *Capsicum chinense* in Brazil. *Plant Disease* 95: 1194-1194.
- Norvell, L. L., Hawksworth, D. L., Petersen, R. H. and S. A. Redhead. 2010. Fungal nomenclature. *Mycotaxon* 113: 503-514.
- Nylander, J. A., Wilgenbusch, J. C., Warren, D. L. and D. L., Swofford. 2008. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics* 24: 581-583.



- Pachinburavan, A. 2519. *Cercospora* leaf mold of tomato. *แก่นเกษตร* 4 (1): 92.
- Petcharat, V. and M. Kanjanamaneesathian. 1989. Species of plant pathogen *Cercospora* in Southern Thailand. *Thai Phytopathology* 9: 23–27.
- Phengsintham, P., Braum, U., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E., Cai, L. and K.D. Hyde. 2013. Monograph of Cercosporoid fungi from Thailand. *Plant Pathology & Quarantine Online* 3: 67-138.
- Phengsintham, P., Chukeatirote, E., McKenzie, E. H. C., Moslem, M. A., Hyde, K. D. and U. Braun. 2012. Fourteen new records of cercosporoids from Thailand. *Maejo International Journal of Science and Technology* 6: 47-61.
- Pollack, F.G. 1987. *An annotated compilation of Cercospora names*. pp 1-212. Berlin: J. Cramer.
- Puckdeedindan, P. 1966. *A supplementary host list of plant disease in Thailand*. Tech. Bull. No.7, Dept. of Agr., Bangkok. 24 p.
- Rehner, S.A. and G.J. Samuels. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98: 625–634.
- Ruiz, R. C. and U. Braun. 1989. *Cercospora* and allied genera of Cuba (1). *Cryptogamic Botany* 1: 42-55.
- Seifert, K.A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9 Suppl s1: 83.
- Silva, M. and O. L. Pereira. 2008. Postharvest *Cercospora apii* fruit rot disease on *Cucurbita maxima* (Cucurbitaceae). *Australasian Plant Disease Notes* 3: 21-23.
- Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Sontirat, P., P. Phitakpraiwan, W. Choobamroong and P. Giatgong. 1980. *Plant Pathogenic Cercosporae in Thailand*. Tech. Bull., Mycology Branch, Plant Pathol. and Microbiol. Div., Dept. of Agr. 51 p.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313.
- Talavera, G. and J. Castresana. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* 56:564-577.
- Taylor, J. W. 2011. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2: 113-120.



- To-anun, C., Hidayat, I. and J. Meeboon. 2011. Genus *Cercospora* in Thailand: Taxonomy and Phylogeny (with a dichotomous key to species). *Plant Pathology & Quarantine* 1: 11-87.
- Vilgalys, R. and M. Hester. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Page 315-322. In : M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego.
- Yun, Y.H., Minnis, A.M., Kim, Y.H., Castlebury, L.A. and M.C. Aime. 2011. The rust genus *Frommeiella* revisited: a later synonym of *Phragmidium* after all. *Mycologia* 103: 1451-163.

Table 1 Leaf spot specimens caused by cercosporoid fungi collected from this study.
(2019-2021)

| Host | Locations |
|-------------------------------|--|
| <i>Abelmoschus esculentus</i> | Mueang district, Surat Thani province |
| <i>Musa</i> sp. | Tha Muang district, Chataburi province |
| <i>Dendrobium</i> sp. | Nabirom sub-district, Bang lan district, Nakhon Pathom province |
| <i>Brassica chinensis</i> | Ban Kham, Chatturat district, Chaiyaphum province |
| <i>Cannabis sativa</i> | Don Khwang, Mueang district, Uthai Thani |
| <i>Apium graveolens</i> | Wang Kanai, Tha Maka district, Kanchanaburi province |
| <i>Coccinia grandis</i> | Doi Lan, Mueang district, Chiangrai province; Na Nai, Phon Sawan district, Nakhon Phanom province |
| <i>Citrullus lanatus</i> | Sa Yai Som, U Thong district, Suphan Buri province |
| <i>Vigna radiata</i> | Lam Phayon, Tak Fa district, Nakhon Sawan province |
| <i>Lablab purpureus</i> | Doi Lan, Mueang district, Chiangrai province |
| <i>Vigna unguiculata</i> | Sai Nung, Tha Koy, Tha Yang district, Phetchaburi province; Kaeng Krachan District Phetchaburi province |
| <i>Arachis hypogaea</i> | Huay Sai Nuea sub-district, Cha-am district, Phetchaburi |
| <i>Nelumbo nucifera</i> | Nhong Han, San Sai district, Chiangmai province |
| <i>Zinnia violacea</i> | Thung Song district, Nakhon Si Thammarat province |
| <i>Gomphrena globosa</i> | Thung Song district, Nakhon Si Thammarat province |
| <i>Beta vulgaris</i> | Pak Khwae, Mueang district, Sukhothai province |
| <i>Romaine lettuce</i> | Phu Thap Buek, Phetchabun province |
| <i>Capsicum furtescens</i> | Cheng Doi, Doi Saket district, Chiangmai province; Pak Phanang district, Nakhon Si Thammarat province; Dune Sart, Kranuan district, Khon Kaen province; Tha Chana district, Surat Thai province |
| <i>Momordica charantia</i> | Ban Na Makhua, Pla Pak district, Nakhon Phanom province Ban Bang Por, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat; Kaeng |
| <i>Carica papaya</i> | Krachan District Phetchaburi province; Doi Lan, Mueang district, Chiangrai province; Ban Na Makhua, Pla Pak district, Nakhon Phanom province |
| <i>Manihot esculenta</i> | Fhahoun sub-district, Ko Wang district, Yasothon province |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | Bang Shong, Pak Khwae, Mueang district, Sukhothai province |

Table 2 List of *Cercospora* and *Corynespora* included in this study.

| Taxa | Accession No. | Host | GenBank ITS | Accession No. tef1 |
|------------------------------------|---------------|------------------------------|-------------|--------------------|
| <i>Cercospora agavicola</i> | CPC 117292 | <i>Agave tequilana</i> | NR111175 | AY966897 |
| <i>Cer. althaeina</i> | CBS 248.67 | <i>Althaea rosea</i> | NR111770 | JX143284 |
| <i>Cer. apii</i> | CBS 116455 | <i>Glebionis coronaria</i> | NR119525 | AY840486 |
| | M1095 | <i>Apium graveolens</i> | this study | this study |
| <i>Cer. apiicola</i> | CBS 116457 | <i>Apinum</i> sp. | NR119526 | AY840503 |
| <i>Cer. armoraciae</i> | CBS 250.67 | <i>Armoracia rusticana</i> | JX143545 | JX143299 |
| <i>Cer. beticola</i> | CBS 116456 | <i>Beta vulgaris</i> | NR121315 | AY840494 |
| | M0878 | <i>Beta vulgaris</i> | this study | this study |
| | M0879 | <i>Beta vulgaris</i> | this study | this study |
| <i>Cer. celosiae</i> | CBS 132600 | <i>Celosia cristata</i> | JX143570 | JX143326 |
| <i>Cer. citrulina</i> | ICMP 21757 | <i>Citrullus lanatus</i> | MK210537 | MK210420 |
| | M1008 | <i>Coccinia grandis</i> | this study | this study |
| | M1028 | <i>Citrullus lanatus</i> | this study | this study |
| <i>Cer. coniogrammes</i> | CBS 132634 | <i>Coniogramme japonica</i> | NR147260 | JX143341 |
| <i>Cer. cyperina</i> | CPC 23919 | <i>Cyperus alternifolius</i> | NR147292 | - |
| <i>Cer. euphorbiae-sieboldiana</i> | CBS 113306 | <i>Euphorbia sieboldiana</i> | NR147262 | JX143351 |
| <i>Cer. flagellaris</i> | CBS 113127 | <i>Eichhornia crassipes</i> | DQ835075 | DQ835101 |
| <i>Cer. glycinicola</i> | CPC 23911 | <i>Glycine max</i> | KT193670 | - |
| | CPC 23912 | <i>Glycine max</i> | NR147293 | - |
| <i>Cer. gomphrenigena</i> | CBS 144613 | <i>Gomphrena globosa</i> | MK442573 | MK442690 |
| <i>Cer. helianthicola</i> | LIPIMC 0775 | <i>Helianthus tuberosus</i> | KC776156 | - |
| <i>Cer. ipomoeae</i> | CEO16 | <i>Ipomoea aquatica</i> | JN662322 | - |
| <i>Cer. lactucae-sativae</i> | CPC 23819 | <i>Lactuca sativa</i> | KT193675 | - |
| <i>Cer. malloti</i> | CPC 24828 | <i>Musa sapientum</i> | KT193691 | - |
| <i>Cer. mercurialis</i> | CBS 550.71 | <i>Mercurialis perennis</i> | NR111772 | JX143387 |
| <i>Cer. mikaniicola</i> | CPC 22030 | <i>Mikania cordata</i> | KT193694 | - |
| <i>Cer. musigena</i> | CPC 24809 | <i>Musa</i> sp. | NR147294 | - |
| | CPC 24831 | <i>Musa</i> sp. | KT193699 | - |
| <i>Cer. nicotianae</i> | CPC 22006 | <i>Nicotiana tabacum</i> | KT193702 | - |
| <i>Cer. physalidis</i> | CBS 765.79 | <i>Solanum tuberosum</i> | JX143633 | JX143392 |
| <i>Cer. pileicola</i> | CBS 132607 | <i>Pilea pumila</i> | NR147264 | JX143393 |
| <i>Cer. polygonacea</i> | CBS 132614 | <i>Persicaria longiseta</i> | JX143637 | JX143396 |
| <i>Cer. punctiformis</i> | CBS 132626 | <i>Cynanchum wilfordii</i> | JX143638 | JX143397 |
| <i>Cer. rumicis</i> | CPC 5439 | <i>Rumex sanguineus</i> | JX143648 | JX143407 |
| <i>Cer. samambaiiae</i> | CPC 24673 | <i>Thelypteris dentata</i> | NR147287 | KT037474 |
| <i>Cer. senecionis-walkeri</i> | CBS 132636 | <i>Senecio walkeri</i> | JX143649 | JX143408 |
| <i>Cer. soja</i> | CBS 132615 | <i>Glycine soja</i> | JX143659 | JX143419 |
| <i>Cercospora</i> sp.1 | M0308 | <i>Brassica chinensis</i> | this study | this study |
| | M0351 | <i>Romaine lettuce</i> | this study | this study |

Table 2 List of *Cercospora* and *Corynespora* included in this study. (continue)

| Taxa | Accession No. | Host | GenBank Accession No. | |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------|------------|
| | | | ITS | tef1 |
| <i>Cercospora</i> sp.2 | M0967 | <i>Vigna radiata</i> | this study | this study |
| <i>Cer. vignigena</i> | CBS 132611 | <i>Vigna unguiculata</i> | NR147266 | JX143493 |
| <i>Cer. violae</i> | CBS 251.67 | <i>Viola tricolor</i> | NR111774 | JX143496 |
| <i>Cer. zinniae</i> | CPC 22027 | <i>Zinnia elegans</i> | KT193706 | - |
| | CPC 22041 | <i>Zinnia elegans</i> | KT193708 | - |
| <i>Corynespora cassicola</i> | DX-2a | <i>Syringa oblata</i> | MH596853 | MT787295 |
| | CBS 161.60 | <i>Syringa oblata</i> | MH857942 | - |
| | ST1 | <i>Ligustrum xvicaryi</i> | KC138855 | KX429666 |
| | ZM160181 | <i>Fragaria xananassa</i> | KY082696 | KY112719 |
| | M 0327 | <i>Carica papaya</i> | this study | this study |
| | M 0379 | <i>Brassica chinensis</i> | this study | this study |
| | M 0445 | <i>Carica papaya</i> | this study | this study |
| | M 0521 | <i>Vigna unguiculata</i> | this study | this study |
| | M 0522 | <i>Carica papaya</i> | this study | this study |
| | M 0529 | <i>Capsicum furtescens</i> | this study | this study |
| | M 0798 | <i>Musa</i> sp. | this study | this study |
| | M 0984 | <i>Vigna unguiculata</i> | this study | this study |
| | M 0987 | <i>Carica papaya</i> | this study | this study |
| | M 0990 | <i>Carica papaya</i> | this study | this study |
| | M 1117 | <i>Cannabis sativa</i> | this study | this study |
| | M 1119 | <i>Cannabis sativa</i> | this study | this study |
| | M 1122 | <i>Cannabis sativa</i> | this study | this study |
| | M 1124 | <i>Cannabis sativa</i> | this study | this study |
| | M 1125 | <i>Cannabis sativa</i> | this study | this study |
| M 1127 | <i>Cannabis sativa</i> | this study | this study | |
| <i>Cory. citricola</i> | CABI211585 | <i>Poncirus trifoliatus</i> | FJ852593 | - |
| | CBS 169.77 | <i>Poncirus trifoliatus</i> | FJ852594 | - |
| <i>Cory. encephalarti</i> | CBS 145555 | <i>Encephalartos</i> sp. | NR165556 | - |
| <i>Cory. pseudocassicola</i> | CPC 31708 | <i>Byrsonima</i> sp. | NR159833 | MH327877 |
| <i>Cory. smithii</i> | CABI 5649b | <i>Fagus sylvatica</i> | FJ852597 | GU349018 |
| | L120 | <i>Hippocrepis emerus</i> | KY984297 | KY984435 |
| | L130 | <i>Fagus sylvatica</i> | KY984298 | KY984436 |
| <i>Cory. submersa</i> | HKAS 92703 | Submerged wood | NR170017 | - |
| <i>Cory. thailandica</i> | CBS 145089 | Wood in forest | NR161145 | MK047567 |
| <i>Cory. torulosa</i> | CPC 15989 | <i>Musa acuminata</i> | NR145181 | - |
| | M 0796 | <i>Musa</i> sp. | this study | this study |
| | M 0799 | <i>Musa</i> sp. | this study | this study |
| <i>Cylothryiella rubronotata</i> | TR | <i>Acer pseudoplatanus</i> | KX650541 | KX650516 |
| <i>Septoria provencialis</i> | CPC 12226 | <i>Eucalyptus</i> sp. | DQ303096 | JX143522 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand.

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|------------------------------------|---|----------------|------------|---------------|----------|-------------------------|
| <i>Pseudocercospora dendrobii</i> | <i>Cercospora dendrobii</i> | กล้วยไม้ | ขึ้นเหลือง | ใบ | 2561 | ชินนิตร์ และคณะ, 2561 |
| <i>Pseudocercospora abelmoschi</i> | <i>Cercospora abelmoschi</i> <i>Cercospora hibisci</i> <i>Cercospora hibisci-manihotis</i> | กระเจี๊ยบเขียว | จุด | ใบ | 2561 | ชินนิตร์ และคณะ, 2561 |
| <i>Cercospora zinniae</i> | <i>Cercospora atrocincta</i> <i>Cercospora atricincta</i> <i>Cercosporina zinniae</i> | บานชื่น | จุด | ใบ กลีบดอก | 2561 | ชินนิตร์ และคณะ, 2561 |
| <i>Cercospora apii</i> | <i>Cercospora penicillata</i> var. <i>apii</i> <i>Cercospora penicillata</i> f. <i>apii</i> <i>Cercosporina apii</i> <i>Cercospora apii</i> f. <i>dauci-carotae</i> <i>Cercospora levistici</i> <i>Cercospora apii</i> f. <i>clerodendri</i> | ขึ้นฉ่าย | จุด ไหม้ | ใบ | 2549 | ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549 |
| <i>Passalora arachidicola</i> | <i>Passalora arachidicola</i> <i>Cercospora arachidis</i> var. <i>macrospora</i> | ถั่วลิสง | จุด | ใบ | 2513 | เฉลิมชัย และคณะ, 2513 |
| <i>Cercospora asparagi</i> | <i>Cercospora caulicola</i> <i>Cercosporina asparagicola</i> | หน่อไม้ฝรั่ง | ไหม้ | กิ่ง ก้าน ใบ | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| <i>Pseudocercospora timorensis</i> | <i>Cercospora batatae</i> <i>Ramularia batatae</i> <i>Cercospora timorensis</i> <i>Cercospora ipomoeae-purpureae</i> | มันเทศ | จุด | ใบ | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|-----------------------------------|--|-------------------|----------|------------|----------|-------------------------------|
| <i>Cercospora beticola</i> | <i>Cercosporina beticola</i> | สวิสชาร์ต | จุด | ใบ | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| | <i>Cercospora flagelliformis</i> | | | | | |
| | <i>Cercospora longissima</i> | ผักกาดหอม ผักสลัด | จุด | ใบ | 2520 | พัฒนา และคณะ, 2520 |
| | <i>Cercospora flagelliformis</i> | | | | | |
| | <i>Cercospora anthelmintica</i> | | | | | |
| | <i>Cercospora spinaciae</i> | | | | | |
| | <i>Cercospora chenopodiicola</i> | | | | | |
| | <i>Cercosporina spinacicola</i> | | | | | |
| <i>Cercospora brassicicola</i> | <i>Cercospora brassicae-campestris</i> | ผักกาดเขียวปลี | จุด | ใบ | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |
| | <i>Cercospora brassicae-juncea</i> | | | | | |
| <i>Cercospora canescens</i> | <i>Cercosporiopsis canescens</i> | ถั่วหรั่ง | จุด ไหม้ | ใบ | 2536 | ชุตินันต์ และคณะ, 2536 |
| | <i>Cercospora vignicaulis</i> | ถั่วแขก | จุด | ใบ | 2528 | ประไพศรี และคณะ, 2528 |
| | | ถั่วลิสง | จุด | ใบ | 2513 | เฉลิมชัย และคณะ, 2513 |
| | | ถั่วฝักยาว | จุด | ใบ | 2527 | ประไพศรี และคณะ, 2527 |
| | | ถั่วเขียว | จุด | ใบ | 2523 | Sontirat <i>et al.</i> , 1980 |
| <i>Phaeoramularia capsicicola</i> | <i>Cercospora capsicicola</i> | พริก | จุดตากบ | ใบ | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| | <i>Cladosporium capsici</i> | พริกชี้ฟ้า | จุด | ใบ | 2554 | อภิรัชต์ และคณะ, 2554 |
| | <i>Phaeoramularia capsicicola</i> | พริก | จุดตากบ | ใบ | 2516 | อารีย์, 2516 |
| | <i>Passalora capsicicola</i> | | | | | |
| | <i>Cercospora capsici</i> | | | | | |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|--------------------------------|--|--|-------------------------------|-----------------------|----------------------|--|
| <i>Claroehilum henningsii</i> | <i>Cercospora henningsii</i> <i>Cercospora manihotis</i> <i>Septogloeum manihotis</i> <i>Helminthosporium manihotis</i> <i>Cercospora cearae</i> | มันสำปะหลัง | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| <i>Zasmidium citri-griseum</i> | <i>Stenella citri-grisea</i> <i>Zasmidium citri-griseum</i> | ส้มเขียวหวาน ส้มจุก ส้มจีน ส้มโชกุน | กริสีขี้มีลาโนส จุดน้ำหมาก | ใบ | 2550 | วุฒิสักดิ์ และคณะ, 2550 |
| <i>Cercospora citrullina</i> | <i>Cercospora cucurbitae</i> <i>Cercospora sechii</i> <i>Cercospora momordicae</i> <i>Cercospora trichosanthis</i> <i>Cercospora chardoniana</i> <i>Cercospora momordicae</i> <i>Cercospora momordicae</i> <i>Cercospora luffae</i> | มะระ, มะระจีน ตำลึง แตงโม มะระ, มะระจีน | เน่า จุด จุด | ยอด ใบ ผล ใบ ใบ | 2528 2554 2505 | ปราณีต และคณะ, 2528 พรพิมล และคณะ, 2554 Chandrasrikul, 1962 Chandrasrikul, 1962 |
| <i>Cercospora coffeicola</i> | <i>Cercospora herrerana</i> <i>Ramularia goeldiana</i> | กาแฟ | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| <i>Cercospora daizu miura</i> | <i>Passalora sojina</i> Syn <i>Cer. daiza miura</i> | จุดตากบ | จุด | ใบ | 2514 | ประพันธ์ และประวิทย์, 2514 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|------------------------------------|---|------------------------------|---------|------------|----------|----------------------|
| <i>Cercospora duddiae</i> | <i>Passalora sojina</i> Syn <i>Cer. daiza miura</i> | กระเทียม | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| | | หอมใหญ่ | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| | | หอม, หอมแดง, หอมเล็ก | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| | | หอมเล็ก, หอมแบ่ง | | | 2545 | นิตยา, 2545 |
| <i>Cercospora gerberae</i> | | เยอปีร่า | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| <i>Cercospora gossypina</i> | | ฝ้าย | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| | | | | | 2523 | พัฒนา และคณะ, 2523 |
| <i>Cercospora helianthicola</i> | | ทานตะวัน | จุด | ใบ | 2523 | วสันต์ และมานะ, 2523 |
| <i>Cercospora hydrangea</i> | <i>Cercosporina hydrangeicola</i> | ไฮเดรนเยีย | จุด | ใบ | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| | <i>Cercospora hydrangeana</i> | | | | | |
| | <i>Cercospora arborescentis</i> | | | | | |
| <i>Cercospora kikuchii</i> | <i>Mycosphaerella phaseoli</i> | ถั่วเหลือง | จุด | ใบ | 2522 | พัฒนา และคณะ, 2522 |
| <i>Cercospora lactucae-setivae</i> | <i>Cercospora longispora</i> | กะหล่ำปลี | จุด | ใบ | 2552 | พรพิมล, 2552 |
| | <i>Cercospora longissima</i> | ผักกาดหอม ผักสลัด | จุด | ใบ | 2552 | พรพิมล, 2552; 2554 |
| | <i>Cercospora lactucae</i> | | | | 2554 | |
| | <i>Cercospora ixeridis-chinensis</i> | | | | | |
| <i>Cercospora lactucae-indicae</i> | <i>Cercospora longispora</i> | กระเจี๊ยบมอญ, กระเจี๊ยบเขียว | จุด | ใบ | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |
| | <i>Cercospora longissima</i> | ผักกาดหอม ผักสลัด | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| | <i>Cercospora lactucae</i> | | | | | |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|------------------------------------|---|-------------------|--------------------------|------------|------------------------------|---|
| <i>Cercospora lactucae-indicae</i> | <i>Cercospora ixeridis-chinensis</i> <i>Cercospora lactucae-indicae</i> | ผักกาดหอม ผักสลัด | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| <i>Cercospora longipes</i> | | อ้อย | จุดสีน้ำตาล | ใบ | 2516 | อุดม, 2516ก |
| <i>Cercospora moricola</i> | | หม่อน | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| <i>Cercospora physalidis</i> | <i>Cercospora nicotianae</i> <i>Cercospora solanicola</i> <i>Cercospora physalicola</i> <i>Cercospora raciborskii</i> <i>Cercosporina daturicola</i> <i>Cercospora capsici</i> <i>Cercospora abchastica</i> <i>Cercospora melongenae</i> <i>Cercosporina petuniae</i> | ยาสูบ | จุดตากบ | ใบ | 2502 2508 2550 | ทองพูน, 2502 มานพ, 2508 ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550 |
| <i>Cercospora janseana</i> | <i>Cercospora oryzae</i> <i>Napicladium janseanum</i> <i>Passalora janseana</i> <i>Sphaerulina oryzina</i> | ข้าว | ขีดสีน้ำตาล เมล็ดต่าง | ใบ เมล็ด | 2501 2524 2549 2554 | วิจิตร, 2501 สมคิด, 2524 ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549 วิษชุดา, และคณะ, 2554 |
| <i>Cercospora personata</i> | <i>Phaeoisariopsis personata</i> <i>Syn. Cercosporidium personatum</i> <i>Syn. Cercospora personata</i> | ถั่วลิสง | tikka | ใบ | 2528 2529 2513 2501 | โสภณ, 2528 ธรรมศักดิ์ และ Beute, 2529 เฉลิมชัย และคณะ, 2513 นิรนาม, 2501 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|--------------------------------|---|---|----------------|---------------|--------------|--|
| <i>Cercospora pisa-sativae</i> | <i>Cercospora pisa-sativae</i> | ถั่วลิ้นเตา | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |
| <i>Cercospora ricinella</i> | <i>Cercospora albidomaculans</i> <i>Cercospora ricini</i> | ละหุ่ง | จุด | ใบ | 2501 | นิรานาม, 2501 |
| <i>Cercospora sesami</i> | | งา | จุด, เมล็ดเน่า | ใบ เมล็ด | 2522 | พัฒนา และคณะ, 2522 |
| <i>Cercospora sorghi</i> | | ข้าวฟ่าง | จุดสีเทา | ใบ | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |
| <i>Cercospora tectonae</i> | | สัก | จุด | ใบ | 2522 | พัฒนา และคณะ, 2522 |
| <i>Cercospora theae</i> | <i>Cercospora theae</i> <i>Pseudocercospora ocellata</i> | ชา | จุด | ใบ | 2529 | วิรัช และคณะ, 2529 |
| <i>Cercospora viticola</i> | | องุ่น | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| <i>Cercospora zinniae</i> | <i>Cercospora atricineta</i> <i>Cercospora atrocincta</i> <i>Cercosporina zinniae</i> | บานชื่น | จุด | ใบ กลีบดอก | 2549 2550 | ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549 ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550 |
| <i>Claro hilum henningsii</i> | <i>Cercosporidium henningsii</i> <i>Passalora henningsii</i> <i>Cercospora manihotis</i> <i>Cercospora cearae</i> <i>Septogloeum manihotis</i> <i>Helminthosporium manihotis</i> | มันสำปะหลัง | จุด | ใบ | 2520 2508 | โสภณ, 2520 นิรานาม, 2508 |
| <i>Corynespora cassiicola</i> | <i>Cercospora melonis</i> <i>Helminthosporium cassiaeicola</i> | ถั่วหรั่ง ถั่วเขียว, ถั่วเขียวผิวมัน | จุด, ไหม้ | ใบ | 2536 | ชุตินันต์ และคณะ, 2536 |
| | | | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------|--------------------------|------------|----------|-------------------------------|
| <i>Corynespora cassiicola</i> | <i>Cercospora melonis</i> | แตงฝรั่ง, แตงเทศ | จุด | ใบ | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |
| | <i>Corynespora mazei</i> | ฝ้าย | จุด | ใบ | 2524 | ชุติมันต์ และคณะ, 2524 |
| | <i>Helminthosporium warpuriae</i> | มะเขือแปราะ | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |
| | <i>Helminthosporium papayae</i> | ถั่วแขก, ถั่วพุ่ม | จุด | ใบ | 2526 | ชุติมันต์ และคณะ, 2526 |
| | <i>Cercospora vignicola</i> | เยอบีร่า | จุด | ใบ | 2553 | ธารทิพย์, 2553 |
| | <i>Helminthosporium vignae</i> | กะเพรา | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |
| | | มะละกอ | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| | | | | | 2530 | กรรณิการ์ และคณะ, 2530 |
| | | | | | 2555 | พรพิมล และคณะ, 2555 |
| | | ยางพารา | จุดก้างปลา | ใบ | 2530 | พงษ์เทพ และกาญจน์สินธุ์, 2530 |
| | | ทับทิม | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |
| | | ส้มโอ | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |
| | | งา | จุดเป่ากระสุน, เมล็ดเน่า | ใบ | 2529 | นิวัฒน์ และพิศาล, 2529 |
| | | ถั่วเหลือง | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |
| | | ทานตะวัน | ไหม้ | ใบ | 2537 | นลินี และคณะ, 2537 |
| | | มะขาม | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |
| | | ยาสูบ | จุด | ใบ | 2535 | พัฒนา และคณะ, 2535 |
| | | มะเขือเทศ | จุด | ใบ | 2522 | สมชัย และคณะ, 2522 |
| | | ผักบุ้ง, ผักบุ้งไทย | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |
| | | ฟัก, ฟักเขียว, แฝง | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|------------------------------------|--|------------------|---------|------------|----------|-------------------------------|
| <i>Corynespora cassiicola</i> | | แตงฝรั่ง, แตงเทศ | จุด | ใบ | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |
| <i>Didymella bryoniae</i> | <i>Mycosphaerella citrullina</i> <i>Sphaeria bryoniae</i> <i>Didymella melonis</i> <i>Phyllosticta citrullina</i> <i>Sphaerella bryoniae</i> <i>Sphaerella melonis</i> | แตงโม | ยางไหล | ลำต้น | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |
| <i>Paracercospora egenula</i> | <i>Cercospora egenula</i> <i>Cercoseptoria egenula</i> <i>Pseudocercospora egenula</i> <i>Cercospora solani-melongenae</i> | มะเขือยาว | จุด | ใบ | 2523 | พัฒนา และคณะ, 2523 |
| | | มะเขือยาว | จุด | ใบ | 2532 | วสันต์ และมานะ, 2532 |
| | | มะเขือขื่น | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Phaeoramularia capsicola</i> | <i>Cercospora unamunoi</i> <i>Cercospora capsicola</i> <i>Passalora capsicola</i> <i>Cercospora capsici</i> <i>Cercospora angolensis</i> <i>Phaeoramularia angolensis</i> <i>Pseudophaeoramularia angolensis</i> | พริก | จุด | ใบ | 2516 | อารีย์, 2516 |
| | | ส้มแมนดาริน | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora abelmoschi</i> | <i>Cercospora abelmoschi</i> <i>Cercospora hibisci</i> <i>Cercospora hibisci-manihotis</i> | กระเจี๊ยบเขียว | จุด | ใบ | 2531 | นิยมรัฐ และคณะ, 2531 |
| | | | | | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| | | | | | 2561 | ชนิทร และคณะ, 2561 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References | | | | | |
|--|--|------------------|------------|------------|----------|-------------------------------|--------------|---------------------|----|------|-------------------------------|
| <i>Pseudocercospora abelmoschi</i> | <i>Cercospora hibisci-manihotis</i> | กระเจี๊ยบมอญ, | จุด | ใบ | 2531 | นิยมรัฐ และคณะ, 2531 | | | | | |
| | | กระเจี๊ยบเขียว | | | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 | | | | | |
| <i>Pseudocercospora atromarginalis</i> | <i>Pseudocercospora fuliginea</i> | มะเขือเทศ | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 | | | | | |
| | <i>Cercospora atromarginalis</i> | | | | 2519 | Pachinburavan, 2519 | | | | | |
| | <i>Cercospora rigospora</i> | | | | 2523 | พัฒนา และคณะ, 2523 | | | | | |
| | <i>Cercospora tosenis</i> | | | | 2549 | ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549 | | | | | |
| | <i>Cercospora nigri</i> | | | | | | | | | | |
| | <i>Cercospora solani-biflori</i> | | | | | | | | | | |
| | <i>Cercospora solani-nigri</i> | | | | | | | | | | |
| | <i>Pseudocercospora solani-melongenicola</i> | | | | | | | | | | |
| <i>Pseudocercospora biophyti</i> | <i>Cercospora biophyti</i> | ออกซาลิส เดบิลิส | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 | | | | | |
| <i>Pseudocercospora dendrobii</i> | <i>Cercospora dendrobii</i> | กล้วยไม้ | ปื้นเหลือง | ใบ | 2561 | ชินนินทร และคณะ, 2561 | | | | | |
| | | | | | | ทัศนาวพร และคณะ, 2553 | | | | | |
| | | | | | | พรพิมล และคณะ, 2554 | | | | | |
| | | | | | | กุลฉวี, 2526 | | | | | |
| <i>Pseudocercospora centrosematicola</i> | <i>Cercospora centrosematicola</i> | อัญชัน | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 | | | | | |
| <i>Pseudocercospora cosmicola</i> | <i>Cercospora cosmicola</i> | คอสมอส | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 | | | | | |
| <i>Pseudocercospora cruenta</i> | <i>Cercospora cruenta</i> | ถั่วฝักยาว | จุด | ใบ | 2527 | ประไพศรี และคณะ, 2527 | | | | | |
| | | | | | | <i>Cercospora phaseolorum</i> | 2505 | Chandrasrikul, 1962 | | | |
| | | | | | | <i>Cercospora vignae</i> | ถั่วฝักยาว | จุด | ใบ | 2549 | ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549 |
| | | | | | | <i>Cercospora dolichi</i> | กวาวเครือขาว | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|---|---|---|---|----------------------------------|--|---|
| <i>Pseudocercospora cruenta</i> | <i>Cercospora raciborskii</i> <i>Cercospora vignae-sinensis</i> <i>Cercospora neovignae</i> | | | | | |
| <i>Pseudoperonospora cubensis</i> | <i>Peronospora cubensis</i> <i>Peronospora cubensis</i> <i>Peronoplasmodium cubensis</i> | บวบเหลี่ยม มะระ, มะระจีน, มะระยาว แตงฝรั่ง, แตงเทศ แตงกวา, แตงร้าน แตงโม แตงไทย | ราน้ำค้าง จุด ราน้ำค้าง ราน้ำค้าง ราน้ำค้าง | ใบ ใบ ใบ ใบ ใบ ใบ | 2550 2505 2501 2526 2552, 2554 2525 2552, 2554 2550 2509 2505 2509 | ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550 Chandrasrikul, 1962 นิรนาม, 2501 ประไพศรี และคณะ, 2526 ชินินทร และคณะ, 2552; 2554 ประไพศรี และคณะ, 2525; ชินินทร และคณะ, 2552; 2554 อมรรัตน์ และคณะ, 2550 Puckdeedindan, 1966 Chandrasrikul, 1962 ขวัญไทย, 2509 |
| <i>Pseudocercospora daturina</i> | <i>Cercospora daturina</i> | ลำโพงกาสลัก | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora dovyalidis</i> | <i>Cercospora dovyalidis</i> <i>Pseudocercospora dovyalidis</i> | ตะขบควาย | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora euphorbie-pubescentis</i> | | โป๊ยเซียน | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora heveae</i> | <i>Cercospora heveae</i> <i>Cercosporina heveae</i> | ยางพารา ยางพารา | จุด จุด | ใบ ใบ | 2505 2532 | Chandrasrikul, 1962 พัฒนา และคณะ, 2532 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|--|--------------------------------|----------------------|------------|------------|----------|-------------------------------|
| <i>Pseudocercospora jatrophae</i> | <i>Cercospora jatrophae</i> | สบู่ดำ | จุด | ใบ | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| | <i>Cercoseptoria egenula</i> | มะเขือขื่น | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora eragrostidis</i> | | กล้วยไม้ | ปื้นเหลือง | ใบ | 2553 | ทัศนพร และคณะ, 2553 |
| | | กล้วยไม้ | จุดสนิม | ดอก | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| <i>Pseudocercospora gardeniae</i> | <i>Cercospora gardeniae</i> | พุทซ้อน | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora jujubae</i> | <i>Cercospora jujubae</i> | พุทรา, พุทรานอินเดีย | จุด | ใบ | 2553 | พรพิมล และคณะ, 2553 |
| | <i>Cladosporium zizyphi</i> | พุทรา | จุด | ใบ | 2553 | พรพิมล และคณะ, 2553 |
| | | พุทรา | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| <i>Pseudocercospora jatrophae</i> | <i>Cercospora jatrophae</i> | สบู่ดำ | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora justiciae</i> | <i>Cercospora justiciae</i> | หางกระรอก | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora kaki</i> | <i>Cercospora kaki</i> | พลับ | จุด | ใบ | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| <i>Pseudocercospora kopsii</i> | | พุทชมพู | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora kurimensis</i> | <i>Cercospora nerii-indici</i> | ยี่โถ | จุด | ใบ | 2532 | วสันต์ และมานะ, 2532 |
| <i>Pseudocercospora liquidambaricola</i> | | เมเปิ้ล | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora mali</i> | <i>Cercospora mali</i> | สาละ | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |
| | <i>Cercospora minima</i> | | | | | |
| <i>Pseudocercospora marsdeniae</i> | <i>Cercospora marsdeniae</i> | กระทิงหมอบ้า | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora mori</i> | | หม่อน | จุด | ใบ | 2552 | พัฒนา และคณะ, 2552 |
| | | หม่อน | จุด | ใบ | 2522 | พัฒนา และคณะ, 2522 |
| <i>Pseudocercospora mitracarpi</i> | | หญ้าจุกขาว | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|--------------------------------------|---|--------------------|---------|------------|----------|-------------------------------|
| <i>Pseudocercospora musae</i> | <i>Cercospora musae</i> | กล้วย | จุด | ใบ | 2525 | ประไพศรี และคณะ, 2525; |
| | <i>Mycosphaerella musicola</i> | | | | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| <i>Cercospora nymphaeacea</i> | | กล้วย | ใบจุด | ใบ | 2511 | Chandrasrikul, 1968 |
| | | | | | 2549 | พรพิมล และศรีสุรางค์, 2549 |
| | <i>Cercospora nymphaeacea</i> | บัว | จุด | ใบ | 2549 | ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549 |
| | <i>Cercoseptoria nymphaeacea</i> | | | | 2550 | ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550 |
| | <i>Cercospora exotica</i> | | | | | |
| | <i>Cercospora nelumbii</i> | | | | | |
| | <i>Cercospora nelumbinis</i> | | | | | |
| <i>Pseudocercospora pericampylis</i> | | ชา | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| | | สลิดห่มคา, เถาเขมา | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora prunicola</i> | <i>Cercospora prunicola</i> | ท้อ | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| | <i>Cercoseptoria prunicola</i> | | | | | |
| | <i>Cercospora pruni-yedoensis</i> | | | | | |
| | <i>Pseudocercospora pruni-yedoensis</i> | | | | | |
| | <i>Cercoseptoria pruni-perciae</i> | | | | | |
| <i>Pseudocercospora psophocarpi</i> | <i>Cercospora psophocarpi</i> | ถั่วเหลือง | จุด | ใบ | 2525 | อุดม และคณะ, 2525 |
| | <i>Cercospora aranetae</i> | ถั่วพู | จุด | ใบ | 2525 | วีระศักดิ์ และอุดม, 2525 |
| <i>Pseudocercospora puderi</i> | <i>Cercospora puderi</i> | กุหลาบ | จุด | ใบ | 2532 | วสันต์ และมานะ, 2532 |
| | <i>Cercospora puderii</i> | | | | | |
| <i>Pseudocercospora punicae</i> | <i>Cercospora punicae</i> | ทับทิม | จุด | ใบ | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|-------------------------------------|--|-----------|---------------|------------|----------|-------------------------------|
| <i>Pseudocercospora repens</i> | <i>Cercospora repens</i> | ยี่โถ | จุด | ใบ | 2560 | Nguanhom <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudocercospora sp.</i> | | สาละ | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา และคณะ, 2534 |
| <i>Pseudocercospora timorensis</i> | <i>Cercospora timorensis</i> | มันเทศ | จุด | ใบ | 2534 | พัฒนา, 2534 |
| | <i>Ramularia batatae</i> | มันเทศ | จุด | ใบ | 2532 | วสันต์ และมานะ, 2532 |
| | <i>Cercospora batatas</i> | | | | | |
| | <i>Cercospora ipomoeae-purpureae</i> | | | | | |
| <i>Pseudocercospora sawadae</i> | <i>Cercospora sawadae</i> | ฝรั่ง | จุด | ใบ | 2522 | ขจรศักดิ์ และคณะ, 2522 |
| | <i>Cercospora psidii</i> Sawada | | | | | ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550 |
| <i>Pseudocercospora sesami</i> | <i>Cercospora sesamicola</i> | งา | จุดสามเหลี่ยม | ใบ | 2529 | นิวัฒน์ และพิศาล, 2529 |
| | <i>Cylindrosporium sesami</i> | | | | | |
| | <i>Cercoseptoria sesami</i> | | | | | |
| <i>Pseudocercospora stizolobii</i> | <i>Cercospora stizolobii</i> | ถั่วพริ้ว | จุด | ใบ | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |
| | <i>Cercospora lussoniensis</i> | | | | | |
| | <i>Cercospora mucunae-capitatae</i> | | | | | |
| <i>Pseudocercospora subsessilis</i> | <i>Cercospora subsessilis</i> | สะเดา | จุด | ใบ | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| | <i>Cercosporina subsessilis</i> | | | | | |
| | <i>Cercoseptoria domingensis</i> | | | | | |
| | <i>Pseudocercosporella meliae</i> | | | | | |
| | <i>Pseudocercosporella indica</i> | | | | | |
| <i>Passalora arachidicola</i> | <i>Cercospora arachidicola</i> | ถั่วลิสง | จุด | ใบ | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| | <i>Cercospora arachidis</i> var. <i>macrospora</i> | | | | | |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|---------------------------------|--|------------|--------------------|------------|--------------------------------------|---|
| <i>Passalora bougainvillea</i> | <i>Cercospora bougainvilleae</i> <i>Cercosporidium bougainvilleae</i> | เฟื่องฟ้า | จุด | ใบ | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| <i>Passalora koepkei</i> | <i>Cercospora koepkei</i> <i>Mycovellosiella koepke</i> <i>Pseudocercospora miscanthi</i> | อ้อย | จุดเหลือง | ใบ | 2516 | อุดม, 2516 วันทนีย์ และคณะ, 2537 |
| <i>Passalora vaginae</i> | <i>Cercospora vaginae</i> <i>Mycovellosiella vaginae</i> | อ้อย | จุด, กาบใบจุดสีแดง | ใบ | 2516 2537 | อุดม, 2516 วันทนีย์ และคณะ, 2537 |
| <i>Passalora sojina</i> | <i>Syn Cercospora daizu miura</i> | ถั่วเหลือง | จุดตากบ | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| <i>Passalora rubrotincta</i> | <i>Cercospora rubrotincta</i> <i>Cercospora consobrina</i> <i>Cercospora guliana</i> <i>Cercospora amygdali</i> <i>Cercosporina amygdali</i> | ท้อ | จุด | ใบ | 2514 2509 | ประพันธ์ และประวิทย์, 2514 Puckdeedindan, 1966 |
| <i>Nothopassalora personata</i> | <i>Cercosporidium personatum</i> <i>Cladosporium personatum</i> <i>Cercospora personata</i> <i>Passalora personata</i> <i>Phaeoisariopsis personata</i> <i>Mycosphaerella berkeleyi</i> <i>Cercosporidium personatum</i> | ถั่วลิสง | tikka | ใบ | 2528 2529 2513 2501 2554 | โสภณ, 2528 ธรรมศักดิ์ และ Beute, 2529 เฉลิมชัย และคณะ, 2513 นिरานาม, 2501 พรพิมล และคณะ, 2554 |



Table 3 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|----------------------------------|---|----------|--------------------|------------|--------------|------------------------------------|
| <i>Passalora bougainvillea</i> | <i>Septogloeum arachidis</i> <i>Cercospora arachidis</i> | ถั่วลิสง | จุด | ใบ | 2554 | พรพิมล และคณะ, 2554 |
| <i>Rosisphaerella rosicola</i> | <i>Cercospora rosicola</i> <i>Passalora rosicola</i> <i>Mycosphaerella rosicola</i> <i>Cercospora rosigena</i> <i>Cercospora rosae</i> <i>Mycological Society</i> <i>Cercospora rosae-indianensis</i> | กุหลาบ | จุด จุดสีน้ำตาล | ใบ | 2505 2515 | Chandrasrikul, 1962 อนงค์, 2515 |
| <i>Scolecotigmina mangiferae</i> | <i>Cercospora mangiferae</i> <i>Stigmina mangiferae</i> <i>Sciniatosporium mangiferae</i> | มะม่วง | จุด | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| <i>Sphaerella caricae</i> | <i>Mycosphaerella caricae</i> | มะละกอ | จุด | ใบ | 2529 | กรรณิการ์ และคณะ, 2529 |



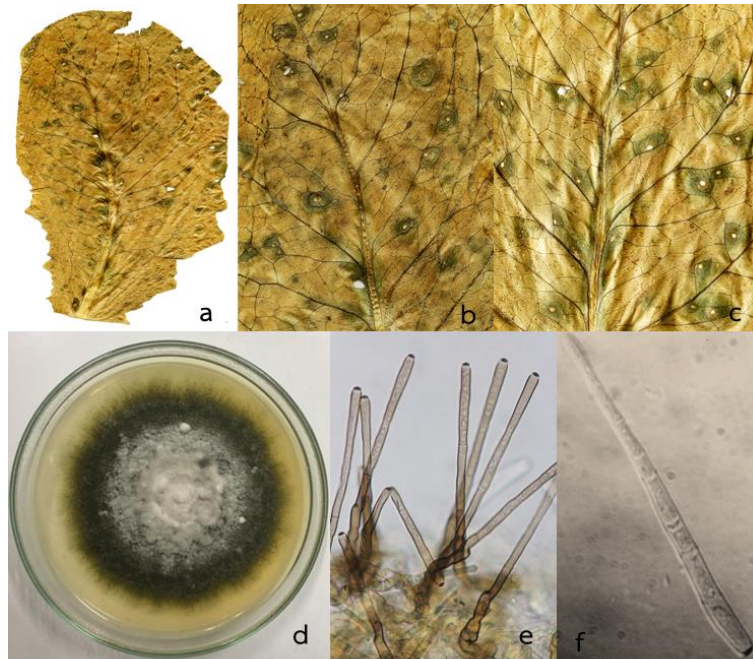


Figure 1 Leaf spot on *Romaine lettuce* (M0351) caused by *Cercospora* sp.1
a-c: spot symptoms leaves; d: colony of fungi on PDA;
e: conidiophores; f: conidia

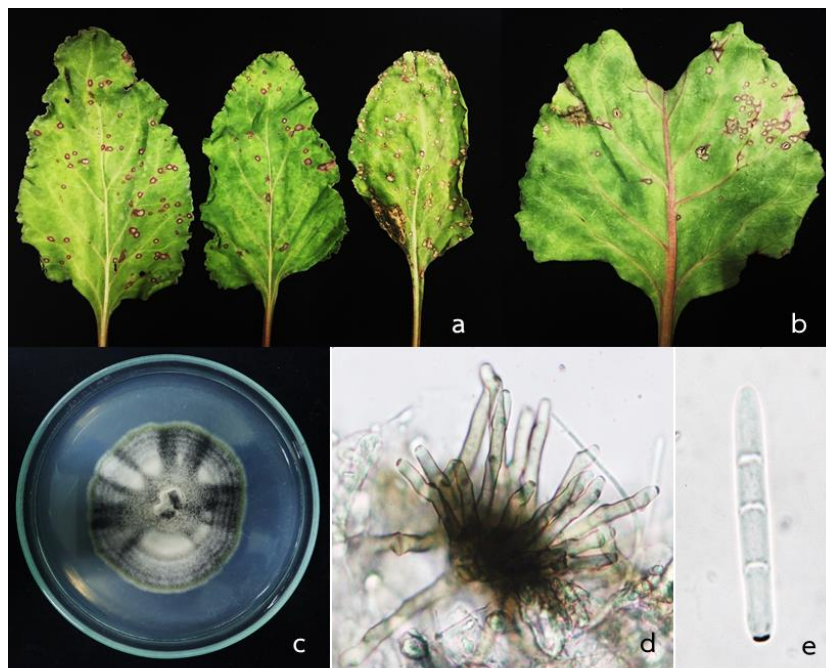


Figure 2 Leaf spot on leaves of *Beta vulgaris* (M0879) caused by *Cer. beticola*
a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
d: conidiophores; e: conidia

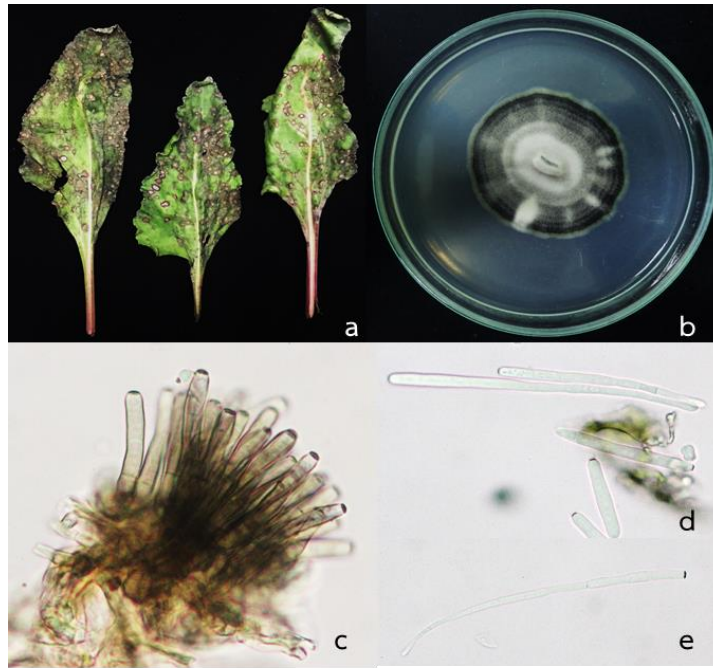


Figure 3 Leaf spot on leaves of *Beta vulgaris* (M0878) caused by *Cercospora beticola*
 a: spot symptoms leaves; b: colony of fungi on PDA;
 c: conidiophores; d-e: conidia

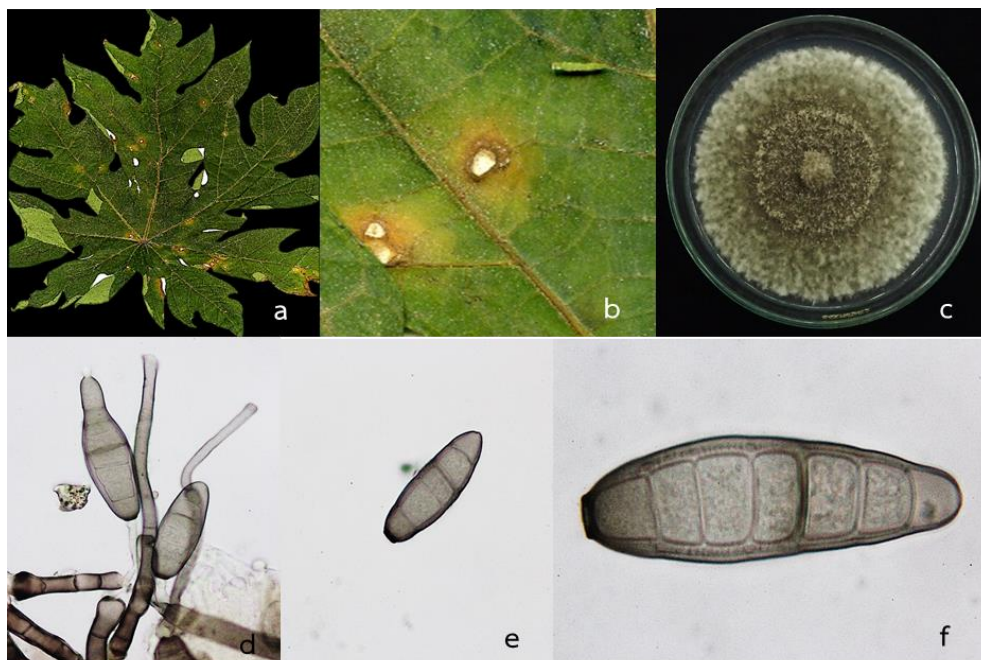


Figure 4 Leaf spot on leaves of *Carica papaya* (M0987) caused by *Corynespora cassicola*
 a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
 d-f: conidia

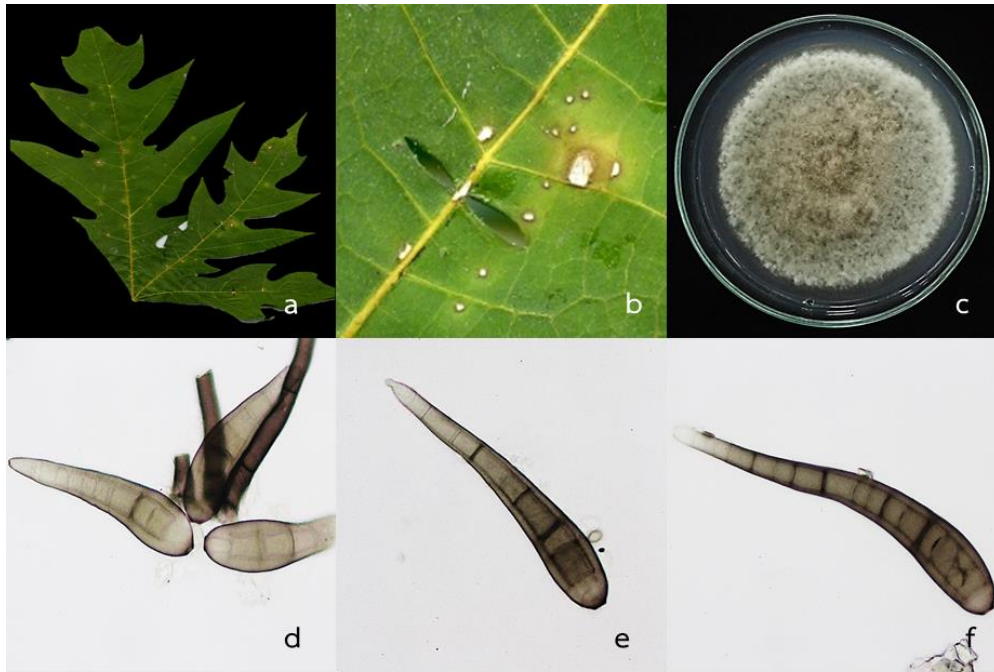


Figure 5 Leaf spot on leaves of *Carica papaya* (M0990) caused by *Corynespora cassiicola*-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA; d-f: conidia

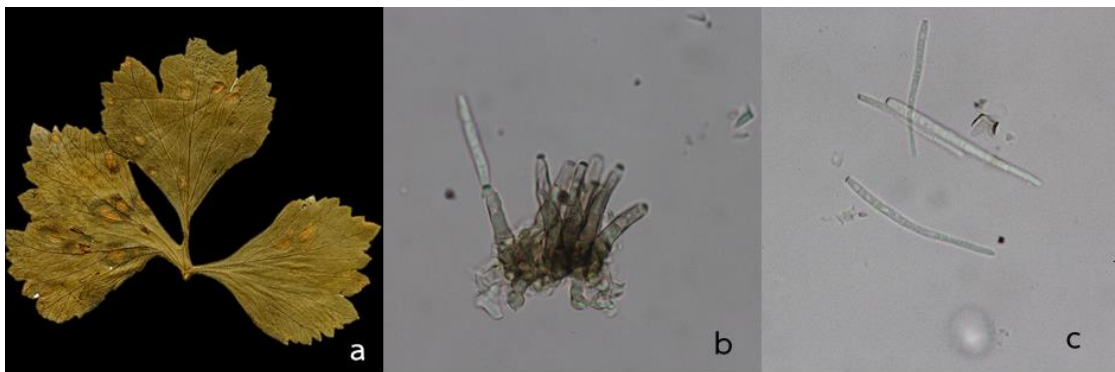


Figure 6 Leaf spot on leaves of *Apium graveolens* (M1095) caused by *Cercospora apii* a: spot symptoms leaves; b: conidiophore; c: conidia

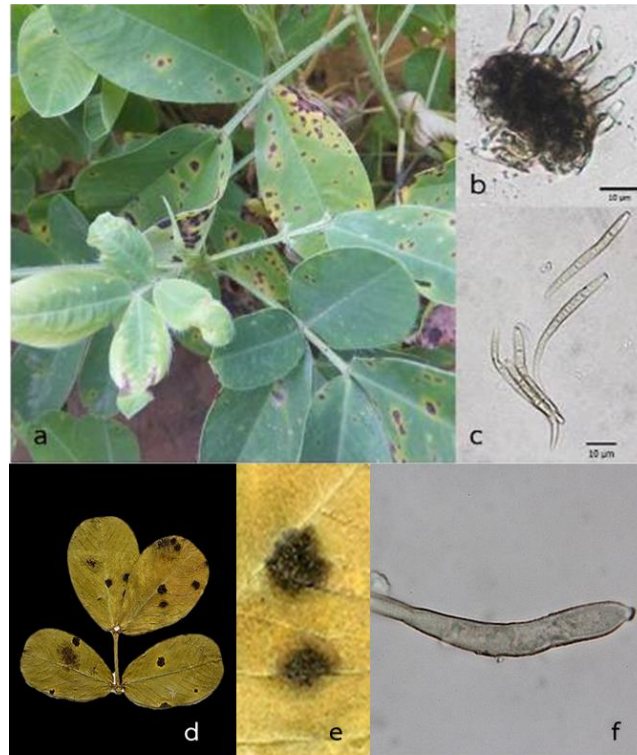


Figure 7 Leaf spot on leaves of *Arachis hypogaea* (C-23) caused by *Cercospora arachidicola* (syn. *Passalora arachidicola*)
a, d-e: spot symptoms leaves; b: conidiophore; c, f: conidia

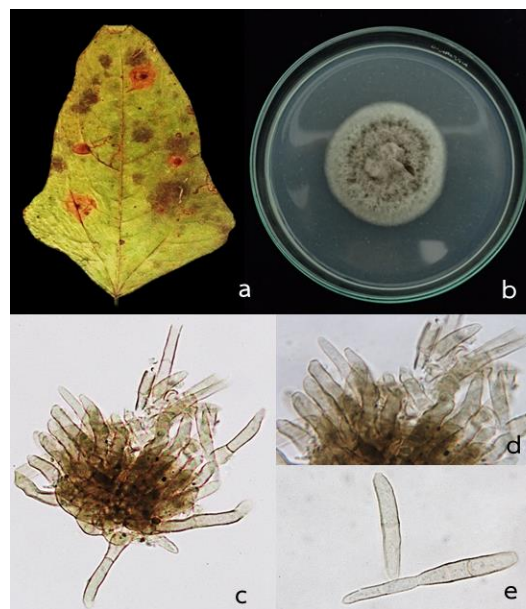


Figure 8 Leaf spot on leaves of *Vigna unguiculata* (M0521) caused by *Corynespora cassiicola*
a: spot symptoms leaf; b: colony of fungi on PDA;
c-d: conidiophores; e: conidia



Figure 9 Leaf spot on leaves of *Capsicum furtescens* (M0529) caused by *Corynespora cassiicola*
 a: spot symptoms leaf; b: colony of fungi on PDA; c-e: conidia

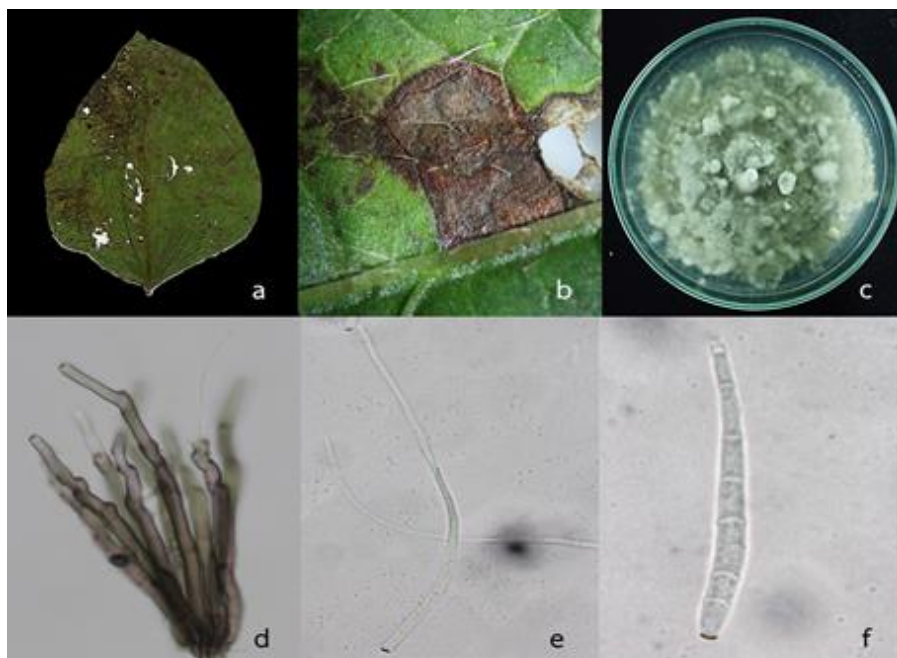


Figure 10 Leaf spot on *Romaine lettuce* (M0967) caused by *Cercospora* sp.2
 a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
 d: conidiophores; e-f: conidia

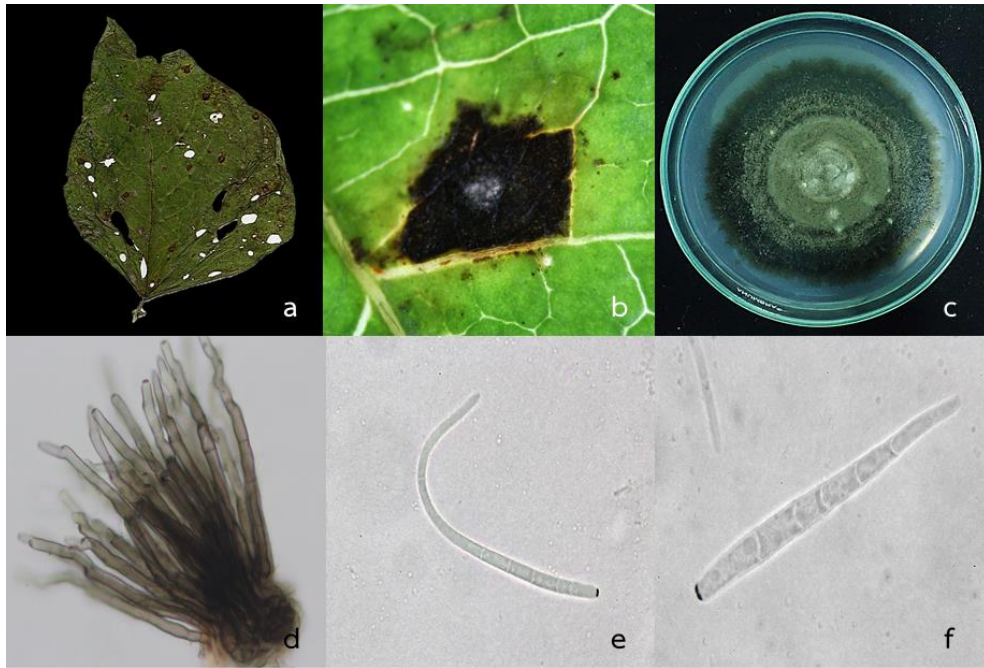


Figure 11 Leaf spot on *Romaine lettuce* (M0967) caused by *Cercospora* sp.2
 a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
 d: conidiophores; e-f: conidia

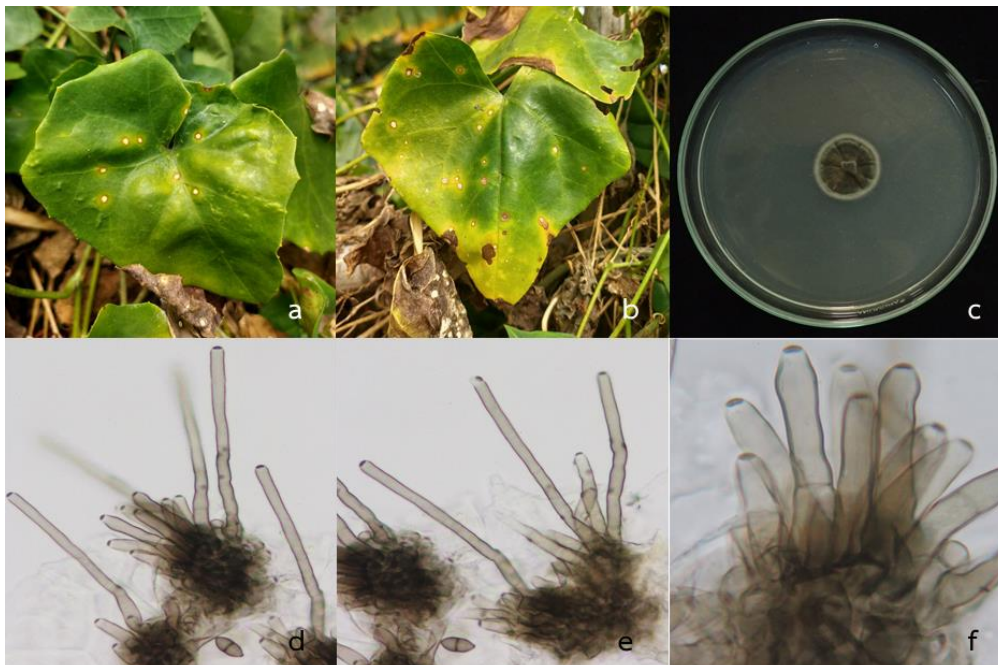


Figure 12 Leaf spot on *Coccinia grandis* (M0983) caused by *Cercospora citrulina*
 a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
 d-f: conidiophores

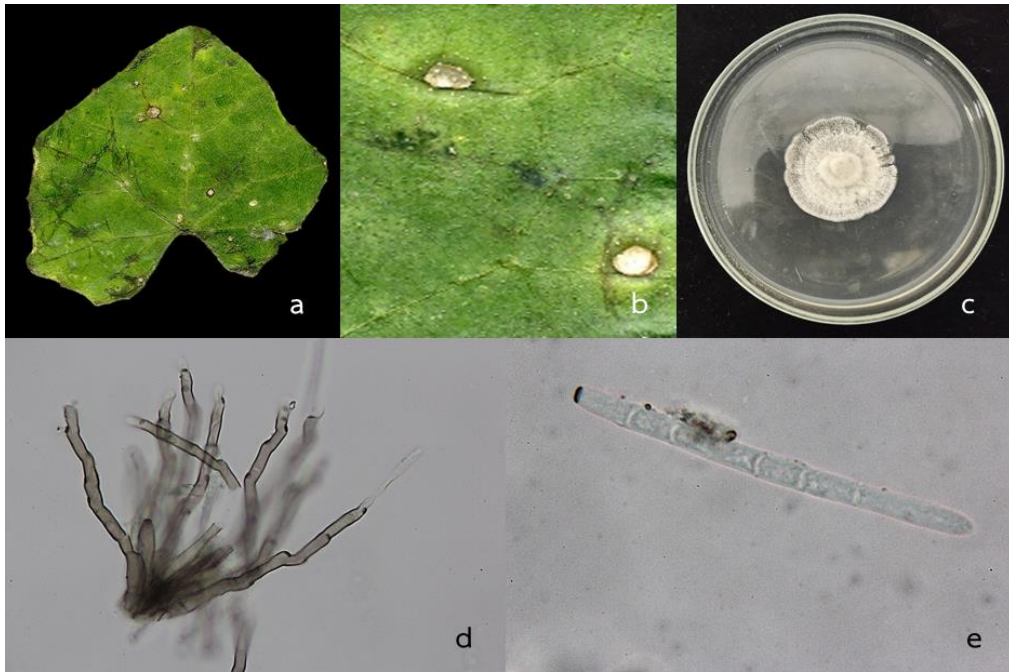


Figure 13 Leaf spot on *Coccinia grandis* (M1008) caused by *Cercospora citrulina*
 a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
 d: conidiophores; e: conidia

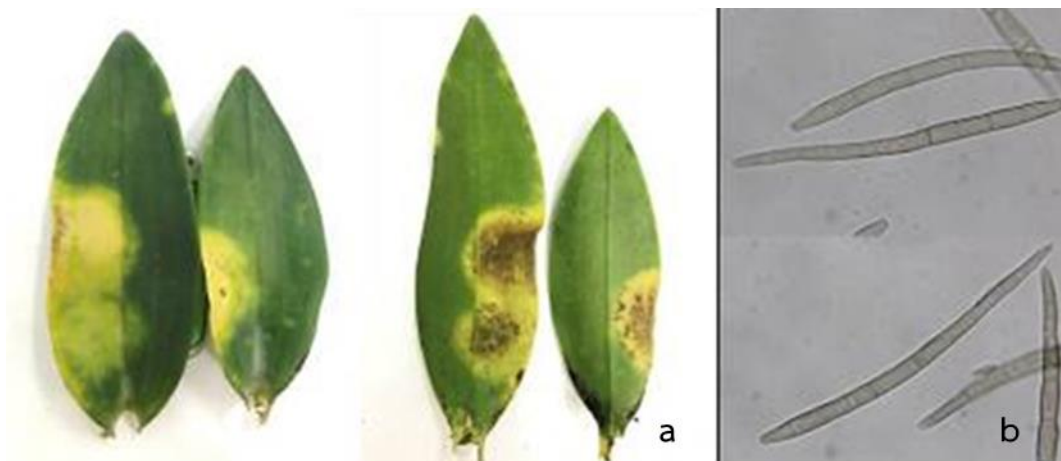


Figure 14 Leaf spot on *Dendrobium sp.* caused by *Pseudocercospora dendrobii*
 a-b: spot symptoms leaves; b: conidia

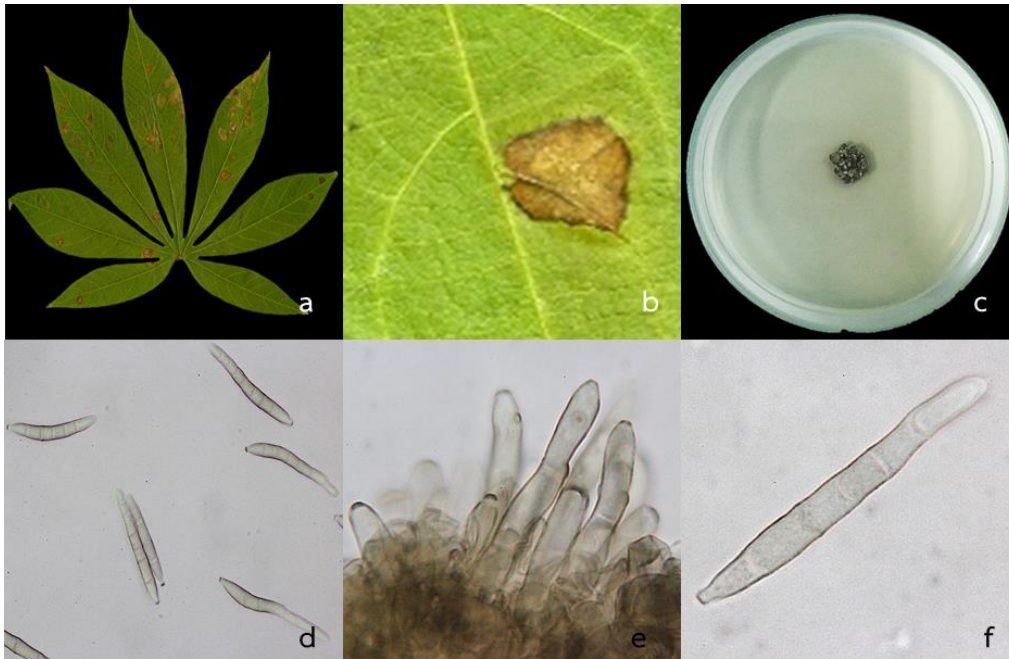


Figure 15 Leaf spot on *Manihot esculenta* (M0993) caused by *Mycosphaerellaceae*
 a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
 e: conidiophores; d, f: conidia

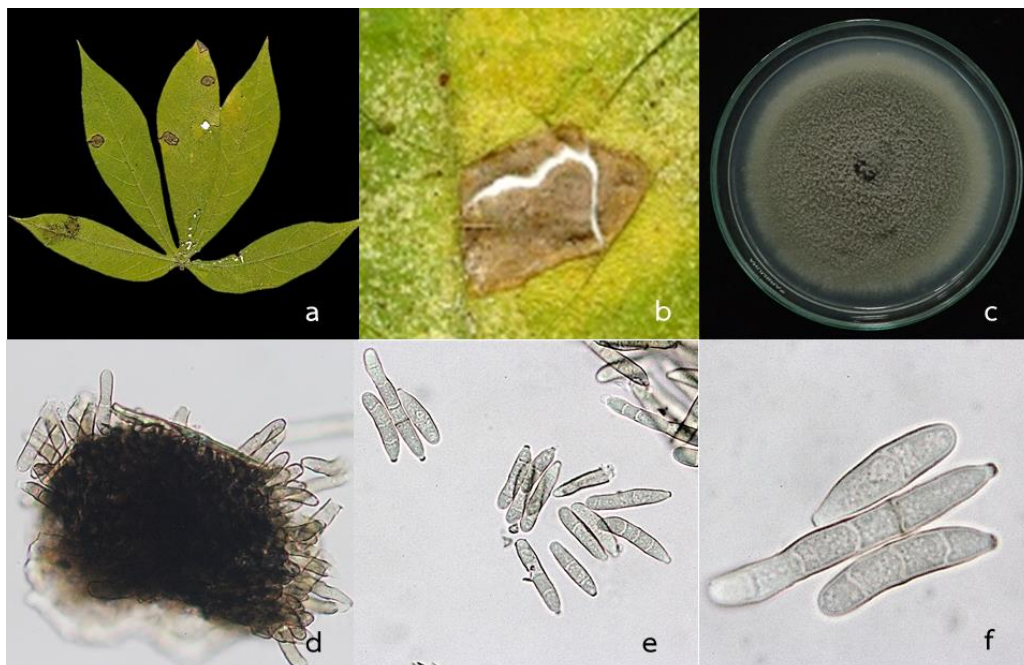


Figure 16 Leaf spot on *Manihot esculenta* (M0988) caused by *Mycosphaerellaceae*
 a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
 d: conidiophores; e-f: conidia

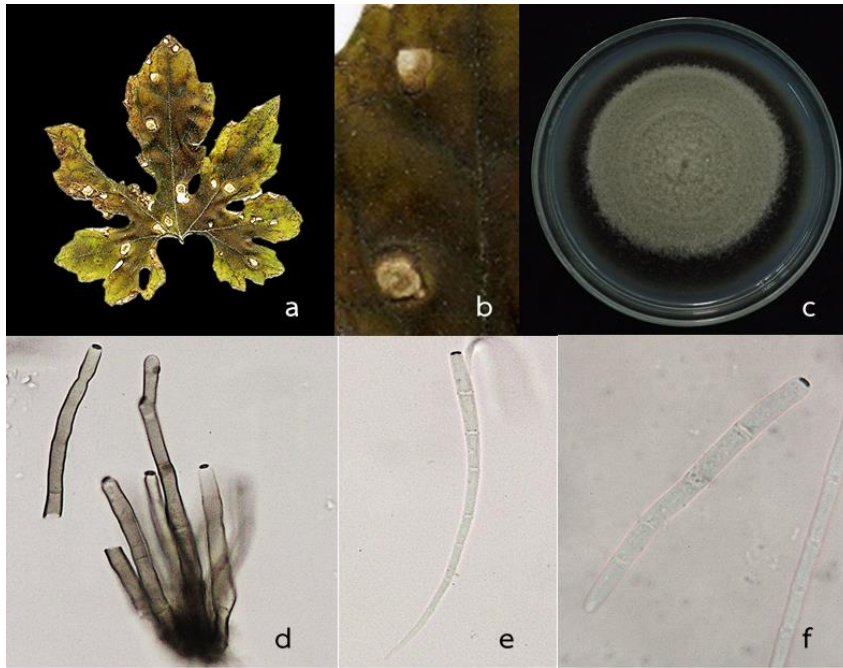


Figure 17 Leaf spot on *Momordica charantia* (M0985) caused by *Cercospora citrulina*
 a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
 d: conidiophores; e-f: conidia

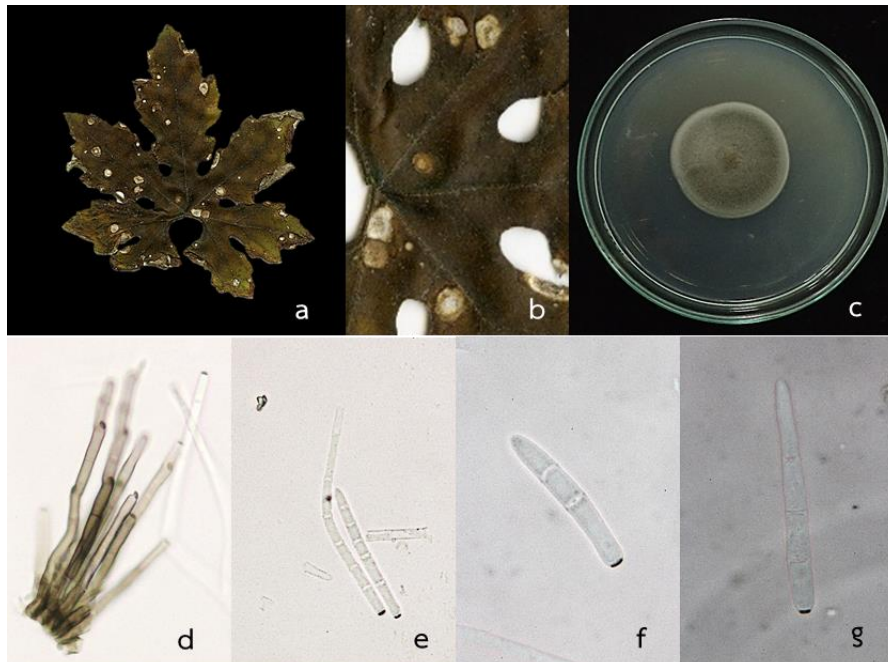


Figure 18 Leaf spot on *Momordica charantia* (M0986) caused by *Cercospora citrulina*
 a-b: spot symptoms leaves; c: colony of fungi on PDA;
 d: conidiophores; e-f: conidia

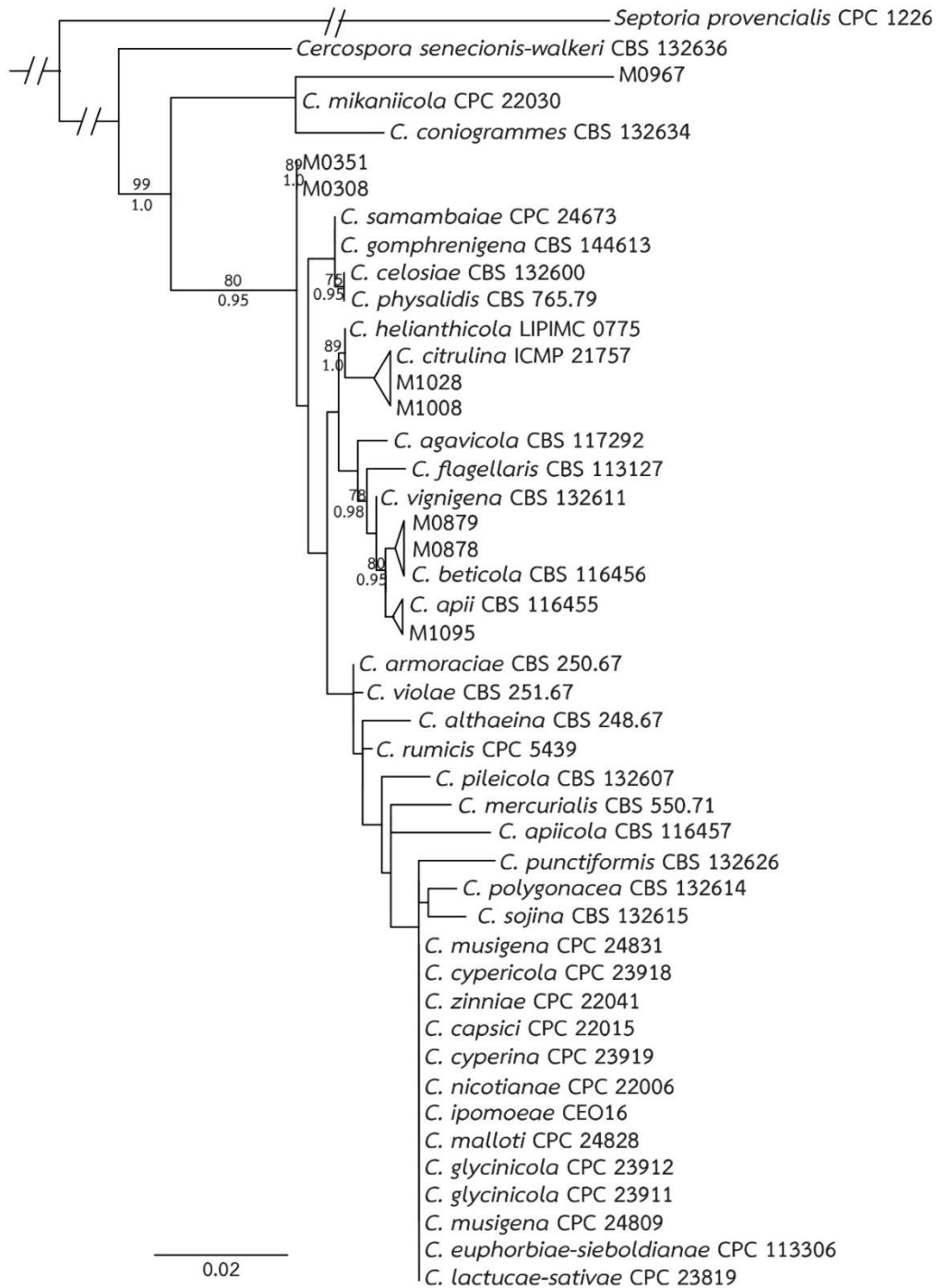


Figure 19 Phylogram of *Cercospora* obtained in a maximum likelihood search in RAxML of concatenated dataset of ITS and TEF1 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥0.95) summarized from 10,000 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes

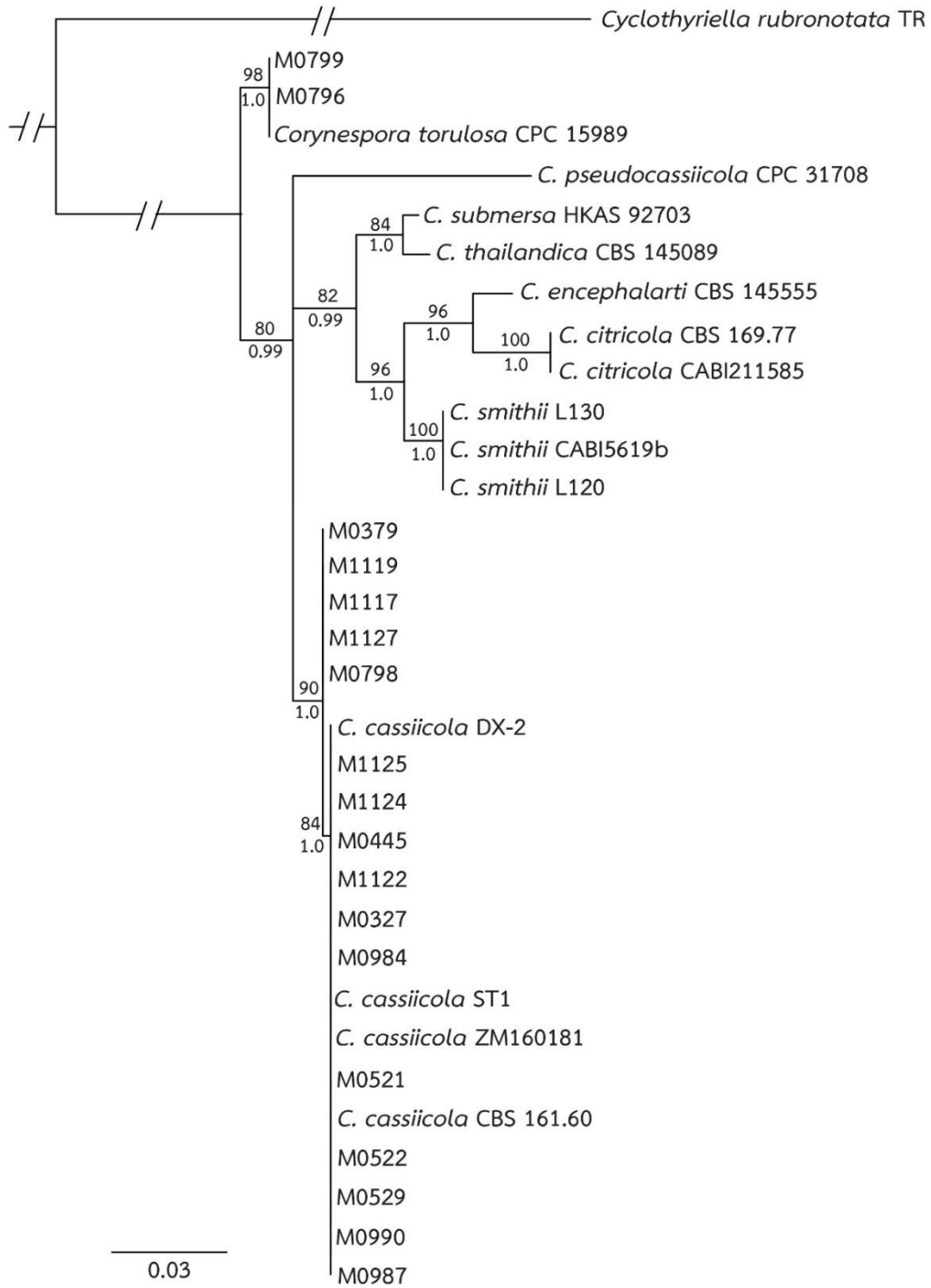


Figure 20 Phylogram of *Corynespora* obtained in a maximum likelihood search in RAxML of concatenated dataset of ITS and TEF1 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥0.95) summarized from 10,000 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes

อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืช

Taxonomy and phylogeny of Pucciniaceae in Thailand

ชนินทร์ ดวงสอดา^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} สุณีรัตน์ สิมะเตือ^{1/}

มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{3/}

^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

Abstract

Rust disease samples caused by fungi in family Pucciniaceae were collected from various plantations located in 22 provinces of Thailand during October 2019 - September 2021 in order to study the relationships of Pucciniaceae fungi with the host plant data. Based on the morphological characteristics combined with the host plant data, 138 rust disease specimens of 58 host plants were identified as the rust fungi in 8 families, namely, Albuginaceae, Coleosporiaceae, Crossoporsoraceae, Phakopsoraceae, Pucciniaceae, Pucciniastraceae, Raveneliaceae, and Zaghouaniaceae. The identification using molecular data was difficult for rust fungi due to the limitation of standard (type) molecular data. The phylogeny of some Pucciniaceae fungi was considered with the host plant data. It was found that some Pucciniaceae had the narrow host range or more specificity to the host plant than others. Further studies targeting the fungal species on their host plants could provide information for predicting disease progression. In addition, information on the classification of Pucciniaceae fungi reported in Thailand was gathered.

Keywords : Pucciniaceae, phylogeny

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-14-63



รายงานผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๖๔ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะอาการของราสนิม จากแปลงปลูกพืชในพื้นที่ 20 จังหวัด ระหว่าง ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 เพื่อจำแนกชนิด พิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและพืชอาศัย เพื่อเป็นแนวทางในการพิจารณาขอบเขตของพืชอาศัย ได้ราสนิมจำนวน 138 ตัวอย่าง จากพืชอาศัย 58 ชนิด เมื่อจำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ได้ตัวอย่างราสนิมจาก 8 family ได้แก่ Albuginaceae, Coleosporiaceae, Crossosporaceae, Phakopsoraceae, Pucciniaceae, Pucciniastraceae, Raveneliaceae และ Zaghouaniaceae นำราสนิม Pucciniaceae มาจำแนกชนิด พบราสนิมจำนวน 22 ชนิด เมื่อจำแนกชนิดด้วยข้อมูลพันธุกรรมพบว่าข้อมูลที่สามารถใช้อ้างอิงตามมาตรฐานสากลยังมีจำกัด จึงพิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในตัวอย่างราสนิมบางชนิด พบว่าราสนิมมีพืชอาศัยที่แคบ และราสนิมบางชนิดมีแนวโน้มที่มีความจำเพาะต่อพืชอาศัยในระดับสายพันธุ์ของพืช ซึ่งต้องมีการพัฒนาวิธีการศึกษาต่อไป เพื่อสามารถใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ รวมไปถึงการคาดการณ์การเกิดโรคได้ และได้รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกราสนิม Pucciniaceae ที่มีรายงานพบในประเทศไทย

คำหลัก : Pucciniaceae ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

คำนำ

ราสนิม (Rust fungi) วงศ์ Pucciniaceae เป็นราสนิมสาเหตุโรคพืชกลุ่มใหญ่ ที่ทำความเสียหายให้แก่พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น เบญจมาศ ทานตะวัน ข้าวโพด ข้าวสาลี พืชตระกูลถั่วหน่อไม้ฝรั่ง และพืชที่สำคัญอีกหลายชนิด โดยราสนิมเชื้อราสาเหตุโรคพืชในสกุล Pucciniaceae มีจำนวน 20 สกุล โดยมี 2 สกุล คือ *Puccinia* และ *Uromyces* เป็นสมาชิกกลุ่มใหญ่ โดยราสนิมสองสกุลนี้ มีรายงานว่าพบการเข้าทำลายบนพืชอาศัยที่มีความใกล้เคียงกัน (host jump) ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจเนื่องมาจากวิวัฒนาการของราสนิมทั้งสองสกุล เนื่องจากราสนิมมีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย ดังนั้น ในการจำแนกชนิดของราสนิมแต่เดิม จึงอาศัยข้อมูลของพืชอาศัย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะวงจรชีวิตของราสนิมมาใช้ในการจัดจำแนกชนิด โดยลักษณะดังกล่าวข้างต้นในบางกรณีไม่เพียงพอต่อการจำแนก ทำให้พบว่าราสนิมหลายชนิดถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่มีความซับซ้อน (complex species) โดยลักษณะนี้ยังพบว่าสามารถเกิดกับเชื้อราชนิดอื่น ๆ ไม่เพียงแต่ราสนิมเท่านั้น แต่เนื่องจากวิวัฒนาการของราสนิมเอง ร่วมกับความสัมพันธ์ที่พัฒนาร่วมกับพืชอาศัย (co-evolution) ทำให้ปัจจุบันมีรายงานการพบราสนิมบนพืชที่มีความใกล้เคียงกับพืชอาศัยดั้งเดิม ทำให้เกิดความสับสนและผิดพลาดในการจำแนกชนิดของราสนิมด้วยเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพืชอาศัย เพื่อให้เข้าใจวิวัฒนาการระหว่างราสนิมและพืชอาศัย ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยบ่งชี้ หรือ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์และวิวัฒนาการ (phylogeny) ของราสนิมในหลายสกุลที่มีความใกล้เคียงกัน บนพืชอาศัยต่าง ๆ กัน หรือพืชอาศัยที่มีความใกล้เคียงกัน โดยนำข้อมูล

จากหลายๆด้านเช่น ข้อมูลชีวโมเลกุลจากหลายตำแหน่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย ลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่เก็บตัวอย่างหรือพบราสนิม มาวิเคราะห์รวมกันอย่างเป็นระบบ (systematics study)

นอกจากนี้ การศึกษาวิวัฒนาการของราสนิมควบคู่กับพืชอาศัย ทำให้สามารถเข้าใจวิวัฒนาการระหว่างราสนิมและพืชอาศัย (phylogenetic relationship) ซึ่งสามารถนำไปสู่การคาดหมายหรือการทำนายการเกิดโรคในพืช (pattern of pathogenicity) อีกทั้งราสนิมในวงศ์ Pucciniaceae พบว่าเป็นราสนิมกลุ่มใหญ่ที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของราสนิมในวงศ์ Pucciniaceae จึงมีความสำคัญ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษานอกจากจะทำให้เข้าใจวิวัฒนาการของราสนิม ขอบเขตของพืชอาศัยแล้ว ยังสามารถประเมินการเข้าทำลายพืชอาศัยหรือการข้ามพืชอาศัย (host jump) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคาดการณ์การเกิดโรคได้ นอกจากนี้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชอีกทางหนึ่ง ดังนั้นการศึกษาดังนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทาบตัวอย่างกระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Microcentrifuge, Thermal cyclers, Vortex, Tissue Lyser, Gel electrophoresis, เครื่องถ่ายภาพเจล, microwave, micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร, กล้องจุลทรรศน์แบบ compound, กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo, Dry heat block
3. วัสดุในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ไข่มดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate
5. สารเคมี ได้แก่ Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™), Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Glucanex®), Lithium Borate buffer (LB), PureDireX Genomic DNA Isolation Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, SERVA HiSens Stain G, Nuclease-Free Water - ไพรเมอร์ ได้แก่

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)



the Small Subunit (SSU, 16S)

NS1F: GTAGTCATATGCTTGTCTC (White *et al.*, 1990)

Rust18SR: ACCTTGTTACGACTTTTACTTC (Aime, 2006)

Cytochrome c oxidase subunit 3 (CO3)

CO3F1: TCAGTATGTTATTTAACGATGTAG (Vialle *et al.*, 2009)

CO3R1: TCCTCATCAGTAAACTAATA (Vialle *et al.*, 2009)

6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>; Kears *et al.*, 2012)

วิธีการ

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมวงศ์ Pucciniaceae

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมวงศ์ Pucciniaceae จากพืชต่างๆ ได้แก่ พืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง ถั่วฝักยาว ถั่วลิสง กาแฟ สัก สีสาวดี ตะไคร้ เบญจมาศ โมก มะเดื่อฝรั่ง รวมถึงราสนิมที่พบบนหญ้า เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลที่เกิดจากราสนิมอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุมสืบเนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาจำแนกชนิดและทำการสกัดดีเอ็นเอ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑโรคพืช ตึกอสังครสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากราสนิมที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑโรคพืช

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ได้แก่ ลักษณะของ teliospore urediniopore spermatia และลักษณะอื่น ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo และ Compound เพื่อบันทึกขนาด รูปร่างและบันทึกภาพ รวมถึงการบันทึกข้อมูลของพืชอาศัย จำแนกชนิดราสนิม สาเหตุโรคพืช โดยเปรียบเทียบกับลักษณะของราสนิมที่ศึกษา กับคู่มือหรือวรรณกรรมของ Aime (2006) Cummins and Hiratsuka (2003) Cline *et al.* (2013) Kolmer *et al.* (2001) Ono and Aime (2006) Swann *et al.* (2001)

3. จำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตัด และย้ายเส้นใย conidia ของรา cercosporoid ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ



เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the Large Subunit (LSU, 28S)

LROR: ACCCGCTGAACTTAAGC (Vilgalys and Hester, 1990)

LR6: CGCCAGTTTCTGCTTACC (Vilgalys and Hester, 1990)

the Small Subunit (SSU, 16S)

NS1F: GTAGTCATATGCTTGTCTC (White *et al.*, 1990)

Rust18SR: ACCTTGTTACGACTTTTACTTC (Aime, 2006)

Cytochrome c oxidase subunit 3 (CO3)

CO3F1: TCAGTATGTTATTTAACGATGTAG (Vialle *et al.*, 2009)

CO3R1: TCCTCATCAGTAAACACTAATA (Vialle *et al.*, 2009)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง LSU SSU ITS และ CO3 ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่คุณผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature ของแต่ละตำแหน่ง LSU SSU ITS และ CO3 ที่ 62 60 60 และ 58 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ที่ได้จากการทดลองมาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (<http://www.geneious.com>, Kears *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) ที่ได้จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูล มาจัดเรียง (align) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Kato and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (Kumar et al., 2016) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำการรวมชุดข้อมูลของดีเอ็นเอเป็น combined dataset บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ nexus หรือ nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดโดยวิเคราะห์จาก combined dataset วิเคราะห์ด้วย phylogenetic criteria 2 แบบ คือ

1. Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ phy และวิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command -f a) เริ่มจาก random starting tree และ กำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง

2. Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ nexus วิเคราะห์โดยโปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ กำหนด 4 runs แต่ละ run ประกอบด้วย 4 chains วิเคราะห์จำนวน 10 ล้าน generations ตั้งค่า cold chain ที่ temperature 0.25 สุ่มตัวอย่าง substitution model parameters และบันทึก trees ทุก 500 generations ตรวจสอบความเชื่อมั่นของ topology ด้วย cumulative and compare functions ด้วย AWTY (Nylander et al., 2008)

4. บันทึกข้อมูลราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่รายงานพบในประเทศไทย

รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกราสนิม Pucciniaceae ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มีการจัดจำแนกด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลของสนิม Pucciniaceae ที่มีรายงานพบในประเทศไทย เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาประเมินความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิด เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง

5. การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ในอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร



ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมวงศ์ Pucciniaceae

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะอาการของราสนิม จากแปลงปลูกพืชในพื้นที่ 20 จังหวัด จากพืช 58 ชนิด จำนวน 138 ตัวอย่าง ระหว่าง ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 (Table 1, Figure 1) ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอสังคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จำแนกชนิดราสนิมที่ทำการเก็บตัวอย่างด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นราสนิมจาก 8 family ได้แก่ Albuginaceae, Coleosporiaceae, Crossosporaceae, Phakopsoraceae, Pucciniaceae, Pucciniastraceae, Raveneliaceae และ Zaghouaniaceae นำราสนิม Pucciniaceae และจำแนกชนิดโดยใช้ข้อมูลพืชอาศัยประกอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบราสนิมจำนวน 22 ชนิด (Table 1, Figure 2-27)

3. จำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

ราสนิมเป็นเชื้อราที่ไม่สามารถเลี้ยงให้บริสุทธิ์ได้ และมีปริมาณน้อย ทำให้การสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ค่อนข้างมีข้อจำกัด ทำให้ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ พบว่าสามารถสกัดได้ดีดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพ 20 ตัวอย่าง และจากดีเอ็นเอดังกล่าว เมื่อทำปฏิกิริยา PCR พบว่าบางตำแหน่ง เช่น the Large Subunit (LSU) the Internal Transcribed Spacer (ITS) มีคุณภาพของ PCR product ค่อนข้างต่ำ เมื่อจัดทำ sequencing ข้อมูลที่ได้ค่อนข้างมีความแปรปรวนสูง ดังนั้นจึงคัดเลือกราสนิมไอโซเลทที่มีข้อมูลที่สมบูรณ์มาทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Figure 28)

การจำแนกชนิดด้วยข้อมูลพันธุกรรมของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae พบว่าข้อมูลที่สามารถใช้อ้างอิงตามมาตรฐานสากลยังมีจำกัด อย่างไรก็ตาม การจำแนกชนิดของราสนิม ต้องใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย ประกอบกับข้อมูลพันธุกรรม (systematics identification) จากการศึกษาครั้งนี้สามารถจำแนกราสนิม Pucciniaceae ได้ 23 ชนิด ได้แก่ *Puccinia arachnidis*, *Puc. Cynodontis*, *Puc. Horiana*, *Puc. Melanocephala*, *Puc. Nakanishikii*, *Puc. Polysora*, *Puc. Sorghi*, *Puccinia sp.1*, *Puccinia sp.2*, *Puccinia sp.3*, *Puccinia sp.4*, *Puccinia sp.5*, *Puccinia sp.6*, *Puccinia sp.7*, *Puccinia sp.8*, *Puccinia sp.9*, *Puccinia sp.10*, *Puc. thaliae*, *Uromyces appendiculatus*, *U. commelinae*, *Uromyces sp.1* และ *Uromyces stariae-italicae*

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในตัวอย่างราสนิมบางชนิด พบว่าราสนิมมีพืชอาศัยที่แคบ เช่น เชื้อรา *U. appendiculatus* และมีแนวโน้มที่มีความจำเพาะต่อพืชอาศัยในระดับสายพันธุ์ของพืช เมื่อพิจารณาจาก phylogeny จะเห็นได้ว่า ใน clade ของเชื้อรา *U. appendiculatus* แสดงให้เห็นถึงความหลากหลาย และแยกกลุ่มย่อยภายในตามชนิดของพืชอาศัย เช่น ระหว่างราสนิมถั่วฝักยาว (M0052) และราสนิมถั่วเขียว (M0067) และยังมีข้อสังเกตจากตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมที่ได้จาก

การศึกษาครั้งนี้คือ เชื้อรา *Puccinia* ซึ่งเป็นเชื้อราในวงศ์ Pucciniaceae ซึ่งมักพบบนพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และเชื้อรา *Phakopsora* ซึ่งเป็นเชื้อราในวงศ์ Phakopsoraceae มักพบบนพืชใบเลี้ยงคู่

4. บันทึกข้อมูลราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่รายงานพบในประเทศไทย

รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกราสนิมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มีการจัดจำแนกด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลของรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย เพื่อใช้ประกอบการพิจารณาประเมินความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิด เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับ การตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง (Table 2)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การจำแนกชนิดของราสนิมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ทำให้เกิดข้อจำกัด เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต้องใช้ในการพิจารณามีไม่เพียงพอ เช่น ลักษณะของสปอร์ไม่ระยะการเจริญ มีข้อมูลไม่ครบทุกระยะ แต่หากได้รับคำปรึกษาหรือคำแนะนำโดยผู้มีความเชี่ยวชาญและมีประสบการณ์ในการจำแนกราสนิม ทำให้ลดอุปสรรคในการจำแนกชนิดลงไป ในปัจจุบันด้วยความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยี ทำให้การจำแนกราสนิมในปัจจุบัน ได้รับการยอมรับในการจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพืชอาศัย และข้อมูลทางชีวโมเลกุล โดยมีการวิเคราะห์เป็นเชิงระบบ (systematics classification) ทำให้การจำแนกชนิดเป็นไปอย่างแม่นยำ แม้จะมีข้อมูลของระยะการเจริญของราสนิมไม่ครบ ทำให้สามารถลดปัญหาด้านการจำแนกชนิด อย่างไรก็ตามข้อมูลทางพันธุกรรมของราสนิมยังไม่หลากหลาย หรือสามารถเข้าถึงได้เหมือนเชื้อราชนิดอื่น ๆ เนื่องจากขั้นตอนในการสกัดดีเอ็นเอ การทำปฏิกิริยา PCR ค่อนข้างท้าทาย เนื่องจากราสนิมเป็นเชื้อราที่ไม่สามารถเลี้ยงให้บริสุทธิ์ได้ ทำให้มักพบการปนเปื้อนดีเอ็นเอเชื้อราชนิดอื่น อีกทั้งมีปริมาณน้อย ทำให้การสกัดดีเอ็นเอจากสปอร์ค่อนข้างมีข้อจำกัด ทำให้ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ นอกจากนี้การจำแนกราสนิมด้วยข้อมูลพันธุกรรม ต้องทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลมาตรฐาน (type sequences) แต่ตัวอย่างของราสนิมส่วนใหญ่จะมีอายุที่ค่อนข้างมาก เนื่องจากมีการค้นพบเป็นเวลานาน ทำให้เกิดอุปสรรคต่อการนำข้อมูลพันธุกรรมมาใช้ จึงต้องมีการศึกษาในการเสนอตัวอย่างมาตรฐานขึ้นมาทดแทนหรือเปรียบเทียบตามวิธีการสากลซึ่งต้องอาศัยระยะเวลาในการศึกษา

อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้แม้ไม่สามารถพิจารณาข้อมูลเชิงวิวัฒนาการของวงศ์ Pucciniaceae แต่ก็ยังสามารถพิจารณาข้อมูลของราสนิมหลายชนิด จากข้อมูลที่บ่งชี้ว่าราสนิมบางชนิดมีพืชอาศัยที่แคบ และมีแนวโน้มที่มีความจำเพาะต่อพืชอาศัยในระดับสายพันธุ์ของพืช การศึกษาชนิดของราสนิมโดยวิเคราะห์ร่วมกับความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และพืชอาศัย สามารถใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ รวมไปถึงการคาดการณ์การเกิดโรคได้ นอกจากนี้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืช ซึ่งสามารถสนับสนุนการการค้าระหว่างประเทศในการนำเข้าและส่งออกสินค้าทางการเกษตร

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ Professor Roger Shivas ผู้เชี่ยวชาญด้าน Mycology โดยเฉพาะราสนิม และราเขม่าดำ จาก University of Southern Queensland Dr. Yu Pei Tan จาก Plant Biosecurity of Queensland ที่ให้ความอนุเคราะห์ และคำแนะนำในการจำแนกชนิดของราสนิมในการศึกษาค้นคว้า และขอขอบคุณ ดร.พรพิมล อธิปัญญาคม คุณศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช สมาชิก เพื่อน พี่น้อง ในกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- ฉายแสง หล่อสุวรรณ และ ปิยะ เกียรติทอง. 2525. โรคใบจุดเหลี่ยมของถั่วแขก. *วารสารโรคพืช* 2: 16.
- เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง อุดม เลียบวัน อรรถสิทธิ์ บุญธรรม ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ วันทนีย์ อุวานิชย์ ญัฐกฤติ พิทักษ์ วัลวิภา สุชาโต สมศักดิ์ ทองศรี และ ตุลย์ อินทร์มพรรย์. 2547. *เอกสารวิชาการอ้อย*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 147 หน้า.
- เฉลิมลาภ ช่วยประสิทธิ์ จินตนา ชะนะ สมศิริ แสงโชติ และ พงศ์พันธุ์ เขียวศิริธัญ. 2524. โครงการอ้อยพืช : โรคและการป้องกันกำจัด. น. 69. ใน : *รายงานการค้นคว้าวิจัยประจำปี 2524*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา โกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล และ อติศักดิ์ คำนวนศิลป์. 2547. *เอกสารวิชาการ สถาบันวิจัยพืชไร่ ปี 2547 โรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด พิมพ์ครั้งที่ 2*. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 69 หน้า.
- ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. 2528. โรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในการผลิตถั่วแขกฝักสดเพื่ออุตสาหกรรมแช่แข็ง. *วารสารโรคพืช* 5: 150-159.
- ทะนง พงษ์พานิช. 2508. *การสำรวจโรคอ้อยขึ้นต้นในบางท้องที่ของประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 61 หน้า.
- ธนากร จารุพัฒน์ วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล นิพนธ์ ทวีชัย และ ศศิณัฐ แสงวงศ์. 2526. *โรคอ้อยในประเทศไทย*. สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย. 180 หน้า.
- ธารทิพย์ ภาสบุตร ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และ สุณิรัตน์ สิมะเตือ. *สำรวจรวบรวมและจำแนกชนิดราสนิมสาเหตุโรคไม้ผล ไม้ยืนต้นและวัชพืชในแปลงปลูก*. น. 1004 – 1016. ใน : *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- ธารทิพย์ ภาสบุตร. 2553. โรคของว่านเศรษฐกิจเรือนนอก. น. 134 – 139. ใน : *โรคไม้ดอกไม้ประดับ*. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ.
- นิรนาม. 2501. การตรวจโรคพืชให้แก่ประชาชนและหน่วยราชการ. น. 83-86. ใน : *รายงานประจำปี 2501*. แผนกโรควิทยา กองพืชพันธุ์ กรมกสิกรรม.

- นิรนาม. 2505. รายชื่อโรคที่ตรวจพบ. น. 207-215. ใน : รายงานประจำปี 2505. แผนกโรควิทยา กองพืชพันธุ์ กรมกสิกรรม.
- นิรนาม. 2508. โรคพืชที่ตรวจพบเป็นครั้งคราว. น. 299-312. ใน : รายงานประจำปี 2508. แผนกโรคพืชวิทยา กองพืชพันธุ์ กรมกสิกรรม.
- ประพันธ์ บุญกลิ่นขจร และ ประวิทย์ กฤตยานวัช. 2514. การศึกษาเรื่องถั่วเหลือง. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ประยุกต์ กรุงเทพฯ. 71 หน้า.
- ประพาส วีระแพทย์ อรุณี จันทรสนิท สุรีย์ สุขพันธ์โพธาราม กรองกาญจน์ เจียมมนกชัย สงบ ไชยมงคล และ กันตี ทิพจร. 2520. การสำรวจและศึกษาโรคสำคัญ ๆ ของข้าวสาลี ทริติเคลีบาร์เลย์ และโอ๊ต. น. 69-70. ใน : รายงานผลการค้นคว้าวิจัยปี 2520. กองการข้าว กรมวิชาการเกษตร. (บทคัดย่อ).
- ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ศิริพงษ์ คุ้มภัย วิรัช ชูบำรุง และ พัฒนา สนธิรัตน์. 2527. ศึกษาเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับถั่วไร่รับประทานฝักสด. น. 39-49. ใน : รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2527 เล่มที่ 3. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- ผ่องศรี ธาราภูมิ. 2531. การสำรวจโรคของเบญจมาศและการศึกษาโรคใบจุดของเบญจมาศในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 106 หน้า.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแพงฤทธิ์รงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2537. ดรรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.
- พงษ์วิภา หล่อสมบูรณ์. 2529. ราสนิมในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 193 น.
- พรพิมล อธิปัญญาคม และ สุรภี กิรติยะอังกูร. 2548. โรคของดอกคาร์เนชั่น. น. 74 -89. ใน : โรคไม้ดอก. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ.
- พิศาล ศิริธร และ นิวัฒน์ เสนาะเมือง. 2526. โรคของถั่วพุ่ม. เกษตร 11: 158-164.
- พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2552. โรคของข้าวโพด. น. 119- 130. ใน : คู่มือโรคผัก. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด นนทบุรี.
- ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และ ธารทิพย์ ภาสบุตร. 2550. สำรวจ รวบรวม และจำแนกชนิดเชื้อราสนิมสาเหตุโรคพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับและวัชพืชในแปลงปลูก. น. 993 – 1003. ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549 เล่ม 2. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- วิจัย รักรักษาศาสตร์. 2546. ราวทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 351 หน้า.

- สุนีรัตน์ สีมะเต็อ อภิรัชต์ สมฤทธิ์ ธารทิพย์ ภาสบุตร และ พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2550. สํารวจรวบรวม และจำแนกชนิดเชื้อราสนิมสาเหตุโรคพืชไร่ และวัชพืชในพืชปลูก. น. 1017-1025. ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549 เล่ม 2. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- สุนีรัตน์ สีมะเต็อ. 2552. โรคของถั่วฝักยาว. น.53 - 54. ใน : คู่มือโรคผัก พิมพ์ครั้งที่ 1. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. บริษัทเอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด นนทบุรี.
- สุนีรัตน์ สีมะเต็อ และ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2553. โรคของดอกเบญจมาศ. น.58 - 69. ใน : โรคไม้ดอกไม้ประดับ. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ.
- สุรพล ยินอัครพรรณ อํามา ชินสว่างวัฒนกุล ปรีชา สุรินทร์ และ พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2530. โรคราสนิมของถั่วเขียวผิวมันและถั่วเขียวผิวดำ. น. 50. ใน : การประชุมวิชาการโรคพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 1. สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย. (บทคัดย่อ).
- อนงค์ จันท์ศรีกุล. 2520. โรคและศัตรูไม้ประดับ. บริษัทสำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด กรุงเทพฯ. 163 หน้า.
- อุดม ภูพิพัฒน์ และ วาย อาร์ เมธา. 2510. ผลการสำรวจและโรคที่พบใหม่ของข้าวโพด. น. 45-48. ใน : รายงานประจำปี 2510. งานวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- อุดมลักษณ์ มัจฉาชีพ. 2529. หน่อไม้ฝรั่ง. วารสารการเกษตร ศูนย์บางพระ 24: 54-56.
- อนุสรณ์ อัดตปัญญา วิรัช ชูบำรุง วันทนีย์ อู่วานิชย์ สุทธิรักษ์ แซ่หลิม วิสูตร เกตุทองแถม และ นิยม จิวจิ้น. 2519. การศึกษาสาเหตุและการแพร่ระบาดของโรคราสนิมของอ้อยในประเทศไทย. น. 493-497. ใน : รายงานผลการวิจัยประจำปี 2518-2519. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร.
- Aime, M. C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47: 112-122.
- Beenken, L., Zoller, S. and R. Berndt. 2012. Rust fungi on Annonaceae II: the genus *Dasyscypha* Berk. & M.A. Curtis. *Mycologia* 104: 659-681.
- Chaijuckam, P., Saralamba, S., Sriariyanum, M., Chowpongpan, S. and J.J. Guerrero. 2020. Genetic Variation of *Coleosporium plumeriae* from Different Provinces in Thailand. *Applied Science and Engineering Progress* 13: 38-47.
- Chandrasikul, A. 1962. A preliminary host list of plant disease in Thailand. Tech. Bull. No.6, Department of Agriculture, Bangkok. 23 p.
- Chandrasikul, A. 1962. A supplementary host list of plant disease in Thailand. Tech. Bull. No.6, Department of Agriculture, Bangkok. 14 p.
- Charleston, M. A. and D. L. Robertson. 2002. Preferential Host Switching by Primate Lentiviruses Can Account for Phylogenetic Similarity with the Primate Phylogeny. *Systematic Biology* 51, 528-535.

- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y. and S. Zhou. 2016. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources* 16(1): 138-149. doi: 10.1111/1755-0998.
- Cline, E.T., Farr, D.F., Rossman, A.Y., Palm, M.E. and E.B. McCray. 2013. Fungal Nomenclature Database, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory. ARS, USDA. <http://nt.arsgrin.gov/fungalDATABASES/nomen/> Nomenclature.cfm. Accessed March 2013.
- Conow, C., Fielder, D., Ovidia, Y. and R. Libeskind-Hadas. 2010. Jane: a new tool for the cophylogeny reconstruction problem. *Algorithms for Molecular Biology* 5: 16.
- Cummins, G.B. and Y. Hiratsuka. 2003. *Illustrated Genera of Rust Fungi*. St. Paul, Minnesota: APS Press. 223 p.
- Cunningham, G.H. 1931. *The Rust Fungi of New Zealand: together with the biology cytology and therapeutics of the Uredinales*. Dunedin, New Zealand: Printed privately by J. McIndos. 261 p.
- Doungsa-ard, C., Alistair, R.M., Geering, A.D.W., Dalisay, T.U., Ray, J. and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraseriathes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology* 44: 25-30.
- Eckardt, N.A. 2006. Identification of Rust Fungi Avirulence Elicitors. *Plant Cell* 18: 1-3.
- Engkhaninun, J., Chatasiri, S., To-anun, C., Visarathanonth, N., Kakishima, M. and Y. Ono. 2005. New geographical distribution and host records of rust fungi from northern Thailand. *Mycoscience* 46:137-142.
- de Hoog, G.S. and A.H.G. Gerrits van den Ende. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. *Mycosciences* 41: 183-189.
- Katoh, K. and H. Toh. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9: 286-298.
- Kern, F.D. 1913. The nature and classification of plant rusts. *Transactions of the American Microscopical Society* 32: 41-67.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and J.A. Stalpers. 2008. *Dictionary of The Fungi*. Egham, UK: CABI Bioscience. 655 p.
- Kolmer, J.A., Ordonez, M.E. and J.V. Groth. 2001. *The Rust Fungi*. In *eLS*: John Wiley & Sons, Ltd. 8 p.



- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28 (12): 1647-1649.
- Kumar, S., Stecher, G. and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/ msw054.
- Lohsomboon, P., Manoch, L. and N. Visarathanonth. 1992. The rust fungi of Thailand 1.on Graminicolous plants. *Kasetsart Journal: Natural Science* 26: 244-256.
- Lohsomboon, P., Manoch, L., Visarathanonth, N., Kakishima, M., Ono, Y. and S. Sato. 1986. Materials for the rust flora in Thailand II. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 27: 271-281.
- Lohsomboon, P., Kakishima, M. and Y. Ono. 1994. A monograph of *Sphaerophragmium* (Uredinales). *Mycological Research* 98: 907-919.
- Lorsuwan, C., Tontyaporn, S., Virasathanonth, N., Manoch, L. and M. Kakishima. 1984. Materials for the rust flora in Thailand I. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 25: 57-65.
- Morin, L., Aveyard, R., Batchelor, K.L., Evans, K.J., Hartley, D., and M., Jourdan. 2006. Additional strains of *Phragmidium violaceum* released for the biological control of blackberry. pp. 565-568. In : *15th Australian Weeds Conference Proceedings: Managing Weeds in a Changing Climate*. September 24-28, 2006. the Adelaide Convention Centre. Adelaide, South Australia.
- Nylander, J. A., Wilgenbusch, J. C., Warren, D. L. and D. L., Swofford. 2008. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics* 24: 581-583.
- Ono, Y. and M.C. Aime. 2006. Recent advances in rust systematics. *Mycoscience* 47: 111.
- Ono, Y., Kakishima, M., Lohsomboon, P., Manoch, L. and N. Visarathanonth. 1988a. Two new species of Uredinales from Thailand. *Mycologia* 80: 261-263.
- Ono, Y., Kakishima, M., Lohsomboon, P., Sato, S., Manoch, L. and N. Visarathanonth. 1988b. Two rust fungi with pseudosuprastomatal sori collected in Thailand. *Transaction British Mycological Society* 91: 467-472.
- Petersen, R.H. 1974. The Rust Fungus Life Cycle. *Botanical Review* 40: 453-513.



- Puckdeedindan, P. 1966. *A supplementary host lost of plant disease in Thailand*. Tech. Bull. No.7, Department of Agriculture Bangkok. 24 p.
- Rokas, A. and S.B., Carroll. 2005. More Genes or More Taxa? The Relative Contribution of Gene Number and Taxon Number to Phylogenetic Accuracy. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1337-1344.
- Rokas, A., Williams, B.L., King, N. and S.B., Carroll. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425: 798-804.
- Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Shivas, R.G. and K. D. Hyde. 1997. Biodiversity of plant pathogenic fungi in the tropics. 47-56 pp. In : KD Hyde ed. *Biodiversity of tropical microfungi*. Hong Kong: Hong Kong University Press.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313.
- Swann, E.C., Frieders, E.M. and D.J. McLaughlin. 2001. Urediniomycetes. 37-55 pp. In : DJ McLaughlin, EG McLaughlin, PA Lemke eds. *The Mycota*. Verlag, Berlin: Springer.
- Talavera, G. and J., Castresana. 2007. Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments. *Systematic Biology* 56: 564-577.
- Van Der Merwe, M.M., Ericson, L., Walker, J., Thrall, P.H. and J.J., Burdon. 2007. Evolutionary relationships among species of *Puccinia* and *Uromyces* (*Pucciniaceae*, *Uredinales*) inferred from partial protein coding gene phylogenies. *Mycological Research* 111: 163-175.
- Vilgalys, R. and M. Hester. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.
- Webster, J. and Weber, W.S. 2007. *Introduction to fungi*. New York: Cambridge University Press. 841 p.
- Wiberg, L. and J. Walker. 1990. *Uromyces minor* on peas in Australia, with notes on other rusts of *Pisum*. *Australasian Plant Pathology* 19: 42-45.



Table 1 Rust specimens collected from this study. (2019-2021)

| Family | Taxa | TPPH No. | Lab No. | Host common name | Scientific name | Location |
|-----------------|------------------------------|----------|---------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| Albuginaceae | <i>Albugo</i> sp.1 | 005209 | M 0965 | Amaranth | <i>Amaranthus viridis</i> | Saraburi |
| Coleosporiaceae | <i>Coleosporium</i> sp. | 004336 | M 0065 | Goldenrod | <i>Solidago canadensis</i> | Saraburi |
| | | 004611 | M 0066 | Water Morning Glory | <i>Ipomoea aquatica</i> | Saraburi |
| | <i>Coleosporium ipomoeae</i> | 005085 | M 0954 | Frangipani | <i>Plumeria</i> sp. | Chiangrai |
| | | 005408 | - | Water Morning Glory | <i>Ipomoea aquatica</i> | Chiangmai |
| | | 005635 | M 1043 | Water Morning Glory | <i>Ipomoea aquatica</i> | Suphan Buri |
| Crossosporaceae | <i>Dasturella</i> sp.1 | - | M 0007 | Bamboo | <i>Bambusa</i> sp. | Ubon Ratchathani |
| | | 005093 | M 0005 | Bamboo | <i>Bambusa</i> sp. | Ubon Ratchathani |
| | | 005093 | M 0955 | Bamboo | <i>Bambusa</i> sp. | Ubon Ratchathani |
| | | 005271 | - | Bamboo | <i>Bambusa vulgaris</i> | Lampang |
| | | 005309 | - | Rough Giant Bamboo | <i>Dendrocalamus asper</i> | Chiangrai |
| | | 005326 | - | Bamboo | <i>Bambusa vulgaris</i> | Chiangrai |
| | <i>Phakopsora</i> sp.1 | 005340 | M 0051 | Purging nut | <i>Jatropha curcas</i> | Chiangmai |
| | | 004273 | M 0062 | Grape | <i>Vitis</i> sp. | Nakhon Ratchasima |
| Phakopsoraceae | <i>Phakopsora</i> sp.2 | - | M 0064 | Sugar Apple | <i>Annona squamosa</i> | Saraburi |
| | | 005466 | M 0063 | Sugar Apple | <i>Annona squamosa</i> | Saraburi |
| | <i>Phakopsora</i> sp.3 | 005275 | - | Kyasuma grass | <i>Pennisetum pedicellatum</i> | Lampang |
| | <i>Phakopsora phyllanthi</i> | 004946 | M 0057 | Star Gooseberry | <i>Phyllanthus acidus</i> | Nakhon Ratchasima |
| | | 004946 | M 0945 | Star Gooseberry | <i>Phyllanthus acidus</i> | Nakhon Sawan |
| | <i>Cerotelium fici</i> | 005084 | M 0953 | Fig | <i>Ficus carica</i> | Chiangmai |
| | | 005157a | M 0045 | Fig var. BNR | <i>Ficus carica</i> (BNR) | Chiangmai |



Table 1 Rust specimens collected from this study (2019-2021) (continue)

| Family | Taxa | TPPH No. | Lab No. | Host common name | Scientific name | Location |
|----------------|------------------------------|----------|---------|----------------------|-----------------------------------|-------------------|
| Phakopsoraceae | <i>Cerotelium fici</i> | 005157b | M 0958 | Fig | <i>Ficus carica</i> | Chiangmai |
| | | 005158 | M 0046 | Fig var. MR | <i>Ficus carica</i> (MR) | Chiangmai |
| | | 005159 | M 0047 | Fig var. Jolly Tiger | <i>Ficus carica</i> (Jolly Tiger) | Chiangmai |
| | | 005160 | M 0048 | Fig var. Black Genoa | <i>Ficus carica</i> (Black Genoa) | Chiangmai |
| | | 005161 | M 0049 | Fig var. Panaehee | <i>Ficus carica</i> (Panaehee) | Chiangmai |
| | <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | 005568 | M 0058 | White Mulberry | <i>Morus alba</i> | Nakhon Ratchasima |
| | | 005378 | - | Soybean | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005627 | M 1035 | Soybean สจ.5 | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005628 | M 1036 | Soybean สจ.5 | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005633 | M 1041 | Soybean ชม.60 | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005634 | M 1042 | Soybean | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005637 | - | Soybean | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005638 | - | Soybean สจ.5 | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005639 | - | Soybean | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005640 | - | Soybean สจ.5 | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005641 | - | Soybean สจ.5 | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005642 | - | Soybean ชม.60 | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005647 | - | Soybean ชม.60 | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005648 | - | Soybean | <i>Glycine max</i> | Chiangmai |
| | | 005649 | - | Soybean | <i>Glycine max</i> | Phitsanulok |
| Pucciniaceae | <i>Puccinia arachnidis</i> | - | M 0006 | Peanut | <i>Arachis hypogaea</i> | Surin |



Table 1 Rust specimens collected from this study (2019-2021) (continue)

| Family | Taxa | TPPH No. | Lab No. | Host common name | Scientific name | Location |
|--------------|----------------------------|----------|-------------------------|------------------|-------------------------|-------------------|
| Pucciniaceae | <i>Puccinia arachnidis</i> | - | M 0056 | Peanut | <i>Arachis hypogaea</i> | Nakhon Ratchasima |
| | | 005075 | M 0952 | Peanut | <i>Arachis hypogaea</i> | Surin |
| | | 005139 | M 0956 | Peanut | <i>Arachis hypogaea</i> | Ratchaburi |
| | | 005263 | - | Peanut | <i>Arachis hypogaea</i> | Lopburi |
| | | 005330 | - | Peanut | <i>Arachis hypogaea</i> | Chiangrai |
| Pucciniaceae | <i>Puccinia cynodontis</i> | 005273 | - | Bermuda grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Phrae |
| | | 005285 | - | Bermuda grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Nakhonratchasima |
| | | 005288 | - | Bermuda grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Uttaradit |
| | | 005299 | - | Bermuda grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Uttaradit |
| | | 005300 | - | Bermuda grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Uttaradit |
| | | 005301 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Uttaradit |
| | | 005303 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Uttaradit |
| | | 005306 | - | Weed | <i>Cynodon dactylon</i> | Uttaradit |
| | | 005310 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Phrae |
| | | 005311 | - | Weed | <i>Cynodon dactylon</i> | Phrae |
| | | 005316 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Phitsanulok |
| | | 005317 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Phitsanulok |
| | | 005318 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangrai |
| | | 005323 | - | Unknown | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangrai |
| | | 005324 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangrai |
| 005325 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangrai | | |



Table 1 Rust specimens collected from this study (2019-2021) (continue)

| Family | Taxa | TPPH No. | Lab No. | Host common name | Scientific name | Location |
|--------------|-------------------------------|----------|------------|------------------------------------|------------------------------|-------------------|
| Pucciniaceae | <i>Puccinia cynodontis</i> | 005328 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangrai |
| | | 005331 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangrai |
| | | 005380 | - | Unknown | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangmai |
| | | 005398 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangmai |
| | | 005399 | - | Unknown | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangmai |
| | | 005403 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangmai |
| | | 005407 | - | Grass | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangmai |
| | | 005414 | - | Unknown | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangmai |
| | | 005435 | - | | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangrai |
| Pucciniaceae | <i>Puccinia cynodontis</i> | 005445 | - | | <i>Cynodon dactylon</i> | Chiangrai |
| | <i>Puccinia horiana</i> | 005501 | M 0003 | Chrysanthemum | <i>Chrysanthemum</i> sp. | Chiangmai |
| | <i>Puccinia melanocephala</i> | 003731 | M 0060 | Sugar cane | <i>Saccharum officinarum</i> | Nakhon Ratchasima |
| | | 003732 | M 0061 | Sugar cane | <i>Saccharum officinarum</i> | Nakhon Ratchasima |
| | <i>Puccinia nakanishikii</i> | 004960 | M 0949 | Lemon Grass | <i>Cymbopogon citratus</i> | Phayao |
| | | 005322 | M 0053 | Lemon Grass | <i>Cymbopogon citratus</i> | Nakhon Ratchasima |
| | | 005322 | - | Lemon Grass | <i>Cymbopogon citratus</i> | Chiangrai |
| | <i>Puccinia polysora</i> | 005374 | - | Lemon Grass | <i>Cymbopogon citratus</i> | Chiangmai |
| | | - | M 0059 | Maize | <i>Zea mays</i> | Nakhon Ratchasima |
| | | 005168 | M 0959 | Maize | <i>Zea mays</i> | Phitsanulok |
| | | 005211 | M 0966 | Maize | <i>Zea mays</i> | Saraburi |
| | 005420 | M 0055 | Sweet corn | <i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i> | Nakhon Ratchasima | |



Table 1 Rust specimens collected from this study (2019-2021) (continue)

| Family | Taxa | TPPH No. | Lab No. | Host common name | Scientific name | Location |
|----------------------|------------------------|----------|----------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Pucciniaceae | <i>Puccinia sorghi</i> | 005147 | M 0957 | Maize | <i>Zea mays</i> | Kanchanaburi |
| | | 005188 | M 0962 | Maize | <i>Zea mays</i> | Khon Kaen |
| | | 005190 | M 0963 | Waxy corn | <i>Zea mays</i> var. <i>ceratina</i> | Khon Kaen |
| | | 005256 | - | Sorghum | <i>Sorghum bicolor</i> | Nakhonratchasima |
| | | 005291 | - | Maize | <i>Zea mays</i> | Uttaradit |
| | | 005304 | - | Sorghum | <i>Sorghum bicolor</i> | Nakhonratchasima |
| | | 005320 | - | Maize | <i>Zea mays</i> | Chiangmai |
| | | 005626 | M 1034 | Sweet corn | <i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i> | Sukhothai |
| | | 005629 | M 1037 | Sweet corn | <i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i> | Chiangmai |
| | | 005630 | M 1038 | Maize | <i>Zea mays</i> | Chiangmai |
| | 005632 | M 1040 | Sweet corn | <i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i> | Chiangmai | |
| | 005636 | - | Sweet corn | <i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i> | Chiangmai | |
| | 005643 | - | Sweet corn | <i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i> | Chiangmai | |
| | 005644 | - | Maize | <i>Zea mays</i> | Chiangmai | |
| | 005646 | M 0137 | Sweet corn | <i>Zea mays</i> var. <i>rugosa</i> | Sukhothai | |
| | <i>Puccinia</i> sp.1 | 004961 | M 0950 | Spanish Needles | <i>Bidens biternata</i> | Phayao |
| | | 005327 | - | Spanish needles | <i>Bidens biternata</i> | Chiangrai |
| | | 005388 | - | Spanish needles | <i>Bidens biternata</i> | Chiangmai |
| | | 005397 | - | Spanish needles | <i>Bidens biternata</i> | Chiangmai |
| | <i>Puccinia</i> sp.2 | - | M 0054 | Cyperus | <i>Cyperus</i> sp. | Nakhon Ratchasima |
| <i>Puccinia</i> sp.3 | 005187 | M 0961 | Umbrella sedge | <i>Cyperus</i> sp. | Khon Kaen | |



Table 1 Rust specimens collected from this study (2019-2021) (continue)

| Family | Taxa | TPPH No. | Lab No. | Host common name | Scientific name | Location |
|--------------|--------------------------------|----------|---------|------------------|--------------------------------|-------------------|
| Pucciniaceae | <i>Puccinia</i> sp.3 | 005203 | M 0964 | Umbrella sedge | <i>Cyperus</i> sp. | Khon Kaen |
| | <i>Puccinia</i> sp.4 | 004959 | M 0948 | Vetiver | <i>Chrysopogon zizanioides</i> | Phayao |
| | <i>Puccinia</i> sp.5 | 005298 | - | Grass | <i>Apluda</i> sp. | Uttaradit |
| | <i>Puccinia</i> sp.6 | 005284 | - | Guinea grass | <i>Megathyrsus maximus</i> | Nakhon Ratchasima |
| | <i>Puccinia</i> sp.7 | 005332 | - | Bornyard grass | <i>Echinochloa crusgalli</i> | Chiangmai |
| | <i>Puccinia</i> sp.8 | 005315 | - | Wild sugarcane | <i>Saccharum spontaneum</i> | Phitsanulok |
| | <i>Puccinia</i> sp.9 | 005297 | - | Blady grass | <i>Imperata cylindrica</i> | Chiangrai |
| | | 005321 | - | Blady grass | <i>Imperata cylindrica</i> | Chiangrai |
| | <i>Puccinia</i> sp.10 | 005308 | - | Globe amaranth | <i>Gomphrena globosa</i> | Phayao |
| | | 005319 | - | Globe amaranth | <i>Gomphrena globosa</i> | Chiangmai |
| | | 005413 | - | Globe Amaranth | <i>Gomphrena globosa</i> | Chiangmai |
| | | 005415 | - | Globe Amaranth | <i>Gomphrena globosa</i> | Chiangmai |
| | <i>Puccinia thaliae</i> | 004981 | M 0951 | Canna Lily | <i>Canna indica</i> | Phetchabun |
| | <i>Uromyces appendiculatus</i> | - | M 0002 | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> | Chiangmai |
| | | - | M 0052 | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> | Nakhon Ratchasima |
| | <i>Uromyces appendiculatus</i> | - | M 0067 | Green Bean | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Saraburi |
| | | 005180 | M 0960 | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> | Nakhon Ratchasima |
| | | 005264 | - | Bean | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Lopburi |
| | | 005274 | - | Bean | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Lampang |
| | | 005313 | - | Yard long bean | <i>Vigna unguiculata</i> | Lampang |
| | | 005631 | M 1039 | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> | Chiangmai |



Table 1 Rust specimens collected from this study (2019-2021) (continue)

| Family | Taxa | TPPH No. | Lab No. | Host common name | Scientific name | Location |
|------------------|----------------------------------|----------|---------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Pucciniaceae | <i>Uromyces appendiculatus</i> | 005645 | - | Yardlong bean | <i>Vigna unguiculata</i> | Chiangmai |
| | <i>Uromyces commelinae</i> | - | M 0068 | Benghal Dayflower | <i>Commelina benghalensis</i> | Saraburi |
| | | 005292 | - | Benghal Dayflower | <i>Commelina benghalensis</i> | Chiangmai |
| | <i>Uromyces</i> sp.1 | 005266 | - | Mucuna | <i>Mucuna pruriens</i> | Uttaradit |
| | <i>Uromyces stariae-italicae</i> | 004951 | M 0947 | Mauritius Grass | <i>Brachiaria mutica</i> | Phayao |
| 005314 | | - | Panicum grass | <i>Brachiaria mutica</i> | Lampang | |
| Pucciniastraceae | <i>Pucciniastrum</i> sp.1 | 005387 | - | Fuchsia | <i>Fuchsia hybrida</i> | Chiangmai |
| Raveneliaceae | <i>Olivea tectonae</i> | 004950 | M 0946 | Teak | <i>Tectona grandis</i> | Phayao |
| | | 005272 | - | Teak | <i>Tectona grandis</i> | Phrae |
| | <i>Ravenelia</i> sp.1 | 005302 | - | Golden shower | <i>Cassia fistula</i> | Phichit |
| | <i>Olivea tectonae</i> | 005307 | - | Teak | <i>Tectona grandis</i> | Nakhoratchasima |
| Zaghouaniaceae | <i>Hemileia vastatrix</i> | 005295 | - | Coffee | <i>Coffea robusta</i> | Chiangrai |



Table 2 The list of rust diseases caused by Pucciniaceae had been reported in Thailand.

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|--------------------------------|---|------------------|---------|------------|----------|--------------------------------|
| <i>Coleosporium plumeriae</i> | | ลั่นทม | สนิม | ใบ | 2563 | Chaijuckam <i>et al.</i> ,2020 |
| <i>Endophyllum kaernbachii</i> | <i>Aecidium kaernbachii</i> | ผักบุ้ง | สนิม | ใบ | 2529 | พงษ์วิภา, 2529 |
| <i>Macabuna zizyphi</i> | <i>Uredo zizyphi</i> | พุทรา | สนิม | ใบ | 2508 | นิรนาม, 2508 |
| <i>Puccinia hemerocallidis</i> | <i>Dicaeoma hemerocallidis</i> | ดอกไม้จีน | สนิม | ใบ | 2549 | ธารทิพย์ และคณะ, 2549 |
| <i>Puccinia allii</i> | <i>Xyloma allii</i> | กุยช่าย | สนิม | ใบ ก้านดอก | 2552 | สุนิรัตน์ และคณะ, 2550 |
| | <i>Dicaeoma allii</i> | หอมใหญ่ | | | 2549 | ธารทิพย์ และคณะ, 2549 |
| | <i>Puccinia alliorum</i> | | | | | |
| <i>Puccinia arachidis</i> | <i>Dicaeoma arachidis</i> | ถั่วลิสง | สนิม | ใบ | 2550 | สุนิรัตน์ และคณะ, 2550 |
| | <i>Bullaria arachidis</i> | | | | | |
| <i>Puccinia asparagi</i> | <i>Puc. discoidearum</i> var. <i>asparagi</i> | หน่อฝรั่ง | สนิม | ใบ ลำต้น | 2529 | อุดมลักษณ์, 2529 |
| | <i>Dicaeoma asparagi</i> | | | | | |
| | <i>Persooniella asparagi</i> | | | | | |
| <i>Puccinia cynodontis</i> | | graminicolous | สนิม | | 2535 | Lohsomboon <i>et al.</i> ,1992 |
| <i>Puccinia chrysanthemi</i> | | เบญจมาศ, เก๊กฮวย | สนิม | ใบ | 2531 | ผ่องศรี, 2531 |
| <i>Puccinia erianthi</i> | | อ้อย | สนิม | ใบ | 2519 | อนุสรณ์ และคณะ, 2519; |
| | | | | | 2557 | พรพิมล และคณะ, 2557 |
| <i>Puccinia striiformis</i> | <i>Dicaeoma glumarum</i> | ข้าวสาลี | สนิม | ใบ | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |
| | <i>Puccinia striiformis</i> | | | | | |
| | <i>Puccinia lineatula</i> | | | | | |
| <i>Puccinia horiana</i> | | เบญจมาศ, เก๊กฮวย | สนิมขาว | ใบ | 2558 | พงษ์วิภา และคณะ, 2558; |



Table 2 The list of rust diseases caused by Pucciniaceae had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|------------------------------------|---|-------------------------|---------|------------|--------------|--|
| <i>Puccinia horiana</i> | | เบญจมาศ, เก๊กฮวย | สนิมขาว | ใบ | 2553 2550 | สุนีรัตน์ และคณะ, 2553; ยุทธศักดิ์ และคณะ 2550; |
| <i>Puccinia kuehnii</i> | <i>Uromyces kuehnii</i> <i>Caomurus kuehnii</i> <i>Coeomurus kuehnii</i> <i>Puccinia kuhonii</i> | อ้อย | สนิม | ใบ | 2526 | ธนาคร และคณะ, 2526 |
| <i>Puccinia melanocephala</i> | | อ้อย | สนิม | ใบ | 2519 2557 | อนุสรณ์ และคณะ, 2519 พรพิมล และคณะ, 2557 |
| <i>Puccinia nakanishikii</i> | <i>Dicaeoma nakanishikii</i> | ตะไคร้ | สนิม | ใบ | 2550 2549 | ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2550 จารทิพย์ และคณะ, 2549 |
| <i>Puccinia philippinensis</i> | | กกสามเหลี่ยม แห้วหมู | สนิม | ใบ | 2550 | จารทิพย์ และคณะ, 2550 |
| | | | สนิม | ใบ | 2550 | ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2550 |
| | | กกทราย, กกขนาก | สนิม | ใบ | 2550 | จารทิพย์ และคณะ, 2550 |
| | | | สนิม | ใบ | 2550 | สุนีรัตน์ และคณะ, 2550 |
| <i>Puccinia polysora</i> | <i>Dicaeoma polysorum</i> | ข้าวโพด | สนิม | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| | | | | | 2510 | อุดม และเมธา, 2510 |
| | | | | | 2552 | พีระวรรณ, 2552 |
| | | | | | 2550 | ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550 |
| <i>Tranzschelia pruni-spinosae</i> | <i>Puccinia prunorum</i> | ท้อ | สนิม | ใบ | 2511 | Chandrasrikul, 1968 |



Table 2 The list of rust diseases caused by Pucciniaceae had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|---|---|--------------|---------|------------|----------------------|---|
| <i>Tranzschelia pruni-spinosae</i> | <i>Lecythea pruni-spinosae</i> <i>Dicaeoma pruni-spinosae</i> <i>Tranzschelia pruni-spinosae</i> <i>Puccinia pruni</i> | | | | | |
| <i>Puccinia purpurea</i> | <i>Dicaeoma purpureum</i> | ข้าวฟ่าง | สนิม | ใบ ลำต้น | 2511 2549 2557 | Chandrasrikul, 1968 จารทิพย์ และคณะ, 2549 พรพิมล และคณะ, 2557 |
| <i>Puccinia recondita</i> | <i>Puccinia dispersa</i> | ข้าวสาลี | สนิม | ใบ | 2524 | เฉลิมลาภ และคณะ, 2524 |
| <i>Puccinia recondita f.sp. tritici</i> | | ข้าวสาลี | สนิม | ใบ | 2520 | ประพาส และคณะ, 2520 |
| <i>Puccinia rubigo-vera f.sp. tritici</i> | | ข้าวสาลี | สนิม | ใบ | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |
| <i>Puccinia rufipes</i> | <i>Dicaeoma rufipes</i> | หญ้าคา | สนิม | ใบ | 2553 | จารทิพย์ และคณะ, 2553 |
| <i>Puccinia sojae</i> | | ข้าวโพด | สนิม | ใบ | | CABI |
| <i>Puccinia thaliae</i> | | พุทธรักษา | สนิม | ใบ | 2550 2549 | ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2550 จารทิพย์ และคณะ, 2549 |
| <i>Puccinia thwaitesii</i> | <i>Dicaeoma thwaitesii</i> | ขาไก่ดำ | สนิม | ใบ | 2550 | ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2550 |
| <i>Phakopsora pachyrhizi</i> | <i>Uromyces sojae</i> <i>Uredo sojae</i> <i>Phakopsora sojae</i> | ถั่วเหลือง | สนิม | ใบ | 2505 2514 | นิรนาม, 2505 ประพันธ์ และประวิทย์, 2514 |
| <i>Physopella vitis</i> | <i>Uredo vitis</i> | องุ่น | สนิม | ใบ | 2508 | ทะนง, 2508 |
| <i>Uromyces fabae</i> | <i>Capitularia fabae</i> <i>Caemurus fabae</i> | ถั่วลิ้นเต่า | สนิม | ใบ | 2501 2550 | นิรนาม, 2501 ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2550 |



Table 2 The list of rust diseases caused by Pucciniaceae had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|---|----------------------------------|-------------------------|---------|------------|----------|----------------------------------|
| <i>Uromyces appendiculatus</i> | <i>Uredo appendiculata</i> | ถั่วแขก, ถั่วพุ่ม | สนิม | ใบ | 2509 | Puckdeedindan, 1966 |
| | <i>Caecoma appendiculatum</i> | ถั่วฝักยาว | สนิม | ใบ | 2552 | สุณีรัตน์, 2552 |
| | <i>Nigredo appendiculata</i> | | | | 2550 | ศรีสุรางค์, 2550 |
| | <i>Caecomurus appendiculatus</i> | ถั่วฝักยาว | สนิม | ใบ | 2549 | จารทิพย และคณะ, 2549 |
| | <i>Uromyces phaseolorum</i> | | | | | |
| | <i>Uredo phaseoli</i> | | | | | |
| <i>Uromyces appendiculatus</i> | <i>Uromyces aberrans</i> | ถั่วฝักยาว | สนิม | ใบ | 2549 | จารทิพย และคณะ, 2549 |
| | <i>Uredo appendiculata</i> | | | | | |
| | <i>Puccinia phaseolorum</i> | | | | | |
| | <i>Uromyces phaseoli</i> | | | | | |
| <i>Uromyces appendiculus</i> | | ถั่วพุ่ม | สนิม | ใบ | 2526 | พิศาล และนิวัฒน์, 2526 |
| <i>Uromyces caryophyllinus</i> | <i>Lycoperdon caryophyllum</i> | คาร์เนชั่น | สนิม | ใบ | 2520 | อนงค์, 2520 |
| | <i>Uredo dianthi</i> | คาร์เนชั่น | สนิม | ใบ | 2548 | พรพิมล และสุรณี, 2548 |
| | <i>Caecoma dianthi</i> | | | | 2549 | จารทิพย และคณะ, 2549 |
| | <i>Nigredo caryophyllina</i> | | | | | |
| | <i>Caecomurus caryophyllinus</i> | | | | | |
| <i>Uromyces dianthi</i> | | | | | | |
| <i>Uromyces commelinae</i> | <i>Caecomurus commelinae</i> | <i>Aneilema sinicum</i> | สนิม | ใบ | 2548 | Engkhaninun <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Uromyces phaseoli</i> var. <i>phaseoli</i> | | ถั่วแขก, ถั่วพุ่ม | สนิม | ใบ | 2528 | ณรงค์, 2528 |
| <i>Uromyces phaseoli</i> var. <i>typical</i> | | ถั่วแขก, ถั่วพุ่ม | สนิม | ใบ | 2525 | ฉายแสง และคณะ, 2525 |



Table 2 The list of rust diseases caused by Pucciniaceae had been reported in Thailand. (continue)

| Current name | Taxon synonyms | Host | Symptom | Plant part | Reported | References |
|----------------------------------|---|----------------------------------|---------|------------|----------|---------------------------------|
| <i>Uromyces stariae-italicae</i> | | graminicolous | สนิม | | 2535 | Lohsomboon <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Uromyces vignae</i> | <i>Uromyces phaseoli</i> var. <i>vignae</i> | ถั่วฝักยาว | สนิม | ใบ | 2505 | Chandrasrikul, 1962 |
| | <i>Nigredo vignae</i> | | | | 2527 | ประไพศรี และคณะ, 2527 |
| | | ถั่วเขียวผิวดำ, ถั่วเขียวเมล็ดดำ | สนิม | ลำต้น | 2530 | สุรพล และคณะ, 2530 |
| | | ถั่วเขียว, ถั่วเขียวผิวมัน | สนิม | ใบ | 2530 | สุรพล และคณะ, 2530 |





Figure 1 Rust disease specimens collected from this study (2019-2021)



Figure 2 *Uromyces appendiculatus* on *Vigna unguiculata* (M0960)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf; c-d: urediospores



Figure 3 *Olivea tectonae* on *Tectona grandis* (M0946)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf;

c: urediospores

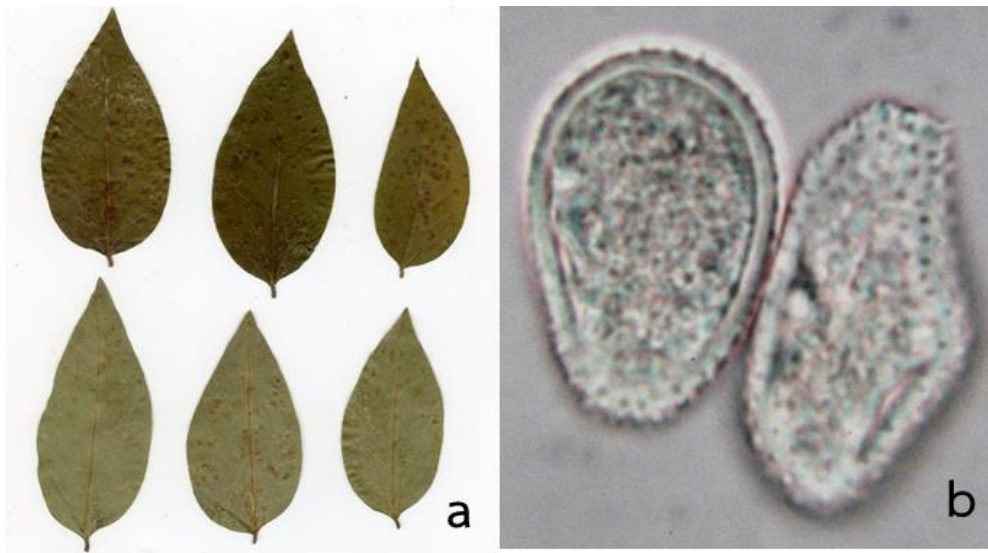


Figure 4 *Phakopsora phyllanthi* on *Phyllanthus acidus* (M0945)

a: symptom on leaves; b: urediospores

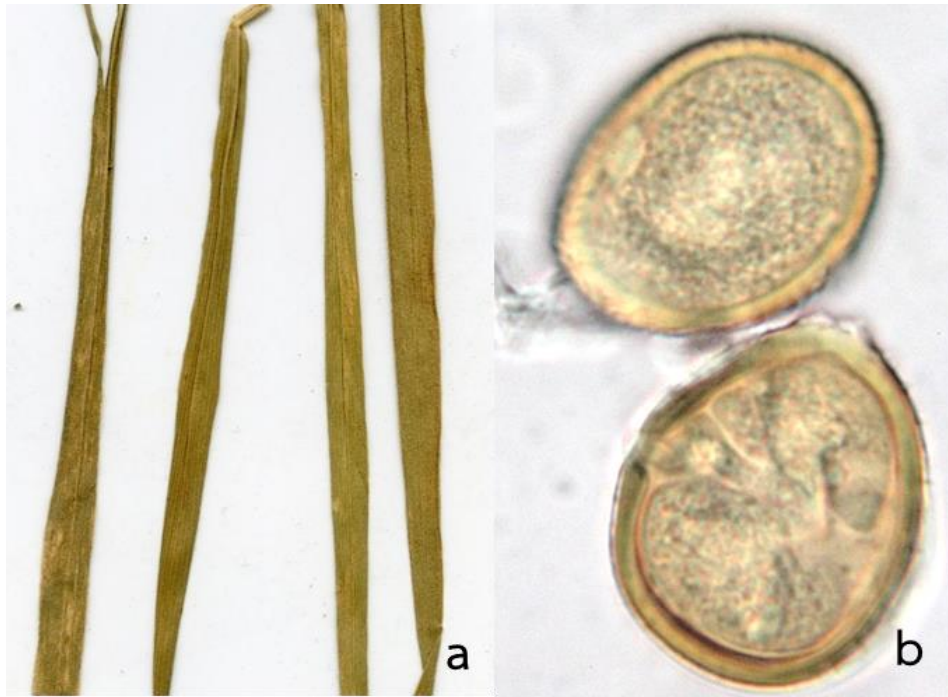


Figure 5 *Uromyces stariae-italicae* on *Brachiaria mutica* (M0947)

a: symptom on leaves; b: urediospores

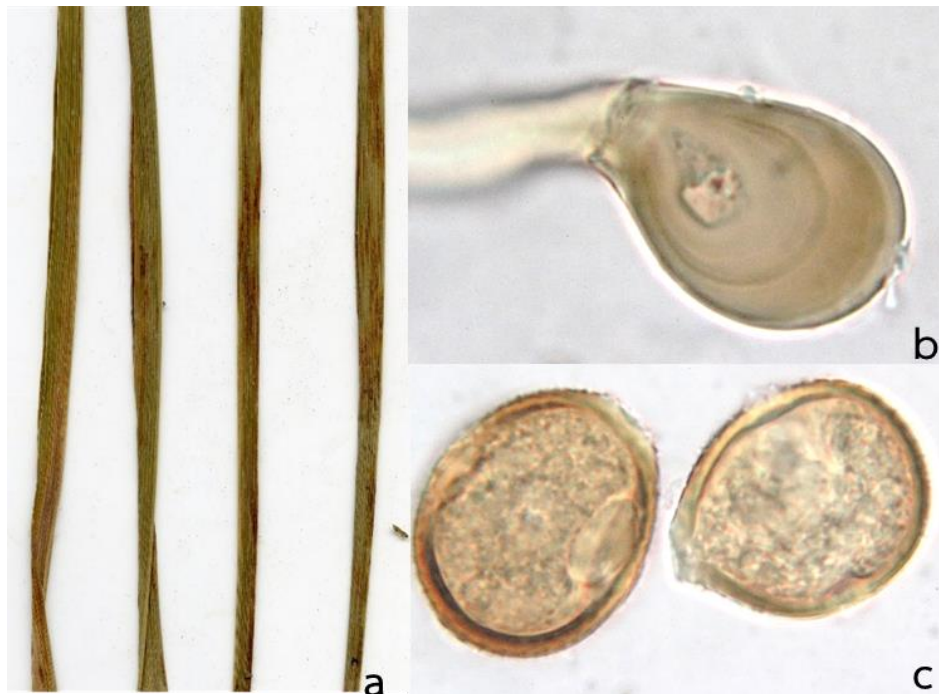


Figure 6 *Puccinia nakanishikii* on *Cymbopogon citratus* (M0949)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

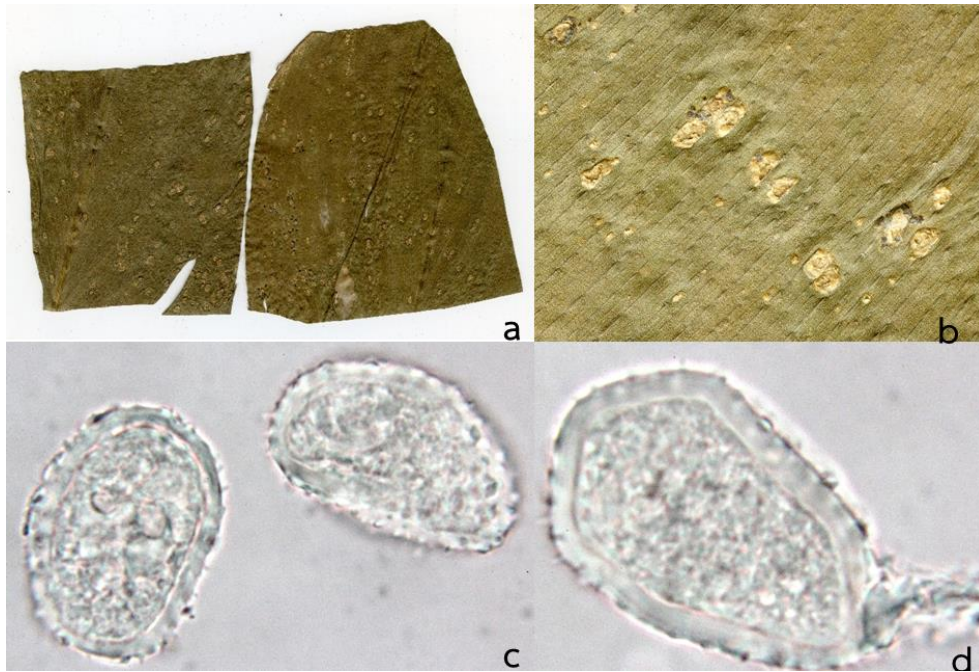


Figure 7 *Puccinia thaliae* on *Canna indica* (M0951)

a: symptom on leaves; b: sori c-d: urediospores

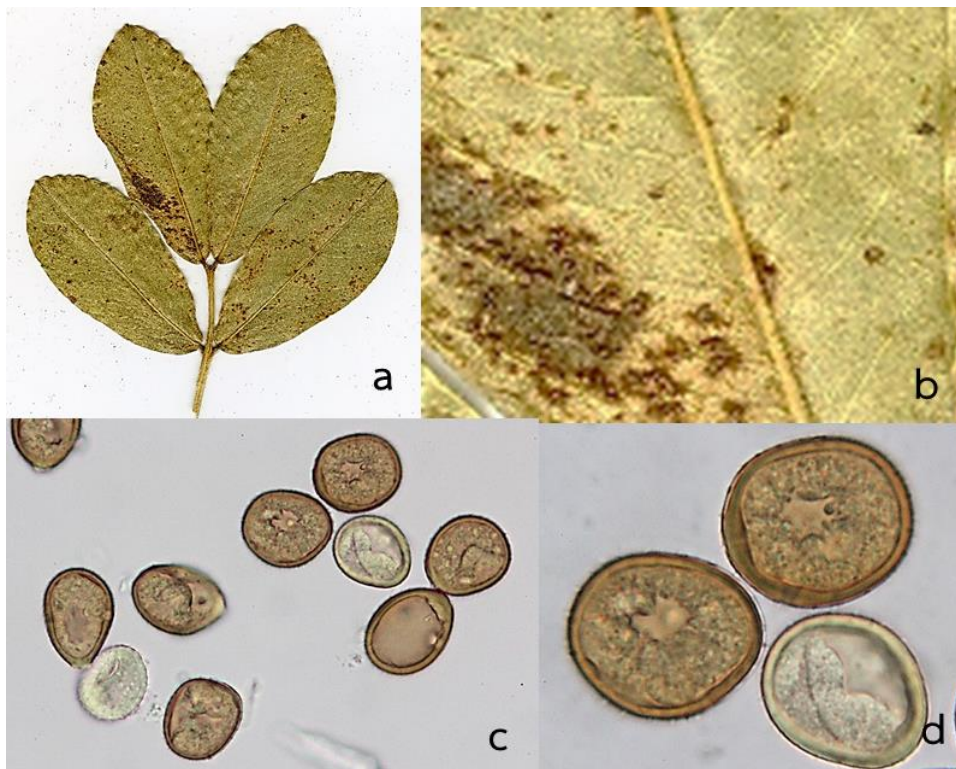


Figure 8 *Puccinia arachnidis* on *Arachis hypogaea* (M0956)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf;
c-d: urediospores

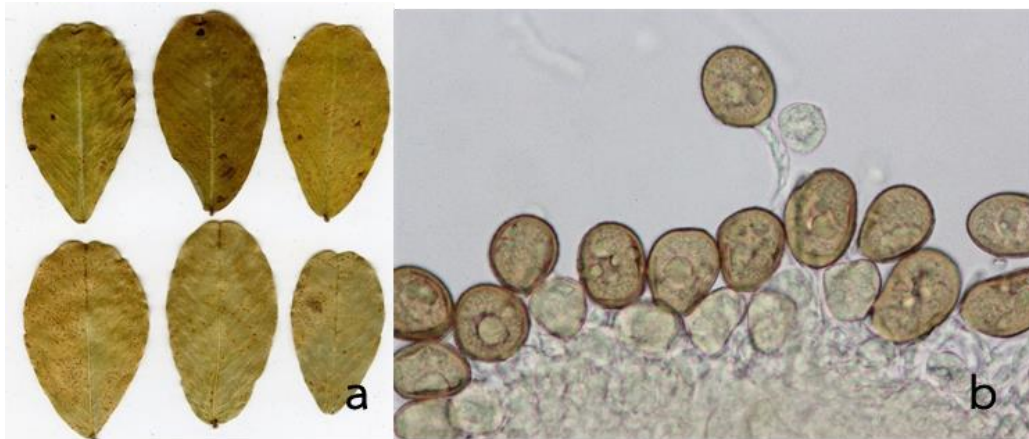


Figure 9 *Puccinia arachnidis* on *Arachis hypogaea* (M0952)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf;

c-d: urediospores

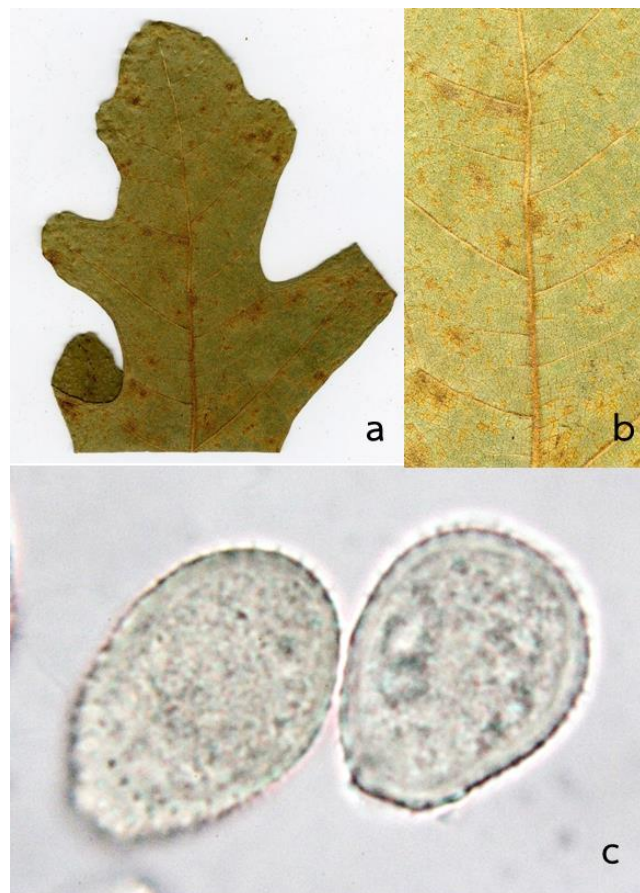


Figure 10 *Cerotelium fici* on *Ficus carica* (M0953)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf;

c: urediospores

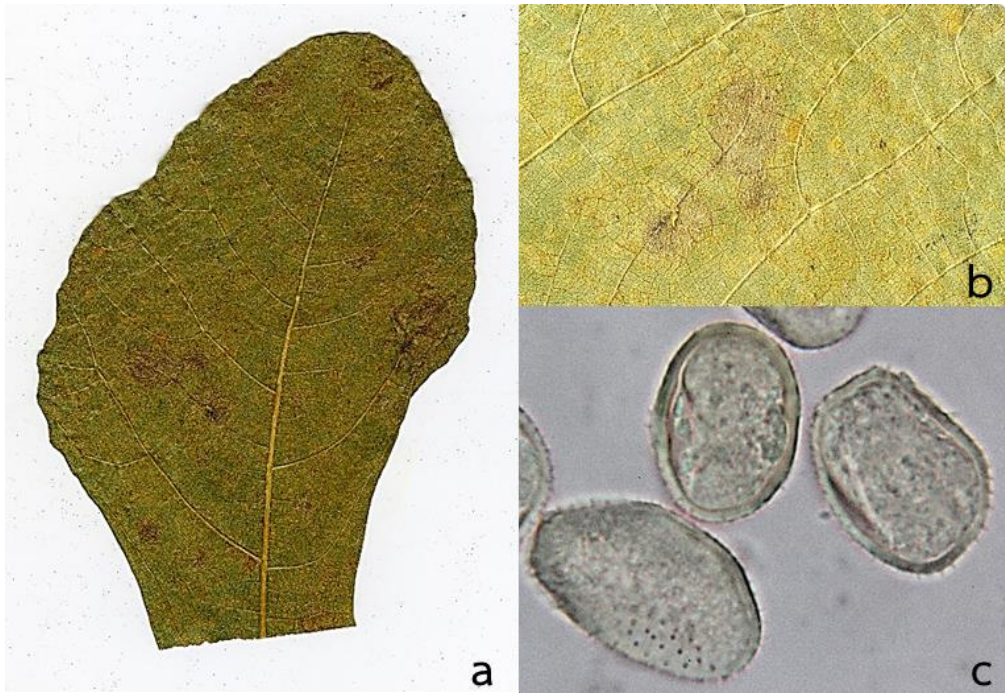


Figure 11 *Cerotelium fici* on *Ficus carica* (M0958)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf;
c: urediospores

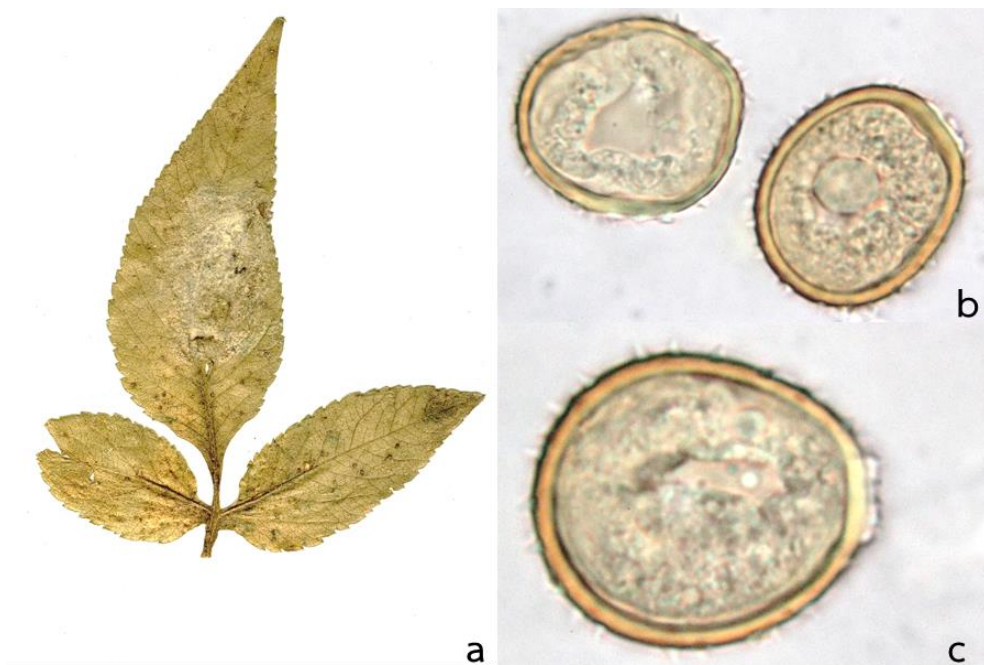


Figure 12 *Puccinia* sp.1 on *Bidens biternata* (M0950)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

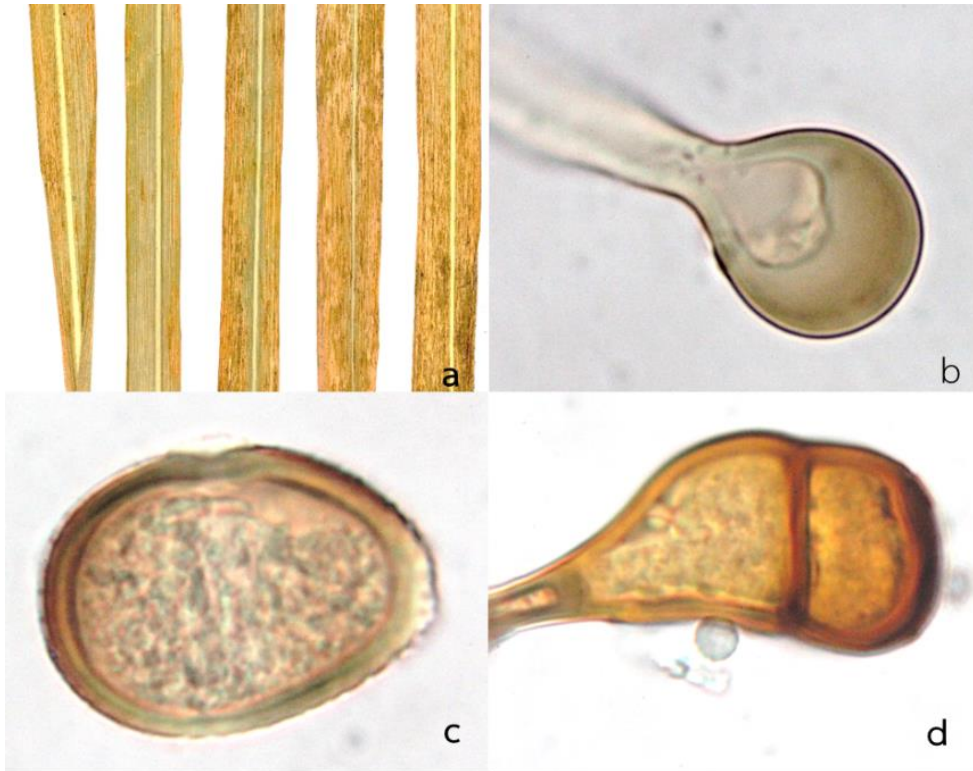


Figure 13 *Puccinia* sp.4 on *Chrysopogon zizanioides* (M0948)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores; d: teliospore



Figure 14 *Dasturella* sp.1 on *Bambusa* sp. (M0955)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

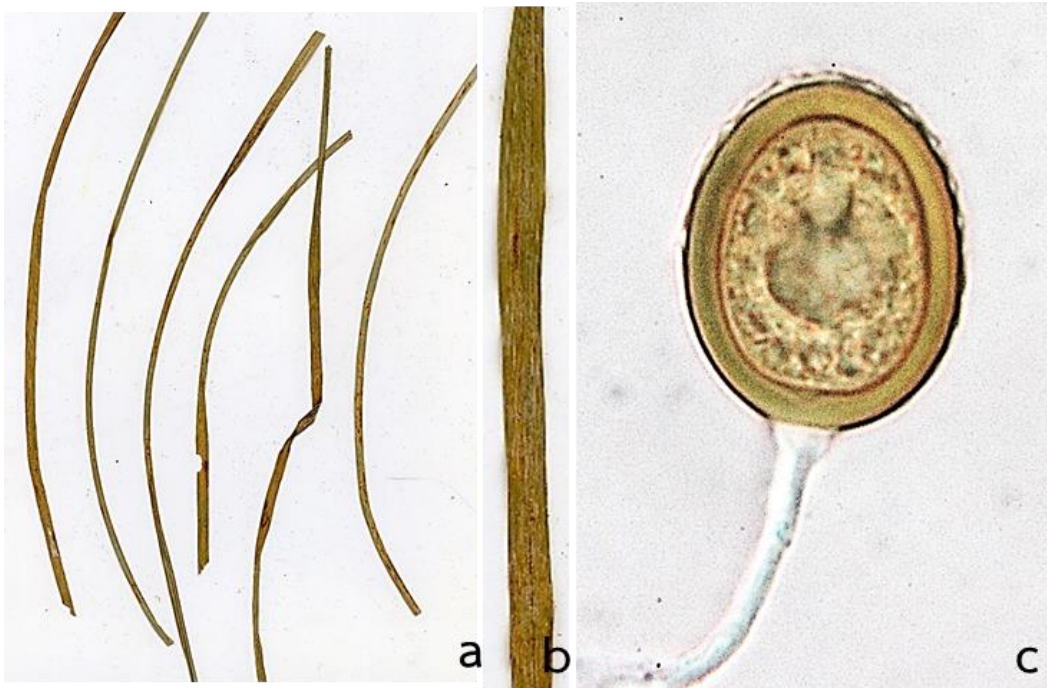


Figure 15 *Puccinia* sp.3 on *Cyperus* sp. (M0961)

a-b: symptom on leaves; c: urediospore on pedicel

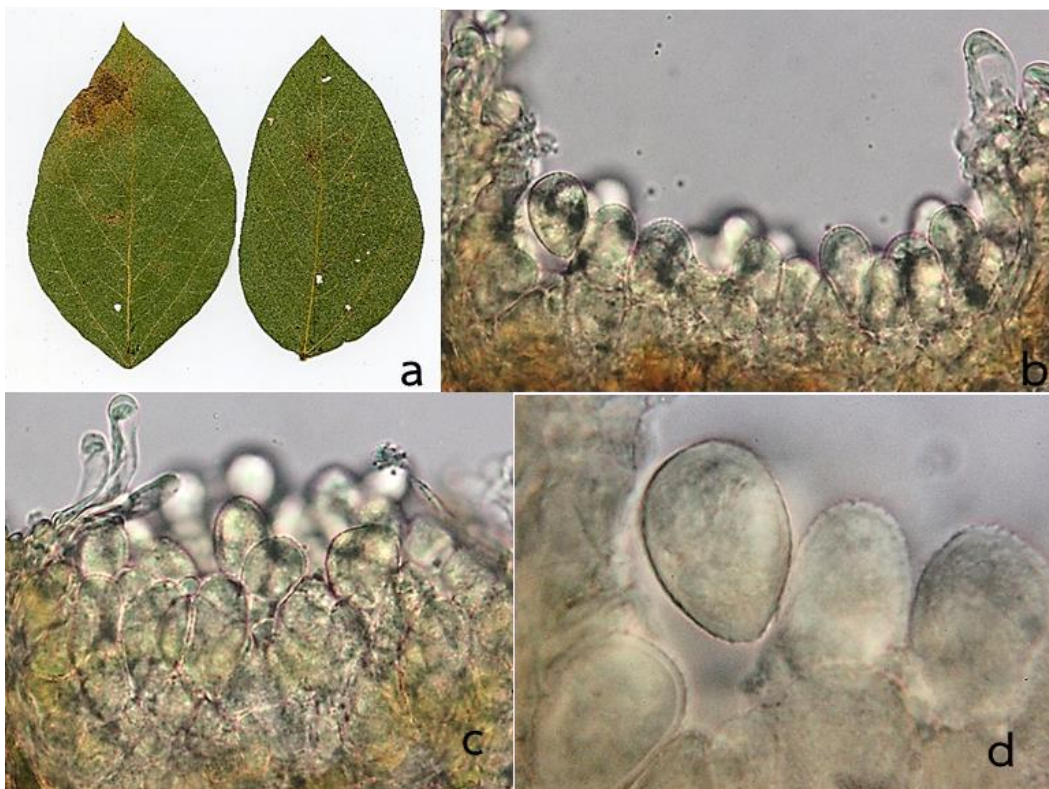


Figure 16 *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (สจ.5) (M1035)

a: symptom on leaves; b-d: urediospores embedded in sori

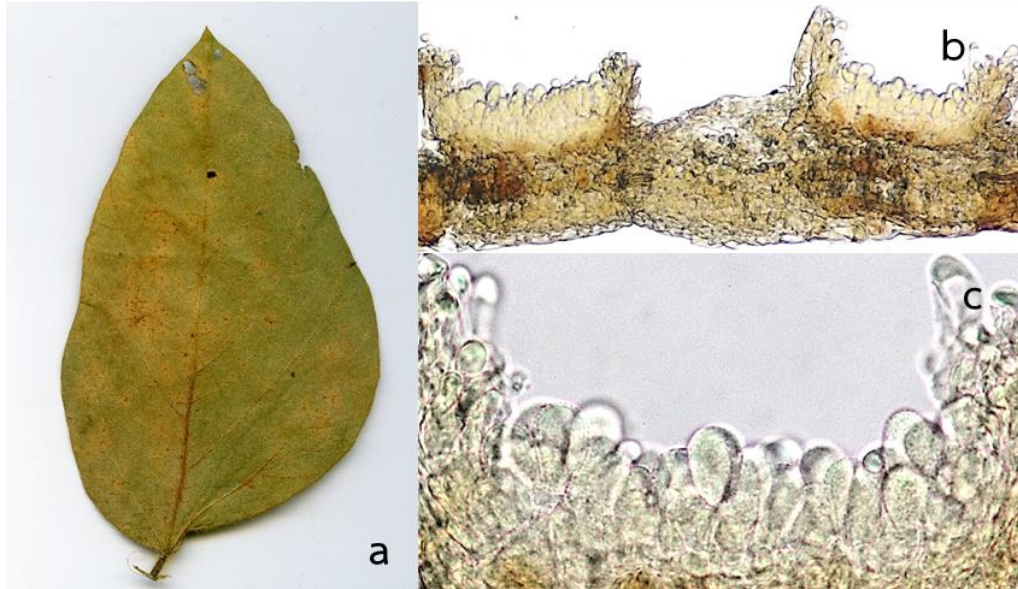


Figure 17 *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (สง.5) (M1036)

a: symptom on leaf; b: cross section of sori; c: urediospores

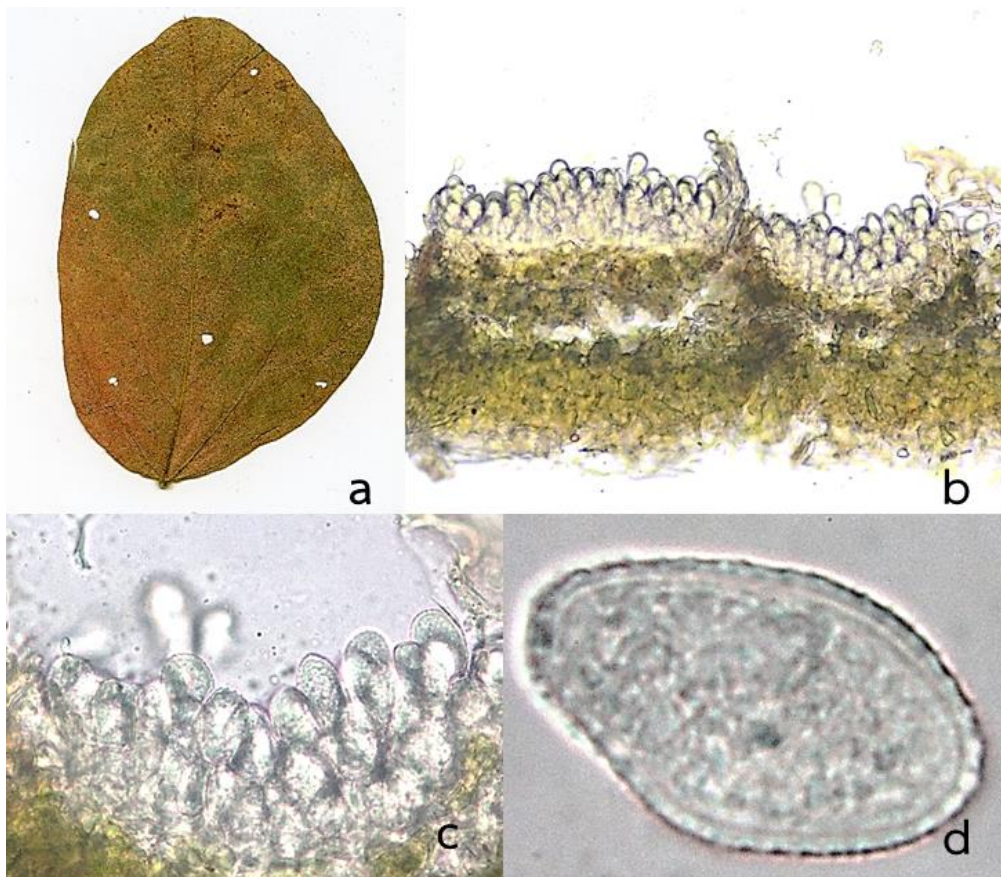


Figure 18 *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (ชม.60) (M1041)

a: symptom on leaf; b: cross section of sori; c-d: urediospores

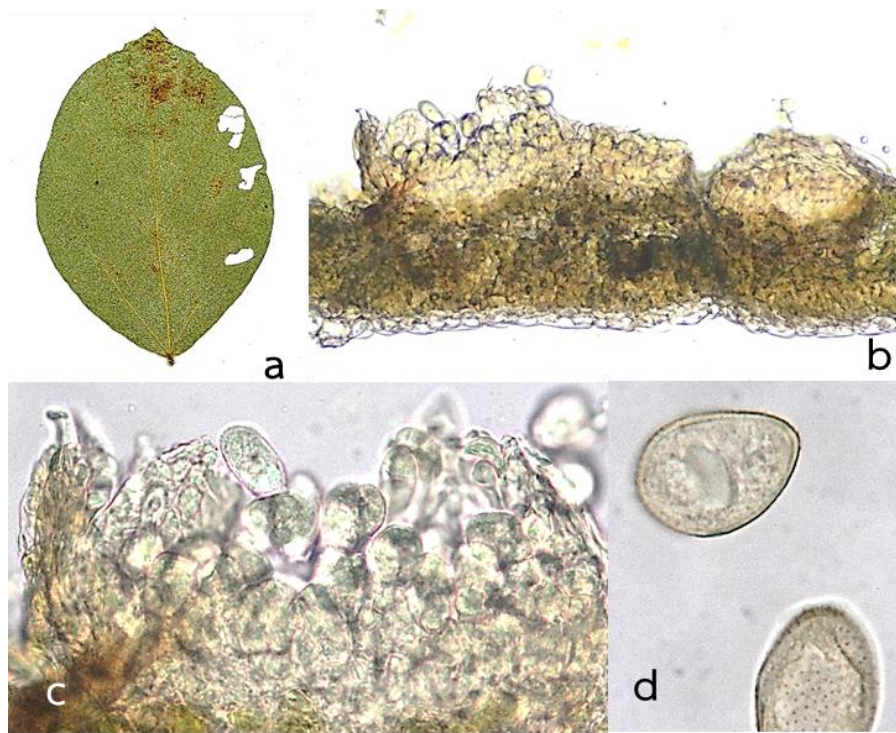


Figure 19 *Phakopsora pachyrhizi* on *Glycine max* (ชม.60) (TPPH 005378)
a: symptom on leaf; b: cross section of sori; c-d: urediospores



Figure 20 *Puccinia sorghi* on *Zea mays* (M0957)
a: symptom on leaf; b-c: urediospores

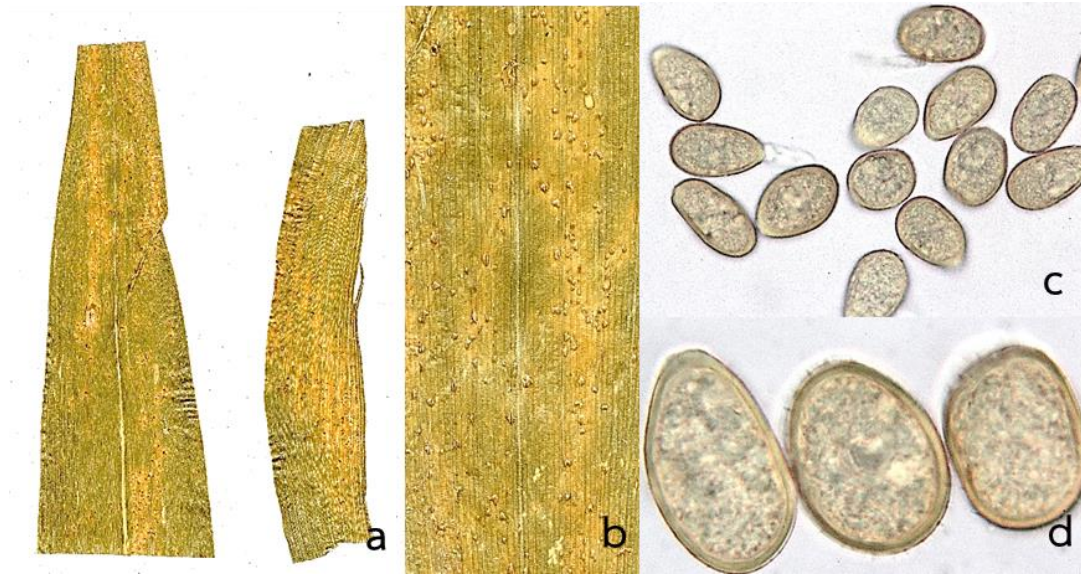


Figure 21 *Puccinia sorghi* on *Zea mays* (M0962)

a-b: symptom on leaves; c-d: urediospores

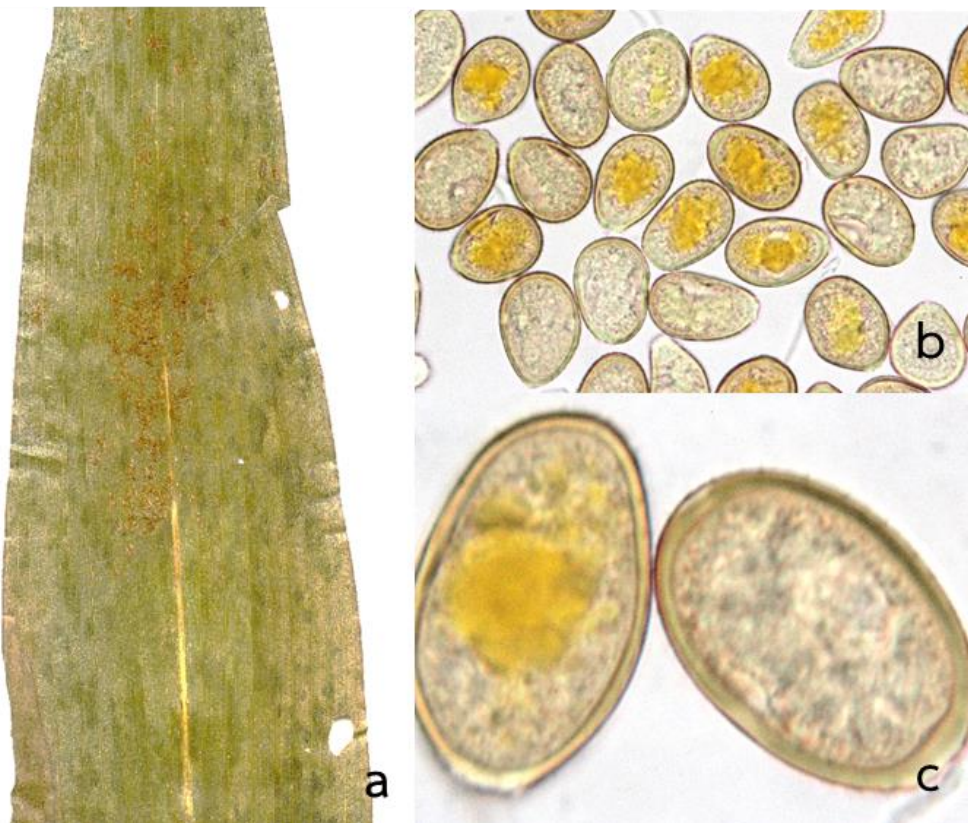


Figure 22 *Puccinia sorghi* on *Zea mays* (TPPH 005291)

a-b: symptom on leaf; c-d: urediospores

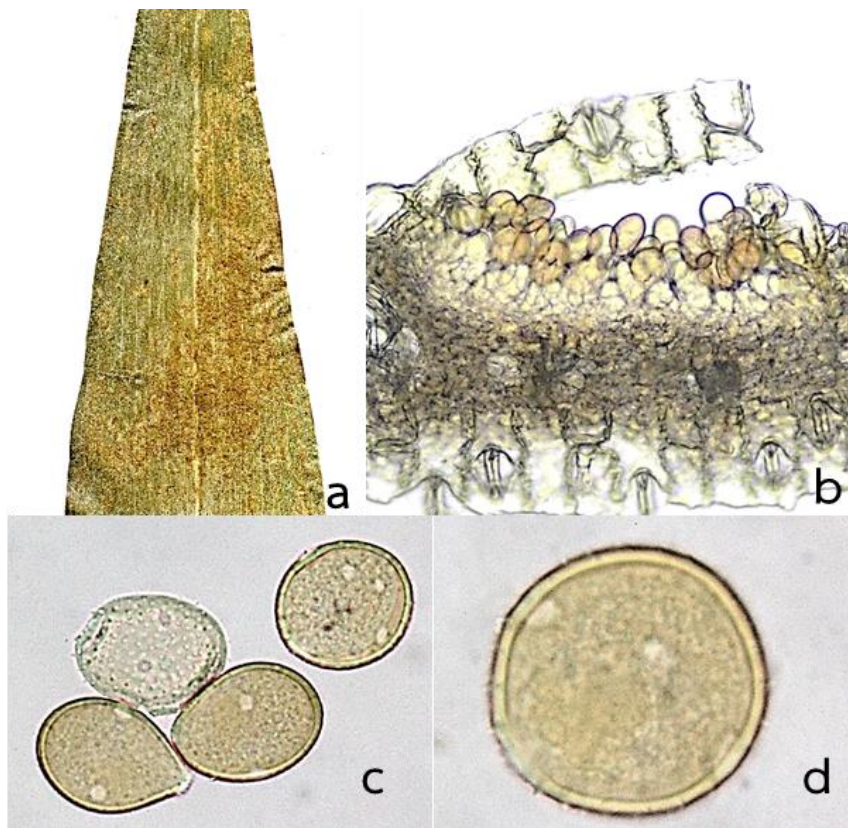


Figure 23 *Puccinia polysora* on *Zea mays* var. *rugosa* (M0055)

a: symptom on leaf; b: sorus, c-d: urediospores

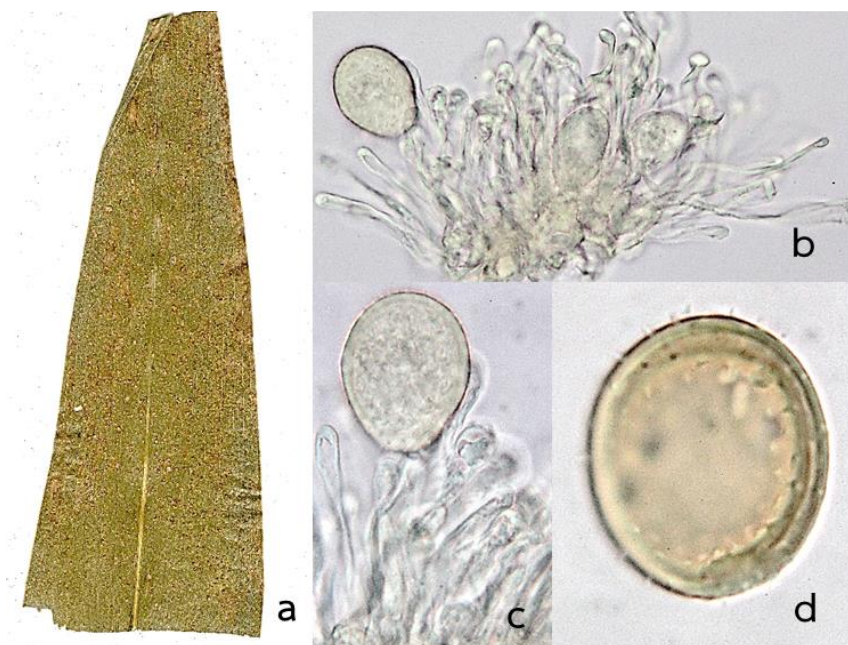


Figure 24 *Puccinia polysora* on *Zea mays* (M0966)

a: symptom on leaf; b-d: urediospores

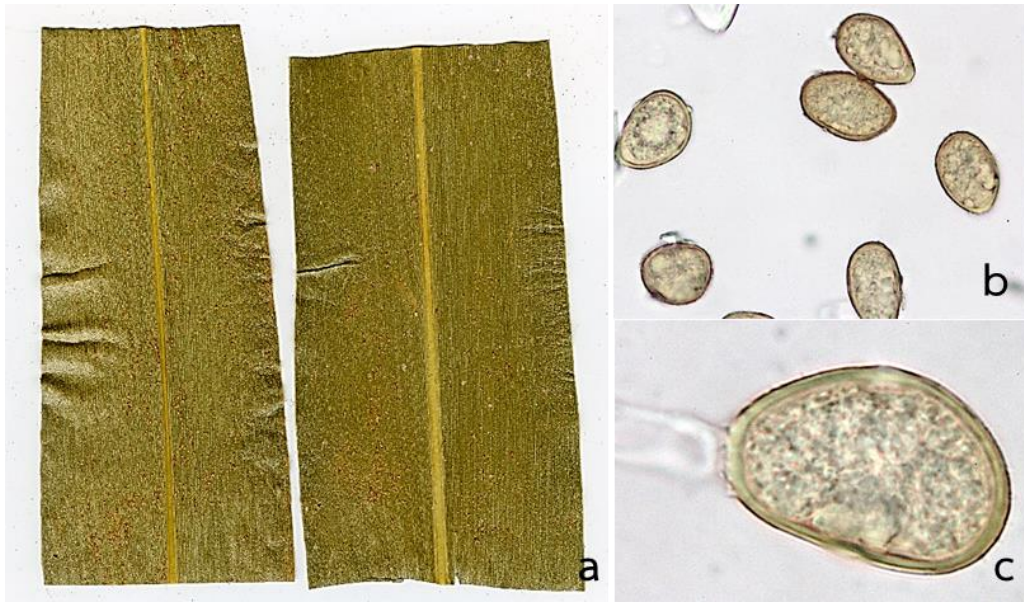


Figure 25 *Puccinia polysora* on *Zea mays* (M0959)

a: symptom on leaves; b-c: urediospores

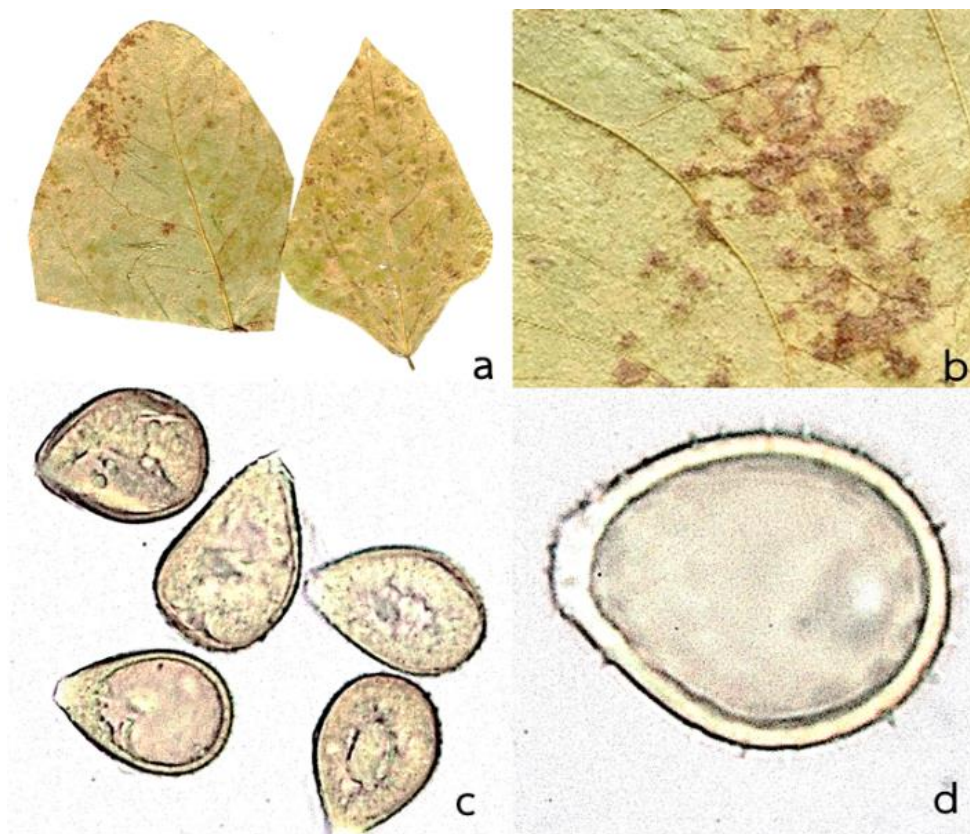


Figure 26 *Uromyces appendiculatus* on *Phaseolus vulgaris* (M0960)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf; c-d: urediospores

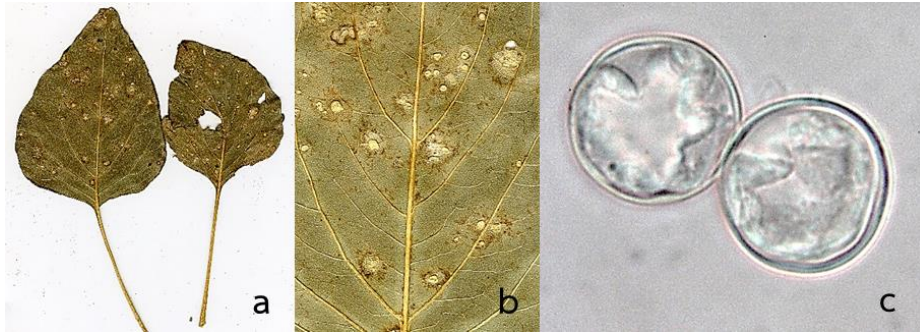


Figure 27 *Albugo* sp.1 on *Amaranthus viridis* (M0965)

a: symptom on leaves; b: sori on lower leaf; c-d: teliospores

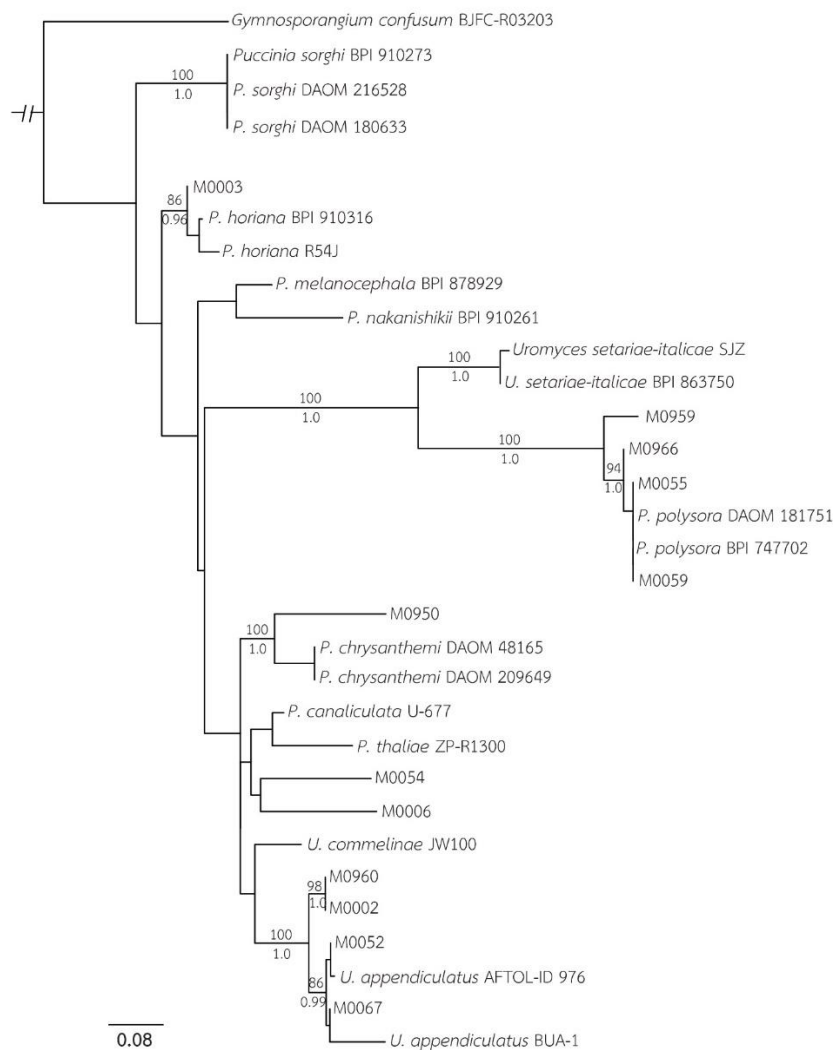


Figure 28 Phylogram of *Pucciniaceae* obtained in a maximum likelihood search in RAxML of the ITS dataset. Bootstrap support values ($\geq 70\%$) from 1,000 replicates above nodes. Posterior probabilities (≥ 0.95) summarized from 10,000 converged trees obtained in a Bayesian search are shown below nodes

การจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

The Identification of the Genus *Radopholus*

With the Molecular Technique

ธิตติยา ชยาภักพัฒนา^{1/} ทิพวรรณ กันหาญาติ^{1/} ไตรเดช ช่ายทอง^{1/} อังคณา พวงเงินมาก^{2/}

^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการการเกษตรที่ 1

Abstract

Radopholus, plant parasitic nematodes found in ornamental plants such as *Calathea* spp., *Anthurium* spp., etc. The species of *Radopholus* nematodes has not yet been identified. Therefore, studies have been conducted to identify this genus of nematodes. Using the classification guidelines of EPPO PM 7/88 (1): *Radopholus similis*, which used morphological classification and the biomolecular classification of nematodes of the genus *Radopholus*. Conducted between October 2019 and September 2021, a total of 1,210 plant samples were examined. Morphologically identification of plant parasitic nematodes was identified under differential interference contrast (DIC) magnification microscopy. Fifty female Genus *Radopholus*, identified as *Radopholus similis*.

The experiment was studied using 3 biomolecular techniques. The first DNA enrichment by polymerase chain reaction in the D2-D3 expansion region of the 28s ribosomal RNA genes. (RDNA) using forward primer D2A (5' - ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3') and reverse primer D3B (5' - TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3'), which yielded good 70 PCR product samples. The samples were sent for analysis of 10 by base sequencing and were compared with those of the existing sequences in the BLASTN database. The showed the result, all of them were *R.similis*. The second experimentation, The 10 PCR product samples were applied by DNA content in the sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region using Real-Time PCR primer forward primer RAD-F: AGACTTGA TGAGCGCAGA and reverse primer RAD-R: CGTGCCAGAGGAAGTGA, which designed specifically for the ITS portion of *R. similis* with

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-15-63



a size of 227 bp, displayed total were identified as *R. similis*. And, the third experiment of 10 PCR product samples was also used for assays using species specific primers of *R. similis*. by forward primer RsimF 5'- GATTCCGTCCTTTGGTGGGGCA-3' and reverse primer RsimR 5'- GAACCAGGCGTGCCAGAGG-3', size 398 bp, completely 10 samples were *R. similis*. The genus *Radopholus* populations of Thailand in the database using maximum likelihood method. The result was found to be absolutely *R. similis*. Hence all taxonomic identification techniques pointed to the conclusion that were *R. similis*

Keywords : Radopholus, burrowing nematode, ornamental plants, Molecular technique

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุล *Radopholus* ที่พบในไม้ประดับ เช่น คล้า หน้าวัว เป็นต้น ยังไม่สามารถจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุลนี้ โดยใช้แนวทางการจัดจำแนกของ EPPO PM 7/88 (1) : *Radopholus similis* ซึ่งใช้การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล ดำเนินการระหว่าง ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564 ได้เก็บตัวอย่างตัวอย่างพืชรวมทั้งสิ้นจำนวน 1,210 ตัวอย่าง จากการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืชด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาผลการจำแนกภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิด Differential interference contrast (DIC) ของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมีย จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าเป็น *Radopholus similis*

การศึกษาการจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลซึ่งดำเนินการ 3 เทคนิค 1)การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในส่วน D2-D3 expansion region ของ 28s ribosomal RNA gene (rDNA) โดยใช้ forward primer D2A (5' - ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3') และ reverse primer D3B (5' - TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3') ซึ่งได้ตัวอย่าง PCR product ที่ดี จำนวน 70 ตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์ลำดับเบสจำนวน 10 ตัวอย่าง แล้วนำไปเทียบเคียงความเหมือนกันของลำดับเบสที่ได้กับที่มีอยู่ในกับฐานข้อมูล BLASTN จากการประมวลผลพบว่า เป็น *R. similis* ทุกตัวอย่าง และ2)การทดสอบตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region โดยใช้ Real-Time PCR ไพรเมอร์ forward primer RAD-F: AGACTTGA TGAGCGCAGA และ reverse primer RAD-R: CGTGCCAGAGGAAGTGA ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับส่วน ITS ของ *R. similis* ขนาด 227 bp พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างเป็น *R. similis* และ3) การตรวจตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการใส่ไพรเมอร์จำเพาะไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* คือ ไพรเมอร์ forward primer RsimF 5'- GATTCCGTCCTTTGGTGGGGCA-3' และ reverse primer RsimR 5'-



GAACCAGGCGTGCCAGAGG-3' ขนาด 398 bp พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างเป็น *R. similis* และ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของยีนส่วน ITS ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ประชากรจากประเทศไทยกับตัวอย่างในฐานข้อมูล ด้วยวิธี maximum likelihood พบว่าเป็น *R. similis* ดังนั้นการอนุกรมวิธานด้วยเทคนิคต่างๆเพื่อการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทั้งหมดผลลัพธ์ที่ได้คือไส้เดือนฝอย *R. similis*

คำหลัก : ไส้เดือนฝอย *Radopholus* ไม้ประดับ เทคนิคทางชีวโมเลกุล

คำนำ

ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ได้ทำความเสียหายต่อของการส่งออกของประเทศไทย เนื่องจากได้เกิดปัญหาการส่งออกพืชไปยังสหภาพยุโรป ถูกปฏิเสธการนำเข้าเนื่องจากมีการตรวจพบ *R. similis* ในพรรณไม้ น้ำ แม้ว่าไม่เคยมีรายงานความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอยสกุลนี้ต่อผลผลิตพืชในประเทศไทย แต่การเป็นศัตรูพืชก็กันทำให้ผู้ประสงค์ส่งออกพืชหลายชนิด อาทิ พืชตระกูล Citrus, Araceae, Marantaceae, Musaceae และ การส่งออก ต้นพันธุ์ กิ่งพันธุ์ และ พืชเพื่อปลูก (plant intend for planting) เป็นต้น ไปยังหลายประเทศ เช่น สหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา (บางรัฐ) ญี่ปุ่น และ ไต้หวัน ต้องได้รับการรับรองว่าปลอดภัยจากไส้เดือนฝอย *R. similis* และ *R. citrophilus* ในการตรวจรับรองไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในปี 2556 ถึง 2559 ที่ผ่านมามีพบว่าในพรรณไม้ น้ำ และไม้ประดับมีหลายชนิดที่ตรวจพบการปนเปื้อนของ *Radopholus* spp. ในพืชส่งออกหลายชนิด เช่น พืชสกุล *Acorus*, *Aglaonema*, *Anubias* และ *Lindernia* เป็นต้น (ธิตยา และคณะ, 2559)

ดังนั้น ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จึงบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจ และด้วยเหตุที่ว่าการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยสกุลนี้ยังมีน้อย จึงจำเป็นต้องศึกษาวิจัยการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล ต่อยอดมาจากการศึกษาการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยา ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้จะทำให้เกิดข้อมูลที่สำคัญสำหรับผู้เกี่ยวข้องกับการส่งออกพืช และผู้ตรวจรับรองการปลอดภัยจากศัตรูพืชโดยเฉพาะไส้เดือนฝอยศัตรูพืช และสำคัญที่สุดคือเป็นฐานข้อมูลอ้างอิงของประเทศไทย และเป็นมาตรฐานที่สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ประเทศผู้นำเข้าได้ และการจำแนกชนิดทางชีวโมเลกุล นี้เป็นการเตรียมความพร้อมเพื่อรับมือกับมาตรฐานที่มีแนวโน้มที่จะต้องใช้เทคโนโลยีที่สูงขึ้นในการตรวจรับรองศัตรูพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดิน วัสดุปลูกและต้นพืช
2. อุปกรณ์การเก็บตัวอย่างในแปลง
3. ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*



4. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกำลังขยายสูง และอุปกรณ์ถ่ายภาพ

5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ยกตัวอย่างเช่น กรวยและตะแกรงแยกเชื้อ ถุงมือ สไลด์ เครื่องอัลตราโซนิก อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ น้ำยาตอง หลอดเก็บตัวอย่าง ตู้ปลอดเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ ตู้เย็นเก็บตัวอย่างพืช อุปกรณ์เลี้ยงพืชอาศัยเชื้อ เป็นต้น

6. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ยกตัวอย่างเช่น ถุงมือ เสื้อคลุม หมวก หลอด PCR ชั้นวางหลอด ไมโครปิเปต ไมโครปิเปตที่ปอ้างควบคุมอุณหภูมิ เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องเขย่าผสมสารละลาย เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ตู้ดูดควันและสารพิษ เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่อง Gel electrophoresis เครื่องกำเนิดพลังงาน เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ตู้แช่แข็ง เป็นต้น และสารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอ เช่น ชุดสกัดสารดีเอ็นเอ, TBE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, อะกาโรส และสีย้อมดีเอ็นเอ เป็นต้น

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จากพืชวงศ์บอน (*Araceae*) พืชวงศ์คล้า (*Marantaceae*) พืชวงศ์กล้วย (*Musaceae*) พืชวงศ์กล้วยพุด (*Strelitziaceae*) กวักมกรรต และ พรรณไม้ น้ำ เป็นต้น เก็บตัวอย่างจากพืช อย่างน้อย 100 ตัวอย่าง แต่ละพืชจำนวนตัวอย่างแล้วความเหมาะสมและโอกาสอำนวย โดยตัวอย่างต้นพืชเก็บใส่ถุงพลาสติกรัดปากถุงให้แน่น นำกลับมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างดินปลูก หรือวัสดุปลูกเก็บบริเวณทรงพุ่มความลึกอยู่ในช่วงประมาณ 0-25 เซนติเมตร จำนวน 10 จุดต่อต้นคลุกเคล้ารวมกันแล้วเก็บตัวอย่าง 250 กรัม นำใส่ถุงพลาสติกรัดปากถุงให้แน่น นำกลับมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ

2. การแยกเชื้อไส้เดือนฝอย

2.1 ตัวอย่างต้นพืชใช้ Ultrasonicator แล้วนำมากรองด้วยวิธีของ Baerman funnel method หรือ Oostenbrink dish

2.2 ตัวอย่างดินและตัวอย่างวัสดุปลูกใช้วิธี Cobb sieving แล้วนำมากรองด้วยวิธีของ Baerman funnel method หรือ Oostenbrink dish

3. การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเบื้องต้น นำน้ำที่เหลือในภาชนะแก้ว จากข้อใส่ในถ้วยนับตัวอย่าง (Syracuse Dish) แล้วนำไปตรวจวินิจฉัย และนับจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) การจัดจำแนกสกุลไส้เดือนฝอย โดยเปรียบเทียบกับ คู่มือการจำแนกสกุลของไส้เดือนฝอย Plant-parasitic nematodes ; A pictorial key to genera (Mai *et.al.*, 1996)

4. เพาะเลี้ยงเพิ่มเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในพืชอาศัยเดิมเพื่อสำรองเลี้ยงไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*

5. การทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยศัตรูเมื่อพบว่าเป็นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จึงนำไปทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ De Grisse, 1969 และ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยเปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกชนิดของ EPPO PM 7/88



(1): *Radopholus similis* และเอกสารอื่นที่เกี่ยวข้อง โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง differential interference contrast (DIC) พร้อมคอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ และโปรแกรมการวัดขนาด โดยมีลักษณะสำคัญที่ต้องบันทึก อาทิ ความยาวของลำตัว ลักษณะริมฝีปาก ความยาวของ stylet ลักษณะหาง เส้นผ่านศูนย์กลางลำตัว ความยาวของ oesophagus ค่า De Man's ratios เช่น ค่า a (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัว) ค่า b (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อความยาวของ oesophagus) ค่า c (อัตราส่วนของความยาวลำตัวต่อความยาวของหาง) เป็นต้น

6. ศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*

6.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ใช้วิธีการตามร่วมกับคำแนะนำของ เจียไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช้ส่วนปลายของ pipette tip ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 6 นาที ถ้าเตาไมโครเวฟเป็นชนิด 750 วัตต์ (สามารถปรับเวลาตามกำลังไฟของเตาไมโครเวฟให้ได้ 4,500 วัตต์-นาที ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม)

6.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR)

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในส่วน D2-D3 expansion region ของ 28s ribosomal RNA gene (rDNA) โดยใช้ forward primer D2A (5' - ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3') และ reverse primer D3B (5' - TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3') และเพิ่มปริมาณ DNA (Kaplan *et al.*, 2000 ; Subbotin *et al.*, 2006) โดยสารที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1.0 U AmpliTaq® DNA Polymerase, 10 mM Tris-Cl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200 uM dNTPs ,0.2 µM primers และ 1.0 µl DNA template เมื่อเตรียม master mix ใส่ หลอด PCR แล้วเติม DNA template ในหลอด PCR นำหลอด ดังกล่าวใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermocycle) จากนั้นตั้งอุณหภูมิและเวลาของขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ปฏิกิริยา Initial denaturation อุณหภูมิ 94 °C เวลา 1 นาที ปฏิกิริยา Denaturation อุณหภูมิ 94 °C เวลา 1 นาที ปฏิกิริยา Annealing อุณหภูมิ 55 °C เวลา 1 นาที ปฏิกิริยา Extension อุณหภูมิ 72 °C เวลา 1 นาที ปฏิกิริยา Final extension อุณหภูมิ 72 °C เวลา 5 นาที จำนวน 35 รอบ



6.3 การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเตรียม 1.5% ของอะกาโรส โดยซิงอะกาโรส 1.5 กรัม ผสมกับ สารละลายบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้สารละลายใส ตั้งไว้ให้เย็น แล้วเทอะกาโรสลงในชุด gel box ที่ปรับสมดุลและวางหิวไว้แล้ว เมื่อเจลแข็งตัว จึงดึงหรือออก แล้วนำเจลที่ได้ไปวางในแชมเบอร์ จากนั้นเทสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล นำ DNA ที่ได้ผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 จากนั้นหยอดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรลงในหลุมของเจลอะกาโรสในแชมเบอร์ เรียบร้อยแล้วจึงต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ นานประมาณ 40-50 นาที แล้วเจลอะกาโรสไปย้อมสี DNA แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง UV-transilluminator แล้วถ่ายภาพ เลือกตัวอย่างได้ PCR product ที่ดี ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำไปจะถูกนำไปเทียบเคียงความเหมือนกันของลำดับเบสที่ได้กับที่มีอยู่ในกับฐานข้อมูล BLASTN

6.4 การทดสอบตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region โดยใช้ Real-Time PCR ไพรเมอร์ forward primer RAD-F: AGACTTGA TGAGCGCAGA และ reverse primer RAD-R: CGTGCCAGAGGAAGTGA ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับส่วน ITS ของ *R. similis* ที่ขนาด 227 bp

6.5 การทดสอบตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการใส่ไพรเมอร์จำเพาะใส่เดือนฝอย *Radopholus similis* คือ ไพรเมอร์ forward primer RsimF 5'- GATTCCGTCCTTTGGTGGCA-3' และ reverse primer RsimR 5'- GAACCAGGCGTGCCAGAGG-3' ขนาด 398 bp และ วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของยีนส่วน ITS ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ประชากรจากประเทศไทยกับตัวอย่างในฐานข้อมูล ด้วยวิธี maximum likelihood

เวลาและสถานที่

ระหว่าง ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2563

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphometric measurements) เปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกชนิดของ EPPO PM 7/88 (1): *Radopholus similis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง differential interference contrast (DIC) ซึ่งพบว่าทุกลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ของการศึกษานี้มีความใกล้เคียงกับผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของ EPPO จึงกล่าวได้ว่าไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่ศึกษานี้ เป็นไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ดังที่แสดงใน ตารางที่ 1



ผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ในตารางที่ 1 มีผลต่อการจำแนกชนิด โดยสามารถอธิบายร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาในภาพที่ 1 ได้ดังนี้ การตรวจวินิจฉัยสกุลของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยมีลักษณะสัณฐานวิทยาตั้งนี้เป็นไส้เดือนฝอยโครงสร้างส่วนหัว (labial framework) และ หลอดดูดอาหาร (stylet) พัฒนาการสามารถมองเห็นได้ชัดเจนและมีโครงสร้างแข็งแรง ทำให้มองเห็นอย่างชัดเจนภายใต้กล้อง ส่วนหัวไม่มี setae ตัวเต็มวัยเพศเมียมีรูปร่าง เรียวยาว (vermiform) ส่วนหลอดอาหาร (esophagus) แบ่งออกเป็น 3 ส่วน มีการซ้อนทับลำไส้ไปด้านหลัง ตำแหน่งของ vulva อยู่ใกล้กึ่งกลางลำตัว ประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ มีแขนงของระบบสืบพันธุ์สองแขนงตรงข้ามกันด้านหน้าและด้านหลัง (Didelphic) ของอวัยวะเพศเมีย และลำไส้ค่อนข้างสีเข้มมองเห็นได้ชัดเจน เพศผู้ที่มีลักษณะรูปร่างแตกต่างกับเพศเมีย (sexual dimorphism) ซึ่งมีลักษณะของหัวยกสูงอย่างชัดเจนมี stylet ขนาดเล็กและบาง (Mai *et.al.*, 1996) กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) สามารถจำแนกได้เพียงในส่วนนี้ ดังนั้นลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่ทำสไลด์ถาวรแล้ว ตรวจวินิจฉัยภายใต้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง differential interference contrast (DIC) ของลักษณะไส้เดือนฝอยรากโพรง *R. similis* จึงมีความสำคัญในการจำแนกชนิด โดยเมื่อกล่าวถึงผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ใน ตารางที่ 1 มีผลต่อการจำแนกชนิดพร้อมอธิบายร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาใน ภาพที่ 1 โดยการใช้โคโคโตมัสคีย์ อนุกรมวิธาน วิวัฒนาการ และลำดับสกุลของ *Radopholus* (ชนิดที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียแบบมีแขนงของระบบสืบพันธุ์อยู่ตรงข้ามกันระหว่างด้านหน้า และด้านหลังของอวัยวะเพศเมีย) ตามข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นกุญแจสำคัญในการจำแนกชนิดของ (Nematoda: Tylenchida) (จิตติยา, 2562)

ลำตัวของไส้เดือนฝอยมีลักษณะเรียวยาวความยาวที่เคยมีการบันทึกไว้ไม่เกิน 820 ในส่วนตัวที่สั้น 510 ไมครอน ลักษณะไส้เดือนฝอยเพศเมียซึ่งโครงสร้างส่วนหัว (labial framework) ยกสูงจากลำตัวเพียงเล็กน้อยมีเพียง 3-6 annuli ส่วนหัวมีลักษณะเป็นครึ่งวงกลม (Head hemispherical) ในส่วนของหลอดอาหารมีพัฒนาการดีและมี stylet knobs ซึ่งมีรูปร่างกลมและขนาดเท่ากัน ความยาวของหลอดอาหารถึง stylet knobs ส่วนใหญ่ประมาณ 17 ไมครอน ใน *R. similis* แต่พบตัวที่สั้นกว่าและยาวกว่าในช่วง 16-23 ไมครอน ในส่วนหน้ารวมทั้งหลอดอาหาร (oesophagus) ค่อนข้างยาว ไม่ว่าจะ เป็น หลอดอาหารส่วนหน้า (procorpus) อาหารส่วนกลาง (metacarpus) และต่อมน้ำลาย (oesophageal glands) ซึ่งได้ขยายตัวเป็นกลีบยาวซ้อนทับลำไส้ไปด้านหลัง และอาหารส่วนกลาง (metacarpus) มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือทรงรี มีพัฒนาการดี มีวาล์วเปิด-ปิดอย่างชัดเจน ส่วนปากช่องคลอด (vulva) อยู่ค่อนข้างกึ่งกลางลำตัวเมื่อวัดโดยละเอียดอยู่ในช่วงร้อยละ 50-67 ของความยาวลำตัวและริมขอบช่องคลอดนูนออกมาเล็กน้อย ไส้เดือนฝอยรากโพรง *R. similis* มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียแยกออกเป็นสองแขนงจากบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียโดยตรงข้ามกันระหว่างส่วนหน้า และส่วนท้ายของลำตัว (Didelphic) และระบบ



สปีพันธุ์ทั้งสองด้านมีหน้าที่พัฒนารังไข่ได้ดี และมีขนาดและความยาวใกล้เคียงกัน ระบบสปีพันธุ์เพศเมียทั้งส่วนหน้าและส่วนท้ายของลำตัวมี spermatheca รูปร่างกลม (spheroid) ภายในบรรจุอสุจิลักษณะคล้ายแท่งขนาดเล็ก (rod-like sperm) ในบริเวณกลางลำตัว lateral fields มี 4 รอยบากตามแนวยาว (incisures) ส่วนของหางมีลักษณะรูปทรงโคนค่อนข้างยาว และ hyaline region length ยาวมากกว่า 9 ไมครอน ในส่วนของ ratios เมื่อเปรียบเทียบกับค่า a (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัว) 20–34 ไมครอน การศึกษานี้ 24-40 ไมครอน แม้จะมีค่ามากกว่าเนื่องมาจากไส้เดือนฝอยหลายตัวมีไข่แก่ทำให้ส่วนกลางลำตัวขยายใหญ่ขึ้นมาก ค่า b (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อความยาวของ oesophagus) 6-10 และ 8-10 ไมครอน ถือว่าอยู่ในช่วงเดียวกัน เช่นกันกับ c (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อความยาวหาง) 7-13 และ 6-12 ไมครอน จากผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมียปริมาณ 50 ตัวพร้อมทั้งค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบกับผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของ PM 7/88 (1): *Radopholus similis* of EPPO Bulletin และรูปภาพของลักษณะสัณฐานวิทยา และไดโคโตมัสคีย์ สามารถจัดจำแนกชนิดได้เป็นไส้เดือนฝอย *Radopholus similis*

ในส่วนการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสใน ส่วน D2-D3 expansion region ของ 28s ribosomal RNA gene (rDNA) โดยใช้ forward primer D2A (5' - ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG -3') และ reverse primer D3B (5' - TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA -3') แล้วเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (PCR) จากตัวอย่าง 50 ตัวอย่าง ผลที่ได้การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสแล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง UV-transilluminator แล้วถ่ายภาพ ซึ่งได้เลือก ตัวอย่างได้ PCR product ที่ 10 ตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำไปจะถูกนำไปเทียบเคียงความเหมือนกันของลำดับเบสที่ได้กับที่มีอยู่ในกับฐานข้อมูล BLASTN จากการประมวลผลพบว่าเป็น *R.similis* ทุกตัวอย่าง (Zheng, et al., 2000) และผลจากการทดลองที่ 2 การทดสอบตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) region โดยใช้ Real-Time PCR ไพร์เมอร์ forward primer RAD-F: AGACTTGA TGAGCGCAGA และ reverse primer RAD-R: CGTGCCAGAGGAAGTGA ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับส่วน ITS ของ *R. similis* ขนาด 227 bp พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างเป็น *R. similis* ดังที่แสดงไว้ในภาพที่ 2 ผลจากการทดลองที่ 3 การตรวจสอบตัวอย่าง PCR product 10 ตัวอย่าง ด้วยการใส่คู่ไพร์เมอร์จำเพาะไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* คือ ไพร์เมอร์ forward primer RsimF 5'-GATTCGTCCTTTGGTGGGCA-3' และ reverse primer RsimR 5'-GAACCAGGCGTGCCAGAGG-3' ขนาด 398 bp พบว่าทั้ง 10 ตัวอย่างเป็น *R. similis* ดังที่แสดงไว้ใน ภาพที่ 3 และ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของยีนส่วน ITS ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ประชากรจากประเทศไทยกับตัวอย่างในฐานข้อมูล ด้วยวิธี maximum likelihood พบว่าเป็น *R. similis* ดังที่แสดงไว้ใน ภาพที่ 4



สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยใช้แนวทางการจัดจำแนกของ EPPO PM 7/88 (1) : *Radopholus similis* ซึ่งใช้การจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งประชากรของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* นั้นไม่ว่าจำทำการจำแนกชนิดด้วยวิธีใดผลลัพธ์ที่ได้ คือ ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* เพียงชนิดเดียว ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าประเทศไทยมีเพียงไส้เดือนฝอย *R. similis*

แนวทางเทคนิค องค์ความรู้ ในการจัดจำแนกชนิด สามารถถ่ายทอดให้กับผู้ที่เกี่ยวข้องและฐานข้อมูลอ้างอิงของประเทศ เพื่ออำนวยความสะดวกในการการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชก่อนการส่งออก

ในด้านของการจัดการและการส่งออกพืชนั้นไส้เดือนฝอยรากโพรง (burrowing nematode) หรือไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus similis* เป็นไส้เดือนฝอยที่มีความสำคัญเพราะเป็นศัตรูพืชกักกันในหลายประเทศ และเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่มีความรุนแรงในการระบาดทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณซึ่งในอดีตได้ทำความเสียหายทางเศรษฐกิจ เช่น ประเทศอินโดนีเซีย รัฐฟลอริดา ในสหรัฐอเมริกา ประเทศในแถบอเมริกาใต้ เป็นต้น แต่เป็นความท้าทายของผู้ที่ต้องการส่งออกไม้ประดับที่จะต้องจัดการกับสถานประกอบการเพื่อให้ปลอดจากไส้เดือนฝอยรากโพรง และโอกาสของประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความสามารถในการสร้างสายพันธุ์ที่แปลกใหม่ของไม้ประดับจนเป็นที่ยอมรับของทั่วโลกและไม่เชื่อว่าไส้เดือนฝอยรากโพรงจะเข้าทำลายพืชทุกชนิด การมีไส้เดือนฝอย *R. similis* แม้จะเป็นเรื่องยากในการจัดการแต่ก็มีหลายสถานประกอบการที่มีความสามารถจัดการจนสามารถส่งออกได้

คำขอบคุณ

คณะวิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่งในความร่วมมือและให้ความรู้ ประสบการณ์ของเกษตรกรผู้ปลูกฝรั่งทุกท่าน และคณะวิจัยขอขอบคุณ นายอนุรัตน์ อุทธิธัญ นายอภิชัย อยู่เอี่ยม นางสาวจุฑามาส ฮวดประสิทธิ์ ที่เป็นผู้ร่วมทีมที่ดีทำงานอย่างเต็มที่

เอกสารอ้างอิง

ธิตยา ชยาภักพัฒนา. 2562. ไตโคโตมัสคีย์ อนุกรมวิธาน วิวัฒนาการ และลำดับสกุลของ *Radopholus* (ชนิดที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียแบบมีแขนงของระบบสืบพันธุ์อยู่ตรงข้ามกันระหว่างด้านหน้า และ ด้านหลังของอวัยวะเพศเมีย) ตามข้อมูลทางสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นกุญแจสำคัญในการจำแนกชนิดของ (Nematoda: Tylenchida) แปลจาก Ryss, AY. 2003. Taxonomy, evolution and phylogeny of the genus *Radopholus* (didelphic species) according to morphological data, with a key to species (Nematoda: Tylenchida). *Zoo systematica Rossica*. 11: 243–256. (อัดสำเนา)



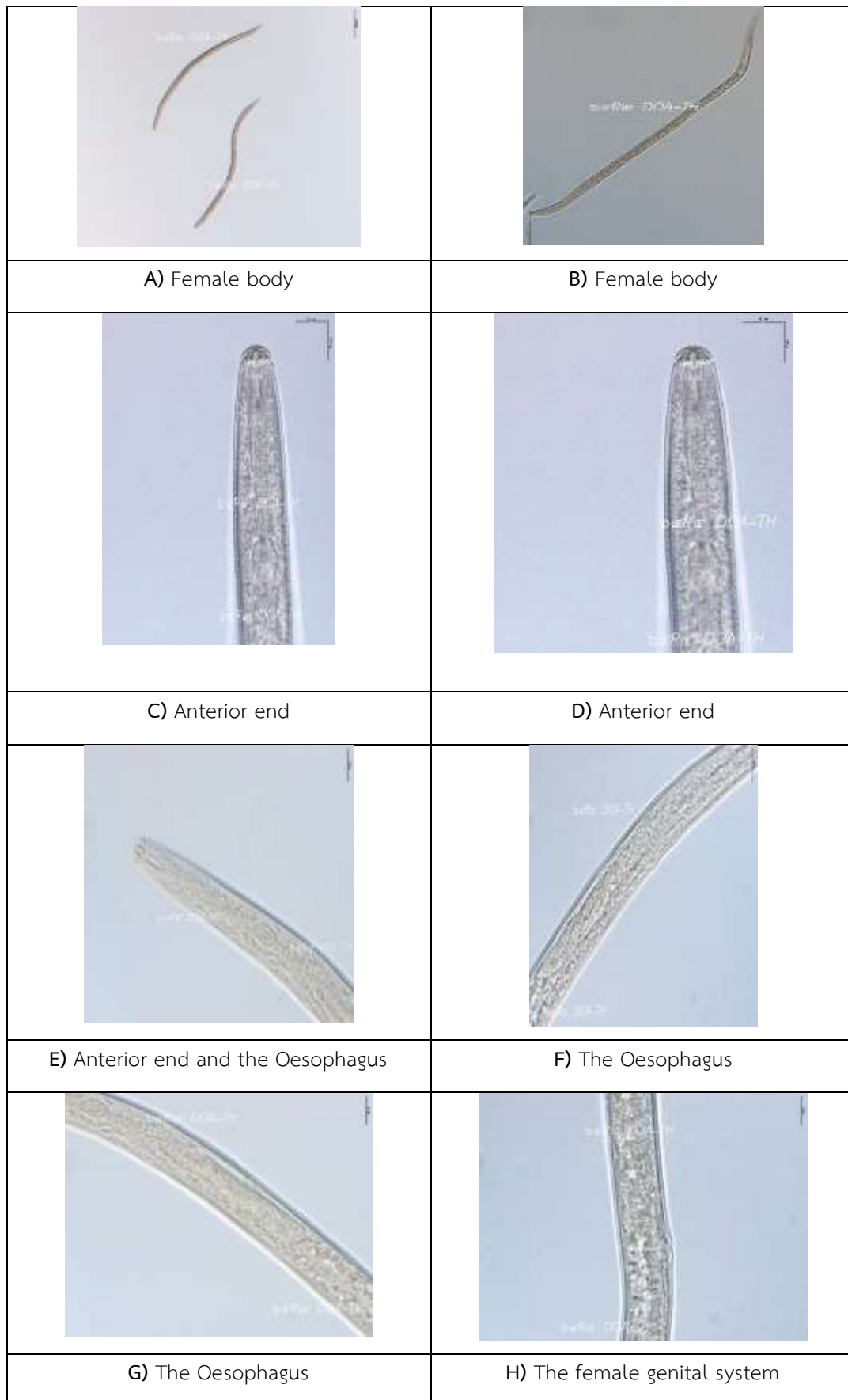
- ธิตยา สารพัฒน์ ไตรเดช ข่ายทอง วีรกรณ์ แสงไสย์ และวานิช คำพานิช. 2559. สถานการณ์การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในพรรณไม้หน้าเพื่อการส่งออก. หน้า 41-53.ใน : *การประชุมวิชาการประจำปี 2559 วิจัยการอารักขาพืช และปัจจัยการผลิตเพื่อขับเคลื่อน เศรษฐกิจไทย* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 25-27 กรกฎาคม 2559 ณ ณ โรงแรมบางแสน เฮอริเทจ จังหวัดชลบุรี.
- De Grisse, A.T. 1969. Redescription ou modifications de quelques techniques utilisées dans l'étude des nématodes phytoparasitaires. *Mededelingen Rijksfakulteit LandbouwwetenschappenGent* 34: 351-369.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization .2008. Diagnostic *Radopholus similis* OEPP/EPPO Bulletin 38, 374–378 (Online). Available. ผิดพลาด! การอ้างอิงไฮเปอร์ลิงก์ไม่ถูกต้อง (June 8, 2014)
- Kaplan, D. T., Thomas, W. K., Frisse, L. M., Sarah, J. L., Stanton, J. M., Speijer, P. R., Marin, D. H., and Opperman, C. H. 2000. Phylogenetic Analysis of Geographically Diverse *Radopholus similis* via rDNA Sequence Reveals a Monomorphic Motif. *Journal of Nematology*. 32(2): 134–142.
- Mai, W.F., P.G. Mullin, H.H. Lyon and K. Loeffler. 1996. *Plant-parasitic nematodes: a pictorial key to genera*. Cornell University Press, New York. 277 p.
- Ryss, A.Y. 2003. Taxonomy, evolution and phylogeny of the genus *Radopholus* (didelphic species) according to morphological data, with a key to species (Nematoda: Tylenchida). *Zoo systematica Rossica*. 11: 243–256.
- Subbotin, S.A., Sturhan, D., Chizhov, V.N., Vovlas, N. & Baldwin, J.G. 2006. Phylogenetic analysis of Tylenchida Thorne, 1949 as inferred from D2 and D3 expansion fragments of the 28S rRNA gene sequences. *Nematology*. 8(3): 455-474
- Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7 (1-2): 203-214.



ตารางที่ 1 ผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมียปริมาณ 50 ตัว พร้อมทั้งค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบกับผลการวัดลักษณะสัณฐานวิทยาของ PM 7/88 (1): *Radopholus similis* of EPPO Bulletin (หน่วยวัด : ไมครอน)

| ลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย สกุล <i>R. similis</i> เพศเมีย | EPPO | | การศึกษานี้ | |
|---|---------|--------|-------------|--------------|
| Body length | 510–820 | (655) | 525-788 | (640±105.04) |
| Stylet length | 16–23 | (18.5) | 16-21 | (19±2.84) |
| Female gonad anterior branch | 112–297 | (174) | 113-270 | (160±50.86) |
| Female gonad posterior branch | 103–269 | (165) | 106-264 | (147±40.67) |
| Body diameter at the anus | 13–24 | (17.7) | 13-21 | (16±3.24) |
| Distance from Excretory pore to head tip | 59–115 | (88) | 60-106 | (86±16.59) |
| Vulva % | 50–67 | (57) | 51-63 | (56±8.29) |
| a | 20–34 | (27) | 24-40 | (30±5.65) |
| b | 6–10 | (7.9) | 8-10 | (9±0.46) |
| c | 7–13 | (9.4) | 6-12 | (10±0.73) |
| hyaline region length | | | 9-17 | (11±1.24) |





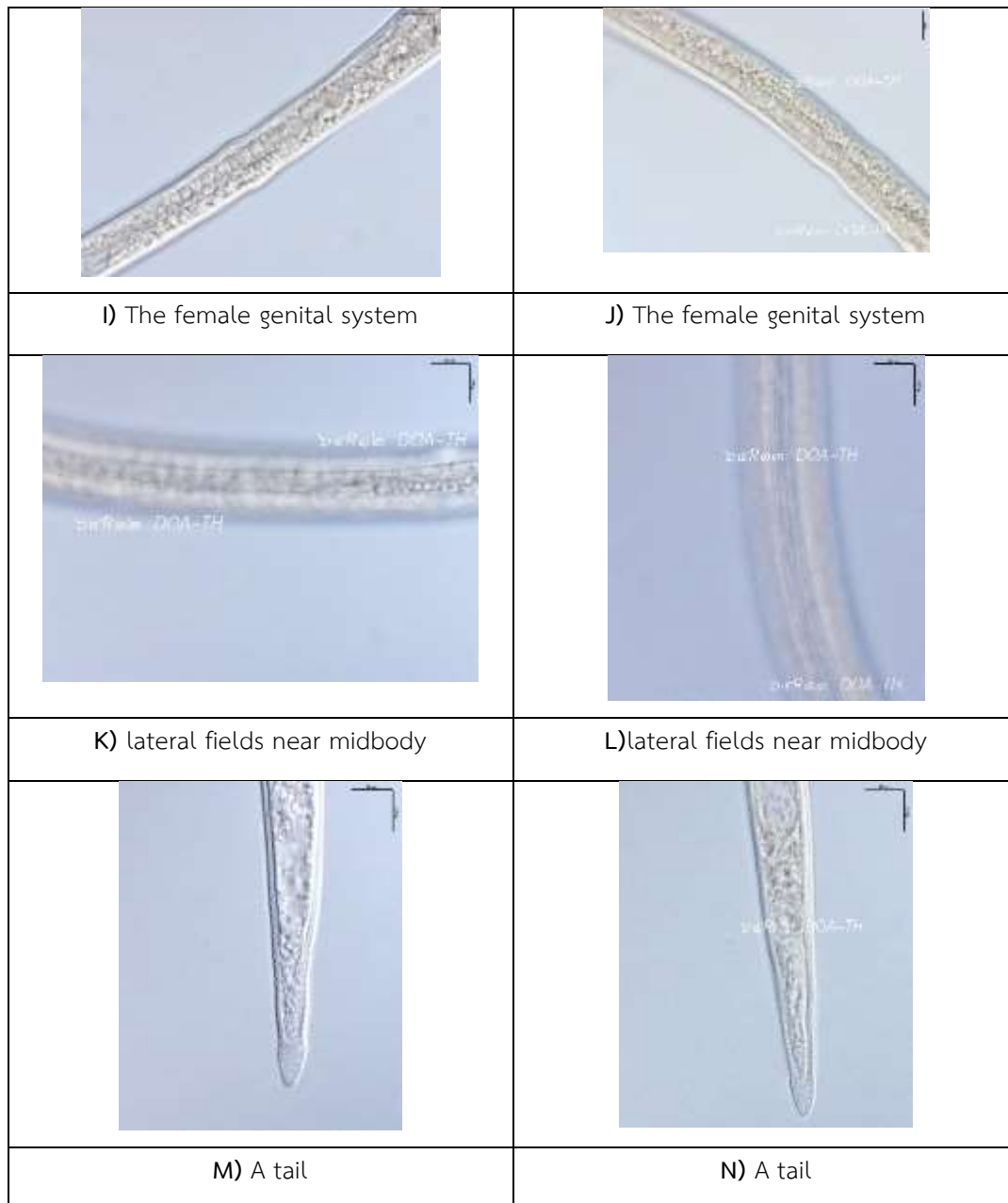
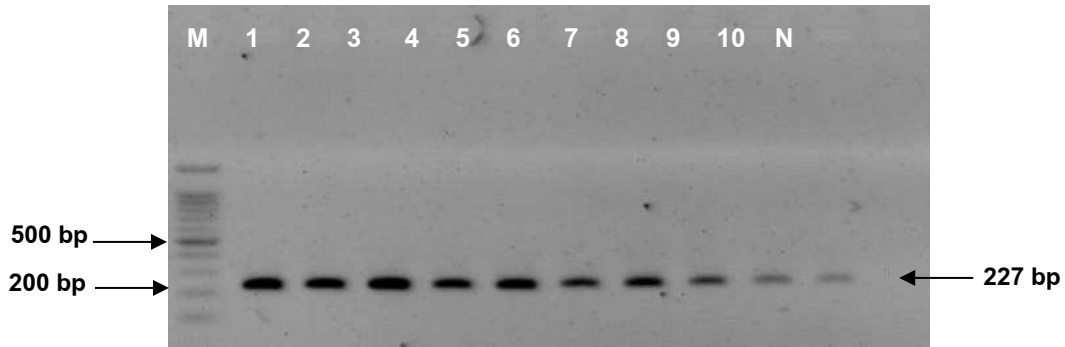
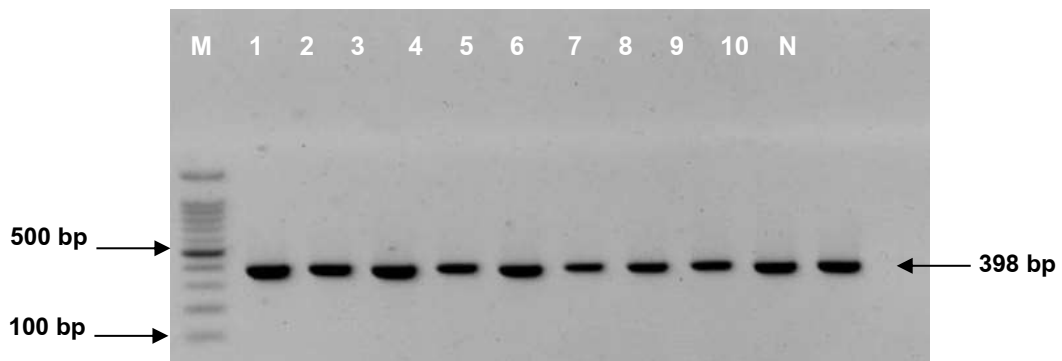


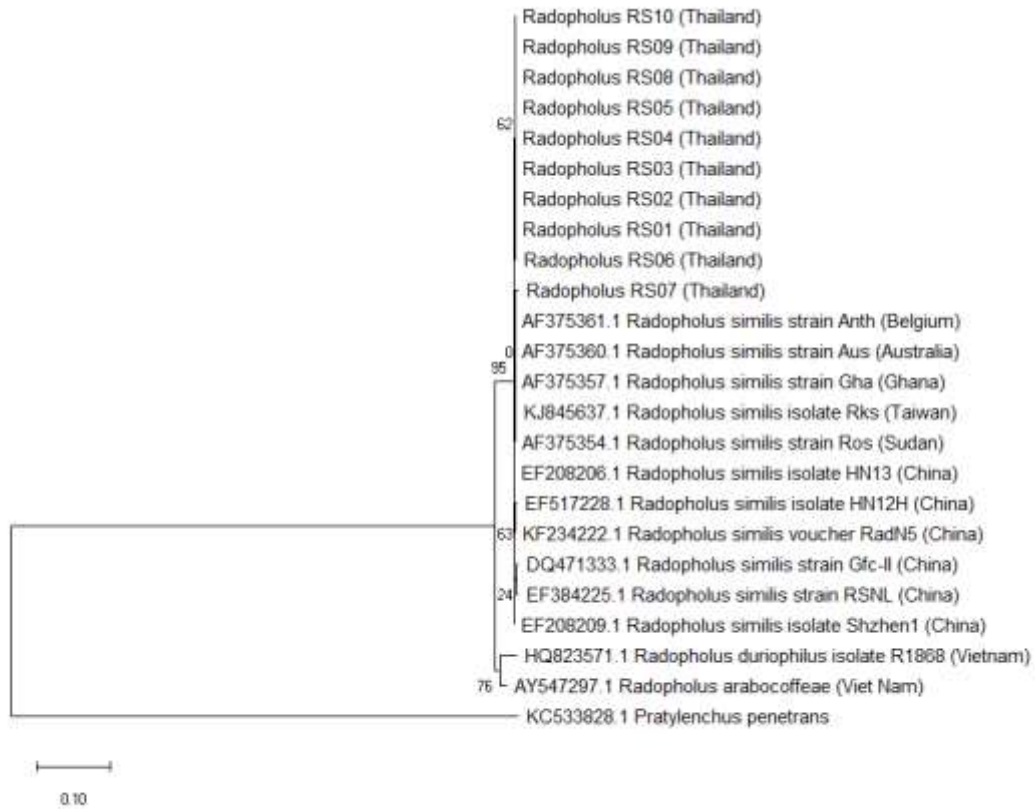
Figure 1 Differential interference contrast (DIC) microscope photographs of *R. similis* (A-B) Female body with labial framework and stylet well developed and vulva slightly post-equatorial. (C-D) The part of anterior end; head hemispherical and slightly set off and stylet well defined with rounded of equal size knobs and a cylindrical procorpus and an ellipsoidal metacarpus. (E-F-G) Anterior end including the oesophagus which oesophageal glands extended into a lobe along the dorsal side of intestine and metacarpus well developed elongate to ellipsoidal with distinct valves. (H-I-J) The female genital system composed of two opposed branches (Didelphic) which two functional and equally developed ovaries; female gonad anterior branch with spheroid spermatheca filled with rod-like sperm and vulva with slight protuberant lips. (K-L) Four lateral fields near midbody. (M-N) A tail elongate-conoid with narrowly rounded terminus.



ภาพที่ 2 ผลการวิเคราะห์ไพรเมอร์ RAD-F: AGACTTGA TGAGCGCAGA และ RAD-R: CGTGCCAGAGGAAGTGA ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับส่วน ITS ของ *R. similis* (Krisna and Eapen, 2019) ขนาด 227 bp



ภาพที่ 3 ผลการวิเคราะห์ไพรเมอร์ คู่ไพรเมอร์จำเพาะ RsimF/RsimR (Ravindran *et al.* 2011) RsimF 5'- GATTCCGTCCTTTGGTGGGCA-3' และ RsimR 5'- GAACCAGGCGTGCC AGAGG-3' ขนาด 398 bp



ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมของยีนส่วน ITS ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ประชากรจากประเทศไทยกับตัวอย่างในฐานข้อมูล ด้วยวิธี maximum likelihood

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ไคโคโตมัสคีย์ อนุกรมวิธาน วิวัฒนาการ และลำดับสกุลของ *Radopholus* (ชนิดที่มีระบบสืบพันธุ์เพศเมียแบบมีแขนงของระบบสืบพันธุ์อยู่ตรงข้ามกันระหว่างด้านหน้า และด้านหลังของอวัยวะเพศเมีย) ตามข้อมูลทางสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นกุญแจสำคัญในการจำแนกชนิดของ (Nematoda: Tylenchida) (อิติตยา, 2562)

1. Spermatheca ที่ว่างเปล่า 2
 - Spermatheca ที่มีการบรรจุอยู่ของอสุจิ. 3
2. โครงสร้างส่วนหัวมีลักษณะคล้ายโดม *R.nativus*
 - โครงสร้างส่วนหัวมีลักษณะแบน. *R. vertexplanus*
3. Spermatheca มีการบรรจุอยู่ของอสุจิที่มีรูปทรงกลม. 4
 - Spermatheca มีการบรรจุอยู่ของอสุจิที่มีลักษณะคล้ายแท่งขนาดเล็ก. 12
4. ปลายหางมีลักษณะเป็นวงแหวน. 5
 - ปลายหางมีลักษณะเรียบ. 10
5. stylet knob มีหนึ่งอันที่ใหญ่กว่าอันอื่นอย่างมาก *R. citri*
 - stylet knobs ทั้งหมดขนาดเท่ากัน. 6
6. บริเวณ Lateral field มีรอยบาก 5 ถึง 6 รอยบาก *R. rotundisemenus*
 - บริเวณ Lateral field มีรอยบาก 4 รอยบาก 7
7. ปลายหางมีลักษณะปลายกว้างกลมมน. *R. rectus*
 - . ปลายหางมีลักษณะแคบลงจนแหลม. 8
8. อวัยวะเพศผู้ (Male spicule) ยาว 20 μm หรือ ยาวกว่า *R. kahikatea*
 - อวัยวะเพศผู้ ยาว 16 μm หรือ สั้นกว่า 9
9. 75 μm หรือ ยาวกว่า. *R. colbrani*
 - หางยาว 45 μm หรือ สั้นกว่า. *R. serratus*
10. spermatheca ส่วนหน้าใหญ่กว่า spermatheca ของส่วนหลังมาก
 - *R.intermedius*
 - spermathecae ทั้งส่วนหน้าและส่วนหลังขนาดเท่ากัน 11
11. โครงสร้างส่วนหัว มี 2 annuli; บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 3 รอยบาก. *R. vacuus*
 - โครงสร้างส่วนหัว มี 3 annuli; บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 4 รอยบาก. *R. inanis*



12. spermatheca ส่วนหน้าใหญ่กว่า spermatheca ของส่วนหลังมาก.
 *R. magniglans*
 – spermathecae ทั้งส่วนหน้าและส่วนหลังขนาดเท่ากัน 13
13. stylet knob มีหนึ่งอันที่ใหญ่กว่าอันอื่นอย่างมาก. 14
 – stylet knobs ทั้งหมดขนาดเท่ากัน..... 15
14. บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 4 รอยบาก; มี postrectal sac
 *R. inaequalis*
 – บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 3 รอยบาก; ไม่มี postrectal
 sac *R. citri*
15. ปลายหางมีลักษณะ เรียบ 16
 – ปลายหางมีลักษณะเป็นวงแหวน..... 19
16. บริเวณเส้นบริเวณ lateral field เส้นคู่ในแคบกว่าเส้นคู่นอก 17
 – ทุกเส้นในบริเวณ lateral field มีขนาดความกว้างเท่ากัน 18
17. ปลายหางกลม; ความยาวหาง 31 μm หรือ น้อยกว่า (ความยาวของ stylet 1.5 μm
 หรือน้อยกว่า), index *b* 5.2 หรือน้อยกว่า. *R. Brevicaudatus*
 – ปลายหางกลมมีลักษณะทรงโคนแคบลงปลายหางมีเดือย; ความยาวของหาง 57 μm หรือ
 ยาวกว่า
 (ความยาวของ stylet 3.7 μm หรือมากกว่า), index *b* 6.9 หรือมากกว่า. . *R. musicola*
18. ความยาวของร่างกายทั้งหมด 500 μm หรือยาวกว่า; ความยาวของ stylet 17 μm หรือยาว
 กว่า; $c' = 3.0$ หรือมากกว่า; ลักษณะของตัวเมียที่ออกไข่คล้ายหนอนตัวกลมเรียวยาว (female
 wormlike). *R. similis*
 – ความยาวของร่างกายทั้งหมด 450 μm หรือสั้นกว่า; ความยาวของ stylet 16 μm หรือ
 สั้นกว่า; $c' = 2.7$ หรือน้อยกว่า; เมื่ออยู่ในระยะวางไข่ตัวเต็มวัยเพศเมียขยายร่างกายการพองตัว
 ขึ้น. *Achlysiella*
williamsi
19. บริเวณ Lateral field มี 3 บาก *R. trilineatus*
 – บริเวณ Lateral field มี 4 บาก หรือมากกว่า. 20
20. บริเวณเส้นบริเวณ lateral field เส้นคู่ในแคบกว่าเส้นคู่นอก 21
 – ทุกเส้นในบริเวณ lateral field มีขนาดความกว้างเท่ากัน. 22
21. ปลายหางมีลักษณะปลายกว้างกลมมน; โครงสร้างส่วนหัวเรียบ, ไม่มี annuli .. *R. megadorus*
 – ปลายหางมีลักษณะแคบ, รูปทรงโคน ; โครงสร้างส่วนหัว มี 3-4 annuli *R. bridgei*
22. โครงสร้างส่วนหัวเรียบ *R. crenatus*



- โครงสร้างส่วนหัวมีวงแหวน 23
- 23. โครงสร้างส่วนหัว มี 2 annuli *R. capitatus*
 - โครงสร้างส่วนหัว มี 3 annuli หรือมากกว่า 24
- 24. โครงสร้างส่วนหัวแบนราบ. *R. neosimilis*
 - โครงสร้างส่วนหัว คล้ายรูปทรงโดม (dome-shaped). 25
- 25. หางลักษณะกว้าง, รูปทรงกระบอก 26
 - หางลักษณะรูปทรงโคน. 28
- 26. บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 3 รอยบาก *R. nativus*
 - บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 4 รอยบาก 27
- 27. อัตราส่วนของความยาวหางต่อความกว้างของร่างกายบริเวณทวารหนัก 2.7 หรือ มากกว่า; ลักษณะของตัวเมียที่ออกไข่เรียวยาว. *R. clarus*
 - อัตราส่วนของความยาวหางต่อความกว้างของร่างกายบริเวณทวารหนัก 2.7 หรือ มากกว่า; เมื่ออยู่ในระยะวางไข่ตัวเต็มวัยเพศเมียขยายร่างกาย หนาขึ้นและพองตัวขึ้นเล็กน้อย.
- R. nelsoni*
- 28. บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 4 รอยบาก
 - *R. vangundyi*
 - บริเวณ lateral field ระหว่าง phasmid และปลายหาง มี 3 รอยบาก
 - *R. similis*

ตารางผนวกที่ 2 รายชื่อพืช และสถานที่ จำนวนต้นและจำนวนตัวการตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล

Radopholus

| ลำดับที่ | พืช | จำนวนต้นพืช | | จำนวนตัวการตรวจพบไส้เดือนฝอยสกุล <i>Radopholus</i> | |
|------------|--|-------------|------------|--|------------|
| | | 2563 | 2564 | 2563 | 2564 |
| 1 | กล้าขุ่นแผน (ตลาดบางใหญ่) | 25 | 25 | 150 | 40 |
| 2 | กล้าขุ่นแผนเรียกเงิน (ตลาดบางใหญ่) | 25 | 25 | 30 | 70 |
| 3 | กล้าถุงเงิน (ตลาดบางใหญ่) | 25 | 25 | - | - |
| 4 | กล้าเสน่ห่านางพิมพ์ (ตลาดบางใหญ่) | 25 | 25 | 22 | 80 |
| 5 | กล้าใบละร้อย (ตลาดบางใหญ่) | 25 | 25 | - | - |
| 6 | กล้ากาเหว่าลาย (ตลาดบางใหญ่) | 25 | 25 | - | - |
| 7 | ดินจากสวนลีลาวดี (คลอง 15) | 10 | 10 | 50 | 35 |
| 8 | หน้าวัวตัดดอก ทropicคอล (บางกรวย) | 50 | 50 | 230 | 150 |
| 9 | หน้าวัวตัดดอก พันธุ์พิสตาเซ่ (บางกรวย) | 50 | 50 | 119 | 85 |
| 10 | หน้าวัวตัดดอก พันธุ์โซเน็ต (บางกรวย) | 25 | 25 | 139 | 95 |
| 11 | หน้าวัวตัดดอก พันธุ์แองเจิ้ล (บางกรวย) | 25 | 25 | 165 | 160 |
| 12 | 4/1 หน้าวัวแคะ (คลอง 15) | 25 | 25 | 12 | 20 |
| 13 | 4/2 กล้าคละพันธุ์ (คลอง 15) | 50 | 50 | 115 | 130 |
| 14 | วัสดุปลูกตาลฉัตร (คลอง 15) | 50 | 50 | - | - |
| 15 | ดินปลูกชวนชม (คลอง 15) | 25 | 25 | - | - |
| 16 | ดินปลูกหมากเหลือง | 50 | 50 | - | - |
| 17 | อะโกลนีมา | 25 | 25 | 30 | - |
| 18 | มอนเตอรา | 10 | 10 | 13 | 6 |
| 19 | พิโลเด็นดรอน | 10 | 10 | 12 | 5 |
| 20 | กานอิม | 25 | 25 | 10 | 2 |
| 21 | หน้าวัวใบ | 25 | 25 | 5 | 13 |
| รวม | | 605 | 605 | 1102 | 891 |

สัณฐานวิทยาและชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch

(Hemiptera: Aphididae) ในประเทศไทย

Morphology and Biology of Cowpea Aphids, *Aphis craccivora* Koch

(Hemiptera: Aphididae) in Thailand

เกศสุดา สนศิริ จารุวัฒน์ แท้กุล ยุวรินทร์ บุญทบ สุนัดดา เขาวลิต

อิทธิพล บรรณาการ จอมสุรางค์ ดวงธิดาร

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The cowpea aphid, *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae), is one of the most destructive insect pest of legume plants. Crop losses caused by *A. craccivora* are due to direct feeding damage and to indirect damage, chiefly via the transmission of plant viruses. The objectives of this study are to the morphology, biology, host plants and distribution of *A. craccivora*. This study was conduct during October 2019 – September 2021 at Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. The morphological studies of *A. craccivora* revealed that the adult of *A. craccivora* was distinctly shiny brown to black body. Body length 2.18 ± 0.38 mm. Antennae six-segmented. Rostrum reaching to middle coxae; Siphunculi tapering and imbricate. Cauda tongue-shape, with 5 – 7 setae. Lateral tubercles on first and seventh abdominal segment posteroventrally to the spiracles. Biological of the *A. craccivora* was studies using yardlong bean (*Vigna sesquipedalis* Koern) as food. The results revealed that the net reproductive rate of increase (R_0) was 67.16, the capacity for increase (r_0) was 0.2832, the cohort generation time (T_0) was 14.854 days and the finite rate of increase (λ) was 1.9100. Most of the adult females gave birth to living young or nymphs after the last molt at 6 hr. with the highest peak of birth at 3 day. The partial ecological life table showed that the highest mortality of *A. craccivora* was found in the first and second instar larva.

Keywords : cowpea aphid, *Aphis craccivora*, Taxonomy, Biology

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-01-10-63



บทคัดย่อ

เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch เป็นแมลงปากดูดศัตรูสำคัญของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย เนื่องจากสามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 80 วงศ์ และยังสามารถเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชแก่พืชถึง 30 ชนิด หากเพลี้ยอ่อนลงทำลายจำนวนมากจะทำให้ผลผลิตเสียหายและลดลง ดังนั้นวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยา พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจายของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ดำเนินการระหว่างเดือน ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2564 ผลการศึกษาพบว่า เพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาวเฉลี่ย 2.18 ± 0.38 มิลลิเมตร มีสีเทาดำถึงสีดำเป็นมันเงามีขี้ผึ้งแปงปกคลุมที่ส่วนท้อง หนวดมี 6 ปล้อง ปาก (rostrum) ยาวถึงโคนขาคู่กลางไซฟุงคูไล (siphunculi) เรียวและยาวกว่าส่วนหาง (cauda) ส่วนหางมีรูปร่างคล้ายลิ้น (tongue-shape) มีขน 4 – 7 เส้น ตุ่มด้านข้างลำตัว (lateral tubercles) บนปล้องท้องที่ 1 และ 7 อยู่ข้างใต้ด้านหลังรูหายใจ (spiracles) บริเวณส่วนท้องด้านหลังมีแถบสีดำ วงจรชีวิตมีการลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะตัวอ่อนมี 4 วัย ระยะตัวอ่อน 4 – 6 วัน ระยะตัวเต็มวัย 6 – 14 วัน ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก ผลการวิเคราะห์ค่าคุณลักษณะทางชีววิทยาจากตารางชีวิตแบบ biological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ที่เลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว มีอัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_0) เท่ากับ 67.1600 เท่า ค่าสัมประสิทธิ์การเพิ่มทางกรรมพันธุ์ (r_c) เท่ากับ 0.2832 ค่าสัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ (λ) มีค่าเท่ากับ 1.9100 เท่า และชั่วอายุขัยของกลุ่ม (T_c) เท่ากับ 14.854 วัน ตัวเต็มวัยสามารถออกลูกได้ในชั่วโมง 6 หลังจากเป็นตัวเต็มวัย และออกลูกได้มากที่สุดในวันที่ 3 การศึกษตารางชีวิตแบบ Partial ecological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เมื่อเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว ในสภาพห้องปฏิบัติการ ระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 มีอัตราการตายสูงที่สุด และระยะตัวอ่อนวัยที่ 3 มีอัตราการตายต่ำสุด

คำหลัก : อนุกรมวิธาน เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora*

คำนำ

เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Aphididae อันดับ (Order) Hemiptera เพลี้ยอ่อนชนิดนี้เป็นศัตรูที่สำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากสามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 80 วงศ์ (Favret and Miller, 2012) เช่น พืชตระกูลถั่ว (ถั่วฝักยาว ถั่วลิสง ถั่วเขียว) พืชตระกูลกะหล่ำ พืชตระกูลแตง ส้ม กระจวาน มันสำปะหลัง กระจับปี่ มะเขือ ขี้เหล็ก และชบา เป็นต้น โดยทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเข้าทำลายพืชโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชบริเวณใต้ใบ หรือส่วนอ่อนๆ ของพืช เช่น ยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอกและผล ทำให้พืชมีลักษณะผิดปกติ ใบเหลือง ใบย่น ดอกร่วง ผลบิดเบี้ยว และเมล็ดลีบ ผลและใบที่ถูกทำลายจะแห้งและร่วงไปในที่สุด ทำให้ผลผลิตเสียหายและลดลงมากกว่า 30% และที่สำคัญเพลี้ยอ่อนยังขับมูลน้ำตาล (honeydew) ซึ่งเป็นอาหารของมดและราดำ (sooty mold) ทำให้ราดำเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วจนปกคลุมใบและผล ใบจึงไม่สามารถสังเคราะห์

แสงได้อย่างเต็มที่ ส่วนผลจะสกปรกไม่เป็นที่ต้องการของตลาด นอกจากจะดูดีกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชแล้วเพลี้ยอ่อน *A. craccivora* ยังเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชแก่พืชถึง 30 ชนิด เช่น ในพืชตระกูลถั่ว ได้แก่ ถั่วฝักยาว ถั่วเหลือง ถั่วแขก ถั่วลิสง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตง และพืชตระกูลกะหล่ำ (Blackman and Eastop, 2000) ซึ่งโรคเหล่านี้มีผลทำให้ต้นถั่วแคระแกรน และผลผลิตลดลง 20% (วิเชียรและคณะ, 2543) ดังนั้นวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยา พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจายของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* พร้อมทั้งจัดทำแนวทางวินิจฉัย และได้ตัวอย่างเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงในรูปแบบสไลด์ถาวร รวมถึงจัดทำฐานข้อมูลสำหรับเป็นแหล่งสืบค้นข้อมูลศัตรูพืช นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้ยังใช้เป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาแนวทางการป้องกันกำจัดและเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในพิพิธภัณฑ์ รวมทั้งจัดทำฐานข้อมูลตัวอย่างทั้งหมด เพื่อสามารถใช้เป็นแหล่งสืบค้นอ้างอิง ประกอบการค้นคว้า ได้อย่างมีระบบมาตรฐานสากล

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชผักวงศ์แตง ตระกูลถั่ว พืชตระกูลแตง ตระกูลกะหล่ำ ส้ม มันสำปะหลัง มะเขือ และพริก และตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ใน พิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตร
2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่าง ถังรักษาความเย็น และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
3. อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทำสไลด์ถาวรอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) ได้แก่ potassium hydroxide 10 %, alcohol 70-95 %, acetic acid gacial, clove oil และ canada balsam แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นแก้วปิดสไลด์ ตู้อบสไลด์ถาวร
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope และกล้องถ่ายภาพ
5. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยอ่อนในวงศ์ Aphididae ของ Blackman and Eastop (2000)

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ที่จากเอกสารต่าง ๆ ที่มีการรายงานไว้ในประเทศไทยและ ต่างประเทศ หรือจากข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์
- 2) สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่าง

สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากแหล่งปลูกพืชตระกูลถั่ว พืชตระกูลแตง ตระกูลกะหล่ำ ส้ม มันสำปะหลัง มะเขือ และพริก โดยตัดส่วนของพืชที่มีตัวอ่อน หรือตัวเต็มวัยที่มีเพลี้ยอ่อน

เกาะอยู่ด้วยกรรไกรตัดกิ่ง นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมพร้อมพีชอาศัยนำใส่กล่องพลาสติก และนำเพลี้ยอ่อนอีกส่วนหนึ่งลงในน้ำยาสำหรับดองเพลี้ยอ่อน (แอลกอฮอล์ 80% 2 ส่วน กรดแลคติก 1 ส่วน) บันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พีชอาหาร ส่วนของพีชที่ถูกทำลาย สถานที่ วัน เดือน ปี พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ซึ่งประกอบด้วยค่าละติจูด (Latitude) ค่าลองจิจูด (Longitude) ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (Altitude) และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง นอกจากตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่มีอยู่เดิมในพีชในภัณฑกรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้จากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* ในแปลงปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย ดังนี้

ปีที่ 1 (2563)

ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี ลพบุรี นครสวรรค์ พิษณุโลก และเพชรบูรณ์

ภาคเหนือ ได้แก่ ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เชียงราย แพร่ และ น่าน

ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง จันทบุรี ตราด และชลบุรี

ปีที่ 2 (2564)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ ร้อยเอ็ด เลย ขอนแก่น ยโสธร

สกลนคร ศรีสะเกษ หนองคาย อุดรธานี อุบลราชธานี

ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ภูเก็ต พัทลุง ตรัง และสงขลา

3) การศึกษาทางด้านชีววิทยา

นำเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* ที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงปลูกพีช มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยจะทำการศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนตัวในพีชอาหารอย่างน้อย 2 ชนิด (จะทำการศึกษาในพีชอาหารที่เพลี้ยอ่อนตัวลงทำลายมากเป็นอันดับ 1 และ 2 จากการสำรวจ) วิธีการโดยนำตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* จำนวน 200 ตัว มาเพาะเลี้ยงรวมกันในกล่องพลาสติกขนาด 14 x 23 x 7 เซนติเมตร ให้ใบกล้วยเป็นอาหารโดยใช้สำลีชุบน้ำพันรอบก้านใบเพื่อรักษาความสด เมื่อตัวเต็มวัยออกลูกทำการแยกตัวอ่อนโดยใช้ฟุ้งกันเบอร์ 0 เชื้อเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* แต่ละตัวไปเพาะเลี้ยงใน petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 2 เซนติเมตร รองด้วยกระดาษกรองที่มีความชื้น petri dish ละ 1 ตัว และใส่ใบกล้วยขนาด 3 x 3 เซนติเมตร เพื่อเป็นอาหาร ทำการเปลี่ยนใบกล้วยทุก 2 วัน สังเกตการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิต

บันทึกข้อมูลจำนวนเพลี้ยอ่อนตัว A. craccivora ที่รอดชีวิตทุกๆวันจนกระทั่งเพลี้ยอ่อนตัว A. craccivora เป็นตัวเต็มวัย และนับจำนวนตัวอ่อนที่ตัวเต็มวัยออกลูกทุกวัน จนกระทั่งตัวเต็มวัยตาย นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างตารางชีวิตแบบ biological life table โดยใช้เทคนิคของ Napompeth (1973) และอินทวัฒน์ (2548)

4) การศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน

นำตัวอย่างตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชมาตรวจลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนแต่ละระยะ

การทำสไลด์ถาวร

- นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่เก็บโดยการดองในแอลกอฮอล์มาทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ Blackman and Eastop (2000) ดังนี้
 - นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากขวดดอง ใช้เข็มเจาะบริเวณส่วนกลางอกด้านบนของเพลี้ยอ่อน และรีดเอาของเหลวและตัวอ่อนที่อยู่ภายในตัวออก ระวังอย่าให้ปากเสียหาย นำเพลี้ยอ่อนที่เจาะแล้วใส่ในหลอดแก้วที่มีแอลกอฮอล์ 95% ไปต้มโดยวิธีวอเตอร์บัท (water bath) นาน 1-2 นาที
 - ดูดแอลกอฮอล์ออก เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide: KOH) 10% แช่ทิ้งไว้ 3-5 นาที
 - ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่น 5-6 ครั้งแล้วแช่ทิ้งไว้ในน้ำกลั่นอีก 5-6 นาที
 - ดูดน้ำกลั่นออก เติมกรดแกแลซีลอะซิดิก แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
 - ดูดกรดแกแลซีลอะซิดิกออก เติมโคลฟอย แช่ทิ้งไว้ 10-20 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างเพลี้ยอ่อนใส

การเม้าท์สไลด์

หยดแคนนาดาบัลซัมเพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ เชียเพลี้ยอ่อนลงในหยดแคนนาดาบัลซัมให้เพลี้ยอ่อนหงายท้องขึ้น จัดหมวด ขา ไซฟิงคูล และหางให้อยู่ในตำแหน่งสวยงาม จากนั้นหยดไซลีนลงบนกึ่งกลางแผ่นสไลด์ที่สะอาด ค่อยๆคว่ำแผ่นสไลด์ลงบนแผ่น แก้วปิดสไลด์ซ้ำๆ รีบพลิกแผ่นสไลด์ให้ด้านแผ่นแก้วปิดสไลด์อยู่ด้านบน นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7-15 วัน การเม้าท์สไลด์ด้วยวิธีการนี้สามารถเก็บสไลด์ได้คงทนนาน นับปี

การวินิจฉัยชนิด

- นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตรวจสอบลักษณะสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดกับเอกสารแนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อน ลักษณะสำคัญของเพลี้ยอ่อนที่ใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่ ส่วนหัว; ร่องหมวดและร่องบริเวณหน้าผาก ความสั้นยาว

ของหนวด จำนวนปล้องและความยาวส่วนปลายของปล้องสุดท้าย ความยาวของปาก ส่วนนอก; ความยาวของปลายขาคู่หลังและหนามบนน่องขา ส่วนท้อง; จะมีตุ่มขนาดเล็กปรากฏบริเวณปล้องท้องปล้องที่ 1 และ 7 โดยเฉพาะปล้องที่ 7 ตำแหน่งของตุ่มขนาดเล็กที่ปรากฏอยู่ด้านบนหรือด้านล่างรูหายใจใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกระดับสกุล แต่ในเพลี้ยอ่อนบางชนิดไม่ปรากฏตุ่มดังกล่าว วาดรูปแสดงลักษณะต่างๆที่สำคัญ

- บันทึกรายละเอียดต่างๆ ของเพลี้ยอ่อนที่สำรวจพบ เช่น ลักษณะ รูปร่าง ขนาด สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนในแต่ละระยะ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์เพลี้ยอ่อนแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์

- จัดทำแนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อนและวาดภาพลักษณะสำคัญประกอบ

- เก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

การบันทึกข้อมูล

บันทึกรายละเอียด ชื่อพืช พันธุ์พืช สถานที่เก็บตัวอย่าง วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ซึ่งประกอบด้วยค่าละติจูด (Latitude) ค่าลองจิจูด (Longitude) ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (Altitude) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างและชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ นอกจากตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้จากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564

สถานที่ - แหล่งปลูกพืชผักที่สำคัญของประเทศไทย

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาสัณฐานวิทยาและชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* โดยทำการสืบค้นข้อมูลพืชอาหารที่มีรายงานในประเทศไทยและต่างประเทศ รวมถึงข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์ ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* จำนวน 500 ตัวอย่าง ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา นครปฐม สุพรรณบุรี กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครนายก พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ลพบุรี



สุพรรณบุรี ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ น่าน ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง จันทบุรี ตราด และชลบุรีนำมาจัดทำสไลด์ถาวร และนำไปอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 - 60 วัน และนำไปจัดจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ตรวจสอบลักษณะสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดโดยใช้แนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อนของ Blackman and Eastop (2000) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีในพิพิธภัณฑ์แมลงของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การศึกษาพืชอาหาร และเขตการแพร่กระจาย

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนถั่วในพืชต่างๆ พบว่า เพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* มีพืชอาหาร ได้แก่ พืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Koern) ถั่วพู (*Psophocarpus tetragonolobus* D.C.) ถั่วแปบ (*Dolichos lablab* L.) ถั่วลิสง ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.)) ถั่วเขียว (*Phaseolus aureus* Roxb) เป็นต้น พืชตระกูลกะหล่ำ พืชตระกูลแตง (วงศ์ Cucurbitae); (แตงกวา (*Cucumis Sativus* Linn.) บวบ (*Luffa cylindrica*) น้ำเต้า (*Lagenaria siceraria*) ส้ม (*Citrus reticulata*) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* (L.) พริก (*Capsicum* spp.) มะเขือ (*Solanum melongena* var. *serpentinum* L.) แคบ้าน (*Sesbania grandiflora* Disy) ผักโขม (*Solanum melongena* var. *serpentinum* L.) ชบา (*Hibiscus rosa-sinensis*) กระจี้ยบ (*Hibiscus sabdariffa* L.) ชี้เหล็ก (*Senna siamea* Lam H.S.Irwin & Barneby) โดยพบทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเข้าทำลายพืชโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชบริเวณใต้ใบ หรือส่วนอ่อนๆของพืช เช่น ยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอกและผล พบทุกจังหวัดที่ทำการสำรวจ

การศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora*

การศึกษาชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ได้ดำเนินการในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 60 - 80 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษารูปร่างลักษณะ และวงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* โดยทำการเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว พบว่า เพลี้ยอ่อนถั่วมีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ตัวเต็มวัยสามารถออกลูกได้โดยไม่ต้องผสมพันธุ์ ไข่จะเจริญเป็นตัวอ่อนอยู่ในท้องของตัวเต็มวัยและออกลูกเป็นเพศเมียทั้งหมด วงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* มีการลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะตัวอ่อนมี 4 วัย ตัวอ่อนระยะที่ 1 ที่ออกมาใหม่ๆ มีขนาดเล็กมากมีสีเหลืองอ่อน ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 0.71 ± 0.09 มิลลิเมตร ($n = 20$) ตัวอ่อนระยะที่ 2 ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.93 ± 0.08 มิลลิเมตร ($n = 20$) ตัวอ่อนระยะที่ 3 ลำตัวยาวเฉลี่ย 1.26 ± 0.09 มิลลิเมตร ($n = 20$) ตัวอ่อนระยะที่ 4 ลำตัวยาวเฉลี่ย 1.54 ± 0.10 มิลลิเมตร ($n = 20$) ระยะตัวอ่อนใช้ระยะเวลา 4 - 6 วัน ในการลอกคราบของตัวอ่อนแต่ละระยะ ลำตัวจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและสีของลำตัวและขาฟางคูไล

จะเข้มมากขึ้น ตัวเต็มวัยลำตัวยาวเฉลี่ย 2.18 ± 0.38 มิลลิเมตร ($n = 20$) ลำตัวมีสีเทาถึงดำเป็นมันเงา มีผงแป้งปกคลุมที่ส่วนท้อง บริเวณส่วนท้องมีแถบสีดำ ระยะตัวเต็มวัยเฉลี่ย 16.75 ± 1.16 เพลี้ยอ่อนสามารถออกลูกได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย เฉลี่ย 8.6 ± 1.87 ชั่วโมง ตัวแม่หนึ่งตัวสามารถออกลูกได้เฉลี่ย 81.8 ± 2.40 ตัว (ตารางที่ 1) ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก

ผลการวิเคราะห์ค่าคุณลักษณะทางชีววิทยาจากตารางชีวิตแบบ biological life table ของเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* ที่เลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว พบว่า เพลี้ยอ่อนตัวมีอัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_0) เท่ากับ 67.1600 เท่า ค่าสัมประสิทธิ์การเพิ่มทางกรรมพันธุ์ (r_c) เท่ากับ 0.2832 ค่าสัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ (λ) มีค่าเท่ากับ 1.9100 เท่า และชั่วอายุขัยของกลุ่ม (T_c) เท่ากับ 14.854 วัน (ตารางที่ 2) แสดงให้เห็นว่า เพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* สามารถขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณได้ 67.1600 เท่า ต่อชั่วอายุขัย เพลี้ยอ่อนตัวหนึ่งตัวสามารถเพิ่มปริมาณได้ 1.9100 เท่า โดยตัวเต็มวัยสามารถออกลูกได้ในชั่วโมง 6 หลังจากเป็นตัวเต็มวัย และออกลูกได้มากที่สุดในวันที่ 3

ผลการศึกษาตารางชีวิตแบบ Partial ecological life table ของเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* เมื่อเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว ในสภาพห้องปฏิบัติการพบว่า มีการตายต่อชั่วอายุในแต่ละระยะของการเจริญเติบโต คือ ระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 – 4 เท่ากับร้อยละ 15, 15, 9 และ 6 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) โดยระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 มีอัตราการตายสูงที่สุด และระยะตัวอ่อนวัยที่ 3 มีอัตราการตายต่ำสุด ซึ่งการศึกษาตารางชีวิตแบบนี้เป็นการศึกษาในสภาพห้องปฏิบัติการที่มีปัจจัยต่างๆ ที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของแมลง ดังนั้นการตายของแมลงในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโตเป็นการตายเนื่องมาจากศักยภาพของแมลง การตายดังกล่าวจึงเกิดขึ้นน้อยกว่าที่ควรจะเป็น เมื่อเปรียบเทียบกับการดำรงชีพในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ ซึ่งมีปัจจัยที่มีชีวิต และปัจจัยไม่มีชีวิตมากมายที่เป็นสาเหตุทำให้แมลงตายได้มากกว่า (Jalalipour *et. al.*, 2017) (ณัฐวารีย์, 2552)

การศึกษาด้านอนุกรมวิธาน

| | |
|-----------------|---|
| ชื่อสามัญ | เพลี้ยอ่อนถั่ว (cowpea aphid) |
| ชื่อวิทยาศาสตร์ | <i>Aphis craccivora</i> Koch |
| ชื่อพ้อง | <i>Aphis laburni</i> of extra-European authors nec Kaltenbach, 1843; <i>Aphis salvia</i> Walker, 1852 <i>Aphis craccivora</i> C.L.Koch, 1854 <i>Aphis loti</i> Kaltenbach, 1862 <i>Aphis onobrychidis</i> Goureaux, 1863 |

Aphis mimosa Ferrari, 1872
Aphis robiniae Cockrell, 1885
Aphis atronitensf Cockrell, 1903
Aphis atronitens Cockrell, 1903
Aphis hordi del Guercio, 1913
Aphis Leguminosae Theobald, 1915
Aphis beccarii del Guercio, 1917
Aphis citricola del Guercio, 1917
Aphis isabelline del Guercio, 1917
Aphis papilioncaerum van der Goot, 1918
Aphis cistiella Theobald, 1923
Aphis oxalina Theobald, 1925
Aphis kyberi Hottes, 1930
Aphis meliloti Börner, 1939
Aphis salsolae Börner, 1940
Aphis loti sub sp. Gollmicki Börner, 1952

อันดับ : วงศ์ : วงศ์ย่อย Hemiptera : Aphididae : Aphidinae

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาว 2.18 ± 0.38 มิลลิเมตร ($n = 20$) ตัวอ่อนที่ออกมาใหม่ๆ มีขนาดเล็กมากสีเหลืองอ่อน เมื่อโตขึ้นมีสีเทาดำถึงสีดำเป็นมันเงามีผงแป้งปกคลุมที่ส่วนท้อง หนวดมี 6 ปล้อง ปาก (rostrum) ยาวถึงฐานขาคู่กลาง ไชฟิงคูล (siphunculi) เรียว ส่วนหาง (cauda) มีรูปร่างคล้ายลิ้น มีขน 4 – 7 เส้น ตุ่มด้านข้างลำตัว (lateral tubercles) บนปล้องท้องที่ 1 และ 7 อยู่ข้างใต้ด้านหลังรูหายใจ (spiracles)

ลักษณะบนแผ่นสไลด์แก้ว หัว (head) และหนวด (antennae) ปล้องสุดท้ายสีน้ำตาล หนวดปล้องที่ 3, 4 และฐานปล้องที่ 5 มีสีซีด หนวดสั้นกว่าลำตัว ไชฟิงคูล (siphunculi) และส่วนหาง (cauda) สีน้ำตาลหรือสีดำ ส่วนปาก (rostrum) ยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไชฟิงคูล (siphunculi) ยาวกว่าส่วนหาง (cauda) ส่วนหางมีรูปร่างคล้ายลิ้น (tongue-shape) มีขน 4 – 7 เส้น บริเวณส่วนท้องด้านหลังมีแถบสีดำ (ภาพที่ 4)

พืชอาหาร

- ถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis* Koern)
- ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.))
- ถั่วเขียว (*Phaseolus aureus* Roxb)
- ถั่วพู (*Psophocarpus tetragonolobous* D.C.)
- ถั่วแปป (*Dolichos lablab* L.)
- พริก (*Capsicum* spp.)
- มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* (L.)
- ละหุ่ง (*Ricinus communis* L.)
- ผักโขม (*Amaranthus* sp.)
- ส้ม (*Citrus reticulata*)
- ซีเหليل (*Senna siamea* (Lam.) H.S.Irwin & Barneby)
- กระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* L.)
- ชบา (*Hibiscus rosa-sinensis*)
- แตงกวา (*Cucumis Sativus* Linn.)
- มะเขือ (*Solanum melongena* var. *serpentinum* L.)
- แค (*Sesbania grandiflora* Disy)

การวินิจฉัย

เพลี้ยอ่อน *A. craccivora* มีรูปร่างลักษณะและสีของลำตัวคล้ายคลึงกับเพลี้ยอ่อนดำส้ม *Toxoptera citricidus* แตกต่างจาก *T. citricidus* คือบริเวณส่วนท้องมีแถบสีดำ มีรายงานว่าเพลี้ยอ่อน *A. craccivora* เป็นพาหะนำเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชถึง 32 โรค เช่น โรคไวรัสใบด่าง (bean common mosaic) โรคต่างใบเหลือง (bean yellow mosaic) เป็นต้น (Kennedy, 1962)

เขตการแพร่กระจาย

- มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก
- ประเทศไทยสำรวจพบทั่วทุกภูมิภาค

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาวเฉลี่ย 2.18 ± 0.38 มิลลิเมตร มีสีเทาถึงสีดำเป็นมันเงามีขี้ผึ้งปกคลุมที่ส่วนท้อง หนวดมี 6 ปล้อง ปาก (rostrum) ยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไช่ฟังก์คิวไล (siphunculi) เรียวและยาวกว่าส่วนหาง (cauda) ส่วนหางมีรูปร่าง

คล้ายลิ้น (tongue-shape) มีขน 4 – 7 เส้น ตุ่มด้านข้างลำตัว (lateral tubercles) บนปล้องท้องที่ 1 และ 7 อยู่ข้างใต้ด้านหลังรูหายใจ (spiracles) บริเวณส่วนท้องด้านสันหลังมีแถบสีดำ

วงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* โดยทำการเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว ในสภาพห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 – 80 เปอร์เซ็นต์ มีการลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะตัวอ่อนมี 4 วัย ตัวอ่อนระยะที่ 1 ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 0.71 ± 0.09 มิลลิเมตร (n = 20) ตัวอ่อนระยะที่ 2 ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.93 ± 0.08 มิลลิเมตร (n = 20) ตัวอ่อนระยะที่ 3 ลำตัวยาวเฉลี่ย 1.26 ± 0.09 มิลลิเมตร (n = 20) ตัวอ่อนระยะที่ 4 ลำตัวยาวเฉลี่ย 1.54 ± 0.10 มิลลิเมตร (n = 20) ระยะตัวอ่อน 4 - 6 วัน ตัวเต็มวัยลำตัวยาวเฉลี่ย 2.18 ± 0.38 มิลลิเมตร (n = 20) ระยะตัวเต็มวัย 6 – 14 วัน เพลี้ยอ่อนสามารถออกลูกได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 หลังจากลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย เฉลี่ย 8.6 ± 1.87 ชั่วโมง พิสัย 6 – 11 ชั่วโมง ตัวแม่หนึ่งตัวสามารถออกลูกได้เฉลี่ย 81.8 ± 2.40 ตัว ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก

ผลการวิเคราะห์ค่าคุณลักษณะทางชีววิทยาจากตารางชีวิตแบบ biological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ที่เลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว มีอัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_0) เท่ากับ 67.1600 เท่า ค่าสัมประสิทธิ์การเพิ่มทางกรรมพันธุ์ (r_c) เท่ากับ 0.2832 ค่าสัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ (λ) มีค่าเท่ากับ 1.9100 เท่า และชั่วอายุขัยของกลุ่ม (T_c) เท่ากับ 14.854 วัน ตัวเต็มวัยสามารถออกลูกได้ในชั่วโมง 6 หลังจากเป็นตัวเต็มวัย และออกลูกได้มากที่สุดในวันที่ 3

การศึกษาตารางชีวิตแบบ Partial ecological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เมื่อเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว ในสภาพห้องปฏิบัติการ ระยะตัวอ่อนวัยที่ 1 และ 2 มีอัตราการตายสูงสุดและระยะตัวอ่อนวัยที่ 3 มีอัตราการตายต่ำสุด

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลรายละเอียดของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* พืชอาศัยสำหรับจัดทำฐานข้อมูลอย่างสมบูรณ์ และได้ข้อมูลเบื้องต้นที่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ สามารถนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาในด้านอื่น ๆ และมีตัวอย่างเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง เพื่อใช้ในการอ้างอิง ตรวจสอบความถูกต้อง เพื่อประกอบในงานสำคัญด้านการส่งออก และนำเข้าสินค้าเกษตร ตลอดจนใช้ในด้านการกักกันพืช ซึ่งเป็นไปตามมาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนักกีฏวิทยาและเจ้าหน้าที่กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยาทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลง ตลอดจนเตรียมตัวอย่างแมลงเพื่อการจัดจำแนกชนิด



เอกสารอ้างอิง

- วิเชียร บำรุงศรี. 2543. แมลงศัตรูถั่วเขียวและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูพืชน้ำมัน และพืชไร่ตระกูลถั่ว กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 44 หน้า.
- ลักขณา บำรุงศรี และ ชฎาภรณ์ เฉลิมวิเชียรพร. 2554. แมลงปากดูดชนิดที่สำคัญในประเทศไทย. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. หน้า 39-64.
- อินทวัฒน์ บุรีคำ. 2548. นิเวศวิทยาวิเคราะห์ทางกีฏวิทยา. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม.
- Blackman, R.L. and V.F. Eastop. 2000. Aphids on the World Crops. An Identification and Information Guide. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, England.
- Banziger, H. 1976. Winged Aphids of Species Economically Important in Thailand. Plant Protection Service Technical Bulletin No.36. 41 pp.
- Favret, C. and G.L. Miller. 2012. AphID, Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA; Fort Collins, CO. [4 May 2014]. <http://AphID.AphidNet.org/>.
- Napompeth, B. 1973. Ecology and Population Dynamics of the Cron Planthopper, *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Homoptera: Delphacidae), in Hawaii: Ph.D. Dissertation, University of Hawaii.
- Warunee, S. 2002. Taxonomic Study of Aphids (Homoptera: Aphididae) in Northern Thailand. Ph. D. Thesis, Mahidol University, Bangkok.

ตารางที่ 1 ระยะเวลาการเจริญโตของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่อุณหภูมิตั้งที่ 25 + 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 60 – 80 เปอร์เซ็นต์

| ระยะเวลาการเจริญเติบโต | จำนวน | ค่าเฉลี่ย \pm SD (วัน) | พิสัย (วัน) |
|-------------------------------|-------|-----------------------------|----------------|
| ตัวอ่อน (Nymph) : | | | |
| วัยที่ 1 | 20 | 1.14 \pm 0.11 | 1 - 2 |
| วัยที่ 2 | 20 | 1.21 \pm 0.21 | 1 - 2 |
| วัยที่ 3 | 20 | 1.17 \pm 0.12 | 1 - 2 |
| วัยที่ 4 | 20 | 1.15 \pm 0.09 | 1 - 2 |
| ระยะตัวอ่อน (Nymphal period) | 20 | 4.51 \pm 0.11 | 4 - 6 |
| ระยะตัวเต็มวัย (Adult period) | 20 | 16.75 \pm 1.16 | 6 - 14 |
| อายุขัย (Life span) | 20 | 14.10 \pm 1.48 | 7 - 16 |

ตารางที่ 2 คุณลักษณะทางชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch

| คุณลักษณะทางชีววิทยา | สูตร | ค่าที่ได้ |
|--|---|-----------|
| อัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_0) (Net Reproductive Rate of Increase) | $\sum l_x m_x$ | 67.1600 |
| อัตราการขยายพันธุ์ทางกรรมพันธุ์ (r_c) (Capacity for Increase) | $\frac{\log_e R_0}{T_c}$ | 0.2832 |
| ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (T_c) (Cohort Generation time) | $\frac{\sum l_x m_x \cdot x}{\sum l_x m_x}$ | 14.8540 |
| ค่าสัมประสิทธิ์ของการขยายพันธุ์ที่แท้จริง (λ) (Finite Rate of Increase) | $\text{antilog}_e r_c$ | 1.9100 |

ตารางที่ 3 ตารางชีวิตแบบ Partial ecological life table ของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 25 + 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 60 – 80 เปอร์เซ็นต์

| ระยะการ เจริญเติบโต | จำนวนที่รอด ชีวิต | จำนวนที่ตาย | เปอร์เซ็นต์การ ตาย | เปอร์เซ็นต์การ ตายในชั่วอายุขัย |
|------------------------|----------------------|-------------|-----------------------|------------------------------------|
| (X) | (lx) | (dx) | (100qx) | (100dx/n) |
| ตัวอ่อนระยะที่ 1 | 100 | 15 | 15 | 15 |
| ตัวอ่อนระยะที่ 2 | 85 | 15 | 17.65 | 15 |
| ตัวอ่อนระยะที่ 3 | 70 | 9 | 12.86 | 9 |
| ตัวอ่อนระยะที่ 4 | 61 | 6 | 9.84 | 6 |
| ตัวเต็มวัย | 55 | - | - | - |



ภาพที่ 1 เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch ที่สำรวจพบในพืชอาหารต่างๆ



ภาพที่ 2 ทำการเตรียมพืชอาหารสำหรับใช้ศึกษาชีววิทยาในห้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 3 เพลี้ยอ่อนตัวในแต่ละระยะการเจริญเติบโต

- ก. ระยะตัวเต็มวัย
- ข. ระยะตัวอ่อนวัยที่ 1
- ค. ระยะตัวอ่อนวัยที่ 2
- ง. ระยะตัวอ่อนวัยที่ 3
- จ. ระยะตัวอ่อนวัยที่ 4



ภาพที่ 4 เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch

- ก. ตัวเต็มวัย
- ข. ลักษณะตัวเต็มวัยเมื่อนำไปทำสไลด์ถาวรเพื่อจัดจำแนกชนิด
- ค. ลักษณะของส่วนหัว หนวด ปาก ขา
- ง. ลักษณะส่วนท้อง ไชฟิงคูไล และส่วนหาง

ชีววิทยาของเทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excell.)Biology of *Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excell.

ธัญชนก จงรักไทย อัญศยา พรพมา เอกรัตน์ ธนุทอง
 กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

 Abstract

The study of biology of *Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excell during October 2019-September 2021. Explore in the rice fields and wetlands using a detection survey method in 27 provinces as follows: Chiang Mai Phetchaburi Phetchabun Kanchanaburi Kamphaeng Phet Chanthaburi Chai Nat Trat Tak Nakhon Phanom Nakhon Ratchasima Nakhon Sawan Nan Prachuap Khiri Khan Phra Nakhon Si Ayutthaya Phichit Phitsanulok Rayong Lopburi Lampang Lamphun Sing Buri Sukhothai Suphan Buri Ang Thong Uthai Thani and Ubon Ratchathani Province. Collected 80 samples and dried seeds. Preserved at the Weed Museum, weed science and research group, Plant Protection Research and Development office, Department of Agriculture, Bangkok. The germination of seeds in the laboratory was 55 percent, the maximum germination 74 percent, the minimum 29.0 percent. Seeds collected from some sites were able to germinate at 102 days after planting, indicating that the seeds were dormant. Germination in house conditions the average germination of seeds was 20.7 percent, the maximum germination was 39 percent, the minimum was 2 percent. The growth of *Ludwigia hyssopifolia*, height, canopy size, number of branches, number of pods and seed production in 1, 3 and 5 plants per square meter. This was greater than that of highly competitive conditions with all survival plants that germinated. A plant that fully matured for an average life cycle of 162 days was able to produce 58,424 seeds per plant, which was more than plants growing under competitive conditions with only 5,858 seeds per plant. The seeds can germinate well at the soil surface, depth of

 รหัสสารทดลอง 03-30-60-01-02-03-05-63


not more than 5 centimeters. and can also be propagated using cuttings but if part of the trunk is buried underground it can kill that. In agricultural conditions If farmers want to control the whole plant and seeds should be tilled to a depth of more than 5 cm. It was controlled without the herbicides.

Keywords : Biology, *Ludwigia hyssopifolia*

บทคัดย่อ

การศึกษาชีววิทยาของเทียนนา ทำการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 โดยสำรวจในพื้นที่นาข้าว และพื้นที่ชุ่มน้ำ ด้วยวิธีแบบสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่ 27 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เพชรบุรี เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี กำแพงเพชร จันทบุรี ชัยนาท ตราด ตาก นครพนม นครราชสีมา นครสวรรค์ น่าน ประจวบคีรีขันธ์ พระนครศรีอยุธยา พิจิตร พิษณุโลก ระยอง ลพบุรี ลำปาง ลำพูน สิงห์บุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี อ่างทอง อุทัยธานี และอุบลราชธานี ได้ตัวอย่างเทียนนา จำนวน 80 ตัวอย่าง และเมล็ดแห้ง เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืช กลุ่มวิจัยพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ โดยเมล็ดเทียนนามีความงอกในห้องปฏิบัติการเฉลี่ย 55.0 เปอร์เซ็นต์ ความงอกสูงสุด 74 เปอร์เซ็นต์ ต่ำที่สุด 29.0 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดที่เก็บจากบางพื้นที่สามารถงอกได้ที่ระยะ 102 วัน หลังทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดมีการพักตัว และการงอกในสภาพเรือนทดลอง เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 20.7 เปอร์เซ็นต์ ความงอกสูงสุด 39 เปอร์เซ็นต์ ต่ำที่สุด 2.0 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตทั้งความสูง ขนาดทรงพุ่ม จำนวนแขนง จำนวนฝัก และการผลิตเมล็ด ในจำนวนต้น 1, 3 และ 5 ต้นต่อตารางเมตร มีค่ามากกว่าสภาวะแข่งขันสูงที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก โดยเทียนนา 1 ต้นที่เจริญเติบโตได้อย่างสมบูรณ์ ครอบงอมชีวิตโดยเฉลี่ย 162 วัน สามารถผลิตเมล็ดได้มากถึง 58,424.00 เมล็ดต่อต้น ซึ่งมากกว่าต้นที่เจริญเติบโตในสภาวะแข่งขันสูงที่มีจำนวนเมล็ดเพียง 5,858 เมล็ดต่อต้น เมล็ดเทียนนาสามารถงอกได้ดีที่ระดับผิวดินลึกไม่เกิน 5 เซนติเมตรเท่านั้น และยังสามารถขยายพันธุ์ได้โดยใช้กิ่งปักชำ แต่หากส่วนของลำต้นถูกฝังกลบใต้ดินก็สามารถทำให้เทียนนาตายได้ ในสภาพพื้นที่เกษตร หากเกษตรกรต้องการควบคุมเทียนนาตั้งแต่เริ่มควรทำการไถพรวนฝังกลบเทียนนาทั้งต้นและเมล็ดให้มีความลึกมากกว่า 5 เซนติเมตร ก็จะควบคุมการงอกของเทียนนาได้โดยไม่ต้องใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช

คำหลัก : ชีววิทยา เทียนนา



คำนำ

เทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excell.) อยู่ในวงศ์ Onagraceae เป็นพืชอายุปีเดียว ลำต้นตั้ง สูง 30-70 เซนติเมตร ลำต้นมักมีสีม่วงแดง เป็นเหลี่ยม โคนต้นส่วนที่แช่น้ำมักมีเยื่อสีขาว หุ้ม รากมีเนื้อสีขาว เพื่อช่วยหายใจ ใบเดี่ยวแตกจากลำต้นแบบสลับ แผ่นใบรูปหอก ปลายแหลม ใบเรียบไม่เป็นขน ใบและเส้นกลางใบและลำต้น กลีบเลี้ยงสีเขียว 4 กลีบ กลีบดอกสีเหลือง 4 กลีบ ผลรูปทรงกระบอก ยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร เมล็ดรูปกระสวยสีน้ำตาล ในบางท้องถิ่นจะพบเทียนนาอีกชนิดหนึ่งขึ้นปะปน เรียกว่าหญ้ารังกา (*Jussiaea suffruticosa* L.) ชนิดนี้ลำต้นสีม่วงแดง ตามใบและลำต้นเป็นขน ดอกสีเหลืองเช่นกัน แต่มีขนาดใหญ่กว่า (วิรัช และคณะ, 2547)

เทียนนาเป็นวัชพืชที่มักขึ้นในพื้นที่ชื้นแฉะในเขตร้อน มักอยู่ในน้ำ นาข้าว ริมชายน้ำ และหนองน้ำ โดยถูกบันทึกว่าเป็นวัชพืชหลักในนาข้าว ทั้งดินร่วนปนดินเหนียวและดินเหนียว Holm *et al.* (1997) กล่าวไว้ว่าเทียนนาเป็นวัชพืชที่แพร่หลายอย่างมากในข้าว และพื้นที่ชุ่มน้ำทั่วทั้งสามทวีป โดยมีรายงานว่า เป็นวัชพืชที่รุนแรงในประเทศอินเดีย เกาะบอร์เนียว ไทย มาเลเซีย ไนจีเรีย และตรินิแดด อีกทั้งยังเป็นวัชพืชสามัญในประเทศโคลัมเบีย และฟิลิปปินส์ โดยมีการยืนยันสถานะความสำคัญของเทียนนาในมาเลเซียในปี 2553 Begum *et al.* (2008) รายงานว่าโดยปกติเทียนนาจะสูงไม่เกิน 1 เมตร แต่ในบางพื้นที่สามารถสูงได้ถึง 3 เมตร เทียนนาถูกนำเข้ามาแพร่กระจายในหมู่เกาะแปซิฟิก รวมทั้งประเทศฟิจิ เกาะคริสต์มาส ดังนั้น เทียนนาจึงจัดว่าเป็นวัชพืชที่มีผลกระทบต่อระบบนิเวศของข้าว และพื้นที่ชุ่มน้ำ และประเทศสเปนเพิ่งระบุว่าเทียนนาเป็นวัชพืชที่รุกรานตัวใหม่ในปี 2549 (Ferrer and Laguna, 2009; Ferrer *et al.*, 2009)

เทียนนา เป็นวัชพืชที่มีการแพร่กระจายโดยทั่วไปในนาข้าว และที่ชื้นแฉะ มีรายงานในต่างประเทศว่าเทียนนาสามารถผลิตเมล็ดต่อต้นได้มากถึง 75,000 เมล็ด (Begum *et al.*, 2008) อีกทั้งเมล็ดยังมีการสะสมในดินปริมาณมาก (Gordon and Valk, 2003) ปัจจุบันพบว่าทำให้เกิดปัญหาต่อข้าว และต้องใช้สารกำจัดวัชพืชปริมาณมาก เกษตรกรบางรายปล่อยให้ต้นวัชพืชแห้งตายไปเอง หากมีปริมาณไม่มาก ทำให้เมล็ดวัชพืชหล่นลงสู่ดิน ซึ่งการปล่อยเมล็ดลงสู่ดิน ทำให้วัชพืชพร้อมที่จะระบาดในฤดูปลูกถัดไป หรือเมื่อดินมีความชื้นพอ ประกอบกับมีการใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรมากขึ้น ตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมดิน จนถึงการเก็บเกี่ยว ซึ่งการเคลื่อนย้ายเครื่องจักรกลเหล่านี้มักไม่มีการคำนึงถึงเมล็ดวัชพืชที่ติดไปกับเครื่องจักรกล และนำไปแพร่พันธุ์ในพื้นที่อื่นต่อไป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาชีววิทยา เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสนับสนุนการแจ้งเตือนเกษตรกร และแนวทางการจัดการวัชพืชชนิดนี้



วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) กล้องถ่ายรูปแบบดิจิทัล
- 2) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- 3) เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
- 4) กรรไกร มีด เสียม หรือพลั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
- 5) ดินและกระถาง สำหรับปลูกพืชทดสอบในเรือนทดลอง
- 6) แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกใส่ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
- 7) กระดาษติดตัวอย่างพืช พร้อมแฟ้มปก
- 8) น้ำยาชุบตัวอย่างพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริกคลอไรด์ เอทิลแอลกอฮอล์
- 9) การบูร
- 10) เครื่องรับสัญญาณดาวเทียม เพื่อระบุพิกัด
- 11) อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางพลาสติก กระบะปูน และป้ายแสดงกรรมวิธี
- 12) สมุดบันทึก

วิธีการ

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างในพื้นที่แปลงปลูกข้าวในภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท และนครสวรรค์ ภาคเหนือ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน พิชณุโลก กำแพงเพชร และพิจิตร และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมา อุบลราชธานี

บันทึกข้อมูล บันทึก สถานที่หรือพิกัด สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูก ลักษณะวัชพืช การถูกทำลาย โดยศัตรูพืชตามธรรมชาติ วัน/เดือน/ปีที่สำรวจ

2) ศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน นับเมล็ด จำนวน 100 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร ที่บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา จำนวน 10 ซ้ำ นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิห้อง

บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน ในระยะเวลา 30 วัน หรือจนเมล็ดงอกหมด



3) การงอกในสภาพเรือนทดลอง

นำเมล็ดเทียนนาที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วนับเมล็ดที่ จำนวน 100 เมล็ด โรยในกระถาง เส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงขอบล่างของกระถาง จำนวน 10 กระถาง รดน้ำให้ ความชื้นทุกวัน

บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน นาน 30 วัน หรือจนกว่าเมล็ดงอกหมด

4) การเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ต้นวัชพืชจำนวน 1 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 2 ต้นวัชพืชจำนวน 3 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 3 ต้นวัชพืชจำนวน 5 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 4 ต้นวัชพืชทั้งหมดที่งอก

หว่านเมล็ดเทียนนา จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง จำนวน กรรมวิธีต่างๆ ตามกรรมวิธีของ ศิริพร และคณะ (2558)

บันทึกข้อมูล ความสูงต้น จำนวนกิ่ง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ติดผล จำนวนผลต่อต้น และ จำนวนเมล็ดต่อผลของพืชแต่ละต้นในแต่ละกระบะ

5) ความสามารถในการขยายพันธุ์ จากส่วนของต้น

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ 3 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ปักชำชิ้นส่วนจากโคนต้น

กรรมวิธีที่ 2 ปักชำชิ้นส่วนจากกลางต้น

กรรมวิธีที่ 3 ปักชำชิ้นส่วนจากปลายยอด

หว่านเมล็ดวัชพืช จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง เมื่อต้นมี อายุ 1 เดือน ถอนและนำชิ้นส่วนเหนือดินของวัชพืชมาตัดแบ่งเป็นท่อนๆ ละ 5-10 เซนติเมตร เป็นท่อน พันธ์ุสำหรับปักชำ แยกท่อนพันธ์ุออกตามระยะห่างจากโคน ได้แก่ ท่อนโคน กลางต้น และปลายยอด นำมาปักชำในกระถางขนาด 12 นิ้ว กระถางละ 10 ท่อน จำนวน 10 ซ้ำ

บันทึกข้อมูล การแตกยอดใหม่ จากกิ่งที่ปักชำ ทุกสัปดาห์

6) ศึกษาการงอกของเมล็ดที่ความลึกของระดับดินระดับต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 วางเมล็ดบนผิวดิน



- กรรมวิธีที่ 2 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร
- กรรมวิธีที่ 3 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร
- กรรมวิธีที่ 4 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร
- กรรมวิธีที่ 5 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 20 เซนติเมตร
- กรรมวิธีที่ 6 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 25 เซนติเมตร

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูง 45 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด โรยลงให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงระดับห่างจากขอบบนของกระถาง 5 เซนติเมตร

บันทึกข้อมูล ความงอกของเมล็ดที่งอกโดยเปรียบเทียบในแต่ละกรรมวิธี

เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่าง ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 (ระยะเวลา 2 ปี) ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ พื้นที่นาข้าว และพื้นที่ทำการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

การสำรวจและเก็บตัวอย่างต้น และเมล็ดเหียนนา โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในนาข้าว และสำรวจเพิ่มเติมในพื้นที่การเกษตรอื่นๆ ที่มีความชุ่มชื้น พบเหียนนาในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เพชรบุรี เพชรบูรณ์ กาญจนบุรี กำแพงเพชร จันทบุรี ชัยนาท ตราด ตาก นครพนม นครราชสีมา นครสวรรค์ น่าน ประจวบคีรีขันธ์ พระนครศรีอยุธยา พิจิตร พิษณุโลก ระยอง ลพบุรี ลำปาง ลำพูน สิงห์บุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี อ่างทอง อุทัยธานี และอุบลราชธานี ได้ตัวอย่างเหียนนา จำนวน 80 ตัวอย่าง และเมล็ดแห้ง เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์วัชพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ (Figure 1) (Table 1)

จากการสำรวจมีพื้นที่เป้าหมายเป็นนาข้าว และยังพบในพื้นที่การเกษตรอื่นที่มีลักษณะมีความชื้นสูง หรือเกษตรกรให้น้ำในปริมาณมาก ส่วนใหญ่พบในแปลงพืชผัก เช่น พริก มะเขือ และพริกไทย หรือแปลงพืชไร่ที่ทำการเพาะปลูกหลังการทำนา เช่น ถั่วเหลือง หรือแปลงพืชไร่ที่มีความชุ่มชื้น เช่น สับปะรดที่ปลูกในสวนยางพารา

2) ศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ

หลังจากทดสอบความงอกในสภาพห้องปฏิบัติการ เป็นระยะเวลา 4 เดือน หลังเริ่มทดสอบพบว่า เมล็ดเหียนนามีความงอกเฉลี่ย 55.2 เปอร์เซ็นต์ เริ่มงอกครั้งแรกเพียง 2 วันหลังเพาะเมล็ด



และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุดในช่วง 2-4 วันหลังเพาะเมล็ด เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด 74 เปอร์เซ็นต์ ต่ำสุด 29 เปอร์เซ็นต์ โดยเมล็ดที่เก็บจากบางพื้นที่สามารถงอกได้ช้าสุดที่ระยะ 102 วันหลังเพาะ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดมีการพักตัว (Figure 2 and 3) (Table 2)

3) การงอกในสภาพเรือนทดลอง

หลังจากทดสอบความงอกในสภาพเรือนทดลอง เป็นระยะเวลา 4 เดือน หลังเริ่มทดสอบพบว่า เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 20.7 เปอร์เซ็นต์ เริ่มงอกครั้งแรก 4 วันหลังเพาะเมล็ด เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด 39 เปอร์เซ็นต์ ต่ำสุด 2 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4 and 5) (Table 2)

4) การเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด

ความสูง พบว่า เทียนนาในกรรมวิธีมีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอกในระยะ 3 สัปดาห์แรกหลังงอกมีความสูงมากกว่ากรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ แต่หลังจาก 4 สัปดาห์เป็นต้นไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยวที่ต้นเริ่มแห้งตายมีความสูงน้อยกว่า โดยข้อมูลในระยะเก็บเกี่ยว พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ มีความสูงต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่าง 39.4-50.4 เซนติเมตร มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีความสูง 21.4 เซนติเมตร (Figure 6) (Table 3)

ขนาดทรงพุ่ม พบว่า เทียนนาในกรรมวิธีมีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอกในระยะ 3 สัปดาห์แรกหลังงอกมีขนาดทรงพุ่มมากกว่ากรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ แต่หลังจาก 4 สัปดาห์เป็นต้นไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยวที่ต้นเริ่มแห้งตายมีขนาดทรงพุ่มน้อยกว่า โดยข้อมูลในระยะเก็บเกี่ยว พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1 ต้นต่อกระบะ มีขนาดทรงพุ่มใหญ่ที่สุด มีขนาด 48.8 เซนติเมตร ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก 3 ต้นต่อกระบะ ที่มีขนาด 35.5 เซนติเมตร แต่มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก 5 ต้นต่อกระบะ ที่มีขนาด 28.2 เซนติเมตร โดยกรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ มีความกว้างทรงพุ่มมากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีความสูง 12.9 เซนติเมตร (Table 3)

จำนวนกิ่งต่อต้น พบว่า เทียนนาในกรรมวิธีมีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอกในระยะ 2 สัปดาห์แรกหลังงอกมีจำนวนกิ่งไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ แต่หลังจาก 4 สัปดาห์เป็นต้นไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยวที่ต้นเริ่มแห้งตายมีจำนวนกิ่งน้อยกว่า โดยข้อมูลในระยะเก็บเกี่ยว พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ มีจำนวนกิ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่าง 13.8-16.8 กิ่งต่อต้นมากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีจำนวนกิ่ง 4.2 กิ่งต่อต้น (Table 3)



จำนวนฝักต่อต้น พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ มีจำนวนฝักไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่าง 247.9-436.0 ฝักต่อต้น มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีจำนวนฝัก 43.7 ฝักต่อต้น (Table 3)

จำนวนเมล็ดต่อต้น พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ มีจำนวนเมล็ดไม่แตกต่างกันทางสถิติ อยู่ระหว่าง 33,211.9-58,424.0 เมล็ดต่อต้น มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีจำนวนฝัก 5,858.1 เมล็ดต่อต้น (Table 3)

น้ำหนักสด พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1 ต้นต่อกระบะ มีน้ำหนักสดมากที่สุด 30.1 กรัมต่อต้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก 3 ต้นต่อกระบะ ที่มีน้ำหนัก 16.9 กรัมต่อต้น แต่มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก 5 ต้นต่อกระบะ และกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีน้ำหนักระหว่าง 2.5-10.2 กรัมต่อต้น (Table 3)

น้ำหนักแห้ง พบว่า กรรมวิธีที่ปลูก 1 ต้นต่อกระบะ มีน้ำหนักแห้งมากที่สุด 10.1 กรัมต่อต้น มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูก 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ และกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก ที่มีน้ำหนักแห้งระหว่าง 0.9-5.2 กรัมต่อต้น (Table 3)

วงจรชีวิตของเทียนนา หลังหว่านเมล็ดเทียนนาและให้น้ำพบว่าเมล็ดเทียนนางอกในระยะเวลา 3-5 วัน ออกดอกที่ระยะ 30-44 วันหลังงอก ตัดฝักที่ระยะ 14-21 วันหลังออกดอก เมล็ดแก่ที่ระยะ 14-21 วัน หลังตัดฝัก และเทียนนาเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่มีการเจริญเติบโต ที่ระยะ 74-102 วันหลังเมล็ดชุดแรกสุกแก่ ซึ่งมีวงจรชีวิตตั้งแต่เริ่มงอกจนแห้งตายโดยเฉลี่ย 162 วัน (Figure 8)

จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าเทียนนาที่เจริญเติบโตโดยไม่มีการแข่งขันหรือมีการแข่งขันน้อยสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าในสภาพการแข่งขัน มีองค์ประกอบผลผลิตที่มากกว่าซึ่งทำให้ในสภาพธรรมชาติพบเทียนนาในปริมาณมากถึงแม้มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ต่ำ แต่ด้วยมีจำนวนเมล็ดที่ผลิตได้ในปริมาณที่มากจึงพบมีการแพร่กระจายได้ดี

5) ความสามารถในการขยายพันธุ์ จากส่วนของต้น

จากการทดลองพบว่า ขึ้นส่วนต้นของเทียนนาทุกส่วนที่มีตาสามารถแตกยอดใหม่ได้ทุกส่วน แต่ในสภาพเรือนทดลองเทียนนาไม่สามารถเจริญเติบโตจนออกดอกและติดเมล็ดได้ อาจเนื่องจากสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม มีความชื้นไม่เพียงพอ และจากการทดลองเพิ่มเติมโดยฝังขึ้นส่วนของลำต้นเทียนนาทุกส่วนใต้ดินลึก 5 เซนติเมตร ไม่พบการแตกตาใหม่ และที่ระยะ 30 วันหลังปักชำ พบว่า ขึ้นส่วนมีลักษณะเน่าและ แสดงให้เห็นว่าในการไถพรวนพื้นที่ก่อนการทำการเกษตรให้ดินฝังกลบต้นเทียนนาจะสามารถทำให้ต้นตายได้ (Table 4)



6) ศึกษาการงอกของเมล็ดที่ความลึกของระดับดินระดับต่างๆ

จากการทดลองพบว่า การเพาะเมล็ดโดยโรยเมล็ดบนผิวดินมีเปอร์เซ็นต์ความงอกมากที่สุด 27.63 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเมล็ดที่ระดับ 5, 10, 15, 20 และ 25 เซนติเมตร แสดงให้เห็นว่าเมล็ดเทียนนาหาถูกไถพลิกดินที่ระยะ 5 เซนติเมตรขึ้นไปจะสามารถยับยั้งความงอกของเทียนนาได้ (Table 5)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจเทียนนาในพื้นที่นาข้าวและพื้นที่ทำการเกษตรอื่นๆ พบเทียนนาในพื้นที่ 27 จังหวัด พบ และได้ตัวอย่างเทียนนา จำนวน 80 ตัวอย่าง และเมล็ดแห้ง เก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์วัชพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ โดยเมล็ดเทียนนามีความงอกในห้องปฏิบัติการเฉลี่ย 55.0 เปอร์เซ็นต์ ความงอกสูงที่สุด 74 เปอร์เซ็นต์ ต่ำที่สุด 29.0 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดที่เก็บจากบางพื้นที่สามารถงอกได้ที่ระยะ 102 วันหลังทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดมีการพักตัว และการงอกในสภาพเรือนทดลอง เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 20.7 เปอร์เซ็นต์ ความงอกสูงที่สุด 39 เปอร์เซ็นต์ ต่ำที่สุด 2.0 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตทั้งความสูง ขนาดทรงพุ่ม จำนวนแขนง จำนวนฝัก และการผลิตเมล็ด ในจำนวนต้น 1, 3 และ 5 ต้นต่อตารางเมตร มีค่ามากกว่าสภาวะแข่งขันสูงที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก โดยเทียนนา 1 ต้นที่เจริญเติบโตได้อย่างสมบูรณ์ครบวงจรชีวิตโดยเฉลี่ย 162 วัน สามารถผลิตเมล็ดได้มากถึง 58,424.00 เมล็ดต่อต้น ซึ่งมากกว่าต้นที่เจริญเติบโตในสภาวะแข่งขันสูงที่มีจำนวนเมล็ดเพียง 5,858 เมล็ดต่อต้น เมล็ดเทียนนาสามารถงอกได้ดีที่ระดับผิวดินลึกไม่เกิน 5 เซนติเมตร เท่านั้น และยังสามารถขยายพันธุ์ได้โดยใช้กิ่งปักชำ แต่หากส่วนของลำต้นถูกฝังกลบใต้ดินก็สามารถทำให้เทียนนาตายได้ ในสภาพพื้นที่เกษตร หากเกษตรกรต้องการควบคุมเทียนนาตั้งแต่เริ่มควรทำการไถพรวน ฝังกลบเทียนนาทั้งต้นและเมล็ดให้มีความลึกมากกว่า 5 เซนติเมตร ก็จะควบคุมการงอกของเทียนนาได้ โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีกำจัดวัชพืช

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ พนักงานและจ้างเหมา ของกลุ่มวิจัยวัชพืช ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

วิรัช จันทรศรีมี ช่อม เปรมัชเชียร ทวี แสงทอง จันทรเพ็ญ ประคองวงศ์ ไชยยศ สุพัฒนกุล มาลี ณ นคร สุรินทร์
ทา เพ็ญสุด ศรีสม สุวรรณวงศ์ ศิริพร ชิงสนธิพร. 2547. *วัชพืชสามัญภาคกลาง*. สมาคมวิทยาการ
วัชพืชแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 135 หน้า.



- Begum, M., Juraimi, A.S., Azmi, M., Omar, S.R.S. and A. Rajan. 2008. *Soil seedbank of the Muda rice granary in north-west Peninsular Malaysia invaded by the weed Fimbristylis miliacea (L.) Vahl*. Plant Protection Quarterly Journal. 23(4): 157-161. (Online). Available. <http://www.weedinfo.com.au> (March 9, 2018).
- Ferrer, P.P. and E. Laguna. 2009. [English title not available]. (Sobre *Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Exell (Onagraceae) como integrante de la flora subespontánea valenciana.) *acta botanica malacitana J.* 34: 228-230.
- Ferrer, P.P., E. Laguna, F. Collado-Rosique and A. Vizcaíno-Matarredona. 2009. About *Murdannia spirata* (L.) Brückn. (Commelinaceae), a new non-native species in the European flora. (Sobre *Murdannia spirata* (L.) Bruckn. (Comelinaceae), nueva especie alóctona en la flora Europea.) *Anales de Biología J.* 31: 117-120.
- Gordon, E. and D. Valk AGvan. 2003. Secondary seed dispersal in *Montrichardia arborescens* (L.) Schott dominated wetlands in Laguna Grande, Venezuela. *Plant Ecology J.* 168(2): 177-190.
- Holm, L.G., Doll J., Holm E., Pancho J.V. and J.P. Herberger. 1997. *World Weeds: Natural Histories and Distribution*. New York, USA: John Wiley & Sons Inc. 1,115 p.



Table 1 Locations of *Ludwigia hyssopifolia*.

| Plant | Tambon | District | Province | latitude (N) | longitude (E) |
|--------------|----------------|---------------------|--------------------------|--------------|---------------|
| Eggplant | Chang Khoeng | Mae Chaem | Chiang Mai | 18.491435 | 98.375353 |
| Soybean | San Pong | Mae Rim | Chiang Mai | 18.959458 | 98.969659 |
| | Mae Win | Mae Wang | Chiang Mai | 18.627917 | 98.507390 |
| Soybean | Ki Lek | Mae Rim | Chiang Mai | 18.974370 | 98.956123 |
| Rice | San Pong | Mae Rim | Chiang Mai | 18.969111 | 98.000000 |
| Rice | Yuwa | San Pa Tong | Chiang Mai | 18.632048 | 98.891930 |
| Rice | Ban Mae | San Pa Tong | Chiang Mai | 18.600824 | 98.860570 |
| Soybean | Pa Sang | Mae Chan | Chiang Rai | 20.187009 | 99.864823 |
| Lemon | Rong Khe | Ban Lat | Phetchaburi | 13.069172 | 99.890011 |
| Chilli | Sado Phong | Khao Kho | Phetchabun | 16.583499 | 100.956029 |
| Eggplant | Nong Khwai | Lom Sak | Phetchabun | 16.760766 | 101.247407 |
| Jackfruit | Sai Yok | Sai Yok | Kanchanaburi | 14.486522 | 98.846164 |
| Chilli | Tha Lo | Tha Muang | Kanchanaburi | 13.988194 | 99.566528 |
| Rice | Khlong Nam Lai | Khlong Lan | Kamphaeng Phet | 16.222338 | 99.362157 |
| Rice | Saen To | Khanu Worakabsaburi | Kamphaeng Phet | 16.063062 | 99.847397 |
| Pineapple | Khao Kaeo | Tha Mai | Chanthaburi | 12.820273 | 101.911452 |
| Pineapple | Khao Kaeo | Tha Mai | Chanthaburi | 12.839515 | 101.951148 |
| Black pepper | Khao Kaeo | Tha Mai | Chanthaburi | 12.851570 | 101.955520 |
| Black pepper | Khao Kaeo | Tha Mai | Chanthaburi | 12.851776 | 101.954845 |
| Rice | Wang Kai Thuan | Hankha | Chai Nat | 14.970390 | 100.068358 |
| Jackfruit | Pranit | Khao Samin | Trat | 12.479897 | 102.386137 |
| Jackfruit | Pranit | Khao Samin | Trat | 12.479863 | 102.386075 |
| Pineapple | Saen Tung | Khao Samin | Trat | 12.427363 | 102.377800 |
| Soybean | Thong Fa | Ban Tak | Tak | 17.082653 | 98.838195 |
| Dragon fruit | Saen Samran | Pla Pak | Nakhon Phanom | 17.249645 | 104.661018 |
| Dragon fruit | Nong Yang | Pak Chong | Nakhon Ratchasima | 14.743840 | 101.365200 |
| Dragon fruit | Nong Phak Sen | Pak Chong | Nakhon Ratchasima | 14.765638 | 101.337830 |
| Dragon fruit | Klang Dong | Pak Chong | Nakhon Ratchasima | 14.626649 | 101.331011 |
| Rice | Chong Khae | Takhli | Nakhon Sawan | 15.1866903 | 100.435968 |
| Rice | Chong Khae | Takhli | Nakhon Sawan | 15.1726483 | 100.435266 |
| Rice | Chong Khae | Takhli | Nakhon Sawan | 15.195307 | 100.428925 |
| Chilli | Kong Khwai | Mueang | Nan | 18.674167 | 100.752842 |
| Rice | San | Wiang Sa | Nan | 18.511990 | 100.764800 |
| Jackfruit | SalaLai | Sam Roi Yot | Prachuap Khiri Khan | 12.288432 | 99.766160 |
| Jackfruit | SalaLai | Sam Roi Yot | Prachuap Khiri Khan | 12.269999 | 99.809110 |
| Rice | Bang Pradaeng | Bang Pa-in | Phra Nakhon Si Ayutthaya | 14.265969 | 100.533431 |



Table 1 Locations of *Ludwigia hyssopifolia*. (continue)

| Plant | Tambon | District | Province | latitude (N) | longitude (E) |
|-----------|---------------|------------------|------------------|--------------|---------------|
| Rice | Wat Khwang | Pho Thale | Phichit | 16.149308 | 100.288375 |
| Chilli | Bang Krathum | Bang Krathum | Phitsanulok | 16.569264 | 100.285408 |
| Chilli | Bang Krathum | Bang Krathum | Phitsanulok | 16.569999 | 100.284606 |
| Chilli | Bang Krathum | Bang Krathum | Phitsanulok | 16.562470 | 100.278258 |
| Chilli | Bang Krathum | Bang Krathum | Phitsanulok | 16.562952 | 100.278147 |
| Jackfruit | Wang Nok Aen | Wang Thong | Phitsanulok | 16.842728 | 100.752941 |
| Eggplant | Bang Krathum | Bang Krathum | Phitsanulok | 16.566102 | 100.284091 |
| Chilli | Wang Nok Aen | Wang Thong | Phitsanulok | 16.8199923 | 100.785705 |
| Rice | Wang Nok Aen | Wang Thong | Phitsanulok | 16.81898739 | 100.779360 |
| Rice | Wang Yang | Noen Maprang | Phitsanulok | 16.445253 | 100.706551 |
| Pineapple | Wang Wa | Klaeng | Rayong | 12.781507 | 101.615511 |
| Pineapple | Ban Na | Klaeng | Rayong | 12.843108 | 101.674336 |
| Chilli | Nong Bua | Phatthana Nikhom | Lopburi | 14.875300 | 101.017320 |
| Soybean | Na Pong | Thoen | Lampang | 17.677849 | 99.071161 |
| Rice | Sala | Ko Kha | Lampang | 18.172634 | 99.406438 |
| Rice | Pa Sang | Pa Sang | Lamphun | 18.493001 | 98.945096 |
| Rice | Ban Ruean | Pa Sang | Lamphun | 18.502300 | 98.885327 |
| Rice | Thon Samo | Tha Chang | Sing Buri | 14.750967 | 100.383274 |
| Rice | Na Thung | Sawankhalok | Sukhothai | 17.309992 | 99.727370 |
| Rice | Nong Phak Nak | Sam Chuk | Suphan Buri | 14.734532 | 100.066459 |
| Rice | Chaeng Ngam | Nong Ya Sai | Suphan Buri | 14.825008 | 99.847892 |
| Rice | Si Bua Thong | Sawaeng Ha | Ang Thong | 14.796371 | 100.241050 |
| Rice | Wang Nam Yen | Sawaeng Ha | Ang Thong | 14.713404 | 100.221708 |
| Rice | Thung Pho | Nong Chang | Uthai Thani | 15.396673 | 99.746281 |
| Rice | Thung Pho | Nong Chang | Uthai Thani | 15.395430 | 99.745542 |
| Rice | Kham Wa | Tan Sum | Ubon Ratchathani | 15.408398 | 105.22102 |
| Rice | Huai Yang | Khong Chiam | Ubon Ratchathani | 15.455434 | 105.484849 |



Table 2 The germinations of *Ludwigia hyssopifolia*.

| Percent of germinations | In Laboratory | In House |
|-------------------------|---------------|----------|
| Max | 74.0 | 39.0 |
| Min | 29.0 | 2.0 |
| Average | 55.0 | 20.7 |

Table 3 Growth of *Ludwigia hyssopifolia*.

| Treatment | Hight of Tree | Canopy of Tree | Branch of Tree | Pod/Tree | Seed /tree | Fresh weight | Dry Weight |
|-----------|----------------------|----------------|----------------|----------|------------|--------------|------------|
| 1 Tree | 50.4 a ^{1/} | 48.8 a | 16.8 a | 436.0 a | 58,424.0 a | 30.1 a | 10.1 a |
| 3 Tree | 42.9 a | 35.5 ab | 15.8 a | 336.7 a | 45,113.3 a | 16.9 ab | 5.2 b |
| 5 Tree | 39.4 a | 28.2 b | 13.8 a | 247.9 a | 33,211.9 a | 10.2 b | 3.4 b |
| All | 21.4 b | 12.9 c | 4.2 b | 43.7 b | 5,858.1 b | 2.5 b | 0.9 b |
| C.V. (%) | 24.8 | 29.6 | 24.1 | 46.7 | 43.0 | 69.2 | 62.3 |

^{1/} Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.



Table 4 Percent of new shoot.

| Treatment | cuttings on the ground | underground cuttings |
|----------------------|------------------------|----------------------|
| base of the plant | 70.0 | 0.0 |
| central of the plant | 70.0 | 0.0 |
| tip of the plant | 70.0 | 0.0 |

Table 5 Seed germination at different levels.

| Treatment | Percent of germinations |
|---------------------------|-------------------------|
| Upper soil | 27.63 a ^{1/} |
| Under soil 5 centimeters | 0.00 b |
| Under soil 10 centimeters | 0.00 b |
| Under soil 15 centimeters | 0.00 b |
| Under soil 20 centimeters | 0.00 b |
| Under soil 25 centimeters | 0.00 b |
| C.V. (%) | 38.76 |

^{1/} Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.





Figure 1 Habitat of *Ludwigia hyssopifolia*. 1) tree 2) flower and 3) fruit



Figure 2 Germination test in laboratory 1) petri dish for germination test
2) germinated seeds

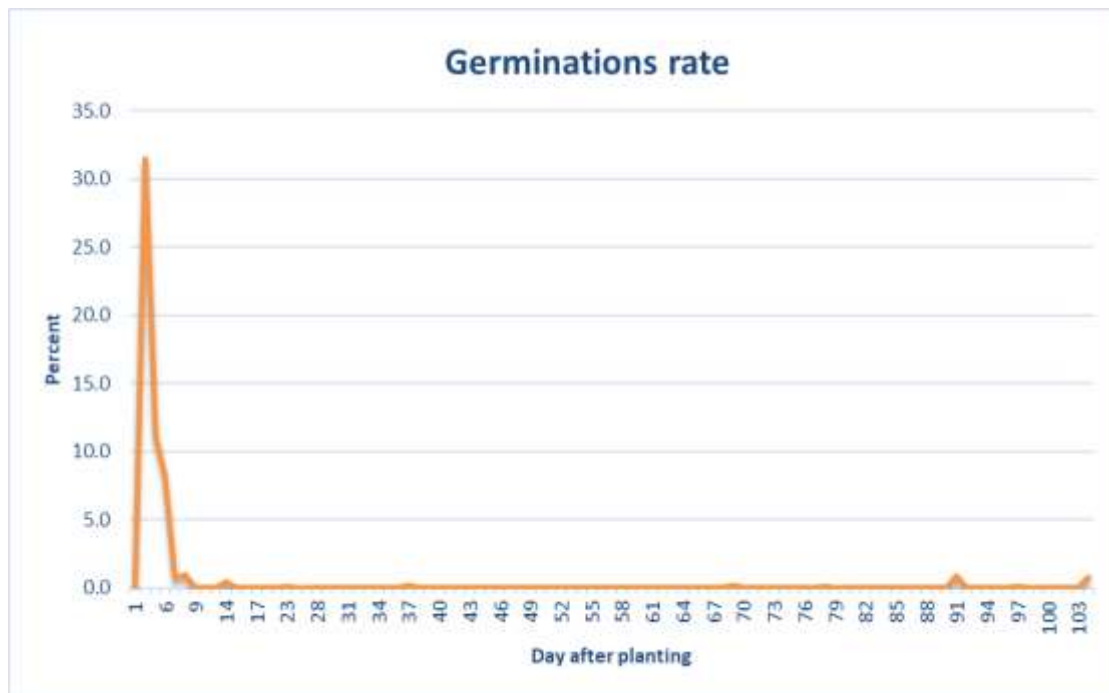


Figure 3 Germination rate in laboratory



Figure 4 Germination test in house 1) flowerpot for germination test 2) seedling

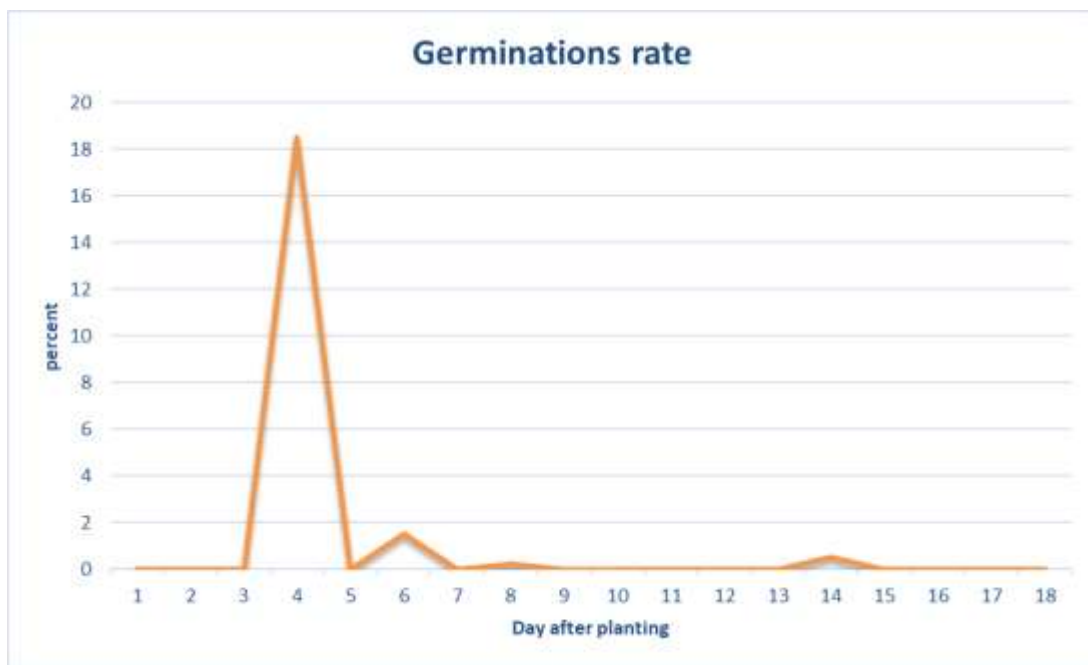


Figure 5 Germination rate in house



Figure 6 Experimental plot of *Ludwigia hyssopifolia*. 1) experimental plot
2) seedling 3) and 4) tree

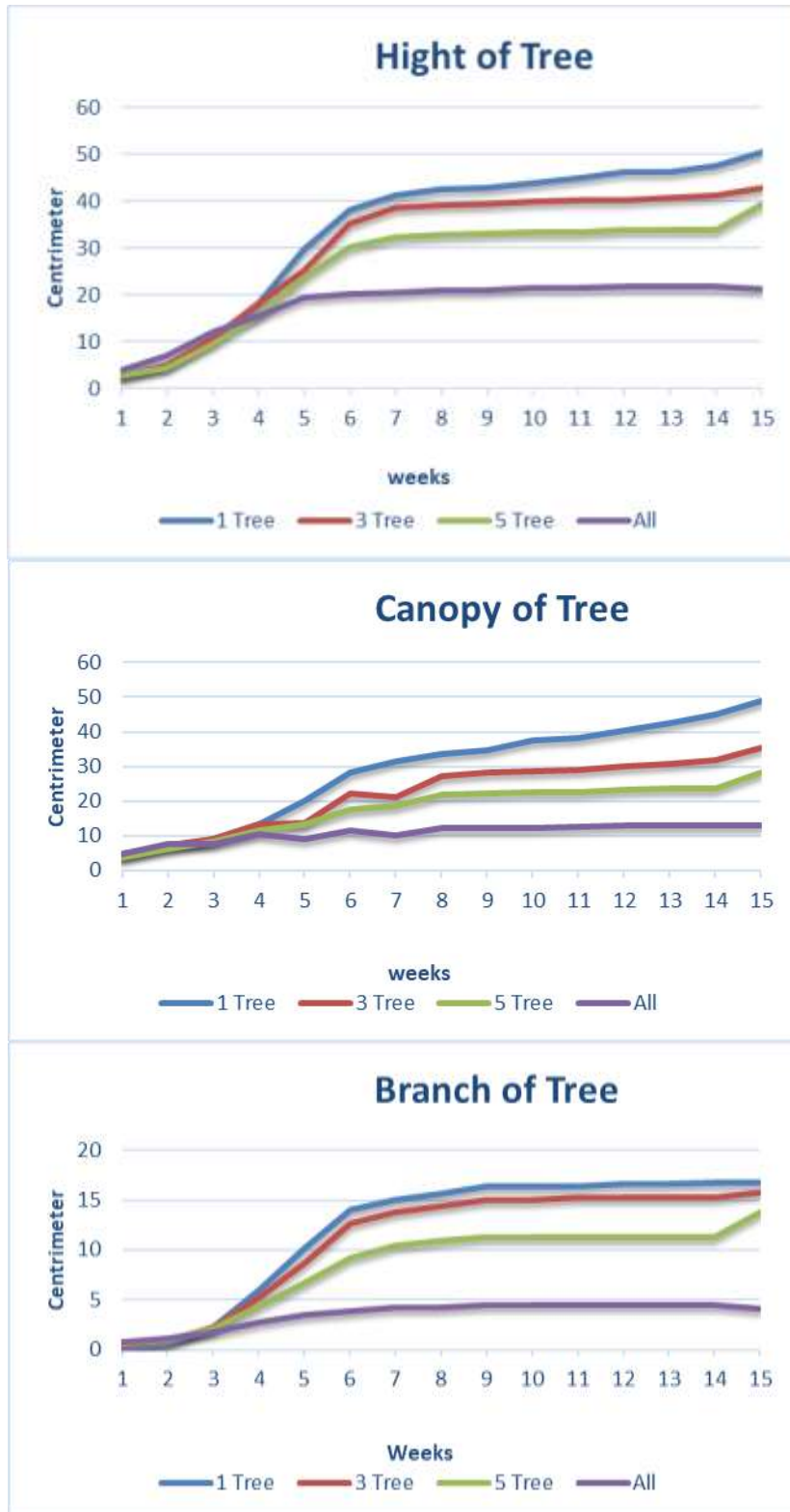


Figure 7 Growth of *Ludwigia hyssopifolia*



Figure 8 Life cycle of *Ludwigia hyssopifolia*

การศึกษานิตแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini (Diptera: Tephritidae)

ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Molecular Identification of fruit fly in Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae)
using DNA Barcode

ยุวรินทร์ บุญทบ จารุวัฒน์ แท้กุล ชมัยพร บัวมาศ

เกศสุดา สนศิริ สุนัดดา เขาวลิต

กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The Dacini is not only one of the most species-rich clades within the dipteran family Tephritidae. It is also one of most serious groups of horticultural pests and thus of particular biosecurity/quarantine concern. Dacini are notoriously difficult to identify by morphological characters. Molecular approaches, such as DNA ‘barcoding’ of the cytochrome c oxidase (*cox1*) gene, are commonly proposed to overcome this issue. Fresh material of Dacini were collected from all regions of Thailand. Sequences were analyzed using a ‘barcode’ approach. Species were identified using standard nucleotide BLAST from GENBANK. Twenty species of Dacini were confirmed and their sequences deposited in Genbank: *Dacus* (1 species): *Dacus longicornis* Wiedemann; *Bactrocera* (10 species): *Bactrocera albistrigata* de Meijere, *B. carambolae* Drew & Hancock, *B. correcta* (Bezzi), *B. dorsalis* Hendel, *B. latifrons* (Hendel), *B. limbifera* (Bezzi), *B. nigrotibialis* (Perkins), *B. tuberculata* (Bezzi), *B. umbrosa* (Fabricius), *B. zonata* (Saunders); and *Zeugodacus* (9 species): *Zeugodacus apicalis* (de Meijere), *Z. caudatus* (Fabricius), *Z. cilifer* (Hendel), *Z. cucurbitae* (Coquillett), *Z. diversa* (Coquillett), *Z. hochii* (Zia), *Z. incisus* (Walker), *Z. isolatus* (Hardy), *Z. platamus* (Hardy) and *Z. tau* (Walker). A molecular phylogeny of these 20 Dacini was generated using *cox1* genes. Maximum Likelihood and Bayesian analysis analyses were used to investigate patterns of clustering of sequences with sequences of other pest species of fruit flies. Analyses of sequences gave consistent results. *Cox1* gene proved effective in resolving *Zeugodacus* and *Dacus* from *Bactrocera* fruit fly species. The phylogeny shows that *Zeugodacus* clade is more closely related to *Dacus* rather than *Bactrocera*. This result supports raising *Zeugodacus* to genus level.

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-15-62



This study provides basic information on the number of species of fruit flies of the tribe Dacini present in Thailand. *Cox1* sequences were demonstrated as effective in identifying Thai Dacini even from partial barcodes. Thus, we recommend that diagnostic and quarantine laboratories use the *cox1* gene for the accurate identification of Dacine species.

Keywords : Dacini fruit fly, identification, DNA barcoding, phylogenetics

บทคัดย่อ

แมลงวันผลไม้เฝ้า (tribe) Dacini เป็นเฝ้าที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดของแมลงวันผลไม้ในวงศ์ Tephritidae ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรอย่างสูงส่งผลกระทบต่อความกังวลใจด้าน กักกันพืช และความปลอดภัยทางชีวภาพ แมลงวันผลไม้เฝ้า Dacini มีรูปร่างลักษณะภายนอกที่ ใกล้เคียงกันมากยากต่อการจำแนกชนิด การใช้เทคนิคชีวโมเลกุล โดยการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) จากยีน cytochrome c oxidase (*cox1*) นั้นสามารถช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ เก็บตัวอย่าง แมลงวันผลไม้จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย สกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง *cox1* และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (standard nucleotide BLAST) พบว่าสามารถยืนยันชนิดและบันทึกในฐานข้อมูล Genbank ได้ 20 ชนิด ได้แก่ แมลงวัน ผลไม้สกุล *Dacus* (1 ชนิด): *Dacus longicornis* Wiedemann; แมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* (10 ชนิด): *Bactrocera albistrigata* de Meijere, *B. carambolae* Drew & Hancock, *B. correcta* (Bezzi), *B. dorsalis* Hendel, *B. latifrons* (Hendel), *B. limbifera* (Bezzi), *B. nigrotibialis*, (Perkins), *B. tuberculata* (Bezzi), *B. umbrosa* (Fabricius), *B. zonata* (Saunders); และ แมลงวันผลไม้สกุล *Zeugodacus* (9 ชนิด): *Zeugodacus apicalis* (de Meijere), *Z. caudatus* (Fabricius), *Z. cilifer* (Hendel), *Z. cucurbitae* (Coquillett), *Z. diversa* (Coquillett), *Z. hochii* (Zia), *Z. incisus* (Walker), *Z. isolatus* (Hardy), *Z. platamus* (Hardy) และ *Z. tau* (Walker) การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้เฝ้า Dacini จำนวน 20 ชนิด มาวิเคราะห์ด้วย maximum likelihood และ Bayesian analysis พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน ยีน *cox1* แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการแก้ปัญหาของ *Zeugodacus* และ *Dacus* จาก *Bactrocera* โดยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่า *Zeugodacus* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Dacus* มากกว่า *Bactrocera* ซึ่งผลที่ได้นี้สามารถใช้สนับสนุนในการยกระดับของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Zeugodacus* การศึกษานี้ให้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับจำนวนชนิดของแมลงวันผลไม้เฝ้า Dacini ในประเทศไทย และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* ได้รับการพิสูจน์ว่ามีประสิทธิภาพในการระบุชนิดของแมลงวันผลไม้เฝ้า Dacini แม้ใช้จาก



บาร์โค้ดบางส่วน ดังนั้นสามารถนำยีน *cox1* ไปใช้ในห้องปฏิบัติการวินิจฉัยศัตรูพืชและงานด้านกักกันศัตรูพืชเพื่อระบุชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า *Dacini* ได้อย่างถูกต้อง

คำหลัก : แมลงวันผลไม้ *Dacini* การจำแนกชนิด ดีเอ็นเอบาร์โค้ด ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

คำนำ

การจำแนกชนิดของศัตรูพืชให้ถูกต้องเพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์นั้นเป็นพื้นฐานสำคัญของงานวิจัยทางชีววิทยาขั้นพื้นฐานและการประยุกต์ ต่าง ๆ เช่น งานด้านกักกันพืช และการเฝ้าระวังศัตรูพืชรุกราน ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าวิธีการทางสัณฐานวิทยาแบบดั้งเดิมไม่เพียงพอในการจำแนกศัตรูพืชที่มีลักษณะรูปร่างใกล้เคียงกันมาก ปัจจุบันจึงมีการศึกษาอนุกรมวิธานแบบผสมผสาน (integrative taxonomy) ซึ่งเป็นการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ เช่น การศึกษาด้านสัณฐานวิทยา (morphological character) และด้านพันธุกรรม (molecular character) มาร่วมในการศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ยากต่อการจำแนกชนิด เช่น แมลงวันผลไม้ (Boontop, 2016)

แมลงวันผลไม้ (true fruit flies) จัดเป็นแมลงศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก เนื่องจากเข้าทำลายผัก ผลไม้ได้มากมายหลากหลายชนิด ทำให้ผักผลไม้เน่าเสียก่อนการเก็บเกี่ยว สร้างความเสียหายมากต่อการทำการเกษตร แต่แมลงวันผลไม้ในเผ่า (*tribe*) *Dacini* นั้นเป็นศัตรูพืชสำคัญในประเทศเขตร้อน และร้อนชื้น สามารถเข้าทำความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตทางการเกษตร จากการสำรวจพบว่าทั่วโลกมีแมลงวันผลไม้เผ่า *Dacini* มากกว่า 932 ชนิดที่เป็นศัตรูพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ (Doorenweerd *et al.*, 2018) และในทวีปเอเชียนี้พบว่ามีแมลงวันผลไม้เผ่า *Dacini* ในสกุล *Dacus* Fabricius สกุล *Bactrocera* Macquart และสกุล *Zeugodacus* Hendel เข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตรสร้างความเสียหายในเชิงปริมาณและมูลค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Krosch *et al.*, 2012)

ปัจจุบันประเทศไทยมีการศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้บางชนิด (Boontop *et al.*, 2021) แต่พบว่าแมลงวันผลไม้เผ่า *Dacini* ตัวเต็มวัยนั้นมีความแปรผันของรูปร่างลักษณะภายนอก ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดให้ถูกต้อง และแม่นยำ (Cameron *et al.*, 2010; Schutze *et al.*, 2012) การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีต่าง ๆ ที่น่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับในระดับสากลมาร่วมใช้จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ที่มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเมื่อทราบชนิดที่ถูกต้องของแมลงวันผลไม้ ทำให้ทราบการแพร่กระจายและชนิดพืชอาหารที่ถูกต้อง สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ แนวทางในการป้องกัน และควบคุมกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงเป็นการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ ด้วยลักษณะสัณฐาน ร่วมกับการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) และการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetics) เพื่อนำข้อมูลด้านดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากการศึกษาค้นคว้ามาจัดทำฐานข้อมูลชนิดของแมลงวันผลไม้ที่มีในประเทศไทยให้มีมาตรฐานทัดเทียมสากล สร้างความน่าเชื่อถือในการเจรจาการค้าส่งออกสินค้าเกษตรของไทยได้หลากหลายชนิด



วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd, Switzerland) พร้อมกล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- เครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation XR) รุ่น Universal Hood II (Biorad, USA)
- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง (ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติกกับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) จาก Bugs for Bugs Pty Ltd, Australia สารฟีโรโมนล่อแมลงวันผลไม้ ได้แก่ เมทิล ยูจีนอล (Methyl Eugenol) คิวลัวร์ (CUE lure) และลาติลัวร์ (Lati lure) รวมทั้งโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) สำหรับรักษาคุณภาพของแมลงวันผลไม้ระหว่างติดกับดักไว้ในแปลงสำรวจ
- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit) (Bioline, Australia), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Bioline, Australia), Agarose gel (Bioline, Australia) และ TBE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), สารละลาย GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)
- สารเคมี RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) และไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

วิธีการ

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากพื้นที่การเกษตร โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้) โดยเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างภูมิภาคละ 3 จังหวัด (Figure 1) ใช้กับดักล่อแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก ซึ่งประกอบด้วยสารล่อ (pheromone) แมลงวันผลไม้ 3 ประเภท ได้แก่ เมทิลยูจีนอล (Methyl Eugenol) คิวลัวร์ (CUE lure) และลาติลัวร์ (Lati lure) ผสมสารฆ่าแมลง malathion ในอัตราส่วน 4 : 1 และภายในกับดักบรรจุสารโพรไพลีนไกลคอล เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ติดกับดัก 5 กับดักต่อสารล่อหนึ่งประเภทต่อหนึ่งพื้นที่ เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 - กันยายน พ.ศ. 2564 จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ร่วมกับแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia (Drew & Romig, 2013) และ Keys to the Tropical Fruit Flies of South-East Asia (Tephritidae: Dacinae) (Drew &



Romig, 2016) นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้แดงในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

2.1 สกัดดีเอ็นเอแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini โดยการนำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยามาสกัดดีเอ็นเอ ตามกรรมวิธี Boontop (2016) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัทโดยนำขาด้านขวาจำนวน 3 ข้างของแมลงวันผลไม้ (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Lysis Buffer GL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตรจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 20 ชั่วโมง ทำการย่อยสลายตัวอย่างโดยเขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม Lysis Buffer G3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาตร 210 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอด ISOLATE II Genomic DNA และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ล้างตะกอน โดยการเติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ตามด้วย Wash Buffer GW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ที่ทิ้งของเหลวที่เหลือตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตรละลายดีเอ็นเอ โดยการเติม Elution Buffer G ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000x g นาน 1 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 เพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คูไพรเมอร์ universal primer จากยีน *cox1*:LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al.*, 1994) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 μ M ไพร์เมอร์ LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 μ M ไพร์เมอร์ HCO2198 1 ไมโครลิตร สารละลาย GoTaq® 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฝาเพื่อให้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตรโดยนำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้ 1) initial-denaturing 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที 2) denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) (โดยในขั้นตอน 2-4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ) และ 5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซี



อาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ที่อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ผสม RedSafe dye ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

2.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA

2.4 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ด้วยการ Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ เก็บบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number

3. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้จากยีน *cox1* ที่ศึกษาเปรียบเทียบความถูกต้องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้จากฐานข้อมูล Genbank จากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าสู่ขั้นตอน alignment ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลใช้เกณฑ์มาตรฐาน 2 เกณฑ์ คือ Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian Inference (BI) และเปรียบเทียบ topology ที่ได้จากทั้ง 2 เกณฑ์มาตรฐาน โดยมีรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้ เตรียม dataset ของยีนตำแหน่ง *cox1* สำหรับ Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ .phy วิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command -f a) เริ่มจาก random starting tree และกำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง และวิเคราะห์โดย Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ .nexus ใช้โปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) ใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งนี้ Mcmcstartingtree = user ngen = 10 000 000 temp



= 0.25 nruns = 4 samplefreq = 1000 pintfreq = 1000 nchains = 4 savebrlens = yes stoprules = yes stopval = 0.01; ปรับ ค่า generation temperature substitution model parameters จำนวน generation และ burnin เพื่อให้ได้ consensus topology ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย cumulative and compare functions โดย AWTY (Nylander *et al.*, 2008)

การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- 2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบให้สอดคล้องกับชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิดและชื่อผู้เก็บตัวอย่าง
- 3) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบ accession number ในฐานข้อมูล Genbank

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : เดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 - เดือนกันยายน พ.ศ. 2564

สถานที่ : 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่าง ๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ด้วยกับดักถังเปียกซึ่งบรรจุสารล่อเมทิลยูจีนอล คิวลัวร์ และลาติลัวร์จาก 6 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ของไทยด้วยกับดักแมลงวันผลไม้ด้วยกับดักแบบถังเปียก ทำการตรวจวิเคราะห์ชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยแนวทางวินิจฉัย (Drew and Romig, 2013, 2016) พบแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini สามารถจำแนกได้ 3 สกุล จำนวน 23 ชนิด ได้แก่

- 1) สกุล *Dacus* จำนวน 3 ชนิด (Figure 2) ได้แก่

Dacus (Callantra) formosanus (Tseng & Chu)

Dacus (Callantra) longicornis Wiedemann

Dacus (Callantra) sphaeroidalis (Bezzi)

- 2) สกุล *Bactrocera* จำนวน 10 ชนิด (Figure 3) ได้แก่

Bactrocera (Bactrocera) albistrigata de Meijere



Bactrocera (Bactrocera) carambolae Drew & Hancock

Bactrocera (Bactrocera) correcta (Bezzi)

Bactrocera (Bactrocera) dorsalis Hendel

Bactrocera (Bactrocera) latifrons (Hendel)

Bactrocera (Bactrocera) limbifera (Bezzi)

Bactrocera (Bactrocera) nigrotibialis (Perkins)

Bactrocera (Bactrocera) tuberculata (Bezzi)

Bactrocera (Bactrocera) umbrosa (Fabricius)

Bactrocera (Bactrocera) zonata (Saunders)

3) สกุล *Zeugodacus* จำนวน 10 ชนิด (Figure 4) ได้แก่

Zeugodacus (Asiadacus) apicalis (de Meijere) comb. nov.

Zeugodacus (Zeugodacus) caudatus (Fabricius), stat. rev.

Zeugodacus (Parasinodacus) cilifer (Hendel), comb. nov.

Zeugodacus (Zeugodacus) cucurbitae (Coquillett), stat. rev.

Zeugodacus (Hemigymnodacus) diversa (Coquillett)

Zeugodacus (Sinodacus) hochii (Zia), comb. nov.

Zeugodacus (Parasinodacus) incisus (Walker), comb. nov.

Zeugodacus (Zeugodacus) isolatus (Hardy), comb. nov.

Zeugodacus (Zeugodacus) platamus (Hardy)

Zeugodacus (Zeugodacus) tau (Walker), comb. nov.

เก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอและศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

2. การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

จากการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490/HCO2198 จากยีน *cox1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini จำนวน 20 ชนิด (Figure 5) ได้แก่

1) สกุล *Dacus* จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *D. formosanus*, *D. longicornis* และ *D. sphaeroidalis*

2) สกุล *Bactrocera* จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *B. albistrigata*, *B. carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. limbifera*, *B. nigrotibialis*, *B. tuberculata*, *B. umbrosa* และ *B. zonata*



3) สกุล *Zeugodacus* จำนวน 10 ชนิด *Z. apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae*, *Z. diversus*, *Z. hochii*, *Z. incisus*, *Z. isolatus*, *Z. platamus* และ *Z. tau*

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (pcr product) จากแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ทั้ง 23 ชนิด ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส (Figure 5) แต่เมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้เพียง 20 ชนิด ดังนี้

1) สกุล *Dacus* จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *D. formosanus* แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จากแมลงวันผลไม้ *D. longicornis* และ *D. sphaeroidalis* ได้

2) สกุล *Bactrocera* จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ *B. albistrigata*, *B. carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. limbifera*, *B. nigrotibialis*, *B. tuberculata*, *B. umbrosa* และ *B. zonata*

3) สกุล *Zeugodacus* จำนวน 9 ชนิด *Z. apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbita*, *Z. hochii*, *Z. incisus*, *Z. isolatus*, *Z. platamus* และ *Z. tau* แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จากแมลงวันผลไม้ *Z. diversus* ได้

และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากการ Blast พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % นั้น แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *cox1* นั้นมีความถูกต้อง และทำการบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ในรูปแบบ accession number (Table1) และจากข้อมูลที่ถูกตั้งชื่อของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว แสดงว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถใช้ในการสกัดดังกล่าวมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้ แต่สำหรับแมลงวันผลไม้ 3 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแต่ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้นั้น อาจเกิดจากความแปรผันของสารพันธุกรรม ของตัวอย่างทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

3. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini และนำมาทำการ alignment ชนิดละ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ยกเว้นแมลงวันผลไม้บางชนิดที่มีจำนวนตัวอย่างน้อย เช่น *D. longicornis*, *Z. apicalis* และ *Z. cilifer* ที่ใช้ 5, 5 และ 9 ตัวอย่าง ตามลำดับนั้น (Table 1) ไม่พบความแตกต่างในลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด ดังนั้น ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี phylogenetic reconstruction สามารถใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ชนิดละจำนวน 1 ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini แต่ละชนิด (จำนวน 20 ชนิด) ดังนี้



1) แมลงวันผลไม้ *D. longicornis*

AGAATTTTAGTGCAGCAGAAGTACCTAGGACACCCGGGAGCCCTAATTGGCGATGATCAAATCTATAACGTAATTGTAACAGCCCATGCAATTTGTAA
 TAATTTTTTTCATAGTTATACCTATTATAAATTGGAGGATTCGGTAATTGATTAGTGCCCTTAATACTAGGAGCCCGAGATATAGCATTCCCCCGA
 ATAAATAATATAAGCTTTTGATTACTACCACCCTCTCTCACATTACTTTAACAAGCAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGAACAGGCTGAACCGT
 TTATCCCCCTTTCTTCTGCTATCGCCACGGAGGAGCTTCTGTAGACTTAGCTATCTTCTCATTACATTTAGCCGGAATCTCATCCATTTTAG
 GAGCCGTAATTTTATTACCACAGTTAATAATACGATCAACCGGAATTACATTCGACCGTATACCTTTATTTGTTTGGAGCAGTTGTATTAACA
 GCCCTTCTTCTTACTTTCTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACAATATTATTAACGACCGAAATTTAAATACTTCATTCTTCGACCCAGC
 AGGTGGAGGAGACCTATCCTATACCAACATCTATT

2) แมลงวันผลไม้ *B. albistrigata*

AGAATTTTAGTTCGAGCTGAAGTACCTAGGACACCCAGGAGACTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCACGCTTTTCGTAA
 TAATTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTGTTCCTTAATATTAGGTGCACCTGATATAGCTTTCCACGA
 ATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTTACATTACTACTAGTAAGAAGTATAGTGGAAAACGGGCTGGTACAGGTTGAACAGT
 TTACCCACCCCTATCATCTGTAATTGCTCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTCTCACTTCACCTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAG
 GGGCAGTTAATTTTATCACAACGTAATTAATATACGATCAACAGGAATTTCAATTTGACCGAATACCTCTTTTCGTTTGGAGCAGTTGTTACTAACA
 GCTCTATTACTTTTATTATCCTTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATTTAAATACTTCCTTTTTTGGACCTGCC
 GGAGGAGGAGACCTATTCTTTACCAACATTTATT

3) แมลงวันผลไม้ *B. carambolae*

AGAATTTTAGTCCGAGCTGAAGTACCTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCACGCTTTTCGTAA
 AATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCACGAA
 TGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTGGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGT
 TACCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTCTCACTTCACCTAGCAGTATTTCTCAATTTTAGG
 AGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTTCGTTTGGAGCAGTTGTATTAACAG
 CTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGGACCTGCC
 GAGGAGGAGACCTATTCTTTACCAACATTTATT

4) แมลงวันผลไม้ *B. correcta*

AGAATTTTAGTTCGTCGAGCTAGGACACCCCGGAGACTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCACATGCTTTTCGTAA
 TAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGACTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCACGAA
 ATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTGGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGT
 TTACCCTCCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGATCTAGCTATTTTCTCACTCCACTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAG
 GAGCAGTAAATTTTATCACAACCGTTATTAAACATACGATCGACAGGAATTTCAATTTGACCGAATACCTCTATTTCGTTTGGAGCAGTTGTATTAACA
 GCTTTATTGCTTTTATTATCACTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATCACTATACTATTAACAGATCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGGACCTGC
 AGGAGGAGGAGATCCTATTCTTACCAACATTTATT

5) แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*

AGAATTTTAGTCCGAGCTGAAGTACCTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTTCGTAA
 AATTTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATTGGTGGATTTGGAAATTGACTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATTTCACGAA
 TGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTGGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGT
 TACCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACTAGCTATTTTCTCACTTCACCTAGCGGGTATTTCTCAATTTTAGG
 AGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATTTCGTTTGGAGCAGTTGTATTAACAG
 CTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCCTTTTTTGGACCTGCC
 GAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATT

6) แมลงวันผลไม้ *B. latifrons*

AGAATCCTAGTTCGAGCTGAATTAGGGACCCCGGAGCATTAAATCGGAGACGACCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCCCATGCTTTTCGTAA
 TAATTTTCTTTATAGTTATACCTATTATAAATTGGTGGGTTTCGGAAATTGACTGTTCCTTTAATACTAGGTGCACCGAGATATAGCATTTCACGAA



ATAACAATATAAGATTTTGGTTACTACCTCCTTCCCTTACACTATTATTAGTGAGAAGCATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGCTGAACAGT
TTACCTCCCTATCATCTGTTATTGCTCATGGAGGAGCATCAGTCGATCTAGCTATTTTCTATTACACTTAGCCGGAATTTCTCAATCTTAG
GAGCAGTAACTTCATCACAACAGTAATCAACATACGATCAACAGGAATTTTCATTGACCGAATGCCTCTTTTCGTTTGAGCAGTTGTTACTAACG
GCCCTATTACTCTTACTGTCACTACCCAGTTTTAGCGGGAGCTATTACCATGCTATTAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGACCCCGC
TGGAGGAGGAGATCCTATCCTTTACCAACACTTATT

7) แมลงวันผลไม้ *B. limbifera*

AGAATTTTAGTTCGAGCTGAACTAGGACACCCTGGAGCATTAAATGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACCGCCCATGCCTTTGTAAT
AATTTCTTTATAGTTATGCCTATTATAATTGGTGGCTTCGAAATGACTTGTCCCTTAATATTAGGAGCTCTGACATAGCCTTCCCACGAA
TAAATAATATAAGATTTTGGTACTCCTGCCTCCTTCCCTTACCCTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTT
TACCCTCCCTTTTATCTGTTATTGCTCACGGAGGGGCATCAGTTGATCTAGCTATTTTTCACCTTCACTTAGCCGGTATTTCTCAATCTAGG
GGCAGTTAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTTTCATTGACCGAATACCTCTTTTCGTTTGAGCAGTTGTGTTAACAG
CCCTATTACTCTGCTATCATTACCAGTCTTAGCAGGAGCCATTACTATATTATAACAGATCGAAATTTAAACACTTCTTCTTTGATCCCGCA
GGAGGAGGAGACCCTATTCTTTACCAGCACTTATT

8) แมลงวันผลไม้ *B. nigrotibialis*

AGAATTTTAGTTCGAGCTGAACTAGGTCATCCTGGAGCATTAAATGGAGATGATCAAATCTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTGTAAT
AATTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGGTTCGAAATGACTTGTCCCTAATATTAGGTGCACCTGATATAGCTTTCCCACGAA
TAAATAATATAAGATTTTGGTACTACCTCCTTCCCTTACCCTTCTGTTAGTGAGAAGTATAGTGAAAAACGGAGCTGGTACAGGATGAACAGTT
TATCCCCCTATCATCTGTTATTGCTCATGGAGGAGCTCAGTTGATCTAGCCATTTTTCACCTTCACTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAGG
GGCGGTTAATTTTATACAACCGTAATTAATATACGATCTACAGGAATTTTCATTGACCGAATACCTCTATTGTTTGAGCAGTTGTATTAACAG
CCTTATTGCTTCTGCTATCCTTACCAGTTTTAGCCGGAGCTATTACTATGTTATTAACAGACCGAACTTAAATACTTCATTTTTGACCCCTGCT
GGTGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACACTTATT

9) แมลงวันผลไม้ *B. tuberculata*

AGAATTTTAGTTCGAGCTGAACTAGGTCACCCTGGAGCATTAAATGGAGATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCCCATGCTTTGTAAT
AATTTCTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGTGGATTTGGAAATGACTTGTCCCTAATATTAGGTGCTCCGATATAGCATTTCACAGAA
TAAATAATATAAGATTTTGGTATTACCTCCTTCCCTTACACTGCTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTT
TACCCTCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGAGGTGCTTCAAGTTGATCTAGCTATTTTTCACCTTCACTTAGCCGGATCTCCTCAATTTTAGG
GGCAGTTAATTTTATTACAACAGTAATTAATATACGATCAACAGGGATTTCTTTGACCGAATACCCTTTTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACGG
CCTTACTACTTTTATTGCTCTGCCAGTTTTAGCCGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCATTTTTGACCCCGCC
GGAGGGGGAGACCCTATTCTTTACCAACACTTATT

10) แมลงวันผลไม้ *B. umbrosa*

AGAATTTTAGTTCGAGCTGAACTAGGTCACCCCGGGCATTAAATCGGAGACGATCAAATCTATAATGTAATTGTAACAGCGCATGCTTTGTAAT
TAATTTTTTTATAGTTATGCCATTATAATCGGGGGCTTCGAAACTGGCTTGTCCCTAATACTAGGAGACCCGACATAGCATTCCCACGA
ATGAATAATATAAGATTTTATTGCTCCTTCCCTTACGCTACTGTTAGTAAGAAGCATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTT
TTACCCACCCCTATCATCAGTTATCGCCACGGAGGAGCATCAGTCGATCTAGCTATTTTTCACCTTCACTTAGCTGGTATCTCTTCAATTTAG
GGCCGTAATTTTATTACTACAGTTATTAATATGCGGTCAACAGGCATCTCATTGACCGAATACCTCTTTTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACA
GCCTTATTACTTTTATTACTTCCAGTTTTAGCCGGGAGCTATTACCATATTATTAACAGACCGAACTTAAACACCTCTTTTTGACCCCGCC
AGGAGGGGGGACCAATTTTATACCAACACTTATT

11) แมลงวันผลไม้ *B. zonata*

AGAATTTTAGTTCGAGCTGAACTAGGACACCCCGGAGCACTAAATGGAGATGATCAGATTTATAATGTAATTGTAACAGCACACGCTTTGTAAT
AATTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATGACTTGTCCCTAATATTAGGAGACCCGACATAGCATTCCCACGAA
TGAATAATATAAGATTTTATTGCTCCTTCCCTTACGCTGCTATTAGTGAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTT
TATCCTCCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCAAGTTGATCTAGCTATTTTTCACCTTCACTTAGCTGGTATTTCTCAATTTAGG
AGCAGTTAATTTTATTACAACGTTATTAACATACGTTCAACAGGAATTTTCATTGATCGAATACCTCTCTTTCGTTTGAGCAGTTGTATTAACAG



CCCTACTTCTATTATCATTACCAGTTTTAGCGGGGGCTATTACTATATTATAACAGATCGAAATTTAAACTTCATTTTTTGACCCTGCA
GGAGGAGGAGACCCTATTCTCTATCAACACTTATT

12) แมลงวันผลไม้ *Z. apicalis*

AGAATTCTAGTGCAGCAGAATTAGGGCACCCAGGAGCCTTAATTGGAGATGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAA
TAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTATACTTGAGGCCCTGACATAGCCTTCCCCGA
ATAAATAATATAAGATTTTGATTACTACCACCTTCTCTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTGAAAACGGAGCTGGGACAGGATGAACTGT
ATACCCACCCCTTTCTTCTATTATTGCACATGGAGGAGCATCAGTAGATTTAGCTATCTTTTCTTACACTAGCAGGAATTCATCTATTTAG
GTGCTGTAATTTTATTACCACAGTAATTAACATGCGGTCTACAGGTATTACCTTCGATCGAATACCTTTATTTGTTTGAGCCGTAGTTTTAACG
GCCCTACTTTTATTACTTTCCCTTCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACAATACTATTAACAGACCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGACCAGC
AGGAGGGGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATT

13) แมลงวันผลไม้ *Z. caudatus*

AGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAAT
AATTTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAAGTACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCCCAGATATAGCATTTCACAGAA
TAAATAATAAGATTCTGATTACTGCCTCCTTCACTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACTGTT
TACCCTCCCTCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTTCTGTTGATCTAGCTATTTTTCTTTACATCTAGCTGGAATTCCTCTATTTTAGG
AGCCGTAATTTTATTACTACAGTAATTAACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTTTGTGTTGAGCAGTAGTGCTAACAG
CCTTATTACTACTTTTATTACCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAACTTAAATACCTTTCTTTCGACCCAGCC
GGAGGTGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATT

14) แมลงวันผลไม้ *Z. cilifer*

AGAATTTAATTCGAGCAGAATTAGGACACCCCGGAGCATTAAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCACACGCATTTGTAAT
AATTTTTTTTATAGTAATACCAATCATAATTGGAGGATTTGGAAACTGATTAGTACCCCTAATACTTGAGCACCAGATATAGCATTTCCTCGAA
TAAATAATAAGATTTTGATTATTGCCCTCCTCTTACACTACTTTTAGTAAGCAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGATGAACAGTT
TACCACCCCTATCATCTATTATTGCCATGGAGGAGCATCAGTTGATTAGCAATTTTTCTTTACATCTAGCAGGAATCTCATCTATTTTAGG
GGCTGTAATTTTATCACTACAGTCATTAATATACGATCAACGGGAATTACTTTCGATCGAATACCTTTATTGTTTGAGCCGTGTATTAACG
CCCTCTTTTATTACTTTTATTACCAGTACTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTGACAGACCGAAATTTAAACACATCCTTTTTCGACCCAGCA
GGAGGTGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATT

15) แมลงวันผลไม้ *Z. cucurbitae*

AGAATCTTAGTCCGGGCAGAACTGGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTA
TGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGA
ATGAATAATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACTGT
TTATCCTCCCTTTTATCAATATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCATCAATTTTAGG
GGCCGTAATTTTATTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCGGATACCTTTATTGTTTGAGCTGTAGTTGACAG
CTCTCTTTTACTTCTATCTCTACCTGTGTTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAATTTAAACACCTTTTCTTCGACCCGGCT
GGTGGTGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATT

16) แมลงวันผลไม้ *Z. hochii*

AGAATTTTAGTTCGTCAGCAGAATTAGGCCACCCGGGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAACGTAATCGTAACAGCTCATGCATTTGTAAT
AATTTTTTTTATGTAATACCCATTATAATTGGAGGGTTTGGAACTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCCCCGACATAGCCTTCCCCGAA
TAAATAACATAAGATTTTGATTACTGCCACCTTCTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTGAAAATGGGGCTGGTACAGGTTGAACTGTT
TACCCCTCTTTTATCAATTTATTGCCACGGAGGGCCTCAGTTGATTAGCCATTTTTTCGCTTACCTAGCTGGTATCTCATCAATTTTAGG
GGCCGTAATTTTATTACACAGTAATCAACATACGATCAACGGGAATTACCTTTGACCGTATACTTTATTGTTTGAGCTGTAGTTCTTACAG
CCCTCTTTTACTACTCTCCCTACCAGTACTAGCAGGGGCTATTACAATACTTTTAAACAGATCGAACTTAAATACATCTTTTTTCGACCCGGCT
GGTGGTGGAGACCCTGTCTTATACCAACACTTATT



17) แมลงวันผลไม้ *Z. incisus*

AGAATTTTAAATCCGAGCAGAATAGGACACCCAGGAGCATTAAATGGAGATGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCACACGCATTTGTAAT
 AATTTTTTTTATAGTAATAACCAATCATAATTGGAGGATTTGGAACTGATTAGTCCACTAATACTTGGAGCACCAGATATGGCTTTCCACGAA
 TAAATAATATAAGATTTTGGCTACTGCCTCCTTCCCTTACTACTTTTAGTAAGCAGAATAGTAGAAAACGGGGCTGGTACAGGATGAACAGTT
 TACCCACCACTATCATCTATTATTGCTCATGGAGGTGCTTCAGTTGACCTAGCAATTTTCTTTACATTTAGCGGGTATCTCATCTATTTTAGG
 AGCTGTAATTTTATTACTACAGTTATTAACATGCGATCGACAGGAATTAATTTGATCGAATGCCTCTATTTGTATGAGCAGTTGTATTAAGT
 CTCTCTTTTACTACTTTTATTACCAGTACTAGCCGGTGCCATCACTATACTTTTAACTGACCGAACTTAAATACATCTTTCTTTGACCCAGCA
 GGAGGTGGAGACCCTATTCTTTACCAACATTTATT

18) แมลงวันผลไม้ *Z. isolatus*

AGAATTTTATAGTACGAGCAGAATAGGCCACCCAGGAGCATTAAATGGGGATGACCAGATTTACAATGTAATTGTAACAGCCCATGCATTTGTAA
 TAATTTTTTTCATAGTAATAACCAATTATAATCGGAGGATTTGGTAACTGATTAGTGCCCTTAATATTAGGAGCCCTGATATAGCATTCCACGAA
 ATAAATAATATAAGATTTTACTCCTACCACCATCTTACTACTTTTACTGAGCAGCAGTATGGAAAACGGAGCTGGAACAGGTTGAACTGT
 ATACCCGCCTCTTTCTTCAATTATTGCTCATGGAGGAGCCTGTGCGATCTGGCTATTTTCTTTACATCTAGCCGGAATTTTATCAATCCTAG
 GAGCAGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAATATACGATCTACTGGAATCACATTCGACCGAATACCTTTATTTGTCTGAGCAGTAGTACTAACAA
 GCTCTGTTACTTCTTTCCCTCCAGTTTTAGCCGGAGCCATCACCATACTTCTAACTGATCGAAACCTAAATACCTCTTTCTTTGACCCAGC
 TGGTGGTGGAGATCCAATTTATACCAACACTTATT

19) แมลงวันผลไม้ *Z. platamus*

AGAATCCTAGTTCGTCAGCAATAGGTCATCCAGGAGCTTAAATGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCATTTGTAAT
 AATTTTTTTCATAGTAATAACCTATTATAATTGGGGGATTCGAAACTGATTAGTACCTTTAATATTAGGTGCCCTGATATAGCTTTTCCCGAA
 TGAATAATATAAGATTTTACTACTGCCTCCTTACTTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGGGCTGGTACAGGTTGAACTGTT
 TATCCACCTCTTTTATCAATATCGCTCATGGAGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTCTTTTACATTTAGCCGGTATTTTATCTATTTTAGG
 TGCCGTAATTTTATTACCACAGTAATTAATATACGATCAACAGGAATTAATTTGATCGAATACCTTTATTTGCTTTGAGCTGTTGTATTAACAG
 CATTATTACTACTATCATTACCTGTATTAGCTGGAGCTATCAACAATCTTTTAACTGATCGAAACCTAAATACCTCTTTCTTTGACCCAGCTG
 GAGGTGGAGATCCTATTTTATACCAACACTTATT

20) แมลงวันผลไม้ *Z. tau*

AGAATTTTATAGTTCGAGCAGAATAGGGCACCCAGGAGCTTAAATGGAGATGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTAT
 AATTTTTTTCATAGTAATAACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATGATTAGTACCTTAATATTAGGAGCACCAGATATAGCTTCCCTCGAA
 TGAATAATATAAGATTTTATTACTCCCTCTTACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACTGTT
 TACCCTCCCTTTTATCAATATCGCCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTCTTACTATTTAGCTGGTATTTTATCAATTTTAGG
 GGCTGTAATTTTACTACTACAGTAATTAATATACGATCAACAGGGATTACATTTGACCGAATACCTTTATTTGCTTTGAGCTGTAGTATTAACAG
 CTCTTTTACTTCTATCTCTCCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGATCGAAACCTAAATACATCTTTCTTTGACCCAGCT
 GGTGGTGGGATCCTATTTTATACCAACACTTATT

ผลการศึกษาคือความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้เผ่า
 Dacini ที่สำรวจพบในประเทศไทยจำนวน 20 ชนิด และลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้ *Ceratitis*
capitata เป็น outgroup (Bartolini *et al.*, 2020) พบว่าข้อมูลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้
 จากการวิเคราะห์แบบ maximum likelihood และ Bayesian Inference มีความสอดคล้องกัน
 (Figure 6) สามารถสนับสนุนการจำแนกและยืนยันชนิดแมลงวันผลไม้ทั้ง 20 ชนิดได้ โดยพบแมลงวัน
 ผลไม้ในสกุล *Dacus* นั้นมีความใกล้ชิดกับสกุล *Zeugodacus* และแยกออกจากสกุล *Bactrocera*
 อย่างชัดเจน โดยผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าแมลงวันผลไม้ใน 4 สกุลย่อย ได้แก่ *Asiadacus*,
Parasinodacus, *Sinodacus* และ *Zeugodacus* นั้น แยกออกจากสกุลย่อย *Bactrocera* อย่าง



เห็นได้ชัด สอดคล้องกับการศึกษาของ Krosch *et al.*, (2012) ที่ทำการศึกษความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini และพบว่า สกุล *Bactrocera* นั้น แยกจากสกุล *Zeugodacus* อย่างชัดเจน และสอดคล้องกับ De Meyer *et al.*, (2015) และ Virgilio *et al.*, (2015) ซึ่งได้ใช้หลักฐานทางความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมาสนับสนุนข้อมูลการจัดจำแนกแมลงวันผลไม้ขึ้นมาใหม่ โดยการย้ายแมลงวันผลไม้สกุลย่อย (subgenera) จำนวน 13 สกุลย่อย ในสกุล *Bactrocera* ซึ่งประกอบด้วย *Asiadacus*, *Austrodacus*, *Diplodacus*, *Hemigymnodacus*, comb. Nov., *Heminotodacus*, *Hemiparatriodacus*, *Nesodacus*, *Niuginidacus*, *Papuodacus*, *Paradacus*, *Parasinodacus*, comb. nov., *Sinodacus* และ *Zeugodacus* ขึ้นมาเป็นสกุลใหม่ ได้แก่ สกุล *Zeugodacus* Hendel

และจากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแมลงวันผลไม้ในสกุลย่อย *Parasinodacus* จำนวน 2 ชนิด คือ *Z. cilifer* และ *Z. incisus* นั้น มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และใกล้ชิดกับแมลงวันผลไม้ในสกุล *Asiadacus* ซึ่งได้แก่ *Z. apicalis* นอกจากนี้แมลงวันผลไม้ 2 ชนิด ในสกุลย่อย *Zeugodacus* คือ *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน และใกล้ชิดกับสกุล *Sinodacus* ซึ่งได้แก่ *Z. hochii* ซึ่งเมื่อพิจารณาพืชอาหารของแมลงวันผลไม้ทั้งสามชนิด พบว่าแมลงวันผลไม้ทั้งสามชนิดนั้นเข้าทำลายพืชในวงศ์ Cucurbitaceae เช่นเดียวกัน (Allwood *et al.*, 1999)

และจากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* สามารถสนับสนุนการศึกษาของ Drew and Romig (2013) ซึ่งรายงานชนิดแมลงวันผลไม้ยืนยันว่า *B. albistrigata* และ *B. frauenfeldi* เป็นคนละชนิดกัน เนื่องจากมีขนาดลำตัวที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นการแก้ไขการศึกษาของ Hardy and Adachi (1954) ที่รายงานว่า *B. albistrigata* และ *B. frauenfeldi* นั้นเป็นชนิดเดียวกันและเป็นชื่อพ้อง (synonym) ดังนั้นการศึกษานี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาสนับสนุนและยืนยันถึงความแตกต่างของแมลงวันผลไม้ทั้งสองชนิดได้ สอดคล้องกับการกระจายที่พบว่า *B. albistrigata* กระจายตัวในประเทศไทย มาเลเซีย และอินโดนีเซีย ในขณะที่ *B. frauenfeldi* นั้น พบกระจายตัวอยู่เฉพาะใน Papua New Guinea, Solomon Islands และรัฐ Queensland ของเครือรัฐออสเตรเลียเท่านั้น

นอกจากนี้การศึกษานี้ยังช่วยยืนยันข้อมูลแมลงวันผลไม้ใน 2 ชนิด ใน สกุล *Bactrocera* ซึ่งมักพบความผิดพลาดจากการจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ *B. nigrotibialis* และ *Z. cilifer* เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกันนั้น เมื่อใช้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสามารถยืนยันและสนับสนุนได้ว่า *Z. cilifer* นั้น มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันอย่างชัดเจนจาก *B. nigrotibialis* นอกจากนี้ยังสามารถแยกแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis*



complex ที่มีความซับซ้อน ได้แก่ *B. dorsalis* และ *B. carambolae* ได้อย่างชัดเจนเช่นเดียวกับ Schutze *et al.*, (2012)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยใช้กับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก ร่วมกับสารล่อที่ใช้ Methyl eugenol, CUE lure และ Lati lure และในการจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบแมลงวันผลไม้จำนวน 3 สกุล ได้แก่ *Dacus*, *Bactrocera* และ *Zeugodacus* ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดโดยการสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากยีน *cox1* ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้เผ่า *Dacini* จำนวน 20 ชนิด

การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้เผ่า *Dacini* ซึ่งในประเทศไทยมักใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนก ซึ่งทำได้ยากและต้องอาศัยความชำนาญของนักอนุกรมวิธาน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ยืนยันว่า *cox1* เป็นยีนที่สามารถใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้เผ่า *Dacini* ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากยีน *cox1* เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve area) มีขนาดนิวคลีโอไทด์มีความเหมาะสมคือประมาณ 500 - 800 คู่เบส ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สามารถเข้ามาจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ง่าย และรวดเร็ว ลำดับดีเอ็นเอของยีน *cox1* ยังสามารถแยกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย และสามารถจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า *Dacini* ได้อย่างถูกต้องถึง 99 - 100% และให้ผลที่สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงวันผลไม้ นอกจากนี้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีการ Maximum Likelihood และ Bayesian analysis นั้นเป็นวิธีการที่เหมาะสมสามารถยืนยันชนิดของแมลงวันผลไม้เผ่า *Dacini* ได้ โดยพบว่าแมลงวันผลไม้ทั้ง 3 สกุลนั้น แยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่หากต้องการศึกษาการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้นจะต้องมีการใช้จำนวนยีนในการศึกษาเพิ่มขึ้น

การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นครั้งแรกที่ใช้ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ (DNA barcode) และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมาสนับสนุนในการจำแนกและยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงวันผลไม้ในประเทศไทย ให้มีความถูกต้อง สมบูรณ์ ทันสมัยและเป็นที่ยอมรับในระดับสากลมากขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณณัฐมน แก้วนุ้ย ดร. ชนินทร ดวงสะอาด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และ ดร. กตัญญูทิศา คำช่วย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้ให้ความช่วยเหลือ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี



เอกสารอ้างอิง

- Allwood, A.J., Chinajariyawong A, Drew R.A.I., Hamacek E.L, Hancock D.L, Hengsawad C., Jinapin J.C., Jirasurat M., Krong C.K., Kritsaneepaiboon S., Leong C.S.T and S. Vijaysegaran. 1999. Host plant records of fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Southeast Asia. *Raffles Bulletin of Zoology*. 47(7): 1-92.
- Bartolini I, Rivera J, Nolazco N and A. Olórtégui. 2020. Towards the implementation of a DNA barcode library for the identification of Peruvian species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *PLoS ONE*. 15(1): e0228136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228136>.
- Boontop, Y. 2016. Natural variation and biogeography of the melon fruit fly, *Zeugodacuscucurbitae* (Diptera: Tephritidae), in Southeast-Asia and the West-Pacific. Ph.D. Thesis. Queensland University of Technology, Brisbane, Queensland, Australia. 347 p.
- Cameron, E.C., Sved, J.A. and A.S. Gilchrist. 2010. Pest fruit fly (Diptera: Tephritidae) in north western Australia: one species or two? *Bulletin of Entomological Research*. 100: 197-206.
- De Meyer, M., H. Delatte, M. Mwatawala, S. Quilici, J.F. Vayssieres and M. Virgilio. 2015. A review of the current knowledge on *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera, Tephritidae) in Africa, with a list of species included in *Zeugodacus*. *ZooKeys*. 540: 539-557.
- Doorenweerd, C., L. Luc, N. Allen, S. Jose and R. Daniel. 2018 A global checklist of the 932 fruit fly species in the tribe Dacini (Diptera, Tephritidae). *ZooKeys*. 730. 17-54. [10.3897/zookeys.730.21786](https://doi.org/10.3897/zookeys.730.21786).
- Drew, R.A.I. and Hancock, D.L. 1994. The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) in Asia. *Bulletin of Entomological Research Supplement Series*. 2: 1-68.
- Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2013. *Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia*. CABI. London, UK. 664 pp.
- Drew, R.A.I. and Romig, M. 2016. *Keys to the tropical fruit flies of South-East Asia*. CABI, London, UK. 487 pp.



- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *In Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hardy, D. E., and M. S. Adachi. 1954. Studies in the Fruit Flies of the Philippine Islands, Indonesia, and Malaya Part 1. Dacini (Tephritidae-Diptera).
- Krosch, M.N., Schutze, M., Armstrong, K.F., Graham, G.C., Yeates, D.K. and A.R. Clarke. 2012. A molecular phylogeny for the Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic and biogeographic implications. A molecular phylogeny for the Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic and biogeographic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.006.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547-1549.
- Nylander, J. A., Wilgenbusch, J. C., Warren, D. L. and D. L., Swofford. 2008. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. *Bioinformatics* 24: 581-583.
- Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Schutze, M.K., Jessup, A. & Clarke, A.R. 2012. Wing shape as potential discriminator of morphologically similar pest taxa within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae). *Bulletin of Entomological Research*. 102: 103-111.
- Schutze, M. K., Aketarawong, N., Amornsak, W., Armstrong, K. F., Augustinos, A. A., Barr, N. and A. R. Clarke. 2015. Synonymization of key pest species within the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae): taxonomic changes based on a review of 20 years of integrative morphological, molecular, cytogenetic, behavioural and chemoecological data. *Systematic Entomology*, 40(2): 456-471.



Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 30:1312-1313.

Virgilio, M., Jordaens, K., Verwimp, C., White, I. M. and M. De Meyer. 2015. Higher phylogeny of frugivorous flies (Diptera, Tephritidae, Dacini): Localised partition conflicts and a novel generic classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 85: 171-179.

Table 1 Collection details (scientific name, specimen voucher, accession number and number of specimens) for fruit flies used in this study.

| No | Scientific name | Accession number | No of specimens | Voucher specimen |
|----|-------------------------|---------------------------------|-----------------|------------------------|
| 1 | <i>B. albistrigata</i> | MW600096 - 15 | 20 | EMBT0401 – EMBT0420 |
| 2 | <i>B. carambolae</i> | MW052780 - 84, MW093419 - 23 | 10 | EMBT1301 - EMBT1310 |
| 3 | <i>B. correcta</i> | MW067300 - 09 | 10 | EMBT0601 - EMBT0610 |
| 4 | <i>B. dorsalis</i> | MW052785 - 89, MW093424 - 28 | 10 | EMBT0701 - EMBT0710 |
| 5 | <i>B. latifrons</i> | MW136282 - 93 | 12 | EMBT0901 - EMBT 0913 |
| 6 | <i>B. limbifera</i> | MZ129218 - 19 | 10 | EMBT0901 – EMBT0920 |
| 7 | <i>B. nigrotibialis</i> | MZ914401 - 10 | 10 | EMBT1001 – EMBT1020 |
| 8 | <i>B. tuberculata</i> | MW600156 - 75 | 10 | EMBT1101 – EMBT1120 |
| 9 | <i>B. umbrosa</i> | MW376156 - 73 | 14 | EMBT1201 – EMBT1215 |
| 10 | <i>B. zonata</i> | MW600176 - 95 | 10 | EMBT1301 – EMBT1320 |
| 11 | <i>D. formosanus</i> | N/A | - | EMBT0101 – EMBT0120 |
| 12 | <i>D. longicornis</i> | MW376179 - 83 | 5 | EMBT0201 – EMBT0220 |
| 13 | <i>D. sphaeroidalis</i> | N/A | - | EMBT0301 – EMBT0320 |
| 14 | <i>Z. apicalis</i> | MW376174 - 77 | 5 | EMBT1401 – EMBT1405 |
| 15 | <i>Z. caudatus</i> | MW376156 - 73 | 15 | EMBT1501 – EMBT1520 |
| 16 | <i>Z. cilifer</i> | MW376133 - 41 | 9 | EMBT1601 – EMBT1620 |
| 17 | <i>Z. cucurbitae</i> | MW045505 - 14, MW052790 - 94 | 14 | EMBT1601.L(SEM) - 1620 |
| 18 | <i>Z. diversus</i> | N/A | - | EMBT1801 – EMBT1820 |
| 19 | <i>Z. hochii</i> | MW600116 - 35 | 20 | EMBT1901 – EMBT1920 |
| 20 | <i>Z. incisus</i> | MW600136 - 55 | 10 | EMBT2001 – EMBT2020 |
| 21 | <i>Z. isolatus</i> | MW600196 -215 | 20 | EMBT2101 – EMBT2120 |
| 22 | <i>Z. platamus</i> | MW600216 - 235 | 20 | EMBT2201 – EMBT2220 |
| 23 | <i>Z. tau</i> | MW052795 - 99, MW093429 - 33 | 10 | EMBT1901.L(SEM) - 1920 |



Table 2 Scientific name of Dacini fruit fly in Thailand.

| | Homotypic synonym | Current name |
|----|---|--|
| 1 | <i>Bactrocera (Asiadacus) apicalis</i> de Meijere | <i>Zeugodacus (Asiadacus) apicalis</i> (de Meijere), comb. nov. |
| 2 | <i>Bactrocera (Zeugodacus) caudata</i> (Fabricius), | <i>Zeugodacus (Zeugodacus) caudatus</i> (Fabricius), stat. rev. |
| 3 | <i>Bactrocera (Parasinodacus) cilifera</i> (Hendel) | <i>Zeugodacus (Parasinodacus) cilifer</i> (Hendel), comb. nov. |
| 4 | <i>Bactrocera (Zeugodacus) cucurbitae</i> (Coquillett) | <i>Zeugodacus (Zeugodacus) cucurbitae</i> (Coquillett), stat. rev. |
| 5 | <i>Bactrocera (Hemigymnodacus) diversa</i> (Coquillett) | <i>Zeugodacus (Hemigymnodacus) diversus</i> (Coquillett) |
| 6 | <i>Bactrocera (Sinodacus) hochii</i> (Zia) | <i>Zeugodacus (Sinodacus) hochii</i> (Zia), comb. nov. |
| 7 | <i>Bactrocera (Parasinodacus) incisa</i> (Walker) | <i>Zeugodacus (Parasinodacus) incisus</i> (Walker), comb. nov. |
| 8 | <i>Bactrocera (Zeugodacus) isolata</i> (Hardy) | <i>Zeugodacus (Zeugodacus) isolatus</i> (Hardy), comb. nov. |
| 9 | <i>Bactrocera (Zeugodacus) platamus</i> (Hardy) | <i>Zeugodacus (Zeugodacus) platamus</i> (Hardy) |
| 10 | <i>Bactrocera (Zeugodacus) tau</i> (Walker) | <i>Zeugodacus (Zeugodacus) tau</i> (Walker), comb. nov. |



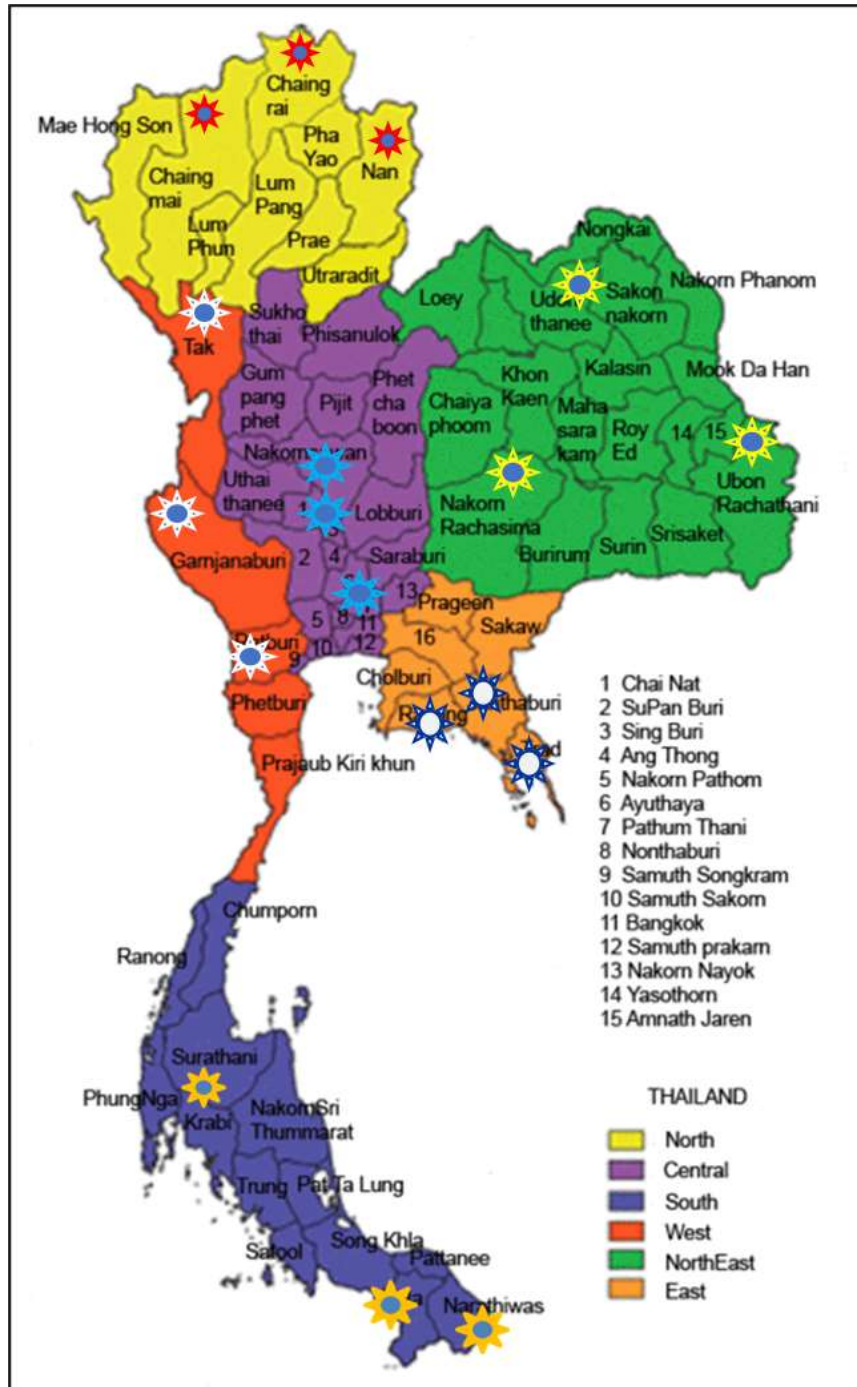


Figure 1 Locations of sampling sites in the six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) at which fruit flies were collected



Figure 2 Fruit flies in Genus *Dacus*

(A) *D. formosanus* (B) *D. longicornis* (C) *D. sphaeroidalis*

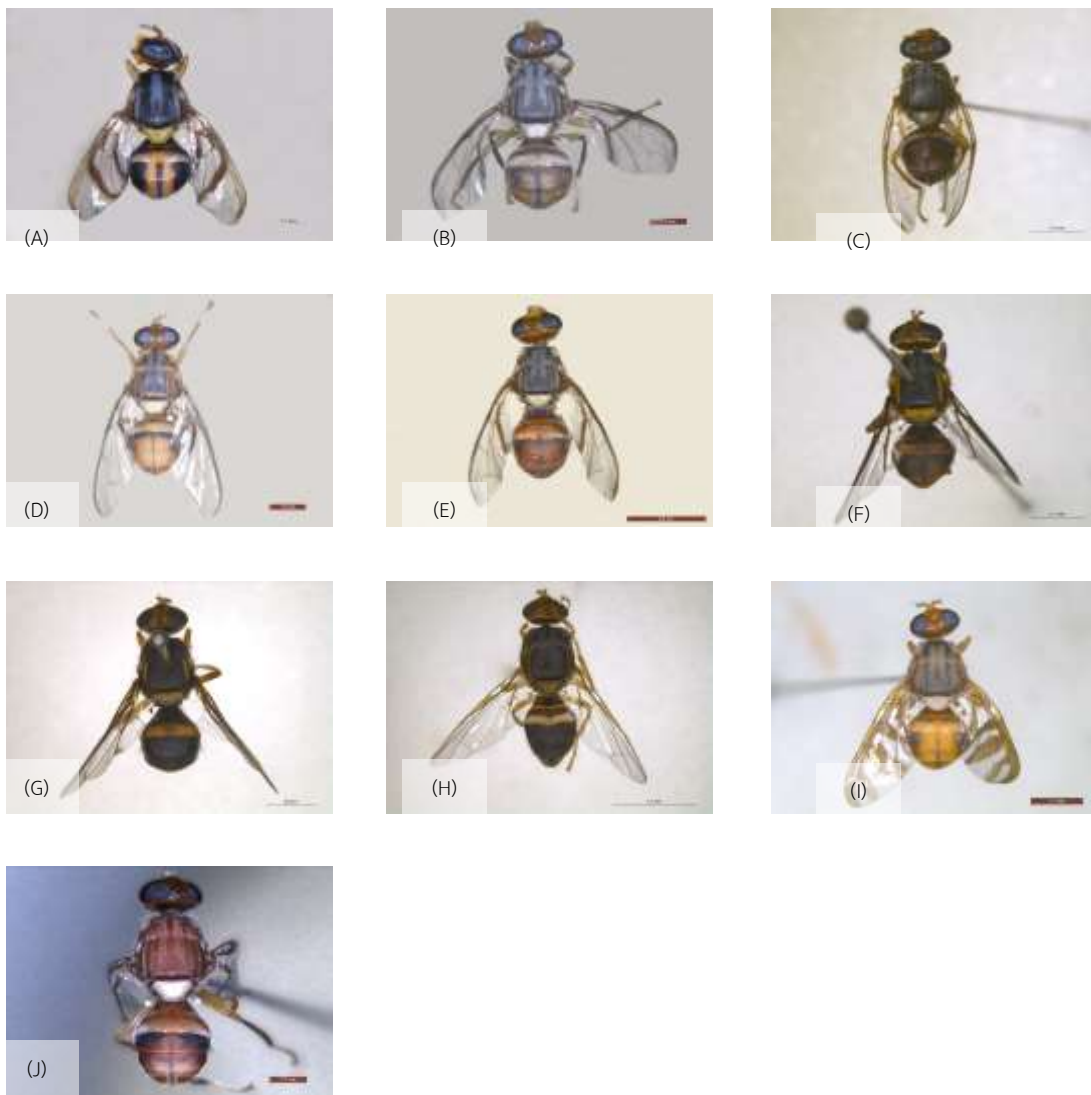


Figure 3 Fruit flies in Genus *Bactrocera*

(A) *B. albistrigata* (B) *B. carambolae* (C) *B. correcta*
 (D) *B. dorsalis* (E) *B. latifrons* (F) *B. limbifera*
 (G) *B. nigrotibialis* (H) *B. tuberculata* (I) *B. umbrosa*
 (J) *B. zonata*

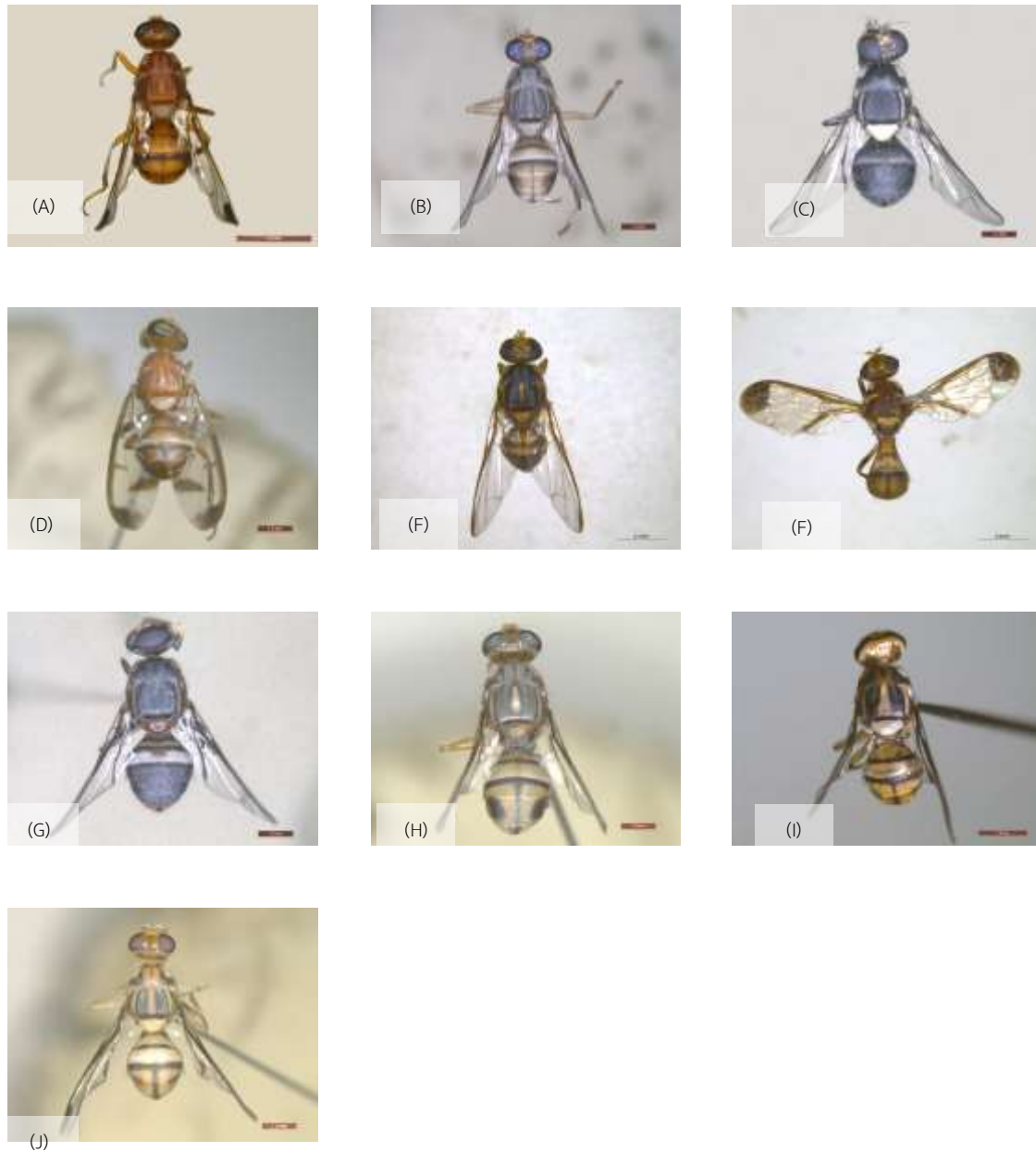


Figure 4 Fruit flies in Genus *Zeugodacus*

- | | | |
|--------------------------|------------------------|------------------------|
| (A) <i>Z. apicalis</i> | (B) <i>Z. caudatus</i> | (C) <i>Z. cilifer</i> |
| (D) <i>Z. cucurbitae</i> | (E) <i>Z. diversus</i> | (F) <i>Z. hochii</i> |
| (G) <i>Z. incisus</i> | (H) <i>Z. isolatus</i> | (I) <i>Z. platamus</i> |
| (J) <i>Z. tau</i> | | |

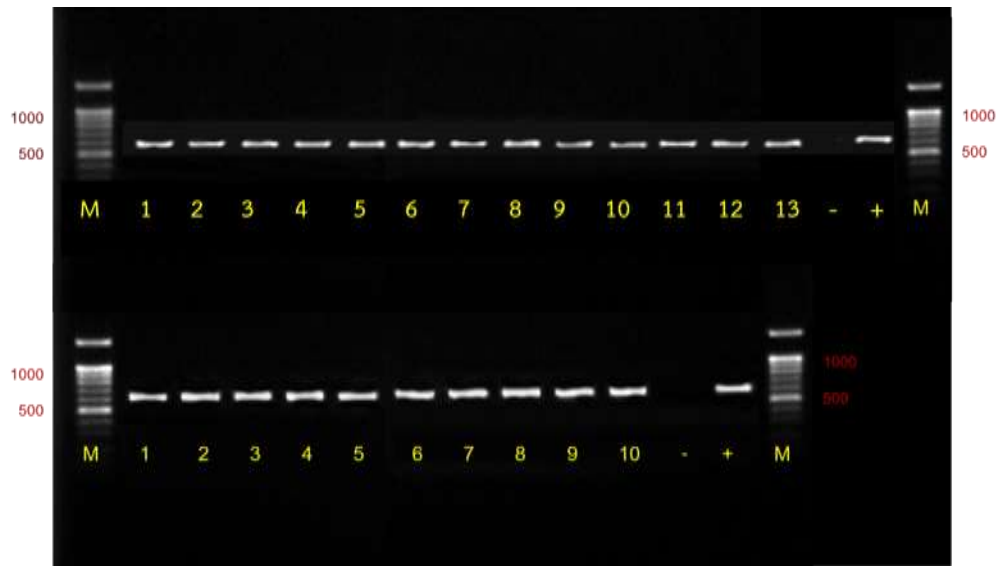


Figure 5 PCR results using the *cox1* (LCO1490/HCO2198) universal primer pair
Dacus formosanus, *D. longicornis*, *D. sphaeroidalis*, *Bactrocera albistrigata*,
B. carambolae, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. limbifera*,
B. nigrotibialis, *B. tuberculata*, *B. umbrosa*, *B. zonata*, *Zeugidacus apicalis*,
Z. caudatus, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae*, *Z. diversus*, *Z. hochii*, *Z. incisus*,
Z. isolatus, *Z. platamus* and *Z. tau* Negative ddH₂O and Positive (*Z. cucurbitae*)

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย
DNA Barcoding for Identification of Thrips in Family Thripidae (Thysanoptera: Thripidae) in Asparagus in the Middle part of Thailand

อิทธิพล บรรณาการ เกศสุตา สนศิริ สิทธิศิริโรตม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Taxonomy and DNA sequence of Thrips in Family Thripidae was studied by surveying and collecting in asparagus crops in the Middle part of Thailand during October 2019 and September 2021. Thrips was taken to Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture for detecting by study the taxonomy and morphology from permanent slides including compared with the specimens of Thrips in DOA Insect Museum. The result from detecting Thrips, 220 were found to represent Thrips in Order Thysanoptera Family Thripidae (3 species 2 genera): 181 chilli thrips; *Scirtothrips dorsalis* (Hood), 33 cotton thrips; *Thrips palmi* (Karny) and 6 Hawaiian flower thrips; *Thrips hawaiiensis* (Morgan). Specimens that preserved in 95% alcohol were analyzed by using PCR technique with mitochondrial COI gene in order to reveal lineage. The results of Neighbor Joining/UPGMA showed the closely relation between 3 thrips populations which collected from Nakhonpathom Kanchanaburi Phetburi Suphanburi Singhburi Lopburi Saraburi Nakhonsawan and Phetchabun Province. Conclusion, thrips that belong to Family Thripidae which found in asparagus crops in the Middle part of Thailand are *S. dorsalis*, *T. palmi* and *T. hawaiiensis*. Key and photographic taxonomic characters of 3 species were provided. The results were contributed to be Insect Museum Databases for exported and imported agricultural goods considering and application of management strategies.

Keywords : Thripidae Asparagus Taxonomy Molecular Biology

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-16-63



บทคัดย่อ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย โดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกหน่อไม้ฝรั่งในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี เพชรบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ เป็นต้น ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึงเดือนกันยายน 2564 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 220 ตัวอย่างและสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ได้ 3 ชนิด ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera ได้แก่ เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood) 181 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny 33 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย *Thrips hawaiiensis* (Morgan) 6 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลาย เขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ใบ ดอก และหน่อของหน่อไม้ฝรั่ง ทั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน COI (Cytochrome Oxidase subunit I) ของเพลี้ยไฟที่เก็บรวบรวมได้ในแต่ละจังหวัด สามารถสรุปได้ว่าชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ที่พบในเขตภาคกลางของประเทศไทย ไม่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยาในระดับชนิด จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิด นำตัวอย่างเพลี้ยไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

คำหลัก : เพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae หน่อไม้ฝรั่ง อนุกรมวิธาน อนุชีววิทยา

คำนำ

หน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกเพื่อการส่งออกเป็นสำคัญ ให้ผลตอบแทนต่อเกษตรกรสูง เป็นพืชที่ใช้พื้นที่ปลูกน้อย ส่วนใหญ่นิยมปลูกในแถบภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม และภาคอีสาน ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา กาฬสินธุ์ และมหาสารคาม เพราะมีสภาพอากาศที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของหน่อไม้ฝรั่ง จากการที่หน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชส่งออกสำคัญไปยังประเทศญี่ปุ่น จึงได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกหน่อไม้ฝรั่งเป็นวงกว้างเพื่อสร้างรายได้ให้กับครัวเรือน แต่การปลูกหน่อไม้ฝรั่งนั้นนอกจากจะประสบปัญหาของโรคแล้ว ยังพบปัญหาการทำลายของแมลง เช่น หนอนกระทุ้งหอม หนอนกระทุ้งฝัก เป็นต้น แต่แมลงขนาดเล็กที่เป็นศัตรูสำคัญที่ทำให้ผลผลิตของหน่อไม้ฝรั่งอีกทั้งยังสามารถติดไปกับสินค้าได้คือ เพลี้ยไฟ ปัจจุบันนอกจากเพลี้ยไฟหน่อไม้ฝรั่ง *Chirothrips spiniceps* Hood และเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* Hood จะลงทำลายหน่อไม้ฝรั่งแล้ว ยังมีเพลี้ยไฟหลายชนิดที่ระบาดและลงทำลายหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลาง (ศิริณี, 2544) จากการที่มีผู้ประกอบการธุรกิจการปลูกหน่อไม้ฝรั่งเป็นจำนวนมาก ประกอบกับตลาด



ทั้งในและต่างประเทศ มีความต้องการหน่อไม้ฝรั่งในปริมาณสูงได้กลายเป็นปัจจัยสำคัญในการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อชนิดของศัตรูพืชที่พบในหน่อไม้ฝรั่ง จึงอาจเกิดพิษตกค้างในผลผลิตมากขึ้น การศึกษาชนิดและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟจะช่วยให้ทราบถึงชนิดที่แน่นอนของเพลี้ยไฟที่ระบาดในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งนั้นๆ ทั้งนี้จะทำให้ชนิดที่ถูกต้องและเหมาะสมแก่การป้องกันกำจัด สามารถวิเคราะห์ชนิดของเพลี้ยไฟศัตรูพืชในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการทดสอบประสิทธิภาพวัตถุอันตรายทางการเกษตรได้อีกด้วย นอกจากนี้ การศึกษาลำดับพันธุกรรมจะทำให้ทราบถึงความแปรปรวนของยีน เพลี้ยไฟในพื้นที่ภาคกลางว่ามีความแตกต่างหรือใกล้เคียงกันอย่างไร การศึกษานี้จะได้ข้อมูลซึ่งไม่มีหน่วยงานอื่นในประเทศทำวิจัยเชิงลึกเช่นนี้ อีกทั้งยังเป็นการวิเคราะห์ชนิดเพลี้ยไฟศัตรูพืชโดยวิธีใหม่ที่ทันสมัย สามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษให้กับนักวิชาการทั่วไป บริษัทเอกชน และผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร ทั้งนี้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟที่พบในหน่อไม้ฝรั่งที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถนำมาศึกษา phylogeny กับเพลี้ยไฟที่ทำลายพืชอื่นๆ ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลงปากคืบ พู่กัน ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ถังรักษาความเย็น อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ 50-100% AGA โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% โคลฟอย แคนาดาบัลซัม เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร และ ตู้อบสไลด์ถาวร อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ 99% กรดอะซิติก DNeasy Kit, dNTP mixtures, 10X PCR buffer, Automatic pipette ปีกเกอร์ หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ DNA Thermal Cycle เครื่อง Electrophoresis, Gel Documentary, Gene Amp PCR กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope ที่ติด camera lucida เป็นอุปกรณ์เสริมช่วยในการวาดภาพแมลงที่พบ กล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ ปากกา rotring และกระดาษไขเขียนแบบ เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae

วิธีการ

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย เช่น นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี กาญจนบุรี เป็นต้น เพื่อศึกษาจำนวนชนิดของเพลี้ยไฟในหน่อไม้ฝรั่ง โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืช เช่น ใบ ดอก และหน่อ เป็นต้น ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA (Alcohol 60%: Glycerine: Acetic acid อัตราส่วน 10:1:1) สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และ แอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI)



รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดตองเพลี้ยไฟ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของศิริณี (2544) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดตองตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่างจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิด (key) ของเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล

การศึกษาลำดับพันธุกรรม

นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ได้จำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้ stereo microscope (ตัวอย่างกลุ่มเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ทำสไลด์ถาวร) ที่เก็บรวบรวมได้จากแต่ละพื้นที่ไปศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

วิธีการหาลำดับเบส COI ปรับปรุงจากวิธีการศึกษายีน COI ของ Karimi, *et al.* (2010)

ขั้นตอนการสกัด ดีเอ็นเอ

- บดตัวอย่างเพลี้ยไฟ 1 ตัวอย่างใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย sterilized polypropylene pestle โดยดำเนินการตามกรรมวิธีของชุดสกัด DNeasy blood and tissue qiagen kit
- นำสารละลายที่ได้ incubated ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที หลังจากนั้น นำเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,000 รอบ/นาที เวลา 2 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง
- ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น DNA Template ในขั้นตอน PCR (polymerase chain reaction)

การศึกษายีน COI โดยเทคนิค PCR

- ศึกษา ยีน COI (cytochrome oxidase subunit I) ซึ่งมีขนาด 642 bp และเป็น Conserved region ของแมลงทุกชนิด (บาร์โค้ด) โดยใช้ universally conserved mtDNA COI primers, LC01490 และ HC02198 (Folmer, *et al.*, 1994)
- นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 3 ทำปฏิกิริยากับ 10m M dNTPs, 5 U/μl Amplitaq, 25 mM MgCl₂, 10X PCR buffer, 20mM sense and antisense primer ขั้นตอนและ อุณหภูมิของขั้นตอนการทำ PCR (Biomethrathermocycler) คือ

| | | | |
|---------------------|-----------|-----------|-------------|
| Initialdenaturation | ที่ 94 °C | 3 นาที | } 35 cycles |
| Denaturation | ที่ 94 °C | 1 นาที | |
| Annealing | ที่ 52 °C | 30 วินาที | |
| Extension | ที่ 72 °C | 90 วินาที | |



Final extension ที่ 72 °C 30 นาที

- หลังจากนั้นนำไป purified โดยดำเนินการตามกรรมวิธีของชุดสกัด Bioneer's PCR purification kit

การหาและวิเคราะห์ลำดับเบสของ ยีน COI

- ดำเนินการส่งผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้) และนำผลของลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม BioEdit 7.0.5.2 (Hall, 1999), nBLAST program, MEGA4 (Kimura, 1980) และ neighbor-joining tree (Saitou and Nei, 1987) เพื่อหาความจำเพาะเจาะจงของเพลี้ยไฟภายในแหล่งเดียวกันและระหว่างแหล่งที่เก็บตัวอย่าง รวมถึงเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และศึกษาความใกล้เคียงกันของเพลี้ยไฟแต่ละชนิด

การบันทึกข้อมูล

พืชอาหาร สถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

เวลาและสถานที่ : เดือน ตุลาคม 2562 ถึง เดือน กันยายน 2564

1. แปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง ห้องปฏิบัติการกลาง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกหน่อไม้ฝรั่งในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี เพชรบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ และนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยซึ่งปรับปรุงมาจาก Palmer (*et al.*, 1989) และศิริณี (2544) ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ได้ 3 ชนิด ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera ได้แก่ เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood) เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny และเพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย *Thrips hawaiiensis* (Morgan) โดยมีแนวทางการวินิจฉัยชนิดและลักษณะทางอนุกรมวิธานดังนี้

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟที่พบในหน่อไม้ฝรั่ง

- 1 Usually small and pale species. Head and pronotum with sculpture of closely set of transverse striations. Tergites and sternites III – VII with dark patch medially. Abdominal tergites III–VI median setae small, close together; II–VIII with lateral thirds covered in closely spaced rows of fine microtrichia.



- Tergites laterally with 3 setae on microtrichia field. Microtrichia present medially on tergites VIII-IX..... *Scirtothrips dorsalis* (Hood)
- Head and pronotum without sculpture. Ctenidia on tergite VIII situated posteromedial to the spiracle2
 - 2 Abdominal sterna without discal setae. Forewing first vein setal row with long gap medially and 2 or more setae nearer apex, rarely micropterous. Metanotum with paired campaniform sensilla. Tergite VIII posteromarginal comb complete metanotal sculpture longitudinal striate; body colour uniformly yellow.....*Thrips palmi* (Karny)
 - Abdominal sterna with at least 1 pair of discal setae. Forewing first vein usually with 3 setae on distal half of wing, distal to a long interval without setae. Metanotum usually striate to longitudinally reticulate with pair of campaniform sensilla, without markings within reticles and with median setae closer to anterior margin Tergite VIII posteromarginal comb complete. Abdomen brown, head and thorax brown or yellow.....
..... *Thrips hawaiiensis* (Morgan)

เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood, 1919)

Scirtothrips dorsalis Hood, 1919: 90, *Heliothrips minutissimus* Bagnall, 1919: 260, *Anaphothrips andreae* Karny, 1925: 24, *Neophysopus fragariae* Girault, 1927:1, *Scirtothrips padmae* Ramakrishna, 1942: 169

ลำตัว (Body) ขนาดเล็ก ลำตัวสีเหลืองอ่อน (Figure 1-A, 1-B) เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 0.60 – 0.80 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 0.70 – 0.90 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่

หัว (Head) ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว มีหนวด 8 ปล้อง หนวดปล้องที่ 1 สีขาว หนวดปล้องที่ 2-3 มีสีน้ำตาลอ่อนที่บริเวณโคนปล้องหนวดมีสีเทาเข้มที่ส่วนปลาย ปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึกรูปส้อม ปล้องหนวดปล้องที่ 5 ถึง 8 มีสีน้ำตาล ปล้องหนวดปล้องที่ 8 ยาวกว่าปล้องที่ 7 (Fig. 1-C) มีขนบริเวณตาเดี่ยว 3 คู่ พื้นพื้นฐานสามเหลี่ยมของตาเดี่ยวอยู่ใกล้ชิดกับเส้นร่างแหบนส่วนหัว เส้นขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3 อยู่ชิดกึ่งกลางของตาเดี่ยวคู่หลัง

อก (Thorax) อกปล้องแรกมีลวดลายเป็นเส้นเรียงตัวชิดกันตามขวาง (Fig. 1-D) มีขนยาวตั้งอยู่บริเวณมุมขอบล่างของอกปล้องแรก 2 คู่ ส่วนท้ายของสันหลังอกปล้องสุดท้ายมีลวดลายเป็นเส้นขนานตามยาว เส้นขนยาว 2 เส้นปรากฏด้านล่างของขอบบนสันหลังอกปล้องสุดท้าย ไม่มีรูรับ



ความรู้สึก (campaniform sensilla) (Fig. 1-E) ปีกคู่หน้ามีการเรียงตัวของเส้นปีกบริเวณโคนปีก 3 เส้น เส้นปีกทรงมีขนแผ่ขยายกว้าง และส่วนปลายปีกมีเส้นขนเหยียดตรง

ท้อง (Abdomen) ด้านบนปล้องท้องปล้องที่ 3-6 มีแถบสีน้ำตาลบริเวณส่วนกลางของปล้องท้อง (Fig. 1-F) บริเวณด้านข้างของปล้องท้องปล้องที่ 2-8 มีเส้นขนขนาดเล็กเรียงตัวกันหนาแน่นและพบเส้นขนเรียงตัวเป็นรูปหัวใจที่บริเวณด้านข้างปล้องท้อง ส่วนกลางท้องไม่ปรากฏการเรียงตัวของเส้นขน เส้นขนรูปหัวใจที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8 พัฒนาสมบูรณ์เป็นเส้นขนยาว

เพศผู้ มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย ส่วนท้ายของปล้องท้องปล้องที่ 9 ไม่มีเส้นขนยาวเหมือนเพศเมีย ต้นขาคู่หลังไม่ปรากฏเส้นขนเรียงเป็นแถว และแผ่นแข็งด้านล่างของส่วนท้องไม่มีร่องหลุม

เพลี้ยไฟพริกมีลักษณะคล้ายคลึงกับเพลี้ยไฟส้มแอฟริกาใต้ (South African citrus thrips) *Scirtothrips aurantii* ซึ่งเป็นสกุลที่มีเส้นขนขนาดเล็กเรียงตัวกันบริเวณด้านล่างของส่วนท้อง แต่จะมีลักษณะแตกต่างกันตรงที่เพลี้ยไฟพริกจะมีเส้นขนบริเวณปีกเหยียดตรง ในขณะที่เพลี้ยไฟส้มแอฟริกาใต้จะมีเส้นขนโค้งงอเป็นคลื่น

ความสำคัญ เพลี้ยไฟพริก (chilli thrips) หรือ เพลี้ยไฟชาสีเหลือง เป็นเพลี้ยไฟขนาดเล็กพบเข้าทำลายพืชได้เกือบทุกชนิดโดยเฉพาะพืชผักสวนครัว มักเข้าทำลายบริเวณส่วนอ่อนๆ ของพืช เช่น ยอดอ่อน ใบอ่อน ตุ่มตาใบ ดอกและผลอ่อน ทั้งนี้สามารถพบเพลี้ยไฟพริกได้ในทุกสภาพภูมิอากาศ โดยเฉพาะช่วงร้อนและอากาศแห้งแล้ง อีกทั้งยังพบว่าเป็นพาหะนำโรคมานสู่พืชตระกูลแตงอีกด้วย

พืชอาหาร มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ ทูเรียน แตงโม เงาะ มังคุด ลำไย ลิ้นจี่ ทุเรียน เนคทารีน สตอเบอร์รี่ พริก หน่อไม้ฝรั่ง มะเขือเปราะ มะเขือเทศ สะเดา ถั่วลิสง อ้อย ถั่วฝักยาว กุหลาบ มะลิ ดาวเรือง บัว ชา หม่อน ผักชี กระถิน มะนาว ลองกอง กัลยไม้ หอมแดง มันฝรั่ง พญา ยอ บวบ ชมพู มะขามเทศ แมงลัก โหระพา โป๊ยเซียน สาบเสือ มะขาม ผักกะเฉด หน่อไม้ฝรั่ง

เขตการแพร่กระจาย เพลี้ยไฟพริกมีต้นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปัจจุบันสามารถพบได้ทั่วโลกจากการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรโดยเฉพาะพืชผักสวนครัวและผลไม้

เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* (Karny, 1925)

Thrips palmi Karny, 1925: 10

ลำตัว ขนาดเล็ก ลำตัวสีเหลืองอ่อน (Fig. 2-A, 2-B) เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.00 – 1.05 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.15 – 1.25 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่

หัว ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว หนวดสีน้ำตาลอ่อน 8 ปล้อง ส่วนปลายของปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 เรียวและมีสีน้ำตาลอ่อนที่บริเวณโคนปล้องหนวดมีสีเทาเข้มที่ส่วนปลาย และเป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึกรูปส้อม ปล้องหนวดปล้องที่ 6 ถึง 8 มีสีน้ำตาล ปล้องหนวดปล้องที่ 8 ยาวกว่าปล้องที่ 7 มีขนบริเวณตาเดี่ยว 3 คู่ ขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3 อยู่ด้านนอกของตาเดี่ยวที่เรียงตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม (Fig. 2-C) ขนตาเดี่ยวบริเวณท้ายส่วนหัวยาวกว่าขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3



อก ส่วนของอกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีขนยาวตั้งอยู่บริเวณมุมขอบล่างของอกปล้องแรก 2 คู่ และมีขนบริเวณส่วนท้ายอกปล้องแรก 3 คู่ (Fig. 2-D) สันหลังอกปล้องสุดท้ายมีลดกลายเป็นเส้นตรงไม่ต่อเนื่อง แต่มีงูส่วนท้ายของสันหลังอกปล้องสุดท้าย เส้นขนยาว 2 เส้นปรากฏด้านล่างของขอบบนสันหลังอกปล้องสุดท้ายและมีรูรับความรู้สึก (Fig. 2-E) ปีกคู่หน้าขาว โปร่งแสง และมีการเรียงตัวของเส้นปีกบริเวณโคนปีก 3 เส้นและเส้นปีกรองที่ส่วนปลายประมาณ 15 เส้น ขามีสีเดียวกับลำตัว ส่วนของปลายขามี 2 ปล้อง

ท้อง ปล้องท้องปล้องที่ 2 มีขนด้านข้าง 2 คู่ ส่วนท้องด้านบนของลำตัวปล้องที่ 6 ถึง 8 มีกลุ่มขนเรียงตัวกันเป็นเส้น ปล้องละ 1 คู่ ตำแหน่งการเรียงตัวอยู่ด้านล่างรูหายใจที่บริเวณขอบด้านบนของส่วนท้อง เส้นขนรูปหัวใจที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8 พัฒนาสมบูรณ์เป็นเส้นขนยาว (Fig. 2-F) ส่วนท้องด้านล่างของลำตัวปล้องที่ 3 ถึง 7 ปรากฏเส้นขนคู่ที่ 3 อยู่ตรงกลางส่วนท้อง

เพศผู้ มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย เส้นขนรูปหัวใจที่ปล้องท้องปล้องที่ 8 สมบูรณ์ ปล้องท้องด้านล่างปล้องที่ 3-7 มีต่อมในส่วนช่องท้องรูปร่างเรียวยาวเรียงตัวขวางกัน

เพลี้ยไฟฝ้ายมีลักษณะคล้ายคลึงกับเพลี้ยไฟมะเขือ (*Thrips flavus* Schrank) โดยมีลักษณะที่แตกต่างคือ ขนตาเดี่ยวคู่ที่สามของเพลี้ยไฟฝ้ายจะอยู่ใกล้กับฐานของขนตาเดี่ยวคู่แรกมากกว่าเพลี้ยไฟมะเขือ

ความสำคัญ เพลี้ยไฟฝ้าย (cotton thrips) เป็นเพลี้ยไฟขนาดเล็ก-กลาง สีเหลือง เพลี้ยไฟชนิดนี้เข้าทำลายพืชเกือบทุกชนิดที่ปลูกและทุกพื้นที่การเกษตรทั่วประเทศไทย นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาอย่างมากต่อผลิตผลเกษตรส่งออก โดยเฉพาะกล้วยไม้ อีกทั้งยังพบว่าเป็นพาหะนำโรคมานัสพืชตระกูลแตง ทั้งนี้สามารถพบได้ในการระบาดของเพลี้ยไฟดอกไม้ [*Frankliniella schultzei* (Trybom)] และ เพลี้ยไฟพริก (*Scirtothrips dorsalis* Hood) (Palmer et al., 1989)

พืชอาหาร ถั่วลิสง ถั่วเหลือง มันฝรั่ง ข้าวโพด งา ทานตะวัน ฝ้าย มะขามเทศ ตำลึง บวบ มะระ มะระขี้นก ผักบุ้งจีน พริก กะเพรา กวางตุ้ง ฟักทอง ฟัก มะรุม แตงกวา ถั่วแปบผี ถั่วฝักยาว หอมหัวใหญ่ หน่อไม้ฝรั่ง โหระพา ผักชี กระเจี๊ยบเขียว มะเขือเปราะ มะเขือม่วง มะเขือเทศ สะเดา แตงไทย ลำโพง กล้วยไม้ กุหลาบ จำปา บัว เบญจมาศ ดาวเรือง กระถ่อน ฝรั่ง พุทรา มะม่วง มะละกอ ทูเรียน องุ่น ลิ้นจี่ กล้วย ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มังคุด แตงโม ท้อ แคนตาลูป มะม่วงหิมพานต์ ยาสูบ หม่อน หล้าข้าวนก พญาขอ วัชพืช

เขตการแพร่กระจาย เพลี้ยไฟฝ้ายมีถิ่นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และติดไปกับผลผลิตทางการเกษตรที่ส่งไปยังประเทศเขตร้อนทั่วโลก

Thrips hawaiiensis (Morgan, 1913)

Euthrips hawaiiensis Morgan, 1913: 3, *Physothrips emersoni* Girault, 1927a: 2, *Thrips io* Girault, 1927d: 351, *Thrips partirufus* Girault, 1927c: 1, *Thrips lacticolor* Girault, 1928a: 2, *Physothrips marii* Girault, 1928b: 2, *Physothrips mjobergi darci* Girault, 1930: 1



ลำตัว ขนาดเล็ก ลำตัวสีน้ำตาลเข้ม หรือส่วนหัวและอกสีเหลืองส้ม ส่วนท้องสีน้ำตาล (Fig. 3-A, 3-B) เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.10 – 1.15 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.20 – 1.25 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่

หัว ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว หนวดสีน้ำตาลอ่อน 7-8 ปล้อง หนวดปล้องที่ 3 สีเหลือง ปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับรู้ความรู้สึกรูปส้อม ปรากฏขนบริเวณตาเดี่ยว 3 คู่ อยู่ด้านบนของตาเดี่ยวที่เรียงตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม (Fig. 3-C) ขนตาเดี่ยวบริเวณท้ายส่วนหัวมีความยาวใกล้เคียงกับขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3

อก ส่วนของอกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีขนยาวตั้งอยู่บริเวณมุมขอบล่างของอกปล้องแรก 2 คู่ และมีขนบริเวณส่วนท้ายอกปล้องแรก 3 คู่ (Fig. 3-D) สันหลังอกปล้องสุดท้ายมีลวดลายขวางแบบร่างแหที่บริเวณขอบด้านบน และเป็นเส้นตรงแบบห่างมุ่งสู่ขอบด้านล่างของอกปล้องสุดท้ายๆ เส้นขนยาว 2 เส้นปรากฏบนขอบสันหลังอกปล้องสุดท้ายและมีรูรับรู้ความรู้สึก (Fig. 3-E) ปีกคู่หน้าขาวโปร่งแสง และมีการเรียงตัวของเส้นปีกบริเวณโคนปีก 3 เส้นและเส้นปีกรองสั้นกว่าเส้นปีกบริเวณปลายปีก ขามีสีเดียวกับลำตัว ส่วนของปลายขามี 2 ปล้อง

ท้อง ปล้องท้องปล้องที่ 2 มีขนด้านข้าง 2 คู่ เส้นขนรูปหัวใจที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8 พัฒนาสมบูรณ์แต่มีขนาดสั้น (Fig. 3-F) ส่วนท้องด้านล่างของลำตัวปล้องที่ 3 ถึง 7 ปรากฏเส้นขนกระจายทั่วท้องประมาณ 12-25 เส้น

เพศผู้ มีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย ลำตัวสีน้ำตาล

เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย (Hawaiian thrips) มีลักษณะคล้ายคลึงกับเพลี้ยไฟมะละกอ (*Thrips parvispinus* Karny) และเพลี้ยไฟหลากสี (*Thrips coloratus* Schmutz) เพลี้ยไฟทั้งสามชนิดนี้มีส่วนหัวและอกเป็นสีส้มเหลือง และส่วนท้องสีน้ำตาล แต่มีลักษณะที่แตกต่างคือ เพลี้ยไฟมะละกอจะไม่ปรากฏรูรับรู้ความรู้สึกที่บริเวณสันหลังอกปล้องสุดท้าย และเพลี้ยไฟหลากสีจะมีเส้นขนปรากฏด้านล่างของขอบบนสันหลังอกปล้องสุดท้ายและมีรูรับรู้ความรู้สึก

ความสำคัญ เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย สีน้ำตาลหรือน้ำตาลปนส้ม โดยมีส่วนอกสีน้ำตาลอ่อนปนส้มหรือสีส้ม ส่วนท้องสีน้ำตาลเข้ม พบเข้าทำลายส่วนดอกของพืชหลายชนิด เช่น กุหลาบ บัว พุด มะม่วง ส้มโอ เนคทาลิน กล้วย เป็นต้น ทั้งนี้สามารถพบได้ในมีการระบาดของเพลี้ยไฟฝ้าย (*Thrips palmi* (Karny)) และ เพลี้ยไฟพริก (*Scirtothrips dorsalis* Hood) (Palmer et al., 1989)

พืชอาหาร ข้าวโพด มะเขือ หน่อไม้ฝรั่ง พริก กวางตุ้ง สะเดา กระจิน กระจับเขียว กุหลาบ ดาวเรือง เข็มขาว บานชื่น ดาวกระจาย พุทธรักษา ลำโพง ยี่โถ พุดสามสี ทานตะวัน บัว ว่านสีทศปาล์ม มะคาเดเมีย ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มังคุด ลองกอง ลำไย เงาะ ทุเรียน ลิ้นจี่ กล้วย กระท้อน ฝรั่ง มะยม มะละกอ มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ ไม้

เขตการแพร่กระจาย เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวายสามารถพบได้ทั้งในแถบเอเชียและแปซิฟิก มีรายงานการพบทางตอนใต้ของสหรัฐอเมริกา และจาไมก้า (Nakahara, 1994) เพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวายมีทั้งชนิด



สีอ่อนและสีเข้ม ทั้งนี้ชนิดที่มีสีเข้มมีรายงานว่า เป็นพาหะนำโรค Tosopovirus ในพืชตระกูลแตง (Wang *et al.*, 2010)

ผลการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI (Cytochrome Oxidase subunit I) ของเพลี้ยไฟพริก เพลี้ยไฟฝ้าย และเพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย โดยนำสารละลายที่ได้จากการทำ PCR มาดำเนินการโคลนด้วยเวกเตอร์ pGEM-T Easy และเลือกโคลนที่บรรจุยีนไปวิเคราะห์ลำดับเบส ด้วยเครื่อง automate sequencer ทำให้ทราบขนาดยีน COI ของเพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิด หลังจากนั้นดำเนินการเปรียบเทียบลำดับเบสของเพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิดกับฐานข้อมูล EMBL/GenBank และเพลี้ยไฟชนิดอื่น ได้แก่ เพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella schultzei* เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* เพื่อหาความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงกันของเพลี้ยไฟแต่ละชนิดที่เก็บรวบรวมได้ จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบส ดีเอ็นเอผลผลิตของเพลี้ยไฟพริก เพลี้ยไฟฝ้าย และเพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย โดยการศึกษาความสัมพันธ์กับประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ (Molecular phylogenetics of Thysanoptera) และใช้โปรแกรม neighbor joining/UPGMA แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (sequence divergence) พบว่า เพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางอนุชีววิทยา โดยเพลี้ยไฟชนิดเดียวกันที่อยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกันจะมีความแปรปรวนของลำดับพันธุกรรมเล็กน้อย (Fig. 4) การศึกษานี้ทำให้ทราบถึงชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ที่เป็นศัตรูสำคัญของหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย และใช้เป็นข้อมูลประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟที่ติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้าและส่งออก และสามารถนำเทคนิควิธีการศึกษามาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟหรือแมลงชนิดอื่นๆ โดยการศึกษาลักษณะทางอนุชีววิทยาที่มีข้อได้เปรียบที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างแมลงได้ทุกระยะทั้งระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยเวลาในการเลี้ยงตัวอย่างแมลงนั้นๆ ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ตัวเต็มวัยในการจำแนกชนิด อีกทั้งยังสามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงทั้งในระยะไข่และตัวอ่อนได้ ช่วยลดระยะเวลาการกักเก็บสินค้าเพื่อตรวจสอบ และสามารถป้องกันชนิดแมลงศัตรูพืชสำคัญที่ติดมากับสินค้านำเข้าได้ทันต่อเหตุการณ์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย โดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกหน่อไม้ฝรั่งในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี เพชรบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ลพบุรี สระบุรี นครสวรรค์ และเพชรบูรณ์ เป็นต้น ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึงเดือนกันยายน 2564 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 220 ตัวอย่างและสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ได้



3 ชนิด ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera ได้แก่ เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood) 181 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny 33 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟดอกไม้ฮาวาย *Thrips hawaiiensis* (Morgan) 6 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลาย เขตการแพร่กระจายโดย เพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ใบ ดอก และหน่อของหน่อไม้ฝรั่ง ทั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน COI (Cytochrome Oxidase subunit I) ของเพลี้ยไฟที่เก็บรวบรวมได้ในแต่ละจังหวัด สามารถสรุปได้ว่าชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae ที่พบในเขตภาคกลางของประเทศไทย ไม่มีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยาในระดับชนิด จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิด นำตัวอย่างเพลี้ยไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรตลอดจนใช้ในด้านการกักกันพืช ซึ่งเป็นไปตามมาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measure: SPS Agreement) ขององค์การการค้าโลก (WTO) ที่ประเทศสมาชิกรวมทั้งประเทศไทยจะต้องใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชเพื่อปกป้องสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม (อรุณี, 2543) และใช้เป็นข้อมูลสำหรับตรวจสอบความถูกต้องนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ ทั้งนี้สามารถใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาที่ได้เรียนรู้จากการศึกษาทดลองจำแนกชนิดแมลงต่างๆ ได้ และสามารถถ่ายทอดเทคนิคให้กับบุคลากรที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงานได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 75 หน้า.
- อรุณี วงษ์กอบรัชฎ์. 2543. การจัดทำบัญชีรายชื่อแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช. เอกสารประกอบการบรรยายพิเศษการประชุมสัมมนา เรื่อง “การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) และการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) เพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร” วันที่ 26 กันยายน 2543 ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294–299.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/. *NT. Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.



- Karimi, J., M. Hassani-Kakhki and M. M. Awal. 2010. Identifying thrips (Insecta: Thysanoptera) using DNA Barcodes. *Journal of Cell and Molecular Research*. 2(1): 35-41.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Nakahara, S. (1994) The genus Thrips Linnaeus (Thysanoptera: Thripidae) of the New World. United States Department of Agriculture. Technical Bulletin, 1822, 1–183.
- Palmer, J. M., L. A. Mound and G. J. du Heaume. 1989. (ed.). CIE Guides to Insects of Importance to Man: 2. Thysanoptera. C.A.B International Institute of Entomology.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for Reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Wang, C. L. and S. Okajima. 1995. Observation in Taiwan on the identity of the Cuban laurel thrips (Thysanoptera, Phlaeothripidae). *Journal of New York Entomological Society*. 103(2): 185-190.



Table 1 Location and number of thrips samples collected from asparagus crops during October 2019 – September 2021

| Province | District | Sub-district | Number of thrips samples | Location |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|--------------------------------------|
| <i>Scirtothrips dorsalis</i> (Hood) | | | | |
| Phetchaburi | Tha yang | Khao ka pook | 16 | N 12° 44' 49.9" E 99° 42' 23.2" |
| Phetchaburi | Cha am | Khao yai | 3 | N 12° 51' 07" E 99° 55' 01" |
| Kanchanaburi | Tha ma ka | Tha mai | 15 | N 13° 54' 24.31" E 99° 39' 24" |
| Kanchanaburi | Tha ma ka | Tha ma ka | 18 | N 13° 55' 41.7" E 99° 47' 46.02" |
| Kanchanaburi | Tha ma ka | Tha ma ka | 5 | N 13° 55' 51.63" E 99° 47' 40.52" |
| Kanchanaburi | Tha ma ka | Tha mai | 11 | N 13° 44' 50.3" E 99° 39' 22" |
| Kanchanaburi | Tha ma ka | Tha mai | 6 | N 13° 55' 10.07" E 99° 47' 34.58" |
| Kanchanaburi | Tha ma ka | Tha mai | 7 | N 13° 55' 3.24" E 99° 47' 52.39" |
| Kanchanaburi | Tha muang | Thung thong | 10 | N 13° 58' 54.5" E 99° 38' 50.81" |
| Kanchanaburi | Huay kra jao | Sra long rua | 6 | N 14° 22' 12.67" E 99° 46' 52.59" |
| Kanchanaburi | Dan ma kham tia | Chorakae phueak | 3 | N 15° 50' 53.88" E 99° 21' 3.14" |
| Kanchanaburi | Bo ploy | Nong khum | 4 | N 14° 15' 15.59" E 99° 27' 39.96" |
| Naknonpathom | Muang | Mab kae | 7 | N 13° 52' 0.19" E 100° 3' 4.54" |
| Naknonpathom | Muang | Thab luang | 6 | N 13° 52' 54.75" E 100° 0' 42.86" |
| Naknonpathom | Muang | Nong ngu leaum | 3 | N 13° 53' 35" E 99° 56' 59" |
| Naknonpathom | Muang | Nong ngu leaum | 2 | N 13° 53' 50" E 99° 57' 55" |



Table 1 Location and number of thrips samples collected from asparagus crops during October 2019 – September 2021 (Continue)

| Province | District | Sub-district | Number of thrips samples | Location |
|--------------|----------------|----------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Nakhonpathom | Kam phang sean | Thung luk nok | 6 | N 14° 2' 14.28" E 99° 53' 10.44" |
| Nakhonpathom | Kam phang sean | Huay mon thong | 3 | N 13° 58' 50" E 99° 56' 57" |
| Nakhonsawan | Ta klee | Ta klee | 2 | N 15° 17' 33.6" E 100° 24' 59.27" |
| Nakhonsawan | Tak fha | U dom thun ya | 2 | N 15° 26' 13.01" E 100° 28' 45.31" |
| Nakhonsawan | Pai sa lee | Na khom | 2 | N 15° 25' 24" E 100° 26' 45" |
| Lopburi | Chai ba dan | Na som | 3 | N 15° 14' 44.88" E 100° 27' 52.6" |
| Lopburi | Chai ba dan | Tha din dum | 8 | N 15° 07' 41.92" E 100° 9' 5.64" |
| Lopburi | Tha luang | Sab jam pa | 4 | N 15° 0' 46.64" E 101° 13' 16.12" |
| Lopburi | Tha luang | Nong pak wan | 5 | N 15° 06' 41" E 101° 10' 33" |
| Lopburi | Ban mee | Yang cham | 4 | N 14° 58' 33" E 100° 28' 08" |
| Saraburi | Wang muang | Wang muang | 3 | N 14° 51' 58" E 101° 6' 35" |
| Phetchabun | Nong phai | Wat boat | 5 | N 16° 03' 26" E 101° 09' 07" |
| Suphanburi | U thong | Don ka | 6 | N 14° 27' 56" E 99° 53' 10" |
| Suphanburi | Song phi nong | Sri | 6 | N 14° 13' 30" E 99° 58' 15" |
| Total | | | 181 | |



Table 1 Location and number of thrips samples collected from asparagus crops during October 2019 – September 2021 (Continue)

| Province | District | Sub-district | Number of thrips samples | Location |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| <i>Thrips palmi</i> (Karny) | | | | |
| Kanchanaburi | Tha ma ka | Tha mai | 6 | N 13° 54' 24.31" E 99° 39' 24" |
| Kanchanaburi | Tha ma ka | Tha ma ka | 2 | N 13° 55' 41.7" E 99° 47' 46.02" |
| Kanchanaburi | Tha ma ka | Tha ma ka | 4 | N 13° 55' 51.63" E 99° 47' 40.52" |
| Kanchanaburi | Tha muang | Thung thong | 4 | N 13° 58' 54.5" E 99° 38' 50.81" |
| Kanchanaburi | Dan ma kham tia | Chorakae phueak | 3 | N 15° 50' 53.88" E 99° 21' 3.14" |
| Nakhonpathom | Kam phang sean | Thung luk nok | 6 | N 14° 2' 14.28" E 99° 53' 10.44" |
| Lopburi | Chai ba dan | Na som | 4 | N 15° 14' 44.88" E 100° 27' 52.6" |
| Lopburi | Chai ba dan | Tha din dum | 4 | N 15° 07' 41.92" E 100° 9' 5.64" |
| Total | | | 33 | |
| <i>Thrips hawaiiensis</i> (Morgan) | | | | |
| Phetchaburi | Cha am | Khao yai | 3 | N 12° 51' 07" E 99° 55' 01" |
| Singburi | Muang | Hua phai | 3 | N 14° 58' 10" E 100° 25' 55" |
| Total | | | 6 | |



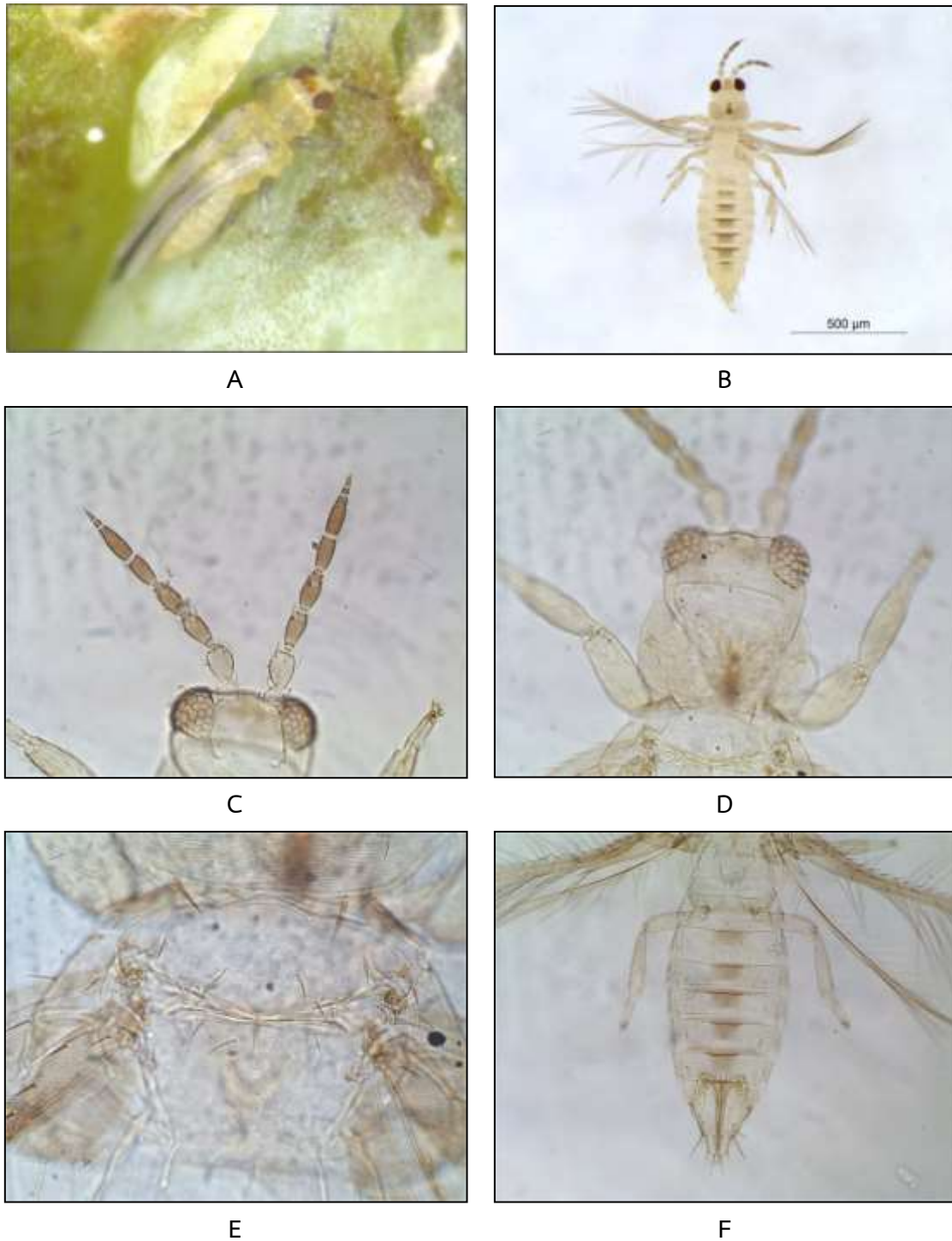


Figure 1 Morphology of chilli thrips; *Scirtothrips dorsalis* (Hood)

A. Adult

B. Slide permanent

C. Head - antennae

D. Pronotum

F. Metanotum

G. Tergites III – VII with dark patch medially

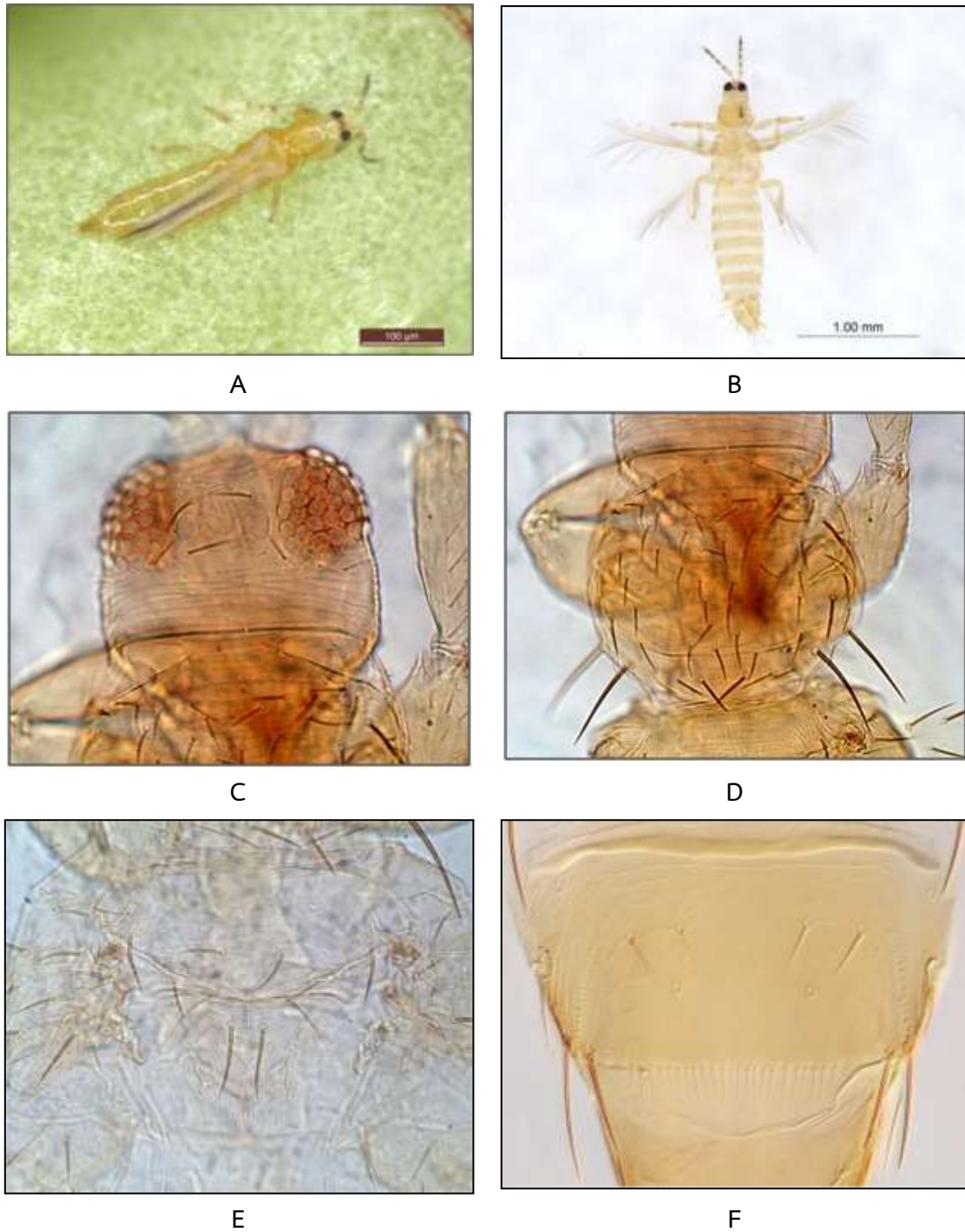


Figure 2 Morphology of cotton thrips; *Thrips palmi* (Karny)

- | | |
|--------------|----------------------|
| A. Adult | B. Slide permanent |
| C. Head | D. Pronotum |
| F. Metanotum | G. Abdominal tergite |

VIII

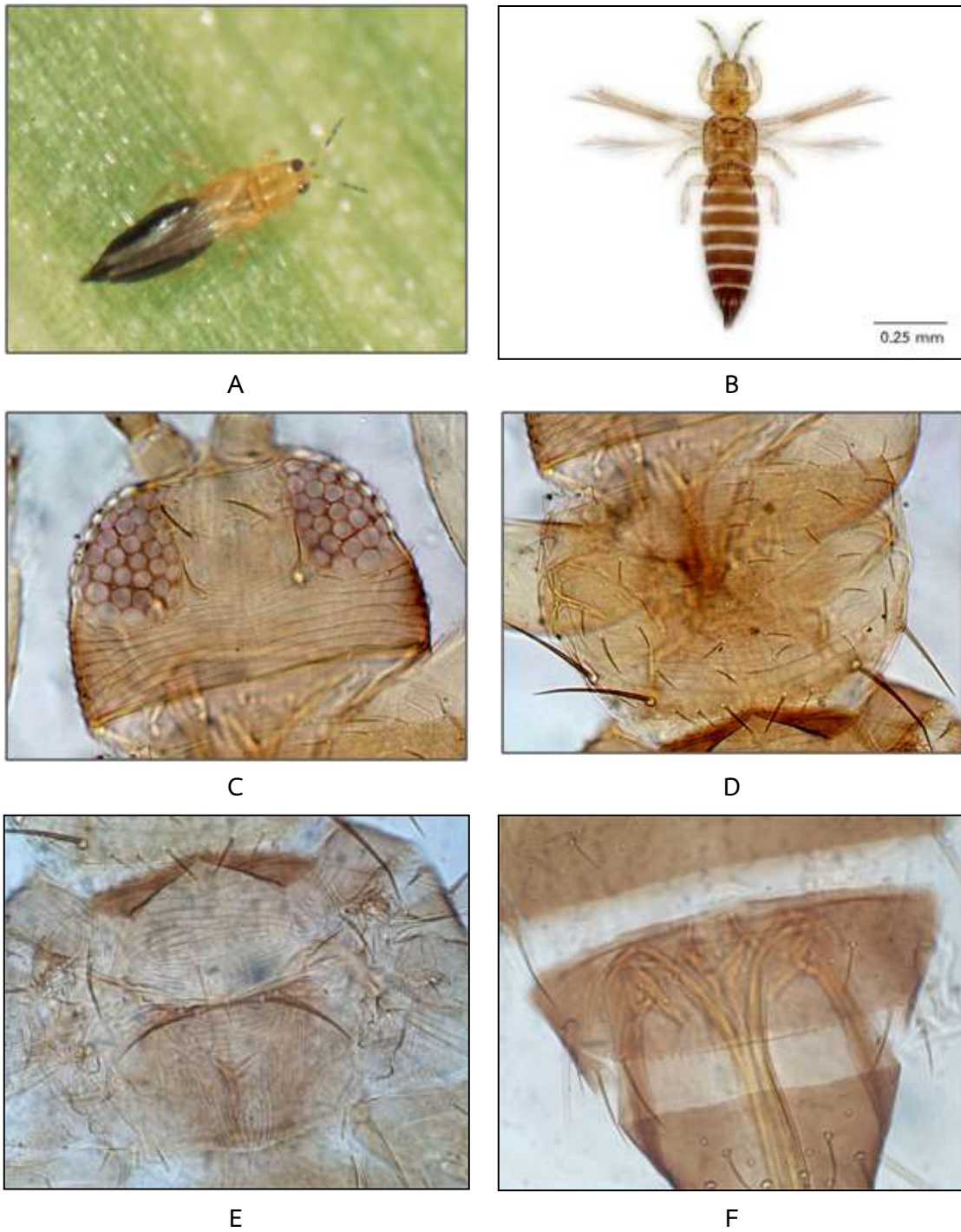


Figure 3 Morphology of Hawaiian thrips; *Thrips hawaiiensis* (Morgan)

A. Adult

B. Slide permanent

C. Head

D. Pronotum

F. Metanotum

G. Abdominal tergite VIII

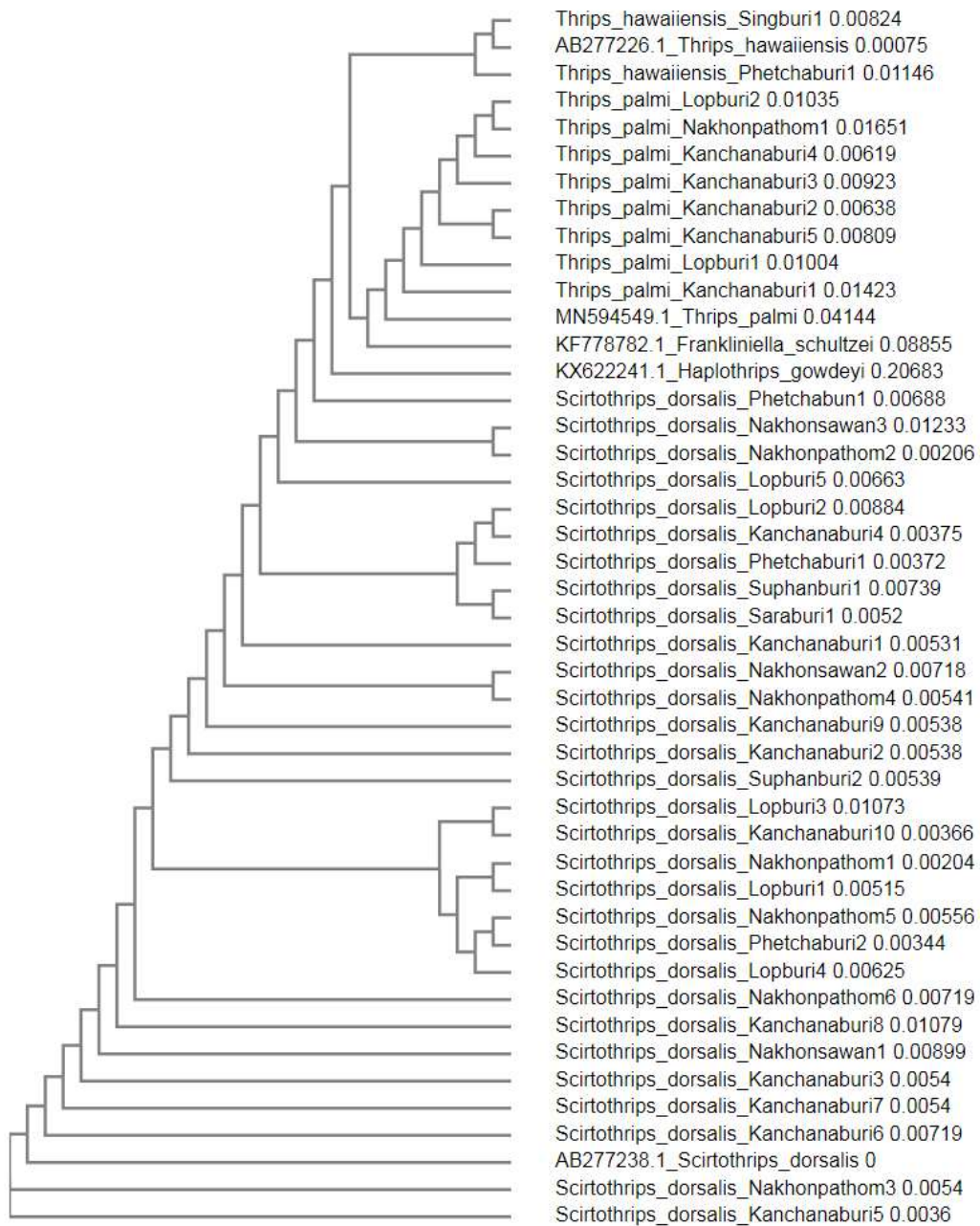


Figure 4 Phylogenetic trees showing the relationship among 3 thrips populations of *Scirtothrips dorsalis*, *Thrips palmi* and *Thrips hawaiiensis* which collected from asparagus crops in Thailand

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* ในข้าว
ด้วยเทคนิค Real-time PCR

Detection of *Burkholderia glumae* in Rice by Real-Time PCR

ทิพวรรณ กันหาญาติ ญัฐธิมา โฆษิตเจริญกุล บุรณี พัวพงษ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเครื่อง กาญจนา ศรีไม้
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Burkholderia glumae, causing bacterial panicle blight disease of rice, is a quarantine pest in Thailand that must be monitored because bacteria can be transmitted by seeds. Effective detection methods are required to prevent further dispersal of the pathogen from imported seeds. This study was conducted to validate the real-time PCR technique to detect *B. glumae* in rice during October 2018 - September 2021. The results from this study showed that the primers, which were designed based on the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) region, were specific to *B. glumae*. Whereas the set of primers, which were designed based on the *rhs* family gene, showed specificity for both *B. glumae* and *B. gladioli* pv. *gladioli*. The sensitivity of the primers was also evaluated and found that *B. glumae* could be detected at the minimum of the concentrations at 15 CFU/ml. The primers could also detect *B. glumae* in the rice seed samples mixed with inoculated seeds.

Keywords : detection, panicle blight disease, rice

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-01-00-04-62



บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Burkholderia glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวจัดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยที่ต้องเฝ้าระวังเพราะสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ วิธีการตรวจหาที่มีประสิทธิภาพจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อที่อาจติดมากับเมล็ดนำเข้า ในการทดลองนี้ทำการทดสอบเทคนิค Real-time PCR สำหรับตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าว ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 – กันยายน 2564 พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) สามารถตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ได้อย่างเฉพาะเจาะจง ส่วนไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *rhs* เกิดผลบวกกับแบคทีเรีย *B. glumae* และ *B. gladioli* pv. *gladioli* ได้ โดยไพรเมอร์ทั้งสองมีความไวในการตรวจหาเชื้อที่ความเข้มข้นเซลล์ 15 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในตัวอย่างเมล็ดข้าวที่ทำการปลูกเชื่อมสมกับตัวอย่างข้าวได้ ถูกต้องทุกตัวอย่าง

คำหลัก : การตรวจหา โรครวงไหม้ ข้าว

คำนำ

แบคทีเรีย *Burkholderia glumae* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรครวงไหม้ (bacterial panicle blight) ของข้าว พบรายงานครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่นและแพร่ระบาดในพื้นที่ปลูกข้าวของหลายประเทศทั่วโลก โดยเชื้อสร้างความเสียหายทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงสูงสุดถึง 75 % (Trung *et al.*, 1993) สำหรับในประเทศไทยยังไม่พบรายงานการเกิดโรคจากเชื้อชนิดนี้ แต่เนื่องจากแบคทีเรีย *B. glumae* สามารถติดไปกับเมล็ด (seed-borne) และเชื้อสามารถเจริญได้ถึงแม้มีอุณหภูมิสูงถึง 41 องศาเซลเซียส จึงทำให้เป็นที่กังวลของหลายประเทศเพราะเริ่มมีรายงานการแพร่ระบาดของโรครวงไหม้ในประเทศเขตร้อนและกึ่งร้อนมากขึ้น (Ham *et al.*, 2011) หากเกิดการแพร่ระบาดของแบคทีเรีย *B. glumae* ในไทยย่อมส่งผลกระทบต่อทางเศรษฐกิจ เนื่องจากข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญของประเทศไทยซึ่งมีพื้นที่ปลูกประมาณ 56 ล้านไร่กระจายอยู่ทั่วประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) แบคทีเรีย *B. glumae* จึงนับเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งทางด้านกักกันพืชที่ต้องมีการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเคลื่อนย้ายหรือนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวจากประเทศที่มีการระบาดของโรค ดังนั้นการหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ จะสามารถลดโอกาสการแพร่ระบาดของเชื้อที่อาจติดมากับเมล็ดได้ จากรายงานของ Nandakumar *et al.* (2009) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* เป็นสาเหตุอาการรวงไหม้ในข้าวได้เช่นเดียวกัน ทำให้การตรวจสอบในเบื้องต้นโดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อและลักษณะอาการของโรคทำได้ยากขึ้น เทคนิค real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่มีประสิทธิภาพ ตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยในตัวอย่างข้าวได้ (Saylor



et al., 2006; Kim et al., 2012) จากข้อดีของเทคนิค งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคนิค real-time PCR มาใช้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าว เพื่อลดโอกาสการแพร่ระบาดของเชื้อที่อาจติดมากับเมล็ดและสามารถนำไปปรับใช้ในงานเฝ้าระวังศัตรูพืชที่ซุกกักกันต่อไปในอนาคตได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ real-time PCR
8. เครื่องชั่ง
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยา real-time PCR
11. เมล็ดข้าว

วิธีการ

1. การเตรียมแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรีย *B. glumae* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก International Rice Research Institute (IRRI) เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าว และแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขั้นตอนตามแนะนำของบริษัท โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 ลูกบดละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นเติมด้วย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000



รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบ

2. ทดสอบสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวได้อย่างเฉพาะเจาะจง และคัดเลือกเพื่อสังเคราะห์ จากนั้นทำการทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) และใช้ชุดน้ำยา LightCycler 480 SYBR green I master (Roche Diagnostics, Thailand) ในการทำปฏิกิริยารวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X LightCycler 480 SYBR Green I Master (Faststart Taq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP, SYBR green dye และ $MgCl_2$), 0.25 μM primer และดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *B. glumae* 1 ไมโครลิตร โดยมีขั้นตอนควบคุมอุณหภูมิเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดังนี้ initial-denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที annealing 63 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที extension 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที (ทำซ้ำ denaturing annealing และ extension จำนวน 45 รอบ) จากนั้นทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า melting temperature (T_m) ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 65-95 องศาเซลเซียส โดยเพิ่ม 0.1 องศาเซลเซียส/วินาที เมื่อสิ้นสุดลดอุณหภูมิลงที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

3. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*

นำดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *B. glumae* แบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าวและแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ มาวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR รายงานผลการมีหรือไม่มีผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายจากการวิเคราะห์ค่า C_p และ melting curve เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย *B. glumae* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก IRRI

4. ทดสอบความไว (sensitivity) ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*

ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรีย *B. glumae* ที่สามารถตรวจหาได้ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *B. glumae* บนอาหาร King's B บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} เท่า จากนั้นเกลี่ยเชื้อให้กระจายบนอาหารด้วยวิธี spread plate บนอาหาร King's B ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และใช้เซลล์



แขวนลอยที่เหลือแต่ละความเข้มข้นจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR โดยเปรียบเทียบกับ conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997)

5. ทดสอบเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* จากตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายโรครวงไหม้ของข้าวจากแปลงนาของเกษตรกรเพื่อนำมาใช้ในการทดสอบด้วยเทคนิค real-time PCR

5.1 การตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* จากใบหรือกาบใบข้าว

เตรียมตัวอย่างโดยตัดส่วนของใบหรือกาบใบยาว 2 เซนติเมตร บดในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) โดยใช้ชุดน้ำยา LightCycler 480 SYBR green I master (Roche Diagnostics, Thailand) ในการทำปฏิกิริยารวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X LightCycler 480 SYBR Green I Master (Faststart Taq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP, SYBR green dye และ MgCl₂), 0.25 uM primer และตัวอย่างทดสอบ 1 ไมโครลิตร โดยมีรายละเอียดโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR เช่นเดียวกับข้อ 2.2 เปรียบเทียบผลกับ conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997) และการแยกเชื้อบนอาหาร King's B

5.2 การตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* จากเมล็ดข้าว

เตรียมตัวอย่างโดยแช่เมล็ดจำนวน 20 เมล็ด ในน้ำกลั่นหนึ่งขวดเชื้อ 2 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า 30 นาที ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยสภาวะเช่นเดียวกับข้อ 2.2 เปรียบเทียบผลกับ conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997) และการแยกเชื้อบนอาหาร King's B

เวลาและสถานที่

| | |
|---------|--|
| เวลา | ตุลาคม 2561 – กันยายน 2564 |
| สถานที่ | ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานбакเตรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร |

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลอง (Table 1) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าวและแบคทีเรียสาเหตุโรคในพืชหลายชนิด ได้แก่ *B. glumae*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *Acidovorax cattleyae*, *A. citrulli*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), *Dickeya zea* (*E. chrysanthemi* pv. *zea*) และ



Ralstonia solanacearum เลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 1 ลูบ ในการสกัดดีเอ็นเอขึ้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลอง

2. ทดสอบสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวได้อย่างเฉพาะเจาะจง และดำเนินการทดสอบไพรเมอร์เบื้องต้นด้วย conventional PCR ได้ไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *B. glumae* ได้เฉพาะเจาะจง จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ คือ GL-13F/GL-14R, Forward/Reverse และ Glu-FW/Glu-RW ส่วนคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R ให้ผลเป็นบวก โดยเกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 138 คู่เบส ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ได้เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *B. glumae* คัดเลือกไพรเมอร์ BG1F/BG1R ที่ออกแบบจากบริเวณ 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) และ ไพรเมอร์ Forward/Reverse ที่ออกแบบจากยีน *rhs* เพื่อใช้ในการทดสอบ เนื่องจากมีขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายเหมาะสมสำหรับการทดสอบด้วยเทคนิค real-time PCR

ดำเนินการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R มีขั้นตอนควบคุมอุณหภูมิเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดังนี้ Pre-incubation 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที Amplification จำนวน 45 รอบ ประกอบด้วย denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที annealing 63 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า melting temperature (Tm) ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 65-95 องศาเซลเซียส โดยเพิ่ม 0.1 องศาเซลเซียส/ วินาที เมื่อสิ้นสุดลดอุณหภูมิลงที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

คู่ไพรเมอร์ Forward/Reverse มีขั้นตอนควบคุมอุณหภูมิดังนี้ Pre-incubation 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที Amplification จำนวน 45 รอบ ประกอบด้วย denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที annealing 60 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที extension 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า melting temperature ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 65-95 องศาเซลเซียส โดยเพิ่ม 0.1 องศาเซลเซียส/ วินาที เมื่อสิ้นสุดลดอุณหภูมิลงที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

3. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*

การทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R สำหรับการตรวจหาแบคทีเรีย *B.*



glumae ด้วยเทคนิค real-time PCR เมื่อวิเคราะห์ melting temperature (Tm) และ melting peak ของผลผลิต PCR พบว่าแบคทีเรีย *B. glumae* และ *B. gladioli* pv. *gladioli* มีค่า Tm เท่ากับ 82.80 °C และ 82.84 °C ตามลำดับ ใกล้เคียงกับรายงานของ Kim *et al.* (2012) ที่มีค่า Tm เท่ากับ 81.50 °C และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 10 ไอโซเลท แบคทีเรีย *P. fuscovaginae*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *A. cattleyae*, *A. citrulli*, *D. zea*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* และ *R. solanacearum*

การทดสอบความจำเพาะของคูไพรเมอร์ Forward/Reverse พบว่าเมื่อวิเคราะห์ Tm และ melting peak ของผลผลิต PCR พบว่ามีค่า Tm เท่ากับ 83.36 °C ใกล้เคียงกับรายงานของ Saylor *et al.* (2006) ที่มีค่า Tm เท่ากับ 82.50 °C สามารถตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ได้เฉพาะเจาะจงและให้ผลการทดสอบเป็นลบกับแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 10 ไอโซเลท แบคทีเรียที่มีรายงานเป็นสาเหตุโรคในข้าว ได้แก่ *P. fuscovaginae*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola* แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอีกหลายชนิด ได้แก่ *A. cattleyae*, *A. citrulli*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *D. zea*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* และ *R. solanacearum* (Table 1, 2)

4. ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*

การทดสอบความไวของคูไพรเมอร์ BG1F/BG1R สำหรับตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าสามารถตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์ 15 โคโลนี/มิลลิลิตร แตกต่างจากรายงานของ Kim *et al.* (2012) ที่สามารถตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์ 1×10^2 โคโลนี/มิลลิลิตร ส่วนการทดสอบคูไพรเมอร์ Forward/Reverse พบว่ามีความไวในการตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ความเข้มข้น 15 โคโลนี/มิลลิลิตร แตกต่างจากรายงานของ Saylor *et al.* (2006) สามารถตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ได้ที่ความเข้มข้น 1-10 เซลล์ โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ที่ใช้ในเทคนิค real-time PCR มีความไวกว่าวิธี conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997) ที่มีความไวในการตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ความเข้มข้นเซลล์ 1.5×10^3 โคโลนี/มิลลิลิตร (Figure 1, Table 3)

5. ทดสอบเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* จากตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายโรครวงไหม้ของข้าว นำมาแยกเชื้อและตรวจยืนยันด้วย conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997) ไม่พบแบคทีเรีย *B. glumae* ในตัวอย่างที่ตรวจ จึงผสมแบคทีเรีย *B. glumae* ในตัวอย่างข้าวเพื่อใช้ในการทดสอบ (Figure 2) การตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Kim *et al.* (2012) และ Saylor *et al.* (2006) จากใบหรือกาบใบข้าวและเมล็ดข้าวที่มีลักษณะ



อาการคล้ายกับโรครวงไหม้ (panicle blight) พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้ถูกต้องทุกตัวอย่างที่ตรวจ โดยมีผลการทดสอบเป็นบวกในตัวอย่างกาบใบข้าวและเมล็ดข้าวที่ผสมแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ใช้ในการทดสอบสอดคล้องกับผลการตรวจด้วย conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997) (Figure 3)

ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบทั้ง 2 คู่ มีความไวในการตรวจเท่ากัน แต่เมื่อพิจารณาถึงการทดสอบความจำเพาะจากรายงานของ Kim *et al.* (2012) พบว่าไพรเมอร์ Forward/Reverse ที่ออกแบบจากบริเวณ 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) ของ Saylor *et al.* (2006) เกิดผลบวกกับแบคทีเรียอ้างอิง (type strain) *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* KACC 10133 สาเหตุโรค bacterial halo blight ของข้าว ซึ่งหากนำมาใช้ในการตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวแล้วอาจเกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ ดังนั้น จากรายงานดังกล่าวรวมทั้งการทดสอบจากงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า คู่ไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR คือไพรเมอร์ BG1F/BG1R ที่ออกแบบจากยีน *rhs* family ตามรายงานของ Kim *et al.* (2012)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดสอบเพื่อตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่าไพรเมอร์ Forward/Reverse ใช้ตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ได้อย่างเฉพาะเจาะจง ส่วนคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R เกิดผลบวกกับแบคทีเรีย *B. glumae* และ *B. gladioli* pv. *gladioli* เทคนิค Real-time PCR มีความไวในการตรวจแบคทีเรียความเข้มข้นเซลล์ 15 โคโลนี/มิลลิลิตร ใกล้เคียง conventional PCR ที่มีความไวในการตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ความเข้มข้นเซลล์ 1.5×10^3 โคโลนี/มิลลิลิตร การตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* จากตัวอย่างใบหรือกาบใบข้าวและเมล็ดข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายกับโรครวงไหม้ (panicle blight) พบว่าสามารถตรวจหาแบคทีเรียได้ถูกต้องทุกตัวอย่างที่ตรวจ โดยมีผลการทดสอบเป็นบวกในตัวอย่างกาบใบข้าวและเมล็ดข้าวที่ผสมแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ใช้ในการทดสอบสอดคล้องกับผลการตรวจด้วยวิธี conventional PCR คู่ไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR คือไพรเมอร์ BG1F/BG1R เนื่องจากมีความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *B. glumae* ไม่เกิดผลบวกกับแบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าวชนิดอื่น

เอกสารอ้างอิง

- สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. *สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2563*. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร กรุงเทพฯ. 215 น.
- Ham, J.H., R.A. Melanson and M.C. Rush. 2011. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? *Mol. Plant Pathol.* 12:329-339.



- Kim, B.K., M.S. Cho, M.H. Kim, H.J. Choi, M.J. Kang and H.S. Shim. 2012. Rapid and specific detection of *Burkholderia glumae* in rice seed by real-time Bio-PCR using species-specific primers based on an rhs family gene. *Plant Dis.* 96: 577–580.
- Nandakumar, R., A. Shahjahan, X. Yuan, E. Dickstein, D. Groth, C. Clark and R.R. Cartwright. 2009. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Dis.* 93: 896-905.
- Sayler, R.J., R.D. Cartwright and Y.N. Yang. 2006. Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. *Plant Dis.* 90: 603–610.
- Takeuchi, T., H. Sawada, F. Suzuki and I. Matsuda. 1997. Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by PCR using primers selected from the 16S-23S rDNA spacer regions. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63: 455-462.
- Trung, H.M., N.V. Van, N.V. Vien, D.T. Lam and M. Lien. 1993. Occurrence of rice grain rot disease in Vietnam. *Int Rice Res Notes* 18: 30.



Table 1 Bacterial strains used in this study and result of specificity test.

| Bacterial species | | Origin | Primer sets | | |
|---|------------|-------------------|----------------|-----------------|----------|
| | | | GL-13f/ GL-14r | Forward/Reverse | BG1F/BGR |
| <i>Burkholderia glumae</i> | | IRRI | + | + | + |
| <i>Pseudomonas fuscovaginae</i> | | IRRI | - | - | - |
| <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> | DOABCC2562 | Suphan Buri | - | - | - |
| | DOABCC2568 | Suphan Buri | - | - | - |
| <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> | DOABCC2561 | Suphan Buri | - | - | - |
| | DOABCC2563 | Suphan Buri | - | - | - |
| <i>Acidovorax cattleyae</i> | DOABCC2078 | Nakhon Pathom | - | - | - |
| <i>Acidovorax citrulli</i> | DOABCC1228 | Nakhon Ratchasima | - | - | - |
| | DOABCC1364 | Khon Kaen | - | - | - |
| <i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> | DOABCC2059 | Nakhon Pathom | - | - | + |
| | DOABCC2479 | Pathum Thani | - | - | + |
| <i>Dickeya zeae</i> | DOABCC2515 | Chiang Mai | - | - | - |
| <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> | DOABCC0681 | Phetchabun | - | - | - |
| | DOABCC2802 | Lamphun | - | - | - |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | DOABCC1954 | Chiang Mai | - | - | - |



Table 1 Bacterial strains used in this study and result of specificity test. (continue)

| Bacterial species | Origin | Primer sets | | |
|-----------------------------|--------|----------------|-----------------|----------|
| | | GL-13f/ GL-14r | Forward/Reverse | BG1F/BGR |
| Unknown, isolated from seed | U843-1 | Kamphaeng Phet | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U843-2 | Kamphaeng Phet | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U870-1 | Nakhon Sawan | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U870-2 | Nakhon Sawan | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U902-1 | Saraburi | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U902-2 | Saraburi | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U903-1 | Saraburi | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U903-2 | Saraburi | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U914-1 | Ratchaburi | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U914-2 | Ratchaburi | - | - |

+ and – indicates species was detected or not detected, respectively



Table 2 Primers used in this study.

| Primer | Sequences (5'-3') | Annealing temperature (°C) | Amplicon size (bp) | References |
|---------|-------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------------|
| BG1F | CCGCGCTGTTTCATGAGGGATAA | 63 | 138 | Kim <i>et al.</i> (2012) |
| BG1R | CGGGCGGAACGACGGTAAGT | | | |
| Forward | ACGTTTCAGGGATRCTGAGCAG | 60 | 282 | Sayler <i>et al.</i> (2006) |
| Reverse | AGTCTGTCTCGCTCTCCCGA | | | |
| GL-13f | ACACGGAAACCTGGGTA | 60 | 400 | Takeuchi <i>et al.</i> (1997) |
| GL-14r | TCGCTCTCCCGAAGAGAT | | | |

Table 3 Ct values for the bacterial cell dilutions in real-time PCR detection

| Cell suspensions (CFU/ml) | Ct value | |
|------------------------------|-----------------|-----------|
| | Forward/Reverse | BG1F/BG1R |
| 1.5×10^1 | 38.03 | 36.10 |
| 1.5×10^2 | 36.86 | 34.52 |
| 1.5×10^3 | 35.14 | 32.52 |
| 1.5×10^4 | 33.62 | 31.27 |
| 1.5×10^5 | 30.43 | 28.26 |
| 1.5×10^6 | 28.85 | 26.33 |
| 1.5×10^7 | 25.30 | 24.24 |



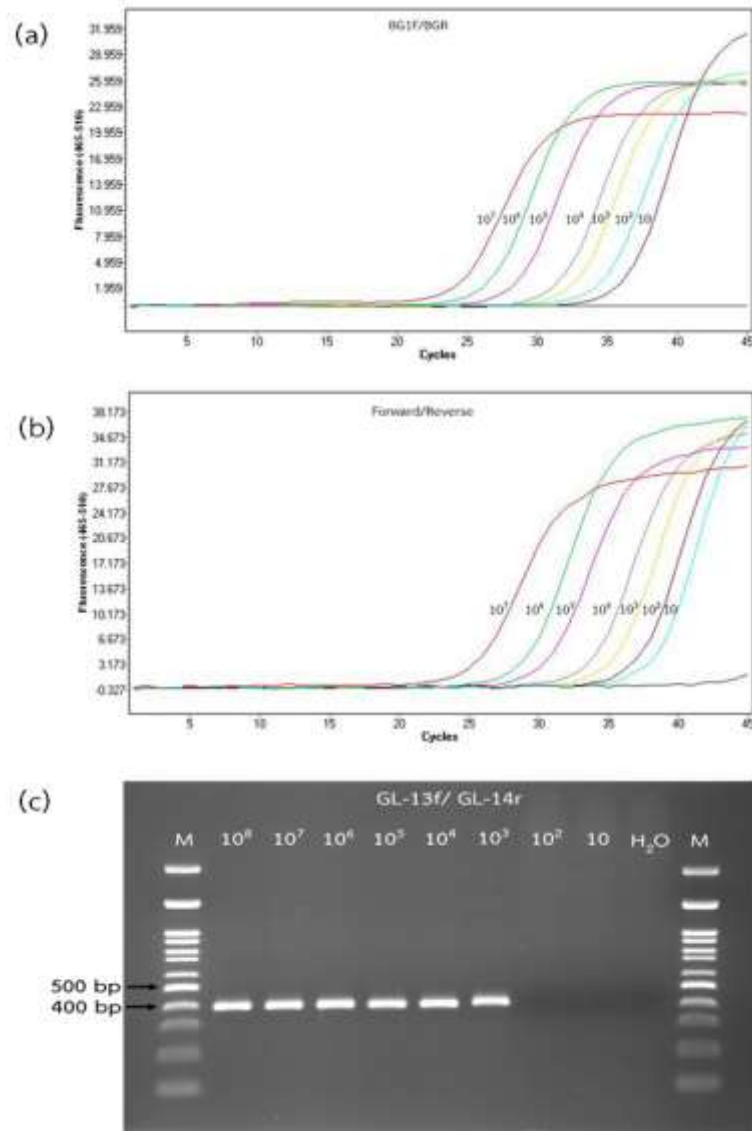


Figure 1 Sensitivity of real-time PCR and conventional PCR. (a-b) Correlation between bacterial number and real-time PCR cycle threshold. (c) Result of conventional PCR detection



Figure 2 Detection of *Burkholderia glumae* by conventional polymerase chain reaction. Lane M, size marker (onemark 100); lane 1, inoculated rice seeds; lanes 2–10, panicle rice samples; lane 11, *B. glumae*; lane 12, negative control (distilled water).

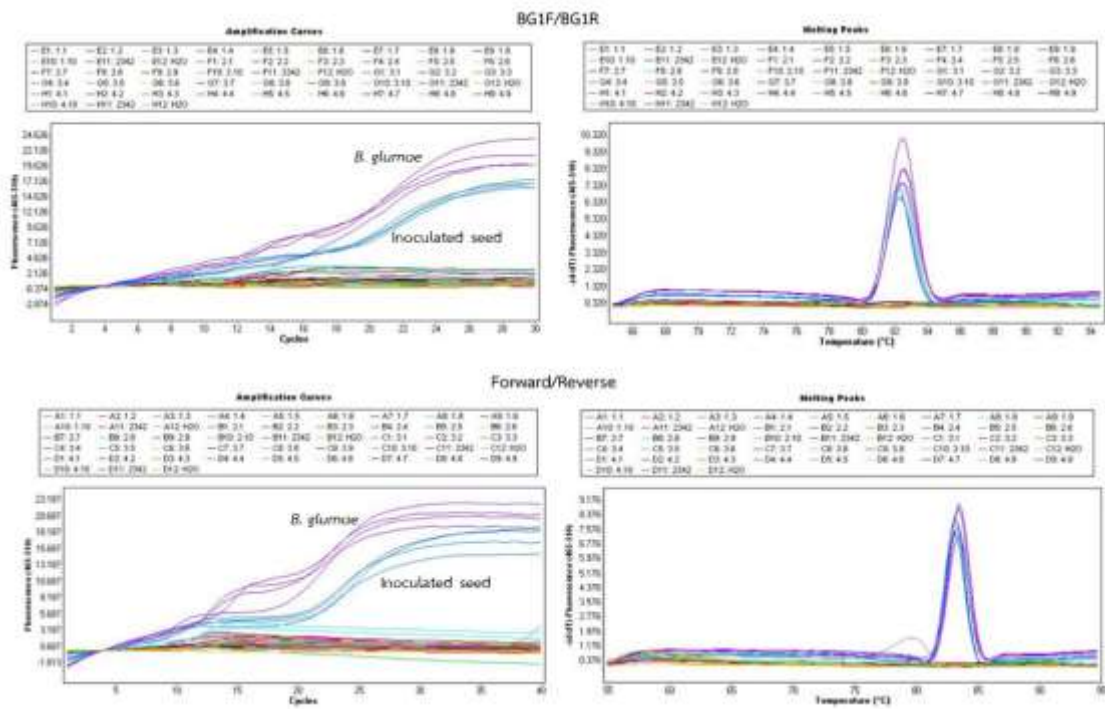


Figure 3 Detection of *Burkholderia glumae* from rice seeds by real-time PCR. The fluorescence intensity and melting curve analysis from each primer set were presented

พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*
species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย
Developing Method to Detection of *Ralstonia solanacearum*
Species Complex Causing Bacterial Wilt of Banana

ทิพวรรณ กันหาญาติ ญัฐจิมา โฆษิตเจริญกุล บุรณี พัววงศ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเครื่อง กาญจนา ศรีไม้
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Ralstonia solanacearum species complex, causing bacterial wilt of banana, is a quarantine pest in Thailand that must be monitored due to its capability of being transmitted through contaminated farming tools and infected plant propagation. This complex bacterial species has been regularly reported in neighboring countries. To prevent the invasion of this bacteria, effective and rapid detection methods are required to monitor and prevent the further dispersal of the *R. solanacearum* species complex from neighboring countries where the outbreak was found. This study was conducted to optimize the PCR technique to detect the *R. solanacearum* species complex during October 2018 - September 2021. This study showed the consistency results that the set of primers 759/760 was specific to the *R. solanacearum* species complex. The set of primers 121F and 121R was confined to only *R. syzygii* subsp. *celebesensis*. Both primer sets could detect bacteria at the minimum concentration of bacterial suspension at 2.6×10^3 CFU/ml and DNA at a concentration of 5 pg/ μ l. This study also found that the appropriate methodologies for extracting DNA from plant samples were the commercial extraction protocols and kits, as well as the protocol of EPPO (2018). The commercial extraction protocols and kits showed the best results for only soil samples.

Keywords : detection, wilt, banana

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-01-00-05-62



บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจัดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยที่ต้องเฝ้าระวังเพราะเชื้อสามารถติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตรและส่วนขยายพันธุ์ของพืชได้ รวมทั้งมีรายงานพบการระบาดของเชื้อในประเทศเพื่อนบ้าน ดังนั้น วิธีการตรวจหาที่มีประสิทธิภาพจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อใช้ตรวจหาเชื้ออย่างรวดเร็วและเฝ้าระวังพื้นที่ปลูกกล้วยในจังหวัดที่มีอาณาเขตติดต่อกับประเทศเพื่อนบ้านที่พบการระบาดของเชื้อ การทดลองนี้จึงทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 – กันยายน 2564 พบว่าไพรเมอร์ 121F/121R สามารถใช้ตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* ได้อย่างเฉพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจเซลล์ความเข้มข้น 2.6×10^3 โคลนี/มิลลิลิตร และ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 5 พิโคกรัม/ไมโครลิตร เท่ากันกับไพรเมอร์ 759/760 ที่สามารถตรวจหาแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex การทดสอบไพรเมอร์และวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR พบว่าทั้งสองไพรเมอร์ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกัน โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจากตัวอย่างพืชคือ วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป และวิธีการของ EPPO (2018) ส่วนวิธีการเตรียมตัวอย่างดินที่เหมาะสม คือ วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

คำหลัก : การตรวจหา โรคเหี่ยว กล้วย

คำนำ

โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นโรคพืชที่มีความสำคัญมากโรคหนึ่งของกล้วยเนื่องจากก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงแก่พืชจนไม่สามารถให้ผลผลิตได้ โดยเฉพาะในโคลอมเบียทำความเสียหายสูงถึง 100% (Álvarez *et al.*, 2015) ในเอเชียพบการแพร่ระบาดของโรคครั้งแรกที่ประเทศฟิลิปปินส์ (Rillo, 1979) ประเทศอินเดีย (Mondal *et al.*, 2012) และต่อมาพบที่ประเทศมาเลเซีย (Zulperi and Sijam, 2014) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้ในกล้วย (วนิดา, 2542) แต่เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกกล้วยเพื่อบริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกกระจายอยู่ทั่วทั้งประเทศ (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) และมีรายงานการระบาดของโรคเหี่ยวของกล้วยที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในประเทศเพื่อนบ้านที่มีชายแดนติดกับประเทศไทย จึงต้องหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ เพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อเพราะหากเกิดการแพร่ระบาดจะเป็นไปอย่างรวดเร็วและแพร่กระจายได้ไกลเนื่องจากเชื้อสามารถติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตรที่ใช้ในแปลงและส่วนขยายพันธุ์ของพืชได้ เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่มีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะ และ



ตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว โดยมีรายงานของ Opina *et al.* (1997) ที่มีการพัฒนาสำหรับตรวจสอบแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex และกรมวิชาการเกษตรใช้ในการตรวจรับรองการปลอดเชื้อในพืชส่งออก จากข้อดีของเทคนิคงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค PCR มาใช้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย เพื่อลดโอกาสการแพร่ระบาดของเชื้อที่อาจติดมากับส่วนขยายพันธุ์และสามารถนำไปปรับใช้ในงานเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันต่อไปในอนาคตได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอ
4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
8. เครื่องชั่ง
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยา PCR
11. กล้วย

วิธีการ

1. การเตรียมแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขั้นตอนตามแนะนำของบริษัท โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 ลูก ละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นเติมด้วย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin



Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

รวบรวมข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจสอบแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยได้อย่างเฉพาะเจาะจง และคัดเลือกเพื่อใช้ในการตรวจด้วยเทคนิค PCR ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร 1X One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ 0.5 μ M เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียรายละเอียดตามรายงานที่สืบค้นได้ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

3. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค PCR ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมาวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง Hitachi U-2001 UV/Vis (Hitachi Instruments, Inc., USA) ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)

4. ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค PCR ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

4.1 ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจพบได้ด้วยเทคนิค PCR

โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} เท่า จากนั้นเกลี่ยเชื้อให้กระจายบนอาหารด้วยวิธี spread plate บนอาหาร PSA ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และใช้เซลล์แขวนลอยที่เหลือแต่ละความเข้มข้นจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)

4.2 ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ตรวจพบได้ด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้เท่ากับ 50, 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร 500, 50, 5 พิโคกรัม/ไมโครลิตร และ 500, 50 เฟมโตกรัม เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)



5. ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR

5.1 ตัวอย่างกล้วยที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคเหี่ยวของกล้วย

แยกเชื้อจากตัวอย่างกล้วยที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคเหี่ยวของกล้วยบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) และตรวจยืนยันตามรายงานของ Fegan and Prior (2005) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taiwan) ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.5 μ M น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ และแบคทีเรีย 1 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

5.2 วิธีการเตรียมตัวอย่างพืช

5.2.1 สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

เตรียมตัวอย่างโดยตัดบริเวณ vascular ของตัวอย่างกล้วย บดในน้ำกลั่น 5 มิลลิตร ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขึ้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท โดยมีรายละเอียดวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 1 เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

5.2.2 สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Zou *et al.* (2017)

เตรียมตัวอย่างโดยตัดบริเวณ vascular ของตัวอย่างกล้วย บดใน extraction buffer #1 (50 mM Tris [pH8.0], 150 mM NaCl, 2% PVP, 1% Tween-20) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประมาณ 30 วินาที นำกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ลงไปแช่ 3 วินาที จากนั้นล้างกระดาษกรองด้วย wash buffer (10 mM Tris [pH8.0], 0.1% Tween-20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นาน 1 นาที ใช้แผ่นกระดาษกรองจำนวน 1 แผ่น สำหรับทำปฏิกิริยา PCR

5.2.3 เตรียมตัวอย่างตามวิธีการของ EPPO (2018)

เตรียมตัวอย่างโดยตัดบริเวณ vascular ของตัวอย่างกล้วย ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% ซับให้แห้ง แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียดใน 50 mM Phosphate buffer (PB) pH 7 (Na_2HPO_4



4.26 กรัม, KH_2PO_4 2.72 กรัม) จำนวน 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที และใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา PCR

5.3 วิธีการเตรียมตัวอย่างดิน

5.3.1 สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

เตรียมตัวอย่างโดยชั่งดิน 10 กรัม เขย่าในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร นาน 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน 30 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขั้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท ใช้ดีเอ็นเอจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา PCR

5.3.2 สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Zou *et al.* (2017)

เตรียมตัวอย่างโดยชั่งดิน 10 กรัม เขย่าในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร นาน 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน 30 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาปั่นตกตะกอนแล้วละลายตะกอนด้วย extraction buffer #1 (50 mM Tris [pH8.0], 150 mM NaCl, 2% PVP, 1% Tween-20) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประมาณ 30 วินาที นำกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ลงไปแช่นาน 3 วินาที จากนั้นล้างกระดาษกรองด้วย wash buffer (10 mM Tris [pH8.0], 0.1% Tween-20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นาน 1 นาที ใช้แผ่นกระดาษกรองจำนวน 1 แผ่น สำหรับทำปฏิกิริยา PCR

5.4 ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวด้วยเทคนิค PCR

ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจากตัวอย่างที่เตรียมไว้ด้วยเทคนิค PCR เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X One PCR Master Mix (GeneDirex[®] Inc., Taiwan) ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.5 μM น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ และตัวอย่างทดสอบ 1 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra[®] (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียรายละเอียดตามรายงานที่สืบค้นได้ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2561 – กันยายน 2564

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร



ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลอง (Table 1) ได้แก่ แบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis*, *R. solanacearum* ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกกล้วย พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ดาวเรือง ยูคาลิปตัส แบคทีเรีย *Acidovorax citrulli*, *A. cattleyae*, *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) และ *Dickeya zae* (*E. chrysanthemi* pv. *zae*) มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยใช้แบคทีเรีย 1 ลูก ในการสกัดดีเอ็นเอขึ้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. ทดสอบสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

รวบรวมข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยได้อย่างเฉพาะเจาะจง และทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อ พบว่ามีไพรเมอร์ 121F/121R ตามรายงานของ Tan (2003) ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* หรือชื่อเดิม Blood Disease Bacterium สาเหตุโรคเลือดในกล้วย (Blood disease of banana) ได้เฉพาะเจาะจงและมีการนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อในประเทศที่พบการระบาดของโรค (Hadiwiyono, 2011) โดยมีอุณหภูมิการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้ อุณหภูมิและเวลาเริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยเปรียบเทียบกับไพรเมอร์ 759/760 ตามรายงานของ Opina *et al.* (1997) ซึ่งกรมวิชาการเกษตรใช้ในการตรวจรับรองการปลอดเชื้อ *R. solanacearum* ในพืชส่งออก โดยมีอุณหภูมิการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้ อุณหภูมิและเวลาเริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 นาที จากนั้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ไพรเมอร์จับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา



15 วินาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Table 2)

3. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค PCR ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 121F/121R ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย พบว่าไพรเมอร์ 121F/121R สามารถใช้ตรวจแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* ที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเหี่ยวได้อย่างเฉพาะเจาะจง ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 317 คู่เบส และให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบกับแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกกล้วย พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ดาวเรือง ยูคาลิปตัส แบคทีเรีย *A. citrulli*, *A. cattleyae*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *D. zea* และ *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ส่วนไพรเมอร์ 759/760 เกิดผลบวกกับแบคทีเรียที่จัดเป็น *R. solanacearum* species complex ได้แก่ แบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* ที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเหี่ยว แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกกล้วย พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ดาวเรือง ยูคาลิปตัส โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 280 คู่เบส และให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบกับแบคทีเรีย *A. citrulli*, *A. cattleyae*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *D. zea* และ *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Figure 1, Table 1)

4. ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค PCR ในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

4.1 ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจพบได้ด้วยเทคนิค PCR

การทดสอบความไวของไพรเมอร์ 121F/121R และ 759/760 สำหรับตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* ด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีความไวเท่ากันสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์ 2.6×10^3 โคโลนี/มิลลิลิตร (Figure 2)

4.2 ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ตรวจพบได้ด้วยเทคนิค PCR

การทดสอบความไวของไพรเมอร์ 121F/121R และ 759/760 สำหรับตรวจหาระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* ด้วยเทคนิค PCR พบว่าทั้งสองไพรเมอร์มีความไวเท่ากัน โดยสามารถตรวจหาดีเอ็นเอแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* ได้ที่ความเข้มข้น 5 พิโคกรัม/ไมโครลิตร (Figure 2)

5. ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR

5.1 ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจากตัวอย่างพืช

การทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 121F/121R เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ 759/760 และใช้ดีเอ็นเอ



เอตันแบบที่ได้จากการเตรียมตัวอย่าง 3 วิธี ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป วิธีการของ Zou *et al.* (2017) และ EPPO (2018) พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ สามารถตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* ได้ถูกต้องทุกตัวอย่างจากการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 วิธี สอดคล้องกันกับผลการแยกเชื้อบนอาหาร PSA (Figure 3) แต่การเตรียมตัวอย่างตามวิธีการของ Zou *et al.* (2017) ที่ถึงแม้จะใช้ระยะเวลาสั้นในการเตรียมตัวอย่าง แต่มีข้อด้อยคือแผ่นกระดาษกรองที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ดูดซับน้ำยาไวบางส่วน ทำให้เหลือปริมาณผลผลิต PCR เพื่อตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลิเลคโตรโพรสิชี่น้อยลง และให้ปริมาณดีเอ็นเอต่อแผ่นไม่เท่ากัน ดังนั้น วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างพืชจึงได้แก่ วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป และวิธีการของ EPPO (2018)

5.2 ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจากดิน

การทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจากตัวอย่างดินแปลงปลูกกล้วยจำนวน 10 ตัวอย่าง ไม่พบแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจึงปลูกเชื้อในดินโดยผสมดินกับเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 10^1 - 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธี ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและวิธีการของ Zou *et al.* (2017) จากการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ 121F/121R และ 759/760 ให้ผลสอดคล้องกัน โดยสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* ได้จากดินผสมเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 2.6×10^3 โคโลนี/มิลลิลิตร จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป ดีกว่าการเตรียมตัวอย่างตามวิธีของ Zou *et al.* (2017) ที่ตรวจหาเชื้อได้จากดินผสมแบคทีเรียความเข้มข้น 2.6×10^5 โคโลนี/มิลลิลิตร โดยที่การเตรียมตัวอย่างตามวิธีของ Zou *et al.* (2017) ให้ผลการตรวจเหมือนกันกับการตรวจหาเชื้อจากส่วนน้ำใสที่ได้จากการชั่งดิน 10 กรัม เขย่าในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร นาน 30 นาที ดังนั้นจากผลการทดสอบสามารถสรุปได้ว่า วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างดินได้แก่ วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป อย่างไรก็ตาม ในขั้นตอนการตรวจวินิจฉัย (diagnostic protocol) ของ EPPO (2018) ไม่แนะนำให้ตรวจเชื้อในดินเพราะผลตรวจไม่แน่นอนเนื่องจากประชากรแบคทีเรียในดินมีการกระจายตัวสูงและมีปริมาณเชื้อในดินต่ำ (Figure 4)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 – กันยายน 2564 พบว่าไพรเมอร์ 121F/121R สามารถใช้ตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* ที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเหี่ยวได้อย่างเฉพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจเซลล์ความเข้มข้น 2.6×10^3 โคโลนี/มิลลิลิตร และดีเอ็นเอความเข้มข้น 5 พิโคกรัม/ไมโครลิตร เท่ากันกับไพรเมอร์ 759/760 ที่สามารถตรวจหาแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex โดยเกิดผลบวกกับแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp.



celebesensis ที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเหี่ยว และแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกกล้วย พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ดาวเรือง ยูคาลิปตัส

การทดสอบไพรเมอร์และวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR พบว่าทั้งสองไพรเมอร์ให้ผลการทดสอบสอดคล้องกัน โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจากตัวอย่างพืชคือ วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป และวิธีการของ EPPO (2018) ส่วนวิธีการเตรียมตัวอย่างดินที่เหมาะสมคือ วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป อย่างไรก็ตาม เนื่องจากมีรายงานพบการระบาดของโรคเหี่ยวของกล้วยที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในประเทศเพื่อนบ้านที่มีชายแดนติดกับประเทศไทย ซึ่งเกิดจากแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebesensis* และ *R. solanacearum* จึงควรใช้ไพรเมอร์ทั้งสองคู่ในการตรวจหาเชื้อเพื่อการเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาระบาดในประเทศต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- วนิดา ฐิตะฐาน. 2542. โรคเหี่ยวของพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 151 หน้า.
- สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. *สารสนเทศเศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้าปี 2560*. บริษัท 21 เซ็นจูรี่ จำกัด. นนทบุรี. 99 น.
- Álvarez, E., P. Alberto, G. Lederson and C. Germán. 2015. *Current status of Moko disease and black sigatoka in Latin America and the Caribbean, and options for managing them*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 50 p. (Publicación CIAT No. 404)
- EPPO. 2018. EPPO Diagnostic Standard. PM 7/21 *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 48: 32– 63.
- Fegan, M and P. Prior. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? p 449–461. In : Allen C; Prior P; Hayward AC, eds. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum complex*. American Phytopathological Society (APS) Press, St. Paul, MN, USA.
- Hadiwiyono. 2011. Blood bacterial wilt disease of banana: the distribution of pathogen in infected plant, symptoms, and potentiality of diseased tissues as source of infective inoculums. *Nusantara Bioscience* 3: 112-117.
- Opina, N., F. Tavner and G. Hollway. 1997. A novel method for development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia*



solanacearum (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5: 19-30.

Rillo, A. R. 1979. Bacterial wilt of banana in the Philippines. *FAO Plant Protect. Bull.* 27: 105–108.

Zou, Y., M.G. Mason, Y. Wang, E. Wee and C. Turni. 2018. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. *PLOS Biology* 16 (5): e1002630. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002630>

Zulperi, D., and K. Sijam. 2014. First report of *Ralstonia solanacearum* Race 2 biovar 1 causing Moko disease of banana in Malaysia. *Plant Dis.* 98:275. doi: 10.1094/PDIS-03-13-0321-PDN.

Table 1 Primers used in this study.

| Primer | Sequence (5'-3') | Amplicon size (bp) | Reference |
|-------------|--------------------------|--------------------|----------------------------|
| Nmult21:1F | CGTTGATGAGGCGCGCAATTT | 144 | Fegan and Prior |
| Nmult21:2F | AAGTTATGGACGGTGGGAAGTC | 372 | (2005) |
| Nmult23:AF | ATTACSAGAGCAATCGAAAGATT | 91 | |
| Nmult22:lnF | ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA | 213 | |
| Nmult22:RR | TCGCTTGACCCTATAACGAGTA | | |
| 759 | GTCGCCGTCAACTCACTTCC | 281 | Opina <i>et al.</i> (1997) |
| 760 | GTCGCCGTCAGCAATGCCGAATCG | | |
| 121F | CGTATTGGATGCCGTAATGGA | 317 | Tan (2003) |
| 121R | AAGTTCATTGGTGCCGAATCA | | |



Table 2 Bacterial strains used in this study and result of specificity test.

| Bacterial species | | Location | Primer sets | |
|--|------------|-------------------|-------------|---------|
| | | | 121F/121R | 759/760 |
| <i>Ralstonia syzigii</i> subsp. <i>celebesensis</i> | DOABCC2730 | Yala | + | + |
| | BCC2924 | Yala | + | + |
| | BCC2925 | Yala | + | + |
| | BCC2927 | Yala | + | + |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | DOABCC2930 | Yala | - | + |
| | DOABCC0832 | Nakhon Phanom | - | + |
| | DOABCC1191 | Loei | - | + |
| | DOABCC1350 | Chiang Rai | - | + |
| | DOABCC1374 | Chachoengsao | - | + |
| | DOABCC1387 | Bangkok | - | + |
| | DOABCC1481 | Chiang Mai | - | + |
| | DOABCC1512 | Chiang Rai | - | + |
| | DOABCC1954 | Chiang Mai | - | + |
| | DOABCC2156 | Chiang Mai | - | + |
| | DOABCC3279 | Phichit | - | + |
| <i>Acidovorax cattleyae</i> | DOABCC2078 | Nakhon Pathom | - | - |
| <i>Acidovorax citrulli</i> | DOABCC1228 | Nakhon Ratchasima | - | - |
| | DOABCC1364 | Khon Kaen | - | - |
| <i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> | DOABCC2059 | Nakhon Pathom | - | - |
| | DOABCC2479 | Pathum Thani | - | - |
| <i>Dickeya zea</i> | DOABCC2515 | Chiang Mai | - | - |
| | DOABCC1181 | Lop Buri | - | - |
| <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> | DOABCC0681 | Phetchabun | - | - |
| | DOABCC2802 | Lamphun | - | - |
| | DOABCC3036 | Kanchanaburi | - | - |

+ and – indicates species was detected or not detected, respectively



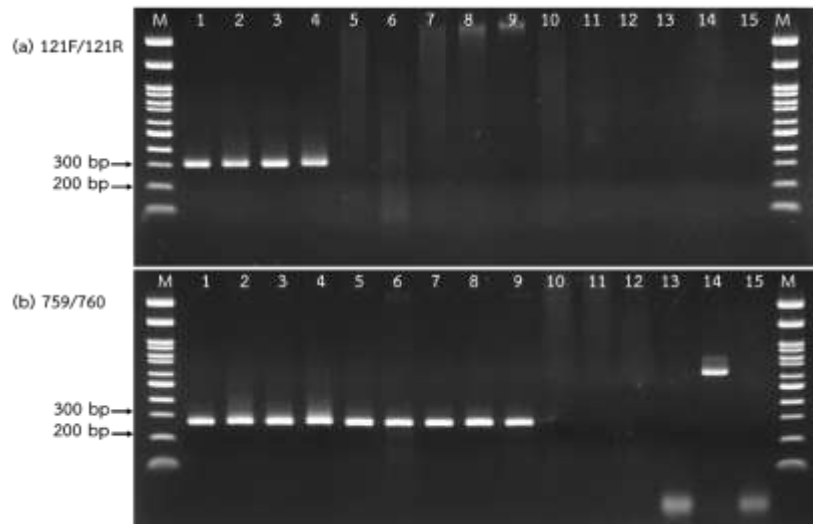


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified for specificity detection *R. solanacearum* species complex using (a) 121F/121R and (b) 759/760 primers, M: onemark 100, lane 1–4: *R. syzygii* subsp. *celebesensis*, lane 5–9: *R. solanacearum*, lane 10: *Acidovorax citrulli*, lane 11: *Acidovorax cattleyae*, lane 12: *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, lane 13: *Dickeya zea*, lane 14: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, lane 15: distilled water

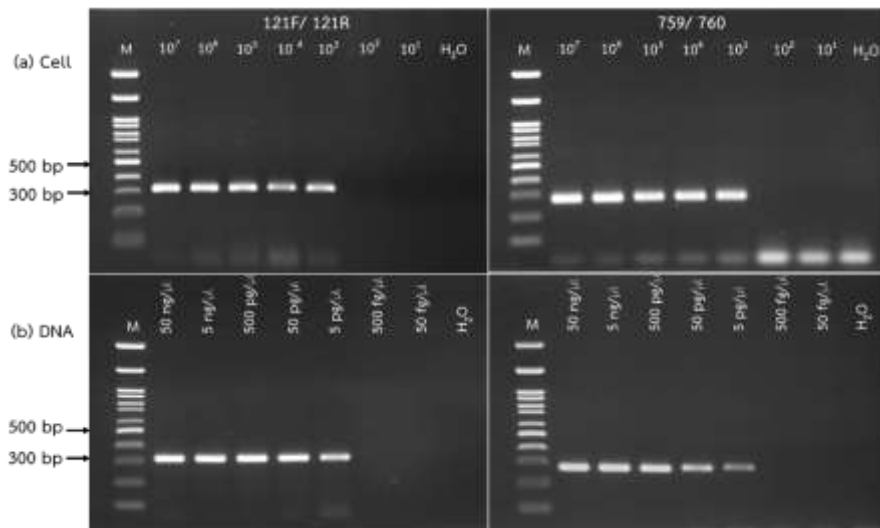


Figure 2 Sensitivity of PCR assay for detection (a) cell suspension and (b) DNA of *R. syzygii* subsp. *celebesensis*.

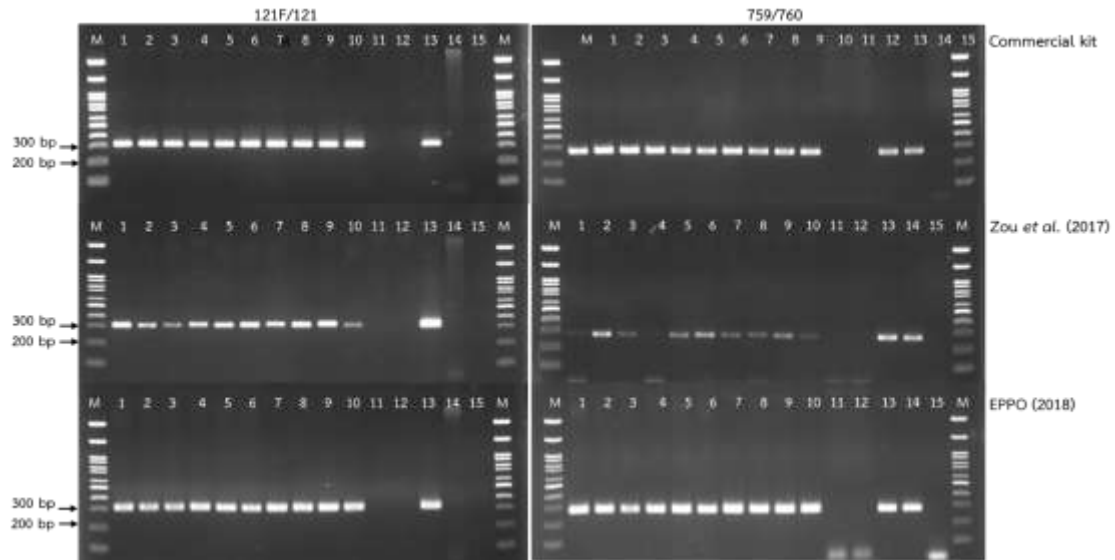


Figure 3 Comparison of primer sets and different extraction methods for detection *R. solanacearum* species complex in plant samples.

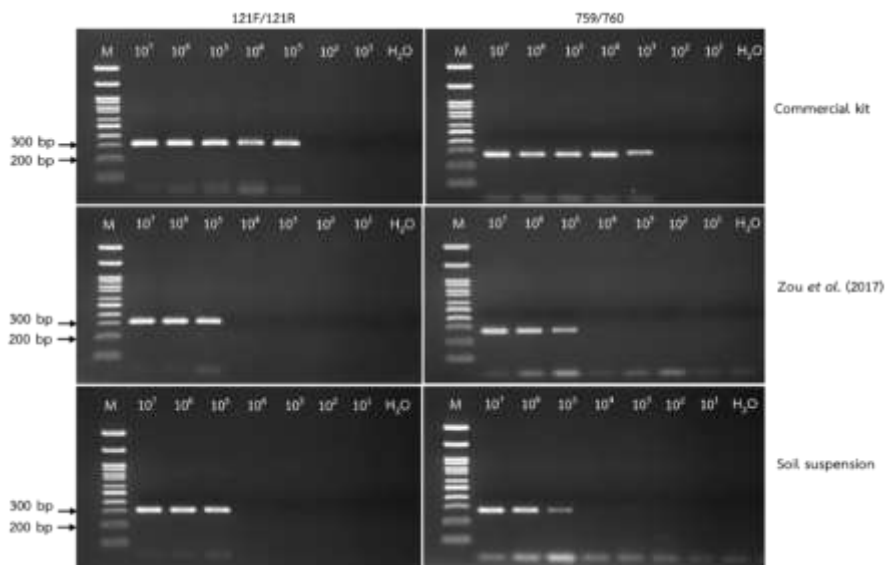


Figure 4 Comparison of primer sets and different extraction methods for detection *R. solanacearum* species complex in soil samples.

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* ในข้าวด้วยเทคนิค
LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)
Detection of *Pseudomonas fuscovaginae* in Rice by LAMP
(Loop-Mediated Isothermal Amplification)

ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ บุรณี พัวพงษ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเครื่อง กาญจนา ศรีไม้
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Pseudomonas fuscovaginae causing bacterial sheath brown rot disease of rice is a quarantine pest in Thailand that must be monitored because bacteria can be transmitted by seeds. Therefore, the effective detection methods are essential to prevent further dispersal of the pathogen from import seeds and surveillance. This study was to validate the LAMP technique to detect *P. fuscovaginae* in rice during October 2018 - September 2021. The result found that *P. fuscovaginae* were detected in the reaction temperature at 65°C for 30 min. The primer combination designated Pf8 are detected both *P. fuscovaginae* and *Burkholderia glumae*. The bacteria could be detected at the concentrations 15 CFU/ml. The detection of *P. fuscovaginae* by LAMP was obtained from rice with similar symptom of brown sheath rot was negative in all samples examined. Comparison of the test results with the PCR method showed different results. Isolation on King's B medium revealed fluorescent bacteria. But when the bacteria were tested again with LAMP, it was negative. Due to inconsistent test results, a polyphasic approach are required.

Keywords : detection, wilt, banana

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-00-06-63



บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* สาเหตุโรคน้ำตาของข้าวจัดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยที่ต้องเฝ้าระวังอีกหนึ่งชนิดเพราะเชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ รายงานวิธีตรวจหาแบคทีเรียชนิดนี้มีน้อยมาก การทดลองนี้จึงทดสอบเทคนิค LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) ให้ทราบถึงประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อ เพื่อใช้ป้องกันการแพร่กระจายของแบคทีเรียที่อาจติดมากับเมล็ดนำเข้า ดำเนินการทดสอบเทคนิค LAMP สำหรับตรวจหาแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในข้าว ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2562 – กันยายน 2564 พบว่าสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* โดยใช้ชุดไพรเมอร์ Pf8 ในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ชุดไพรเมอร์เกิดผลบวกกับแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* และ *Burkholderia glumae* มีความไวในการตรวจหาเชื้อที่ความเข้มข้นเซลล์ 15 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร การตรวจหาแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ด้วยเทคนิค LAMP จากตัวอย่างกาบใบข้าวและเมล็ดข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายกับโรคน้ำตาของข้าว ให้ผลเป็นลบในทุกตัวอย่างที่ตรวจ เปรียบเทียบผลการตรวจหากับวิธี PCR พบว่าให้ผลแตกต่างกัน การแยกเชื้อบนอาหาร King's B พบแบคทีเรียสร้างสารเรืองแสง แต่เมื่อนำแบคทีเรียตรวจยืนยันด้วย LAMP อีกครั้งพบว่าให้ผลเป็นลบ จากผลการตรวจที่ไม่สอดคล้องกันจึงจำเป็นต้องใช้หลายวิธีในการตรวจหาเชื้อ

คำหลัก : การตรวจหา โรคน้ำตาของข้าว

คำนำ

เชื้อสาเหตุของโรคน้ำตาของข้าวถูกศึกษาและจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมี พีชอาศัย ความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยาว่าเป็นแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* โดย Tanii *et al.* (1976) อาการของโรคจะปรากฏบริเวณกาบใบ ใบ และเมล็ดข้าวมีสีเปลี่ยนแปลงไป โดยพบในประเทศเม็กซิโก กัวเตมาลา ปานามา สุรินาม โคลัมเบีย เปรู และ บราซิล (Zeigler *et al.*, 1987) แบคทีเรีย *P. fuscovaginae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ ขนาด 0.5-0.8 x 2.0-3.5 ไมโครเมตร เซลล์เกิดขึ้นคู่หรือเดี่ยวและ เคลื่อนไหวด้วยหาง (flagella) จำนวน 1-4 เส้นที่อยู่บริเวณส่วนปลาย (polar flagella) (Miyajima *et al.*, 1983) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* กลมมนูนผิวเรียบ โปร่งแสง มีสีขาวถึงสีน้ำตาลอ่อนเหลืองปนแสง มีความหนืดคล้ายเนยเหลว

อาการของโรคเน่าสีน้ำตาลจะปรากฏที่กาบใบเปลือกหุ้มใบข้าวระยะต้นกล้าและระยะเจริญเติบโตในภายหลัง ต้นกล้าที่ติดเชื้อในระยะเริ่มแรกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลบนกาบใบด้านล่าง (Cottyn *et al.*, 1994) หลังจากนั้นจะเปลี่ยนสีจากสีเทาน้ำตาลเป็นสีน้ำตาลเข้ม ในที่สุดต้นกล้าที่ติดเชื้อจะเน่าและตายในที่สุด ใบต้นกล้าจะเกิดการเปลี่ยนสีของเส้นกลางใบและเส้นใบได้ อาการของโรคน้ำตาของข้าวจะพบบนกาบใบของต้นข้าวโดยเฉพาะกาบใบของใบธงและ

รวงข้าว มีลักษณะอาการเช่นเดียวกับบนต้นกล้า เกิดแผลบริเวณกาบใบเป็นสีน้ำตาลเข้มล้อมรอบด้วย รอยข้าวขอบสีน้ำตาลเข้ม บางครั้งกาบใบแสดงอาการฉ่ำน้ำ เน่าเป็นสีน้ำตาลเข้มแต่ไม่มีแผลที่ชัดเจน หากเป็นโรครุนแรงกาบใบจะกลายเป็นเน่าและแห้งตายในที่สุด อาการของโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลในแปลงนาข้าวใกล้เคียงกับอาการของโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและเชื้อราอื่น ๆ ทำให้สับสนในการ วินิจฉัยโรค นอกจากนี้แบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ยังสามารถติดไปกับเมล็ดได้ ในประเทศ อินโดนีเซีย มีรายงานว่าแปลงนาที่มีการระบาดของโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลถึง 72% ในฤดูร้อนพบว่า เมล็ดข้าวที่เก็บเกี่ยวจากแปลงที่มีการระบาดของโรคมิเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง แต่ในฤดูฝนพบว่า เมล็ดข้าวเมล็ดข้าวที่เก็บเกี่ยวมีลักษณะไม่ตีสีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ไม่สามารถนำไปใช้ในการ ขยายพันธุ์ได้ (Cahyaniati and Mortensen, 1997) โรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลแพร่ระบาดในพื้นที่ปลูก ข้าวของหลายประเทศทั่วโลก ในเดือนเมษายน 2554 เกิดการระบาดอย่างรุนแรงในประเทศ สาธารณรัฐเกาหลีใต้ สร้างความเสียหายทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงถึง 10 -20% พื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด (Kim et al., 2015) สำหรับในประเทศไทยยังไม่พบรายงานการเกิดโรคจากเชื้อชนิดนี้ แต่เนื่องจากเชื้อ แบคทีเรีย *P. fuscovaginae* สามารถติดไปกับเมล็ด (seed-borne) และเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ สำคัญอีกชนิดหนึ่งทางด้านกักกันพืชที่ต้องการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเคลื่อนย้ายหรือนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวจากประเทศที่มีการระบาดของโรค การใช้เมล็ดพันธุ์ปลอดโรค เป็นอีกวิธีที่ใช้ป้องกันการแพร่ระบาดของโรค ดังนั้นการหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่ เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ จะสามารถลดโอกาสการแพร่ระบาดของ เชื้อที่อาจติดมากับเมล็ดได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอ
4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
8. เครื่องชั่ง
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยา LAMP
11. ข้าว

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลในข้าว และแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่น ๆ ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขึ้นตอนตามแนะนำของบริษัท เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลอง

2. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในข้าวด้วยเทคนิค LAMP

2.1 การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา LAMP

ดำเนินการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าว ด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์ Pf8 เริ่มจากเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.0 μ M FIP และ BIP, 0.4 μ M F3 และ B3, 2.0 μ M F loop และ B loop, 0.4 μ M dNTPs, 1.0 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100 และ 8U *Bst* DNA polymerase บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที

ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อดูผลของปฏิกิริยา โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% ใน 0.5X TBE (88.9 mM Tris, 8.9 mM boric acid, 2.5 mM EDTA) และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., Cambridge, UK) และตรวจการเรืองแสงของสารโดยใช้สารเรืองแสง SYBR Green I (Invitrogen) ที่ความเข้มข้น 1:10 เติมลงไปไหลอดหลังทำปฏิกิริยาเสร็จ

2.2 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae*

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* แบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าวและแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่น ๆ ที่ต้องการทดสอบ มาวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ μ l เพื่อนำไปสำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ทำ 3 ซ้ำ

2.3 ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae*

ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของเซลล์เชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค LAMP โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* บนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.₆₀₀ nm เท่ากับ 0.2 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} เท่า จากนั้นเกลี่ยเชื้อให้กระจายบนอาหารด้วยวิธี spread plate บนอาหาร PSA ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และใช้เซลล์แขวนลอยที่เหลือแต่ละความเข้มข้นจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับ conventional PCR

3. ทดสอบเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* จากตัวอย่างพืช

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าวจากแปลงปลูกข้าวของเกษตรกรเพื่อนำมาใช้ในการตรวจ

3.1 การตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* จากกาบใบข้าว

เตรียมตัวอย่างโดยตัดส่วนของใบหรือกาบใบ บดในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ตรวจยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหาร King's B และ conventional PCR ตามรายงานของ Onasanya *et al.* (2010)

3.2 การตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* จากเมล็ดข้าว

เตรียมตัวอย่างโดยแช่เมล็ดจำนวน 20 เมล็ด ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที มิลลิลิตร ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ตรวจยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหาร King's B และ conventional PCR ตามรายงานของ Onasanya *et al.* (2010)

เวลาและสถานที่

| | |
|---------|--|
| เวลา | ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564 |
| สถานที่ | ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานבקเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร |

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าวแบคทีเรียสาเหตุโรคในพืชอื่น ๆ และแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าว ได้แก่ *P. fuscovaginae*, *Burkholderia glumae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *Acidovorax cattleyae*, *A. citrulli*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya zea*, *Ralstonia solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris* และ *X. citri* pv. *citri* (Table 2) เลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยใช้เชื้อ

แบบที่เรีย 1 รูป ในการสกัดดีเอ็นเอขึ้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในข้าวด้วยเทคนิค LAMP

2.1 การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา LAMP

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าวด้วยเทคนิค LAMP ใช้ไพรเมอร์เซต Pf8 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม มีขั้นตอนดังนี้ เตรียมดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร เติมในปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.0 μ M FIP และ BIP, 0.4 μ M F3 และ B3, 2.0 μ M F loop และ B loop, 0.4 μ M dNTPs, 1.0 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100 และ 8U *Bst* DNA polymerase บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิลิเคโตรโพรซีส พบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันไดซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP การตรวจสอบผลด้วยสารเรืองแสง SYBR Green I หลังทำปฏิกิริยาเสร็จ พบว่าสารเรืองแสง SYBR Green I เปลี่ยนจากสีส้มเป็นเรืองแสงสีเขียวในทุกตัวอย่างดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่ทดสอบยกเว้นน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ สอดคล้องกับการตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิลิเคโตรโพรซีส (Figure 1)

2.2 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย

P. fuscovaginae

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์เซต Pf8 สำหรับการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* พบว่าไพรเมอร์ให้ผลการทดสอบเป็นบวกกับเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 10 ไอโซเลท แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *A. cattleyae*, *A. citrulli*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *D. zea*, *R. solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris* และ *X. citri* pv. *citri* (Table 1, 2)

2.3 ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย

P. fuscovaginae

เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.2 แบคทีเรียมีความเข้มข้นของเซลล์ 1.5×10^8 CFU/ml ทำให้เจือจางด้วยวิธี tenfold serial dilution ใช้สำหรับทดสอบหา ระดับความเข้มข้นของเซลล์เชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค LAMP พบว่าสามารถตรวจแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์ 15 CFU/ml มีความไวกว่า conventional PCR ที่สามารถตรวจแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ความเข้มข้นเซลล์ 1.5×10^3 CFU/ml (Figure 2)

3. ทดสอบเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* จากตัวอย่างพืช

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์ Pf8 ตามรายงานของ Ash *et al.* (2014) จากกาบใบข้าวและเมล็ดข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายกับโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าว ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในทุกตัวอย่างที่ตรวจ ผลการแยกเชื้อบนอาหาร King's B พบแบคทีเรียสร้างสารเรืองแสง แต่เมื่อนำแบคทีเรียตรวจยืนยันด้วย LAMP อีกครั้งพบว่าให้ผลเป็นลบ ผลการตรวจด้วย conventional PCR ตามรายงานของ Onasanya *et al.* (2010) พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 bp เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* (Figure 3) สอดคล้องกับผลการแยกเชื้อบนอาหาร King's B ที่พบแบคทีเรียสร้างสารเรืองแสง เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการพบว่าไม่ใช่คุณสมบัติของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* โดยผลบวกที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากไพรเมอร์ Pff3/PfR3 ตามรายงานของ Onasanya *et al.* (2010) ออกแบบจากยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างในกลุ่มแบคทีเรีย *Pseudomonas* ที่สามารถสร้างสารเรืองแสงที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันได้ ส่วนการตรวจสอบด้วย conventional PCR ตามรายงานของ Cui *et al.* (2016) ให้ผลเป็นลบในทุกตัวอย่างที่ตรวจรวมทั้งแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากของ IRRI ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก จึงไม่นำมาใช้ในการเปรียบเทียบ จากผลการตรวจที่ไม่สอดคล้องกันจำเป็นต้องใช้หลายวิธีในการตรวจหาเชื้อ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ในการตรวจแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* พบว่าทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันไดซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP สอดคล้องกับการตรวจสอบผลด้วยสารเรืองแสง SYBR Green I ที่เปลี่ยนจากสีส้มเป็นเรืองแสงสีเขียวในทุกตัวอย่างดีเอ็นเอแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ยกเว้นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ชุด Pf8 พบว่าไพรเมอร์ให้ผลการทดสอบเป็นบวกกับแบคทีเรีย *B. glumae* และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 10 ไอโซเลท แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *A. cattleyae*, *A. citrulli*, *P. carotovorum* subsp. *Carotovorum*, *D. zea*, *R. solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris* และ *X. citri* pv. *citri* โดยมีความไวในการตรวจแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์ 15 CFU/ml การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ด้วยเทคนิค LAMP จากกาบใบข้าวและเมล็ดข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายกับโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าว ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในทุกตัวอย่างที่ตรวจ ผลการแยกเชื้อบนอาหาร King's B พบแบคทีเรียสร้างสารเรืองแสง แต่เมื่อนำแบคทีเรียตรวจยืนยันด้วย LAMP อีกครั้งพบว่าให้ผลเป็นลบ ผลการตรวจด้วย conventional PCR ตามรายงานของ

Onasanya *et al.* (2010) พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกเช่นเดียวกับแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* สอดคล้องกับผลการแยกเชื้อบนอาหาร King's B ที่พบแบคทีเรียสร้างสารเรืองแสง เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการพบว่าไม่ใช่คุณสมบัติของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ส่วนการตรวจสอบด้วย conventional PCR ตามรายงานของ Cui *et al.* (2016) ให้ผลเป็นลบในทุกตัวอย่างที่ตรวจรวมทั้งแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* จาก IRRI ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก จากผลการตรวจที่ไม่สอดคล้องกันจึงจำเป็นต้องใช้หลายวิธีในการตรวจหาเชื้อเพื่อความแม่นยำในการตรวจ

เอกสารอ้างอิง

- Ash, G.J., J.M. Lang, L.R. Triplett, B.J. Stodart, V. Verdier, C.V. Cruz, P. Rottand and J.E. Leach. 2014. Development of a genomics-based lamp (loop-mediated isothermal amplification) assay for detection of *Pseudomonas fuscovaginae* from rice. *Plant Disease* 98: 909–915.
- Cahyaniati A., and C.N. Mortensen. 1997. *Bacterial Sheath Brown Rot of Rice (Pseudomonas fuscovaginae) Grown in Indonesia*. Seed Health Testing in the Production of Quality Seed. 195 p.
- Cottyn B., M.T. Cerez, and T.W. Mew. 1994. Bacterial pathogens. pp. 91–96. In : T.W. Mew, J.K. Misra, eds. *A Manual of Rice Seed Health Testing*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Cui, Z., M.R. Ojaghian, Z. Tao, K.U. Kakar, J. Zeng and W. Zhao. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of six major bacterial pathogens of rice. *Journal of Applied Microbiology*. 2016; 120(5):1357–67. <https://doi.org/10.1111/jam.13094> PMID: 26864896
- Kim, J., O. Choi, and W.-I. Kim. 2015. First Report of Sheath Brown Rot of Rice Caused by *Pseudomonas fuscovaginae* in Korea. *Plant Disease*. 99:7- 1033.
- Miyajima, K., A. Tanii and T. Akita. 1983. *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 33(3) : 656-657.
- Onasanya, A., A. Basso, E. Somado, E.R. Gasore, F.E. Nwilene and I. Ingelbrecht. 2010. Development of a combined molecular diagnostic and DNA fingerprinting technique for rice bacteria pathogens in Africa. *Biotechnology*. 9(2) : 89-105.
- Tanii A., K. Miyajima and T. Akita. 1976. The sheath brown rot disease of rice plant and its causal bacterium, *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 42(5) : 540-548.

Zeigler RS; G. Aricapa; E. Hoyos. 1987. Distribution of fluorescent *Pseudomonas* spp. causing grain and sheath discoloration of rice in Latin America. *Plant Disease*. 71(10) : 896-900.

Table 1 Primers used in this study.

| Primer | Sequence (5'-3') | Reference |
|--------|--|----------------------------------|
| | <u>Primer set: Pf8</u> | Ash <i>et al.</i> (2014) |
| F3 | TGTGTT CAGTTCCTTCATCG | |
| B3 | TAACAGCGTCACGTTCTTC | |
| FIP | GATCATCAGCGGGACTGTCAGGGTGAGGTCTACGAGAAATTC | |
| BIP | CGACGGCGATTTTCGTTGCGTTATAACAACAACGCTTGCC | |
| LoopF | TGAGAAACGCCTTCTGGTC | |
| LoopB | TGTGCTGTGCCTGATTCTT | |
| PfF3 | AACGGGTGTA CTGGTCAGG | Onasanya <i>et al.</i> (2010) |
| PfR3 | CTCCGAGATTACCCACAAGC | |

Table 2 Bacterial strains used in this study and result of specificity test.

| Bacterial species | | Origin | Primer sets | |
|--|------------|-------------------|-------------|-----|
| | | | PfF3 / PFR3 | Pf8 |
| <i>Pseudomonas fuscovaginae</i> | | IRRI | + | + |
| <i>Burkholderia glumae</i> | | IRRI | - | + |
| <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> | DOABCC2562 | Suphan Buri | - | - |
| | DOABCC2568 | Suphan Buri | - | - |
| <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> | DOABCC2561 | Suphan Buri | - | - |
| <i>Acidovorax cattleyae</i> | DOABCC2078 | Nakhon Pathom | - | - |
| <i>A. citrulli</i> | DOABCC1228 | Nakhon Ratchasima | - | - |
| | DOABCC1364 | Khon Kaen | - | - |
| <i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> | DOABCC2059 | Nakhon Pathom | - | - |
| | DOABCC2479 | Pathum Thani | - | - |
| <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> | DOABCC0681 | Phetchabun | - | - |
| | DOABCC2802 | Lamphun | - | - |
| <i>Dickeya zeae</i> | DOABCC2515 | Chiang Mai | - | - |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | DOABCC1954 | Chiang Mai | - | - |
| <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> | DOABCC0493 | Pathum Thani | - | - |
| <i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> | DOABCC0888 | Phitsanulok | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U164 | Nan | + | - |
| Unknown, isolated from seed | U179-1 | Chiang Rai | + | - |
| Unknown, isolated from seed | U179-2 | Chiang Rai | + | - |
| Unknown, isolated from seed | U699 | Phetchabun | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U713 | Phetchabun | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U721 | Uttaradit | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U722 | Uttaradit | - | - |
| Unknown, isolated from seed | U726 | Uttaradit | + | - |
| Unknown, isolated from seed | U728 | Uttaradit | + | - |
| Unknown, isolated from seed | U759 | Prachin Buri | + | - |

+ and – indicates species was detected or not detected, respectively



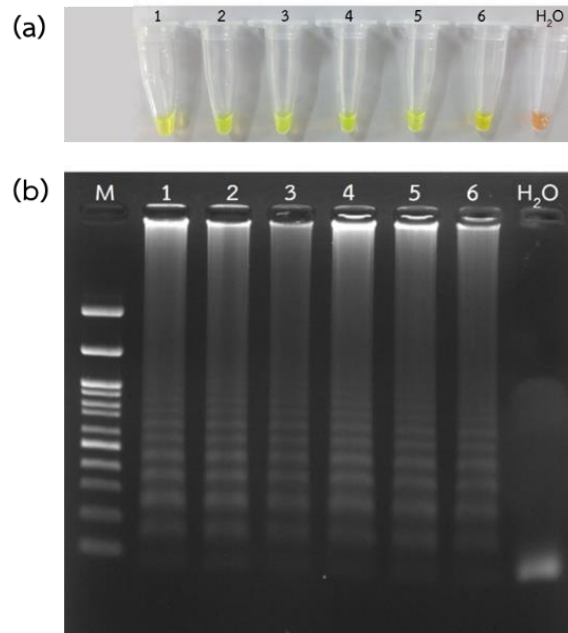


Figure 1 Detection of *Pseudomonas fuscovaginae* from genomic DNA by loop-mediated amplification (LAMP) assay (a) Visual inspection of LAMP assay with fluorescent dye of SYBR Green I (b) agarose gel electrophoresis visualization of LAMP M: onemark 100, lane 1–6: genomic DNA of *Pseudomonas fuscovaginae*, H₂O (negative control)

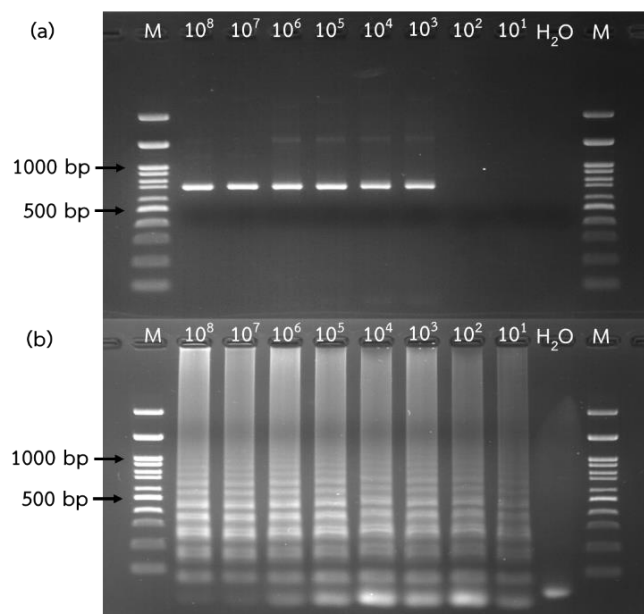


Figure 2 Sensitivity test for detection *Pseudomonas fuscovaginae* by (a) PCR and (b) LAMP assay; M: Onemark 100, H₂O (negative control)

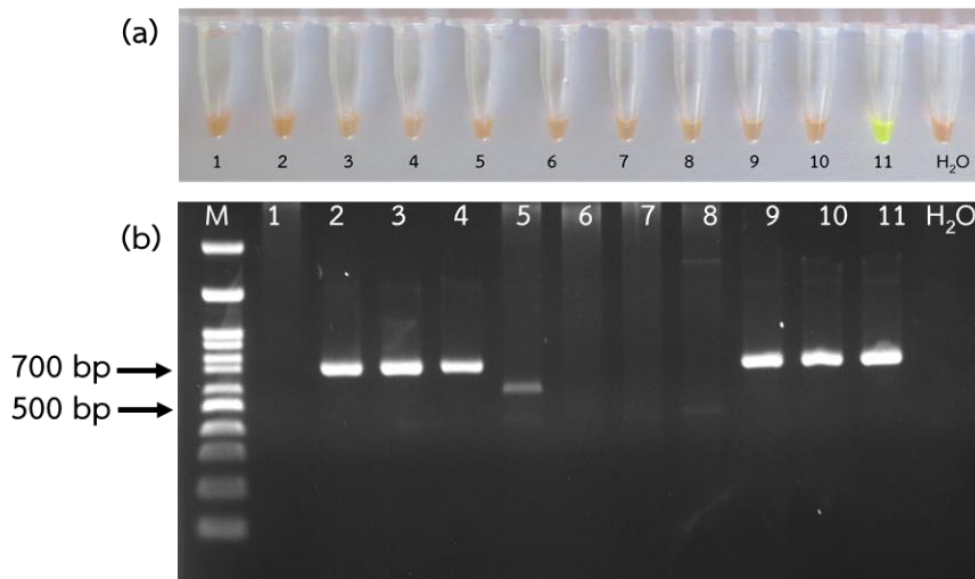


Figure 3 Detection of *Pseudomonas fuscovaginae* from rice by LAMP assay and PCR.

(a) LAMP positive reactions appeared green and negative reactions appeared orange in daylight (b) PCR results, M: Onemark 100, 1–10: rice samples, 11: *Pseudomonas fuscovaginae* (positive control), H₂O (negative control)

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์
Tropical Race 4 ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction
Development Polymerase Chain Reaction technique for detection of
Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* Tropical Race 4 strain

ชรินทร์ ดวงสอด^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล^{1/}

อมรรักษ์ คัดใจเดียว^{1/} มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/}

^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

This study was conducted to develop a Polymerase Chain Reaction technique for detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 strain (FocTR4) during October 2020-May 2021. *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) as well as tissue samples of infected bananas were collected. The plasmid DNA standard of FocTR4 (VCG 01213/16) NRRL36114 was also generated for positive control in PCR reactions. The results from this study showed that the optimized methods were obtained for DNA extraction from all three sample sources: clean culture of FocTR4, fresh samples of banana plant tissue, and dried samples of banana plant tissue. FocTR4-specific primers versus FocTR4 standard DNA revealed that FocTR4-specific primers were obtained. Therefore, the output of this study was a technique for diagnosing *F. oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical Race 4 (FocTR4), the causative agent of banana mortality, which can be detected quickly, accurately, and efficiently. It can save time in diagnosis. It will be of great benefit to the development of pest detection techniques for Thailand's exports and imports. It also supports preparation to deal with the current fast and severe pest epidemic situation.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical Race 4, detection, *Musa*

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-01-00-07-63



บทคัดย่อ

ศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 (FocTR4) ระหว่างเดือนตุลาคม 2563 - พฤษภาคม 2564 รวบรวมตัวอย่างเชื้อรา Foc ตัวอย่างเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่แสดงอาการตายพราย และจัดทำ plasmid DNA มาตรฐานของ FocTR4 (VCG 01213/16) NRRL36114 เพื่อเป็น positive control จากผลการดำเนินงาน ได้วิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากแหล่งตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ clean culture ของเชื้อรา FocTR4 ตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วย และตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วย ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ FocTR4 กับ DNA มาตรฐานของ FocTR4 พบว่าได้ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับ Foc TR4 ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ได้เทคนิคในการตรวจวินิจฉัยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical Race 4 (FocTR4) สาเหตุโรคตายพรายกล้วยที่สามารถตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ สามารถประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย จะก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทย อีกทั้งสนับสนุนการเตรียมรับมือกับสถานการณ์การแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่เป็นไปอย่างรวดเร็วและรุนแรงในปัจจุบัน

คำหลัก : *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 การตรวจสอบ กล้วย

คำนำ

กล้วย (*Musa* spp.) เป็นพืชที่นิยมปลูกทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตร้อนชื้น มีพื้นที่ปลูกมากกว่า 37.62 ล้านไร่ และให้ผลผลิตมากกว่า 125 ล้านตัน โดยพื้นที่ปลูกประมาณ 47 เปอร์เซ็นต์เป็นพื้นที่ปลูกกล้วยคาเวนดิช (Cavendish) (FAO, 2019) สำหรับประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกกล้วยในปี 2561-2562 ประมาณ 5 แสนไร่ พื้นที่ปลูกกว่า 68 เปอร์เซ็นต์ หรือ ประมาณ 3.28 แสนไร่ เป็นพื้นที่ปลูกกล้วยน้ำว้า รองลงมาคือกล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยตานี กล้วยเล็บมือนาง กล้วยหิน และมีพื้นที่ปลูกกล้วยคาเวนดิชเพียง 0.14 เปอร์เซ็นต์ หรือ 700 ไร่ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2562; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562)

โรคตายพราย หรือ โรคเหี่ยวกล้วย (Panama disease หรือ Fusarium wilt) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* หรือ Foc สามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดความเสียหายต่อกล้วย และพืชสกุล *Heliconia* เชื้อจะเข้าทำลายและก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบท่อลำเลียงของพืช การเข้าทำลายส่วนใหญ่จะเข้าทางราก เจริญขึ้นไปตามท่อน้ำ (xylem) เริ่มจากบริเวณกาบใบด้านนอกของส่วนลำต้น (Warman and Aitken, 2018) โรคนี้เป็นโรคที่สำคัญต่อการปลูกกล้วย ซึ่งทำความเสียหายให้กับผลผลิตกล้วยอย่างรุนแรง และเป็น soil borne สามารถคงอยู่ในดินในรูปของ chlamydospore ได้นานกว่า 20 ปี ตั้งแต่ตอนต้นศตวรรษที่ 1900 โรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา Foc สายพันธุ์ race 1 ทำความเสียหายให้กับกล้วยสายพันธุ์ Gros Michel ซึ่งเป็นกล้วยที่มีความสำคัญทางการค้าในภูมิภาคลาตินอเมริกาซึ่งเป็นแหล่งปลูกกล้วยสำคัญของโลก ทำให้มี



การพัฒนากล้วยพันธุ์ที่ต้านทานต่อ Foc Race 1 ขึ้น พบว่า กล้วยพันธุ์คาเวนดิช (Cavendish) สามารถทดแทน กล้วยสายพันธุ์ Gros Michel ได้และเริ่มปลูกทดแทน ในช่วงปี 1960 อย่างไรก็ตาม หลังจากนั้นต่อมา ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาพบว่ามีพันธุ์กล้วยต้านทานโรคอย่างคาเวนดิช ที่ปลูกในพื้นที่เขตร้อนกลับอ่อนแอและเกิดโรคตายพรายได้ ซึ่งเมื่อจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุแล้วพบว่าเกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc) สายพันธุ์ใหม่ที่ยังไม่เคยพบมาก่อน คือ เชื้อรา Foc Tropical Race 4 หรือ Foc TR4

สายพันธุ์ของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc)

1. *F. oxysporum* f.sp. *cubense* Race 1 เข้าทำลายกล้วยเช่น พันธุ์ Gros Michel (กล้วยหอมทอง genome type AAA) Pisang Awak (กล้วยน้ำว้า genome type ABB) เป็นต้น
2. *F. oxysporum* f.sp. *cubense* Race 2 เข้าทำลายกล้วยเช่น พันธุ์ Bluggoe (กล้วยหักมุก genome type ABB) เป็นต้น
3. *F. oxysporum* f.sp. *cubense* Race 3 เข้าทำลายพืชในกลุ่ม Heliconia species
4. *F. oxysporum* f.sp. *cubense* Race 4 เข้าทำลายกล้วยพันธุ์ Cavendish (กล้วยหอมเขียว genome type AAA) Foc Race 4 แยกออกได้เป็น 2 strain คือ Subtropical Race 4 (Foc SR4) พบการระบาดเฉพาะในเขต subtropics และ Tropical Race 4 (Foc TR4) พบในเขต Tropics และกำลังระบาดและทำความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการผลิตกล้วยทั่วโลกอยู่ในขณะนี้ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 เข้าทำลายกล้วยเช่น พันธุ์ Gros Michel หรือ กล้วยหอมทองซึ่งมี genome type AAA พันธุ์ Pisang Awak หรือ กล้วยน้ำว้า genome type ABB

ในภูมิภาคเอเชีย พบรายงานครั้งแรกในปี 1980 ที่ประเทศไต้หวัน หลังจากปี 1990 เริ่มพบรายงานการแพร่ระบาดไปยังประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย จีน ฟิลิปปินส์ ลาว เวียดนาม รวมถึงประเทศอื่นๆ เช่น ประเทศในแถบลาตินอเมริกา จอร์แดน โมซัมบิก ปากีสถาน เลบานอน โอมาน ในปี 1997 พบการระบาดของ Foc TR4 ที่มี vegetative compatibility group (VCG) 01213/16 ระบาดอย่างรุนแรงในรัฐ Northern Territory บริเวณเมือง Darwin ซึ่งส่งผลต่ออุตสาหกรรมผลิตกล้วยของประเทศออสเตรเลียอย่างรุนแรง โดยไม่สามารถปลูกกล้วยคาเวนดิชบนพื้นที่ที่มีการระบาดได้อีก (Conde and Pitkethley, 2001)

การจำแนกชนิดสายพันธุ์ของ Foc ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนก เนื่องจากมีความแตกต่างไม่เพียงพอ อีกทั้งการจัดกลุ่ม vegetative compatibility groups หรือ VCGs ที่ออกแบบโดย Cove (1976) และ Puhalla (1985) ค่อนข้างยุ่งยากเนื่องจากมีข้อจำกัดมากมาย เช่น ต้องมี Foc จากแต่ละกลุ่ม VCGs เพื่อใช้ในการทดสอบซึ่งมีเพียงห้องปฏิบัติการไม่กี่แห่ง ที่มี Foc สำหรับการทดสอบ VCGs อีกทั้งการจัดจำแนกด้วย VCGs ใช้เวลาค่อนข้างนาน ทำให้ไม่ทันการต่อการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา Foc ปัจจุบัน จึงมีผู้คิดค้นวิธีการชีวโมเลกุล โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 เพื่อให้สามารถใช้ตรวจสอบชนิดของรา Foc ได้ทันการณ์ (Bentley *et al.*, 2001; Dita *et al.*, 2010; Dita *et al.*, 2011; Fraser-Smith *et al.*, 2014)



สำหรับประเทศไทยความเสี่ยงในการระบาดของ Foc TR4 เข้ามาในประเทศค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเนื่องมาจากการนำส่วนขยายพันธุ์กล้วยเข้ามาจากประเทศเพื่อนบ้าน ซึ่งมีรายงานการพบ Foc TR4 และในปัจจุบันประเทศไทยใช้การตรวจวินิจฉัยชนิดของ Foc โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งไม่สามารถระบุ race ได้ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการทดสอบการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อรา และการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากตัวอย่างเนื้อเยื่อต้นกล้วย ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้มากกว่า 15 วัน รวมถึงการทดสอบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงกับ Foc TR4 รวมใช้ระยะเวลาเพียง 3-20 วัน (ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างเริ่มต้น) ก็สามารถตรวจวินิจฉัยว่าเป็น Foc TR4 หรือไม่

ดังนั้น การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง จากประสิทธิภาพของวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง จะทำให้เกิดความรวดเร็ว และประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย จะก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทย อีกทั้ง สนับสนุนการเตรียมรับมือกับสถานการณ์การแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่เป็นไปอย่างรวดเร็วและรุนแรงในปัจจุบัน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทาบตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Microcentrifuge, Thermal cyclers, Vortex, Tissue Lyser, Gel electrophoresis, เครื่องถ่ายภาพเจล, microwave, micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร, กล้องจุลทรรศน์แบบ compound, กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo, Dry heat block
3. วัสดุในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบมีดผ่าตัด เข็มเย็บปลายแหลม ปากคีบ
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate
5. สารเคมี ได้แก่ Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™), Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Glucanex®), Lithium Borate buffer (LB), PureDireX Genomic DNA Isolation Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, SERVA HiSens Stain G, Nuclease-Free Water

- ไพรเมอร์ ได้แก่

TR4-F2 CAG GCC AGA GTG AAG GGG GAT (Bentley *et al.*, 2003)

TR4-R1 CGC CAG GAC TGC CTC GTG A (Bentley *et al.*, 2003)

FocTR4-F CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG (Dita *et al.*, 2010)

FocTR4-R1 CGCACGCCAGGACTGCCTCGTGA (Dita *et al.*, 2010)



| | |
|--------------|--|
| FocTR4-R2 | GCCAGGACTGCCTCGTGA (Dita <i>et al.</i> , 2010) |
| EF-1 | ATGGGTAAGGARGACAAGAC (O'Donnell <i>et al.</i> , 1998) |
| EF-2 | GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell <i>et al.</i> , 1998) |
| Ban-Actin2-F | ACAGTGTCTGGATTGGAGGC (Dita <i>et al.</i> , 2010) |
| Ban-Actin2-R | GCACTTCATGTGGACAATGG (Dita <i>et al.</i> , 2010) |

- Plasmid DNA standard ของ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Topical

Race 4 strain VCG 01213/16 NRRL36114

วิธีการ

1. การทดสอบการสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจาก clean culture ของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense*

เขียนเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ Dungsard *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วย

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพราย ทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Dungsard *et al.* (2015) โดยปรับปริมาณของเนื้อเยื่อที่ใช้ตั้งต้น ปรับวิธีการในขั้นตอนของ cell lysis และการตกตะกอนโปรตีน

1.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วย

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพราย ทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Dungsard *et al.* (2015) โดยปรับปริมาณของเนื้อเยื่อที่ใช้ตั้งต้น ปรับวิธีการในขั้นตอนของ cell lysis และการตกตะกอนโปรตีน

2. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4

2.1 นำไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR กับ Plasmid DNA standard ของ Foc TR4

2.2 นำไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR กับ DNA template จาก clean culture ของรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ของ Foc TR4

2.3 นำไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR กับ DNA template จาก ตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพราย

2.4 นำไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR กับ DNA template จาก ตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพราย



3. ตรวจสอบชนิดของ Foc TR4

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ของตัวอย่างจาก clean culture ที่ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับ FocTR4 มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบจำแนกชนิดโดยวิธี phylogenetic reconstruction ด้วย phylogenetic criteria แบบ Maximum Likelihood (ML) และวิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014)

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูล เก็บรักษาตัวอย่างแห้ง สายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ ตัวอย่างเก็บรักษาในรูปแบบตัวอย่างแห้ง ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2563 – กันยายน 2564

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การทดสอบการสกัดดีเอ็นเอ

ผลการดำเนินงานในระหว่างเดือนตุลาคม 2563 - กันยายน 2564 รวบรวมตัวอย่างเชื้อรา Foc ได้ 75 ไอโซเลท ตัวอย่างเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่แสดงอาการตายพรายได้อย่างน้อย 60 ตัวอย่าง จากการทดสอบการสกัดดีเอ็นเอ ตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA ของเชื้อราในตัวอย่างที่ทำการสกัดด้วยไพรเมอร์ EF-1/EF-2 พบว่าได้วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากแหล่งตัวอย่าง 3 ชนิด จำนวน 2 วิธีการ (Protocol 1 และ 2) ดังนี้

วิธีการที่ 1 การสกัดดีเอ็นเอจาก clean culture ของเชื้อรา *F. oxysporum f.sp. cubense*

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ PureDireX® Genomic DNA Isolation Kit โดยดัดแปลงจากวิธีการสำหรับ PureDireX® Genomic DNA Isolation Kit ของบริษัท BIO-HELIX จำกัด มีวิธีการ ดังนี้

1. เติม micro glass beads ขนาด 0.5 mm ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 2.0 ml ประมาณ 0.2 กรัม
2. เติม *Trichoderma* enzyme ความเข้มข้น 200 µg/µl ปริมาณ 8 µl ลงในหลอดจากข้อ 1 จากนั้นเติม cell lysis solution (Buffer CC) ปริมาณ 350 µl
3. เชื้อเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum f.sp. cubense* ที่เลี้ยงให้บริสุทธิ์โดยวิธี single spore isolation บน PDA แล้วย้ายลงในหลอดจากข้อ 2
4. บ่มหลอดจากข้อ 3 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 4-12 ชั่วโมง



5. จากนั้นนำมาเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความเร็ว 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที จำนวน 3-4 ครั้ง
6. ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
7. เติม Buffer CB ปริมาณ 400 μ l กลับหลอดไปมาเพื่อให้สารเข้ากัน จากนั้นนำหลอดไปพักไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมงเพื่อตกตะกอนโปรตีน
8. นำหลอดจากข้อ 7 มาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
9. ดูเฉพาะส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ค่อยๆ หยดลงใน Column CC ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 ml (หลอดใหม่)
10. นำหลอดจากข้อ 9 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 10,000 x g นาน 1 นาที
11. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม
12. เติมสารละลาย Buffer W1 ปริมาณ 400 μ l โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC
13. นำหลอดจากข้อ 12 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
14. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม
15. เติมสารละลาย Buffer W2 ปริมาณ 600 μ l โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC
16. นำหลอดจากข้อ 15 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
17. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม
18. นำหลอดจากข้อ 17 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 2 นาที
19. ย้าย Column CC ไปบรรจุลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
20. เติมสารละลาย Solution BE ปริมาณ 50 μ l โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC โดยระวังไม่ให้ปลาย tip โดนด้านข้างของ column และให้ปลาย tip โกลักับ filter membrane
21. Inculcate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
22. นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 2 นาที
23. เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

Protocol 1: DNA extraction from mycelium cultures

Extraction protocol using PureDireX[®] Genomic DNA Isolation Kit (Modified from protocol instruction for PureDireX[®] Genomic DNA Isolation Kit that designed by BIO-HELIX Co., LTD.) Modified by Chanintorn Doungsa-ard



Cell Lysis



- Add mycelium, micro beads, *Trichoderma* enzyme 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, and 350 μl of the Buffer CC (cell lysis solution)



- Heat tubes at 65 °C overnight
- Shake tubes with Vortex at maximum speed for 10 minutes or Tissue Lyser at 30 times/sec for 3 minutes, 3-4 times

Protein
Precipitation

- Add 400 μl of the Buffer CB



- Invert the tubes to mix the contents
- Incubate at 4 °C for 1 hour
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute

Bind DNA



- Transfer the supernatant to 2 ml Collection Tubes that installed Column CC
- Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute
- Discard the flow-through and place the Column CC back into the same Collection Tubes






Wash



- Add 400 μl of the Buffer W1 into the Column CC
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute
- Discard the flow-through and place the Column CC back into the same Collection Tubes



- Add 600 μl of the Buffer W2 into the Column CC
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute
- Discard the flow-through and place the Column CC back into the same Collection Tubes
- Centrifuge at 14,000 x g for 2 minutes

| | | |
|--------------|--|---|
| Elute |  | <ul style="list-style-type: none"> - Transfer the dried Column CC to a new 1.5 ml microcentrifuge tubes (Being careful not to splash liquid on the spin filter basket) - Add 50 µl of Solution BE to the center of the white filter membrane - Let stand at 60 °C for 3 minutes |
| |  | <ul style="list-style-type: none"> - Centrifuge at 14,000 x g for 2 minutes to elute the purified DNA |
| DNA |  | <ul style="list-style-type: none"> - Storing DNA frozen at -20 or -40 °C and at -80 °C for long term |

วิธีการที่ 2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสด และตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วย

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ PureDireX® Genomic DNA Isolation Kit โดยดัดแปลงจากวิธีการสำหรับ PureDireX® Genomic DNA Isolation Kit ของบริษัท BIO-HELIX จำกัด มีวิธีการ ดังนี้

1. ตัดเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่ต้องการตรวจสอบเป็นเส้นเล็กๆ และตัดให้ละเอียดให้มากที่สุดอีกครั้ง ด้วยกรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุเนื้อเยื่อที่ละเอียด โดยใช้ปลายใบมีดตัดประมาณปลายใบมีด หรือ ปริมาณ 0.2 กรัมสำหรับตัวอย่างแห้ง และ ปริมาณ 0.5 กรัม สำหรับตัวอย่างสด ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml

2. บดเนื้อเยื่อด้วย Pre+Sterized ขนาด 1.5 mL & 2.0 mL Pestle จนละเอียด

3. เติม micro glass beads ขนาด 0.5 mm ประมาณ 0.1 กรัม และ micro glass beads ขนาด 1.0 mm ประมาณ 0.1 กรัม ลงในหลอด microcentrifuge จากข้อ 2

4. เติม *Trichoderma* enzyme ความเข้มข้น 200 µg/µl ปริมาณ 8 µl และเติม cell lysis solution (Buffer CC) ปริมาณ 350 µl ลงในหลอด

5. สำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อแห้ง วางหลอดจากข้อ 4 ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 วัน (48 ชั่วโมง) และสำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อสด ไม่ต้องทำขั้นตอนนี้

6. จากนั้นบ่มหลอดจากข้อ 5 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง หรือ overnight

7. จากนั้นนำมาเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความเร็ว 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที จำนวน 3-4 ครั้ง

8. ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
9. เติม Buffer CB ปริมาณ 400 μ l กลับหลอดไปมาเพื่อให้สารเข้ากัน จากนั้นนำหลอดไปพักไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมงเพื่อตกตะกอนโปรตีน
10. นำหลอดจากข้อ 9 มาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
11. ดูเฉพาะส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ค่อยๆ หยดลงใน Column CC ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 ml (หลอดใหม่)
12. นำหลอดจากข้อ 11 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 10,000 x g นาน 1 นาที
13. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ที่ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม
14. เติมสารละลาย Buffer W1 ปริมาณ 400 μ l โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC
15. นำหลอดจากข้อ 14 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
16. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ที่ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม
17. เติมสารละลาย Buffer W2 ปริมาณ 600 μ l โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC
18. นำหลอดจากข้อ 17 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
19. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ที่ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม
20. นำหลอดจากข้อ 19 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 2 นาที
21. ย้าย Column CC ไปบรรจุลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
22. เติมสารละลาย Solution BE ปริมาณ 50 μ l โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC โดยระวังไม่ให้ปลาย tip โดนด้านข้างของ column และให้ปลาย tip ใกล้กับ filter membrane
23. Incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
24. นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 2 นาที
25. เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

Protocol 2: DNA extraction from Banana plant materials (fresh and dried)

Extraction protocol using PureDireX® Genomic DNA Isolation Kit (Modified from protocol instruction for PureDireX® Genomic DNA Isolation Kit that designed by BIO-HELIX Co., LTD.) Modified by Chanintorn Doungsa-ard



Cell Lysis



- Add small pieces of banana pseudo stem into 1.5 microcentrifuge tubes
- Grind plant material using Pre+Sterized 1.5 mL & 2.0 mL Pestle
- Add 0.5 mm and 1.0 mm micro beads, *Trichoderma* enzyme 200 µg/µl, and 350 µl of the Buffer CC (cell lysis solution)



- Let stand at RT for 2 days for dried specimen, but can skip this step for fresh specimens
- Heat tubes at 65 °C overnight
- Shake tubes with Vortex at maximum speed for 10 minutes or Tissue Lyser at 30 times/sec for 3 minutes, 3-4 times

Protein Precipitation



- Add 400 µl of the Buffer CB



- Invert the tubes to mix the contents
- Incubate at 4 °C for 1 hour
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute

Bind DNA



- Transfer the supernatant to 2 ml Collection Tubes that installed Column CC
- Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute
- Discard the flow-through and place the Column CC back into the same Collection Tubes



- Add 400 µl of the Buffer W1 into the Column CC
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute
- Discard the flow-through and place the Column CC back into the same Collection Tubes
- Add 600 µl of the Buffer W2 into the Column CC
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute
- Discard the flow-through and place the Column CC back into the same Collection Tubes
- Centrifuge at 14,000 x g for 2 minutes

Wash



Elute



- Transfer the dried Column CC to a new 1.5 ml microcentrifuge tubes
(Being careful not to splash liquid on the spin filter basket)
- Add 50 μ l of Solution BE to the center of the white filter membrane
- Let stand at 60 °C for 3 minutes



- Centrifuge at 14,000 x g for 2 minutes to elute the purified DNA

DNA



- Storing DNA frozen at -20 or -40 °C and at -80 °C for long term

2. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4

ดำเนินการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 จำนวน 5 เส้น ได้แก่

| | |
|-----------|--|
| TR4-F2 | CAG GCC AGA GTG AAG GGG GAT (Bentley <i>et al.</i> , 2003) |
| TR4-R1 | CGC CAG GAC TGC CTC GTG A (Bentley <i>et al.</i> , 2003) |
| FocTR4-F | CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG (Dita <i>et al.</i> , 2010) |
| FocTR4-R1 | CGCACGCCAGGACTGCCTCGTGA (Dita <i>et al.</i> , 2010) |
| FocTR4-R2 | GCCAGGACTGCCTCGTGA (Dita <i>et al.</i> , 2010) |

จับคู่ไพรเมอร์สำหรับการทดสอบความจำเพาะจำนวน 3 คู่ ดังนี้

1. TR4-F2/TR4-R1
2. FocTR4-F/FocTR4-R1
3. FocTR4-F/FocTR4-R2

ทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่กับ plasmid มาตรฐานของเชื้อรา Foc TR4 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* race 4 strain VCG 01213/16 NRRL 36114 (Ballard *et al.*, 2018; Dita *et al.*, 2010; O'Donnell *et al.*, 1998) ที่ความเข้มข้น 500 pg ซึ่งมีตำแหน่งจำเพาะ (binding site) ของไพรเมอร์แต่ละเส้นดังแสดงใน Figure 1

2.1 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Plasmid DNA standard ของ Foc TR4

เมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยา PCR เพื่อหา cycling parameters ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่ได้รับผลการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 ทั้ง 3 คู่ โดยทดสอบกับ plasmid DNA มาตรฐานของเชื้อรา Foc TR4 (VCG 01213/16) NRRL36114 พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ได้แก่ TR4-F2/TR4-R1 FocTR4-F/FocTR4-R1 และ FocTR4-F/FocTR4-R2 สามารถตรวจจับ plasmid DNA มาตรฐานของเชื้อรา Foc TR4 (VCG 01213/16) NRRL36114 ได้ (Figure 2) โดยมี annealing temperature ที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียส จำนวน 30 cycle (Figure 3) ดังนั้น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 (VCG 01213/16) NRRL36114 สามารถใช้เป็น positive control ในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา Foc TR4

2.2 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ DNA template จาก clean culture ของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ของ Foc TR4

นำไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 ได้แก่ FocTR4-F/FocTR4-R2 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cycling parameters จากข้อ 2.1 กับ DNA template ที่สกัดได้จาก clean culture ของเชื้อรา Foc ที่ได้จำแนกชนิดแล้ว ได้แก่ เชื้อรา Foc race 1 (lane 1-7 และ 9) และ Foc TR4 (lane 8 และ 10) โดยใช้ไพรเมอร์ตำแหน่ง translation elongation factor alpha 1 ได้แก่ EF-1/EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998) ซึ่งมีขนาด PCR product ประมาณ 650 bp เป็น internal control พบว่า internal control primer สามารถตรวจจับ DNA ของเชื้อรา Foc ได้ทั้งหมด (lane ที่ 1-10) ยกเว้น lane P ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 และไม่มี binding site สำหรับ EF-1/EF-2 (Figure 4)

จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 สามารถตรวจจับได้เฉพาะ DNA ของเชื้อรา Foc TR4 (lane 8 และ 10) รวมถึง positive control (lane P) ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 เท่านั้น และมีขนาดของ PCR product ประมาณ 463 bp (Figure 4)

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 จำนวน 3 คู่ ได้แก่ TR4-F2/TR4-R1 FocTR4-F/FocTR4-R1 และ FocTR4-F/FocTR4-R2 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cycling parameters จากข้อ 2.1 กับ DNA template ที่สกัดได้จาก clean culture ของเชื้อราที่จำแนกชนิดแล้ว ได้แก่ *Trichoderma* sp., *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 (Foc R1) และ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4) โดยใช้ไพรเมอร์ตำแหน่ง translation elongation factor alpha 1: EF-1/EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998) เป็น internal control ซึ่งมีขนาดของ PCR product ประมาณ 650 bp (Figure 5)

จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ สามารถตรวจจับได้เฉพาะ DNA ของเชื้อรา Foc TR4 (lane 5-8) รวมถึง positive control (lane 9) ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 เท่านั้น ซึ่งไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R1 และ FocTR4-F/FocTR4-R2 มีขนาดของ PCR

product ประมาณ 463 bp และไพรเมอร์ TR4-F2/TR4-R1 มีขนาดของ PCR product ประมาณ 1,400 bp (Figure 5)

2.3 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ DNA template จากตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพรายของเชื้อรา Foc TR4

นำไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 ได้แก่ FocTR4-F/FocTR4-R2 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cycling parameters จากข้อ 2.1 กับ DNA template ที่สกัดได้จากตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา Foc TR4 (lane 1-6) และตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยปกติที่ (lane 7) โดยใช้ไพรเมอร์ Ban-Actin2-F/Ban-Actin2-R (Dita *et al.*, 2010) ซึ่งจะตรวจจับกับ DNA ของพืชบริเวณตำแหน่งยีน Actin เป็น internal control ซึ่งมีขนาดของ PCR product ประมาณ 200 bp พบว่า internal control primer สามารถตรวจจับ DNA ของกล้วยได้ แสดงให้เห็นว่า DNA ที่สกัดได้มี DNA ของพืชอยู่ด้วย (lane ที่ 1-15) ยกเว้น lane P ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 และไม่มี binding site สำหรับ Ban-Actin2-F/Ban-Actin2-R (Figure 6)

จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 สามารถตรวจจับ DNA ของเชื้อรา Foc TR4 ที่อยู่ในตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยได้ (lane 1-6) รวมถึง positive control (lane P) ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 เท่านั้น และมีขนาดของ PCR product ประมาณ 463 bp ซึ่งในขณะเดียวกัน ไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 แสดงผลเป็นลบ ในตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่ปกติหรือไม่เป็นโรคตายพราย (lane 7) (Figure 6)

2.4 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ DNA template จากตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพรายของเชื้อรา Foc TR4

นำไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 ได้แก่ FocTR4-F/FocTR4-R2 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cycling parameters จากข้อ 2.1 กับ DNA template ที่สกัดได้จากตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา Foc TR4 (lane 8-14) และตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยปกติที่ (lane 15) โดยใช้ไพรเมอร์ Ban-Actin2-F/Ban-Actin2-R (Dita *et al.*, 2010) ซึ่งจะตรวจจับกับ DNA ของพืชบริเวณตำแหน่งยีน Actin เป็น internal control ซึ่งมีขนาดของ PCR product ประมาณ 200 bp พบว่า internal control primer สามารถตรวจจับ DNA ของกล้วยได้ แสดงให้เห็นว่า DNA ที่สกัดได้มี DNA ของพืชอยู่ด้วย (lane ที่ 1-15) ยกเว้น lane P ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 และไม่มี binding site สำหรับ Ban-Actin2-F/Ban-Actin2-R (Figure 6)

จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 สามารถตรวจจับ DNA ของเชื้อรา Foc TR4 ที่อยู่ในตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยได้ (lane 8-14) รวมถึง positive control (lane P) ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 เท่านั้น และมีขนาดของ PCR



product ประมาณ 463 bp ซึ่งในขณะเดียวกัน ไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 แสดงผลเป็นลบ ในตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่ปกติหรือไม่เป็นโรคตายพราย (lane 15) (Figure 6)

3. ตรวจสอบชนิดของ Foc TR4

นำเชื้อราที่มีผลทดสอบการด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 มาทำการ ยืนยันชนิดที่ถูกต้องอีกครั้ง โดยดำเนินการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของยีนตำแหน่ง the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) ตรวจสอบ ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และ sequencing

จัดทำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021 จากนั้น จัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ร่วมกับ type sequences และ dataset จากการศึกษาของ Maryani *et al.* (2019) โดยวิเคราะห์จาก *tef1* ของ 80 taxa โดยมี *F. fujikuroi* เป็น outgroup ทำการวิเคราะห์รวม 581 bases/taxa เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction ด้วย phylogenetic criteria แบบ Maximum Likelihood (ML) และวิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) พบว่า topology ที่ได้เป็น monophyletic (Figure 7) โดย phylogram ที่ได้จาก ML พิจารณาค่า bootstrap support values ($\geq 70\%$) ที่วิเคราะห์จาก 1,000 ซ้ำ ผลจากการวิเคราะห์และจำแนกด้วยวิธี phylogenetic reconstruction พบว่า เชื้อราไอโซเลทที่ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 สามารถตรวจจับได้หรือให้ผลเป็นบวก ถูกจำแนกอยู่ใน clade เดียวกับเชื้อรา Foc TR4 (Figure 7)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาครั้งนี้ ได้เทคนิคในการตรวจวินิจฉัยเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical Race 4 (Foc TR4) สาเหตุโรคตายพรายกล้วย ที่สามารถตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมี ประสิทธิภาพ โดยได้วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา และได้วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากตัวอย่าง เนื้อเยื่อต้นกล้วยทั้งแบบสดและแบบแห้ง ซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้มากกว่า 15 วัน และได้ไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงกับ Foc TR4 ซึ่งทำให้สามารถตรวจสอบเชื้อรารวมใช้ระยะ เพียง 3-20 วัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างเริ่มต้น ก็สามารถตรวจวินิจฉัยว่าเป็น Foc TR4 หรือไม่ จากประสิทธิภาพของวิธีการสกัดดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง จะทำให้เกิดความ รวดเร็ว และประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย จะก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิค การตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทย อีกทั้ง สนับสนุนการเตรียมรับมือกับ สถานการณ์การแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่เป็นไปอย่างรวดเร็วและรุนแรงในปัจจุบัน



คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร. ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช ที่เชื่อมั่นและให้คำแนะนำในการทดลอง ขอขอบคุณ ดร.พรพิมล อธิปัญญาคม คุณศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช สมาชิกเพื่อน พี่น้อง ในกลุ่มงานวิทยาโมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือ และช่วยเหลือในการดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2562. ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านเกษตร. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <https://production.doe.go.th/service/report-product-statistic/> (11 กุมภาพันธ์ 2562).
- ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. ถั่วฝักยาว: เนื้อที่ให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2551 – 2561. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <http://www.oae.go.th/download/prcai/farmcrop/banana.pdf> (11 กุมภาพันธ์ 2562).
- Bentley S., N.Y. Moore and J. Pattemore. 2003. *Fusarium wilt diagnostics laboratory manual*. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane. 78 p.
- Conde, B.D. and R.N. Pitkethley. 2001. The discovery, identification and management of banana *Fusarium* wilt outbreaks in the Northern Territory of Australia. pp. 260–265. In : Molina AB, Nik Masdek NH, Liew KW (eds). *Banana Fusarium wilt management: towards sustainable cultivation. Proceedings of the International workshop on the banana Fusarium wilt disease*. Genting Highlands Resort, Malaysia, 18–20 October 1999. INIBAP, Montpellier.
- Cove, D.J. 1976. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterization of chlorate resistant mutants. *Heredity* 36: 191-203.
- Dita M.A., C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, Jr M.T. Souza and G.H.J. Kema. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology* 59: 348-357.
- Dita, M.A., C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, M.T. Jr Souza and G.H. Kema. 2011. Corrigendum. *Plant Pathology* 60: 384.
- Doungsa-ard, C., A.R. McTaggart, A.D.W. Geering, T.U. Dalisay, J. Ray and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology* 44: 25-30.



- Maryani, N; L. Lombard, Y.S. Poerba, S. Subandiyah, P.W. Crous and G.H.J. Kema. 2019. Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology* 92: 155-194.
- O'Donnell, K., H.C. Kistler, E. Cigelnik and R.C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2044–2049.
- Puhalla, J.E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* 63: 179–183.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019. FAOSTAT Database. Rome, Italy: FAO. Retrieved on June 2019 from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Fraser-Smith, S., E. Cizlowski, R.A. Meldrum, M. Zander, G.R. Balali and E.A.B. Aitken. 2014. Sequence variation in the putative effector gene SIX8 facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *Plant Pathology* 63: 1044 –1052. doi: 10.1111/ppa.12184.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28 (12): 1647-1649.
- Snyder, W.C. and H.N. Hansen. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany* 27: 64-67.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313.
- Warman, N.M. and E.A.B. Aitken. 2018. The Movement of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (Sub-Tropical Race 4) in Susceptible Cultivars of Banana. *Frontiers in Plant Science* 9: 1-9.





Figure 1 The map of binding sites of FocTR4 primer specific

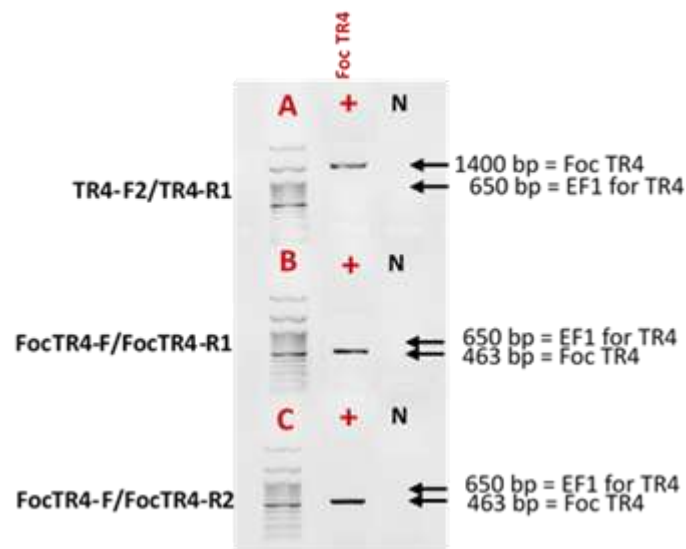


Figure 2 The results of FocTR4 specific primers to plasmid DNA of FocTR4 (VCG 01213/16) NRRL36114

| PCR Cycling Parameters | temp. °C | time | Cycle |
|------------------------|----------|---------|-------|
| Initial denaturation | 95 | 5 mins | - |
| Denaturation | 95 | 1 min | 30 |
| Annealing | 60 | 1 min | |
| Extension | 72 | 3 mins | |
| Final extension | 72 | 10 mins | - |

Figure 3 PCR Cycling Parameters of primers: TR4-F2/TR4-R1 FocTR4-F/FocTR4-R1 and FocTR4-F/FocTR4-R2

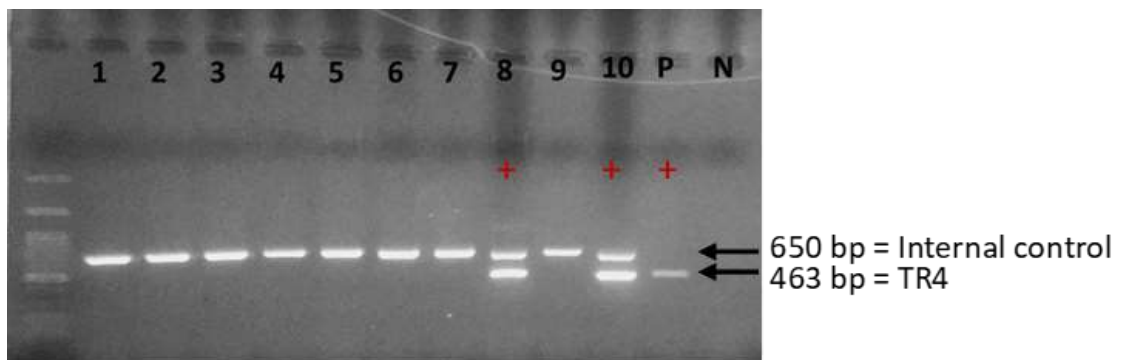


Figure 4 The duplex PCR results of FocTR4-F/FocTR4-R2 primers to FocTR4 testes with DNA obtained from clean cultures of Foc, with EF-1/EF-2 as internal control: Foc race 1 (lane 1-7 and 9); FocTR4 (lane 8 and 9); positive control (lane N)

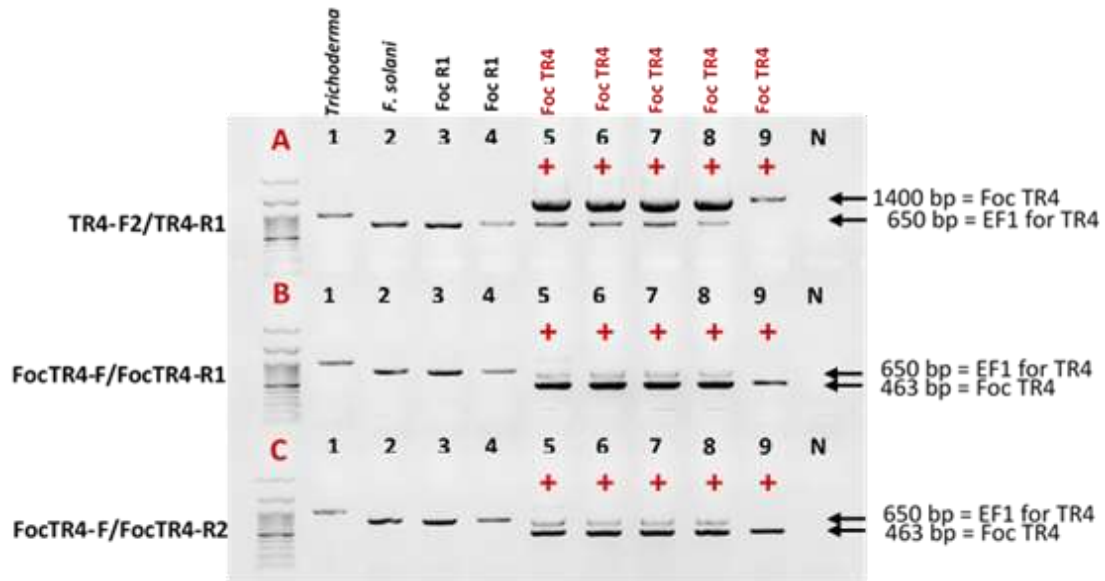


Figure 5 The duplex PCR results of TR4-F2/TR4-R1 FocTR4-F/FocTR4-R1 and FocTR4-F/FocTR4-R2 primers to FocTR4 testes with DNA obtained from clean cultures of fungi, with EF-1/EF-2 as internal control: *Trichoderma* (lane 1); *Fusarium solani* (lane 2); Foc race 1 (lane 3-4); Foc TR4 (lane 5-8); positive control (lane 9); negative control (lane N)

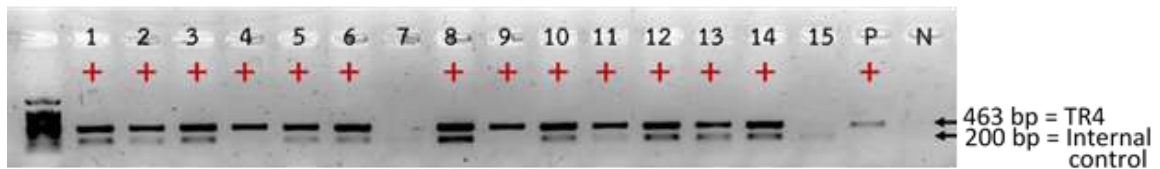


Figure 6 The duplex PCR results of FocTR4-F/FocTR4-R2 primers to FocTR4 testes with DNA obtained from fresh and dried specimens of Panama disease, with Ban-Actin2-F/Ban-Actin2-R as internal control: fresh Panama disease specimens (lane 1-6); healthy and fresh pseudo stem specimen (lane 7); dried Panama disease specimens (lane 8-14); healthy and dried pseudo stem specimen (lane 15); positive control (lane P); negative control (lane N)

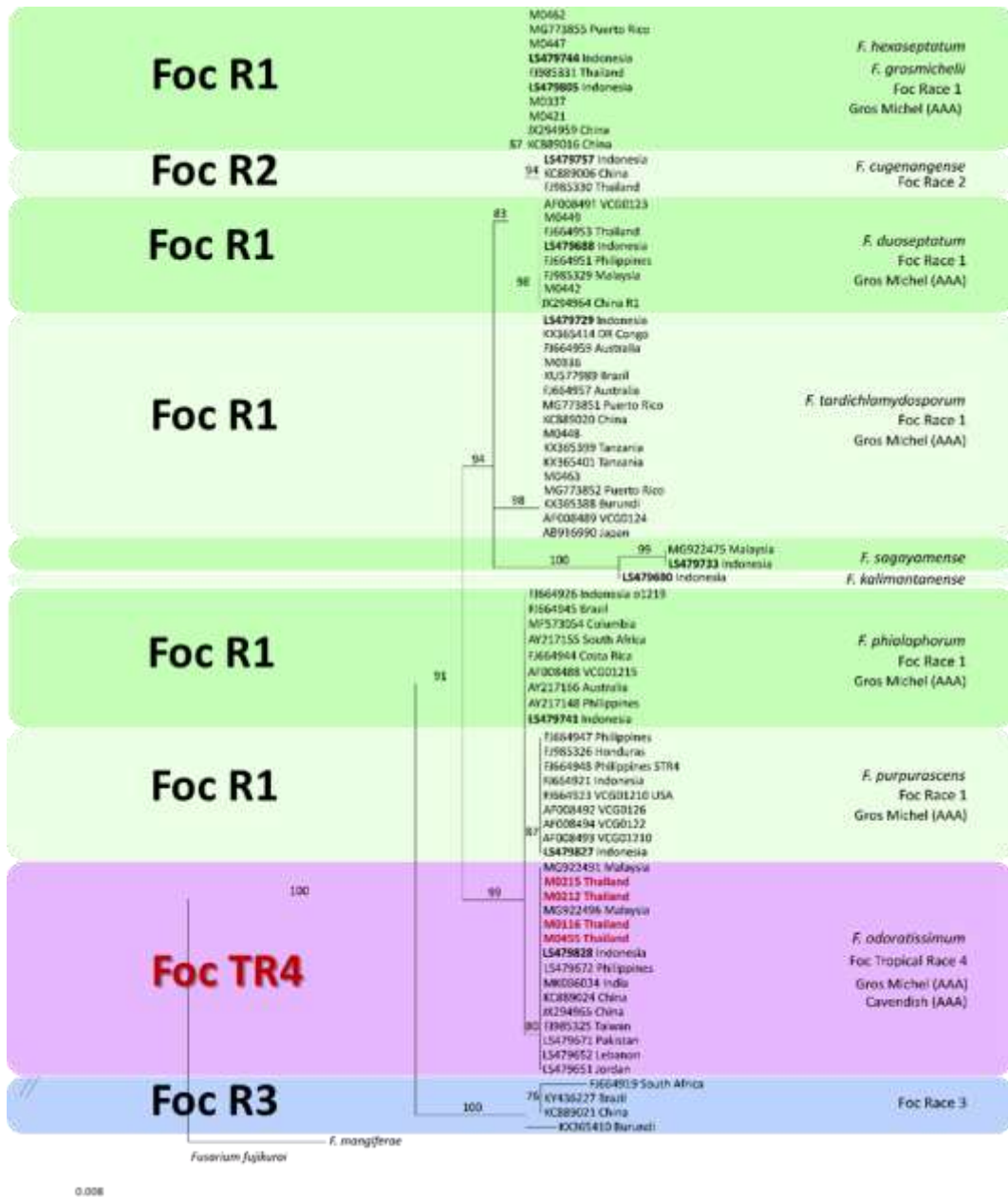


Figure 7 Phylogram of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* obtained in a maximum likelihood search in RAxML of concatenated dataset of the translation elongation factor 1- alpha (*tef1*) gene region. Bootstrap support values ($\geq 70\%$) from 1,000 replicates above nodes. The red bold fonts referred to the isolates which showed the positive results to FocTR4 specific primers

การตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS)
 Diagnosis of Cassava mosaic disease (CMD) caused by *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) by utilizing Next Generation Sequencing (NGS) technology

ภูวนารถ มณีโชติ^{1/} สุนัดดา เชาวลิต^{2/} วาสนา รุ่งสว่าง^{3/}

^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Cassava mosaic disease (CMD), caused by *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV), is the one of most important viral disease in cassava production and spreading throughout the major cassava production area in Thailand. The complete genome sequence is an important tool to diagnosis and accurate identification of viral agents. The aims of this work have been to use next generation sequencing (NGS) for disease diagnosis and genome reconstruction. During October, 2020 – September, 2021, the cassava samples were collected in diseased fields. The total DNA were extracted and diagnosed for SLCMV by PCR using specific primers to *Coat protein gene*. Four isolates from Sisaket, Prachinburi, Chanthaburi, and Buriram provinces were inspected for bipartite viral components by next generation sequencing using Illumina Hiseq 150 PE. The contig assembly was done through reference-guided assembly by using Geneious Prime software. Viral sequences were discovered from the assemble reads and identified to be SLCMV DNA-A and DNA-B with complete genome size of 2.7 kilobases for all isolates. In this work, other 8 isolates were subjected to Sanger sequencing. By the multiple alignment, DNA-A shared 99.1% - 99.9% and DNA-B shared 98.1% - 100%

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-01-00-08-63



identical among them. To determine the genetic relationships between SLCMV isolates and others obtained from GenBank, Neighbor-Joining tree showed that eleven SLCMV isolates were clustered into South-East Asia group including China isolate HN7 and together with other isolates from other countries.

Keywords : Cassava mosaic disease, Sri Lankan cassava mosaic virus, SLCMV, Next-Generation Sequencing

บทคัดย่อ

โรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ก่อให้เกิดความเสียหายและแพร่กระจายไปยังแหล่งผลิตมันสำปะหลังที่สำคัญต่างๆ ของประเทศไทย การตรวจสอบและจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคที่ถูกต้องแม่นยำจำเป็นต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมเชื้อไวรัส ที่สมบูรณ์ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมเชื้อ SLCMV ด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) แพลตฟอร์ม Illumina Hiseq 150 PE เพื่อตรวจสอบ จำแนกชนิดและศึกษาโครงสร้างจีโนมของเชื้อไวรัส ช่วงเดือนตุลาคม 2563 - กันยายน 2564 ได้เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคใบด่างมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์จีโนมเชื้อ SLCMV ด้วยเทคนิค NGS จำนวน 4 ไอโซเลท และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Geneious Prime จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมของเชื้อ SLCMV ไอโซเลท Srisaket Buriram Chanthaburi และ Prachinburi ร่วมกับ ไอโซเลท ๆ ของประเทศไทย จำนวน 8 ไอโซเลท พบว่า DNA-A มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.1 - 99.9 เปอร์เซ็นต์ และ DNA-B ที่ระดับ 98.2 - 99.9 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ SLCMV ด้วย phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง DNA-A และ DNA-B กับเชื้อ SLCMV และ ICMV ที่มีรายงานในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ พบว่าเชื้อ SLCMV ของไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ SLCMV ที่ก่อให้เกิดโรคใบด่างมันสำปะหลังที่พบรายงานในประเทศอินเดีย ศรีลังกา กัมพูชา เวียดนาม ลาว และจีน

คำหลัก : โรคใบด่างมันสำปะหลัง เชื้อไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง การตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลังมันสำปะหลัง

คำนำ

โรคใบด่างมันสำปะหลัง (Cassava mosaic Disease : CMD) ที่เกิดจากเชื้อ *Cassava mosaic virus* ที่จัดอยู่ในสกุล *Begomovirus* ก่อความเสียหายเป็นอย่างมากในหลายประเทศทางแอฟริกา เช่น ยูกันดา ทานซาเนีย และมาดากัสการ์ เป็นต้น ในเอเชียพบการระบาดของเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) และ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV)



โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อ SLCMV ก่อความเสียหายต่อผลผลิตของปลูกล้มลุกสำปะหลังในประเทศอินเดีย และศรีลังกามากถึง 88% (Jose *et al.*, 2008)

ในปี 2559 ได้พบการระบาดของโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ SLCMV ครั้งแรกในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยพบการระบาดในจังหวัดรัตนคีรี ประเทศกัมพูชา (Wang *et al.*, 2016) และได้มีการระบาดไปยังเวียดนาม (Uke *et al.* 2019) ลาว (Chittarath *et al.*, 2021) ไทย และจีน (Wang *et al.*, 2019)

สำหรับการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสสกุล *Begomovirus* ตามหลักเกณฑ์ของ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) โดยต้องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA-A ให้ครบทั้งจีโนม และเมื่อเปรียบเทียบกับ type species ของเชื้อไวรัสแล้วมีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ $\geq 91\%$ จึงจะจัดเป็นไวรัสชนิดเดียวกัน (Brown *et al.*, 2015)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค NGS เป็นวิธีการหาลำดับเบสแบบขนานที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งถือว่าเป็นเทคโนโลยีที่เป็นประโยชน์ มีประสิทธิภาพและความแม่นยำสูง ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ และได้มีการประยุกต์ใช้ทั้งทางด้านการแพทย์ การวิจัยด้านสิ่งแวดล้อม รวมถึงด้านการเกษตรอีกด้วย เช่น การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อสาเหตุโรคพืช เช่น เชื้อไวรัสเข็ชรา เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อไวรอยด์ เป็นต้น

การวิจัยครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อที่จะวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ SLCMV ที่พบในประเทศไทยที่มีความถูกต้องเป็นไปตามหลักสากลตามหลักเกณฑ์ของ ICTV และเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในระดับนานาชาติเพื่องานด้านการอารักขาพืช การนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง
2. สารเคมี
 - ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์สารพันธุกรรมเชื้อไวรัส
 - ไนโตรเจนเหลว
 - ชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan)
 - ชุด TempliPhi Amplification Kit (GE Healthcare, UK)
 - 2x Green PCR Master mix (Biotechrabbit, Germany)
 - 100 bp DNA Ladder with 6X Loading Dye (Biotechrabbit, Germany)
 - Agarose gel (SeaKem, USA)
 - RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)
 - 1X TAE Buffer



3. เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

- โกร่งบดตัวอย่างพืช
- เครื่องปั่นตกตะกอน Mini Spin (Eppendorf, USA)
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ Pipetman Kit (Gilson, France)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Thermo cycler
- เครื่องแยกสารพันธุกรรม Wide Mini-Sub Cell GT Basic System (Biorad, USA)
- เครื่อง ChemiDoc Gel Imaging System (BioRad, USA)
- เครื่องผสมสาร Vortex mixer (Fisher Scientific, USA)
- หลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร
- หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มล. และ 2 มล.
- โปรแกรมวิเคราะห์ Geneious Prime

วิธีการ

1. ตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง

เก็บมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบด่างหรือใบเหลือง เสียรูปทรง จากแหล่งปลูกมันสำปะหลัง ในจังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ สุรินทร์ จันทบุรี บุรีรัมย์ สระแก้ว ปราจีนบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น ระยอง ชลบุรี และฉะเชิงเทรา ที่พบโรคใบด่างมันสำปะหลัง มาทำการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ในห้องปฏิบัติการ

2. การตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค PCR

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลัง

สกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังที่เก็บมาด้วย Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN, Taiwan) มีขั้นตอนดังนี้

1. บดใบมันสำปะหลังแต่ละตัวอย่างให้มีปริมาณ 100 มิลลิกรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วย้ายมาใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ FAPG1 ปริมาตร 400 มิลลิตร และเติม RNase A ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 65 °C นาน 10 นาที

2. เติมบัฟเฟอร์ FAPG1 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที ย้ายส่วนของพืชมาใส่ Filter Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที จากนั้นดูดทิ้งส่วนของเหลวใสใส่ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิตร

3. เติมบัฟเฟอร์ FAPG3 ปริมาตร 1.5 เท่าของทิ้งส่วนของเหลวใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันแล้วย้ายมาใส่ใน FAPG Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที ทิ้งส่วนใส

4. เติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลวใสแล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์ Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที



5. นำ FAPG Column มาวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บ DNA ที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

2.2 การตรวจหาเชื้อ SLCMV ในตัวอย่างมันสำปะหลังที่สงสัยด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อ SLCMV จากตัวอย่างที่ได้รับมาด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SLCMV (Dutt *et al.*, 2005) โดยใช้ส่วนผสมของ Green PCR Master Mix (Biotech rabbit, Germany) ทำปฏิกิริยาในหลอด PCR ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

| | |
|----------------------|--------------|
| 2x master mix buffer | 10 ไมโครลิตร |
| SLCMV-F (10 pmole) | 1 ไมโครลิตร |
| SLCMV-R (10 pmole) | 1 ไมโครลิตร |
| Nuclease-free water | 5 ไมโครลิตร |
| DNA template | 3 ไมโครลิตร |

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermo cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ โดยตัดแปลงวิธีการของ Makesh Kumar *et al.* (2005) ดังนี้

| | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| 1) Predenaturation | 94 °C | 5 นาที |
| 2) Three step-cycling | 35 cycles | |
| Denaturation | 94 °C | 20 วินาที |
| Annealing | 56 °C | 20 วินาที |
| Extension | 72 °C | 45 วินาที |
| 3) Final extension | 72 °C | 5 นาที |

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์แล้ว ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea) ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Gel Imaging System (Biorad, USA)

3. การเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อ SLCMV ด้วยเทคนิค Rolling circle amplification (RCA)

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากมันสำปะหลังในขั้นตอน 2.1 มาเพิ่มปริมาณจีโนมด้วยเทคนิค RCA โดยใช้ส่วนผสมของชุด TempliPhi Amplification Kit (GE Healthcare, England) ทำปฏิกิริยาในหลอดขนาด 1.5 มล. ปริมาตรรวม 10.7 ไมโครลิตร มีส่วนผสมและขั้นตอน ดังนี้

| | |
|---------------|---------------|
| Sample buffer | 5 ไมโครลิตร |
| DNA template | 0.5 ไมโครลิตร |

บ่มที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 3 นาที แล้วบ่มบนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที

| | |
|-----------------|-------------|
| Reaction buffer | 5 ไมโครลิตร |
|-----------------|-------------|



Enzyme mix 0.2 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 15 ชั่วโมง และยั้งปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 65 °C นาน 10 นาที

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมเชื้อ SLCMV ด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) และการวิเคราะห์ข้อมูล

นำดีเอ็นเอที่จากการทำ RCA มาตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความบริสุทธิ์ (A260/A280) ให้อยู่ระหว่าง 1.8 - 2.2 สำหรับความเข้มข้นต้อง ≥ 2 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับความเข้มข้นสำหรับการวิเคราะห์ต้อง ≥ 300 นาโนกรัม เมื่อเตรียมดีเอ็นเอตามข้อกำหนดแล้ว จึงส่งไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq 150 PE และวิเคราะห์ข้อมูลชีวสารสนเทศ โดย บริษัท วิซูโอไบโอเมดิคอล (ไทยแลนด์) จำกัด วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ SLCMV ด้วยเทคนิค Sanger sequencing (Sanger *et al.*, 1977) จำนวน 8 ไอโซเลท

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ Phylogenetic tree

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมเชื้อ SLCMV ทั้ง DNA-A และ DNA-B แล้วจะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ SLCMV ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์ข้อมูลและจัดเรียงข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสจากข้อมูลนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของเชื้อ SLCMV กับไอโซเลทต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

เวลาที่ทำการทดลอง ตุลาคม 2563 - กันยายน 2564

สถานที่ทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. แปลงปลูกมันสำปะหลังจังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์ สระแก้ว จันทบุรี ปราจีนบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น ระยอง ชลบุรี และฉะเชิงเทรา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV)

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบต่างและเสีรูปร่างจากแปลงปลูกมันสำปะหลังในจังหวัดศรีสะเกษ จันทบุรี บุรีรัมย์ และปราจีนบุรี โดยลักษณะอาการที่พบในแปลงสามารถจำแนกสาเหตุของการเกิดโรคได้ 2 สาเหตุ คือ 1) เกิดจากการใช้ท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคมานปลูก (ภาพที่ 1ก) และ 2) อาการที่เกิดจากมีแมลงหริวขาวยาสูบ (ภาพที่ 1ข) เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR พบว่าเป็นโรคใบต่างมันสำปะหลัง จึงได้กำหนดเป็นไอโซเลท Chanthaburi



2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และโครงสร้างจีโนม

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท Sakaeo, Prachinburi, Chanthaburi และ Burirum ซึ่งผลการวิเคราะห์ และ Accession number (Acc. No.) นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ SLCMV จำนวน 8 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค Sanger sequencing มาร่วมวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย (ตารางที่ 1)

โครงสร้างจีโนมของเชื้อ SLCMV ประกอบด้วยดีเอ็นเอวงปิดสายเดี่ยว จำนวน 2 โมเลกุล (ภาพที่ 2) เรียกว่า DNA-A แพลรหัสให้โปรตีนจำนวน 6 โปรตีน ซึ่งมีรหัสการแปลรหัสเป็นโปรตีนอยู่บนสายบวก (viral strand) จำนวน 2 โปรตีน ได้แก่ โปรตีน AV2 (Pre-coat protein) และ โปรตีน AV1 หรือโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (Coat protein: CP) และมีรหัสการแปลรหัสเป็นโปรตีนอยู่บนสายคู่สม (complementary strand) จำนวน 6 โปรตีน ได้แก่ โปรตีน AC1 (Replication-associated protein: Rep), AC2 (Transcriptional activator protein: TrAP), AC3 (Replication enhancer: REEn) และ โปรตีน AC4

สำหรับ DNA-B สามารถแปลรหัสให้โปรตีนจำนวน 2 โปรตีน ซึ่งมีรหัสการแปลรหัสเป็นโปรตีนอยู่บนสายบวกและบนสายคู่สม สายละ 1 โปรตีน ได้แก่ โปรตีน BV1 (Nuclear shuttle protein: NSP) และ BC1 (Movement protein: MP) ตามลำดับ

เชื้อ SLCMV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในสกุล *Begomovirus* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันจำนวน 9 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ TAATATTAC (nanomer) ในส่วนของ common region ทั้งใน DNA-A และ DNA-B ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณสำหรับเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อไวรัส (Gutierrez, 2000; Laufs *et al.*, 1995) ซึ่งพบลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวในเชื้อ SLCMV ทั้ง 12 ไอโซเลทที่ศึกษาในครั้งนี้ด้วย

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AC1 (Rep.) พบว่ามีจำนวนกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน 2 แบบ คือ แบบที่ 1) โปรตีน AC1 ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 1035 แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 345 เรซิดิวส์ ได้แก่ ไอโซเลท Srisaket, Chanthaburi, Chachoengsao, Surin, Nakhon Ratchasima และ Sa Kaeo ส่วนแบบที่ 2) โปรตีน AC1 ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์จำนวน 1056 นิวคลีโอไทด์ แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 352 เรซิดิวส์ ได้แก่ ไอโซเลท Prachinburi, Rayong, Khon Kaen, Ubon Ratchathani, Chonburi และ Burirum (ภาพที่ 3) โปรตีน AC1 (Rep.) มีหน้าที่เกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณของจีโนมไวรัสในพืช จากรายงานของ Wang *et al.* (2020) พบว่า กรดอะมิโนจำนวน 7 เรซิดิวส์ ทางด้าน carboxyl terminus มีผลต่อความรุนแรง (virulence) เชื้อไวรัสและปริมาณของเชื้อไวรัส (titer) ในพืช และนอกจากนี้ยังมีผลต่อการชักนำ เกี่ยวกับกรดซาลิไซลิกในการป้องกันจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสอีกด้วย



3. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) และความสัมพันธ์ของเชื้อ SLCMV ด้วย phylogenetic tree

จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมของเชื้อ SLCMV ไอโซเลท Srisaket Buriram Chanthaburi และ Prachinburi ร่วมกับ ไอโซเลท ๆ ของประเทศไทย จำนวน 8 ไอโซเลท พบว่า DNA-A มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.1% - 99.9% และ DNA-B ที่ระดับ 98.2% - 99.9 % (ตารางที่ 2)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ SLCMV ด้วย phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง DNA-A (ภาพที่ 4) และ DNA-B (ภาพที่ 5) กับเชื้อ SLCMV ICMV และ ACMV ที่มีรายงานในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ พบว่าเชื้อ SLCMV ของไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ SLCMV ที่ก่อให้เกิดโรคใบด่างมันสำปะหลังที่พบรายงานในประเทศอินเดีย ศรีลังกา กัมพูชา เวียดนาม ลาว และจีน

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบด่างหรือใบเหลือง เสียรูปทรง จากแหล่งปลูกมันสำปะหลัง ในจังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์ สระแก้ว ปราจีนบุรี นครราชสีมา และจังหวัดอื่น ๆ ที่พบโรคใบด่างมันสำปะหลัง มาทำการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA-A และ DNA-B ด้วยเทคนิค NGS จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท Srisaket Prachinburi Chanthaburi และ Buriram และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค Sanger sequencing จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท Chachoengsao, Surin, Nakhon Ratchasima, Rayong, Khon Kaen, Ubon Ratchathani, Chonburi และ Sa Kaeo จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ SLCMV ทั้ง 12 ไอโซเลทกับไอโซเลทต่าง ๆ ของเชื้อ SLCMV และ ICMV ที่มีรายงานใน GenBank ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง DNA-A และ DNA-B พบว่าไอโซเลท Chanthaburi จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ SLCMV ที่ก่อให้เกิดโรคใบด่างมันสำปะหลังที่พบรายงานในประเทศอินเดีย ศรีลังกา กัมพูชา เวียดนาม ลาว และจีน

เอกสารอ้างอิง

- Brown, J.K., Zerbin, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C., Fiallo-Olivé, E., Bridon, R.W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V.G., Martin, D.P. 2015. Rivera-sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160: 1593-1619.
- Chittarath, K., Jimenez, J., Vongphachanh, P., Leiva, A.M., Sengsay, S., Lopez-Alvarez, D., Bounvilayvong, T., Lourido, D., Vorlachith, V., Cuellar, W.J. 2021. First report of *Sri Lankan cassava mosaic virus* and Cassava Mosaic Disease in Laos. *Plant Dis.* 105 (6): 1861.



- Dutt, N., Briddon, R.W., Dasgupta, I. 2005. Identification of a second begomovirus, *Sri Lankan cassava mosaic virus*, causing cassava mosaic disease in India. *Arch. Virol.* 150: 2101-2108.
- Gutierrez, C. 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* 19: 792-799.
- Jose, A., Makesh Kumar T. and Edison S. 2008. Host range of *Sri Lankan cassava mosaic virus*. *J. Root Crops* 334: 21-25.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.
- Kumar, T., Sankar, A., R Nair, R., Edison, S. 2005. Detection of Cassava mosaic virus in India: Using polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization technique. *J. Root Crops* 31, 1-6.
- Laufs, J., Jupin, I., David, C., Schumacher, S., Heyraud-Nitschke, F., Gronenborn, B. 1995. Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie* 77, 765-773.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74, 5463-5467.
- Uke, A., Hoat, T.X., Quan, M.V., Liem, N.V., Ugaki, M., Natsuaki, K.T. 2018. First Report of *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* Infecting Cassava in Vietnam. *Plant Dis.* 102: 2669.
- Wang, D., Yao, X.M., Huang, G.X., Shi, T., Wang, G.F., Ye, J. 2019. First Report of *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* Infected Cassava in China. *Plant Dis.* 103: 1437.
- Wang, D., Zhang, X., Yao, X., Zhang, P., Fang, R., Ye, J. 2020. A 7-Amino-Acid Motif of Rep Protein Essential for Virulence Is Critical for Triggering Host Defense Against *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 33: 78-86.
- Wang, H.L., Cui, X.Y., Wang, X.W., Liu, S.S., Zhang, Z.H., Zhou, X.P. 2016. First Report of *Sri Lankan cassava mosaic virus* Infecting Cassava in Cambodia. *Plant Dis.* 100: 1029.



ตารางที่ 1 ไอโซเลต Accession number และขนาดของจีโนมเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) จำนวน 12 ไอโซเลต

| จังหวัด | ไอโซเลต | Acc. No. | จีโนม | นิวคลีโอไทด์ | | | | รวม |
|-------------|-------------------|----------|-------|--------------|-----|-----|-----|------|
| | | | | A | T | C | G | |
| ศรีสะเกษ | Srisaket | MN026160 | DNA-A | 696 | 797 | 608 | 657 | 2758 |
| | | MN026162 | DNA-B | 713 | 855 | 541 | 628 | 2737 |
| จันทบุรี | Chanthaburi | MW854732 | DNA-A | 698 | 797 | 609 | 654 | 2758 |
| | | MZ054161 | DNA-B | 715 | 854 | 539 | 629 | 2737 |
| ปราจีนบุรี | Prachinburi | MN026159 | DNA-A | 693 | 799 | 612 | 656 | 2760 |
| | | MN026161 | DNA-B | 711 | 853 | 538 | 635 | 2737 |
| บุรีรัมย์ | Buriram | OM715154 | DNA-A | 696 | 800 | 605 | 657 | 2758 |
| | | OM715157 | DNA-B | 713 | 857 | 538 | 629 | 2737 |
| สุรินทร์ | Surin | MT671419 | DNA-A | 695 | 799 | 606 | 658 | 2758 |
| | | MT671420 | DNA-B | 713 | 857 | 538 | 629 | 2737 |
| อุบลราชธานี | Ubon Ratchathani | MT671417 | DNA-A | 695 | 797 | 609 | 657 | 2758 |
| | | MT671418 | DNA-B | 713 | 857 | 538 | 629 | 2737 |
| สระแก้ว | Sa Kaeo | MT671421 | DNA-A | 695 | 798 | 608 | 658 | 2759 |
| | | MT671422 | DNA-B | 713 | 853 | 537 | 634 | 2737 |
| ฉะเชิงเทรา | Chachoengsao | MT671409 | DNA-A | 693 | 801 | 611 | 654 | 2759 |
| | | MT671410 | DNA-B | 714 | 852 | 539 | 632 | 2737 |
| นครราชสีมา | Nakhon Ratchasima | MT671423 | DNA-A | 695 | 798 | 607 | 658 | 2758 |
| | | MT671424 | DNA-B | 713 | 855 | 539 | 630 | 2737 |
| ระยอง | Rayong | MT671411 | DNA-A | 693 | 799 | 610 | 657 | 2759 |
| | | MT671412 | DNA-B | 712 | 850 | 538 | 637 | 2737 |
| ชลบุรี | Chonburi | MT671415 | DNA-A | 693 | 798 | 610 | 657 | 2758 |
| | | MT671416 | DNA-B | 713 | 850 | 538 | 636 | 2737 |
| ขอนแก่น | Khon Kaen | MT671413 | DNA-A | 694 | 797 | 612 | 655 | 2758 |
| | | MT671414 | DNA-B | 712 | 854 | 538 | 633 | 2737 |



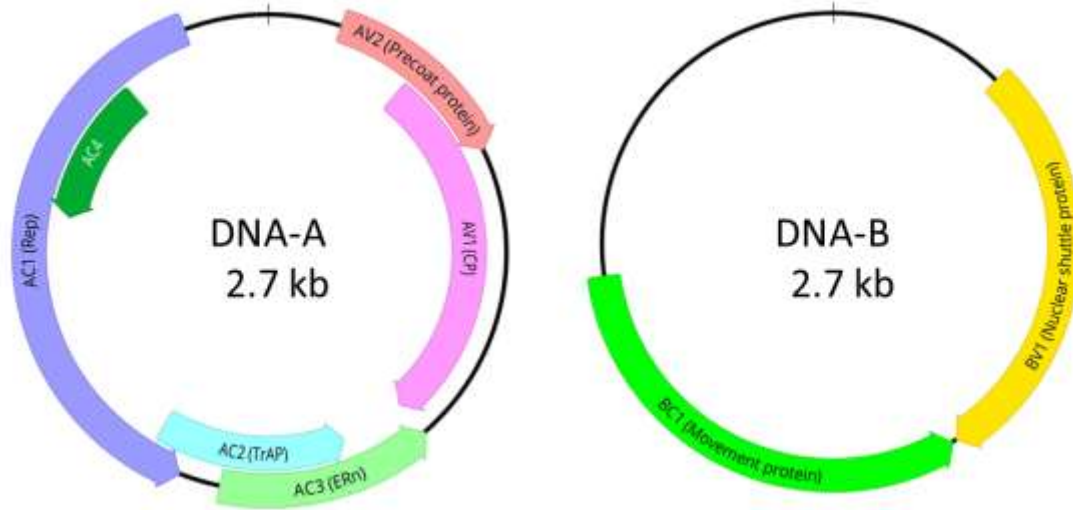
ตารางที่ 2 เปรอ์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA-A และ DNA-B ของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ไอโซเลท Prachinburi, Srisaket, Chanthaburi และ Buriram เทียบกับเชื้อ SLCMV ไอโซเลทอื่น ๆ จำนวน 8 ไอโซเลท

| ไอโซเลท | DNA-A | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Buriram | | 99.9 | 99.8 | 99.8 | 99.8 | 99.7 | 99.3 | 99.3 | 99.3 | 99.2 | 99.2 | 99.2 |
| Prachinburi | 99.9 | | 99.8 | 99.9 | 99.9 | 99.8 | 99.4 | 99.3 | 99.3 | 99.3 | 99.3 | 99.3 |
| Khon Kaen | 99.9 | 100 | | 99.7 | 99.8 | 99.7 | 99.3 | 99.2 | 99.2 | 99.2 | 99.2 | 99.2 |
| Chachoengsao | 99.7 | 99.7 | 99.7 | | 99.8 | 99.7 | 99.3 | 99.2 | 99.3 | 99.3 | 99.2 | 99.2 |
| Chonburi | 99.6 | 99.7 | 99.7 | 99.9 | | 99.9 | 99.3 | 99.2 | 99.3 | 99.2 | 99.2 | 99.2 |
| Rayong | 99.6 | 99.6 | 99.6 | 99.7 | 99.7 | | 99.2 | 99.2 | 99.2 | 99.1 | 99.1 | 99.1 |
| Ubon Ratchathani | 98.5 | 98.4 | 98.4 | 98.6 | 98.6 | 98.4 | | 99.9 | 99.9 | 99.9 | 99.9 | 99.9 |
| Nakhon Ratchasima | 98.5 | 98.4 | 98.4 | 98.5 | 98.4 | 98.4 | 99.7 | | 99.8 | 99.8 | 100 | 99.8 |
| Sa Kaeo | 98.4 | 98.4 | 98.4 | 98.5 | 98.4 | 98.4 | 99.7 | 99.9 | | 99.8 | 99.8 | 99.8 |
| Srisaket | 98.4 | 98.3 | 98.3 | 98.4 | 98.3 | 98.3 | 99.6 | 99.8 | 99.9 | | 99.8 | 99.8 |
| Surin | 98.4 | 98.3 | 98.3 | 98.4 | 98.3 | 98.3 | 99.6 | 99.8 | 99.9 | 99.9 | | 99.8 |
| Chanthaburi | 98.2 | 98.1 | 98.1 | 98.2 | 98.2 | 98.1 | 99.5 | 99.7 | 99.7 | 99.6 | 99.6 | |

DNA-B



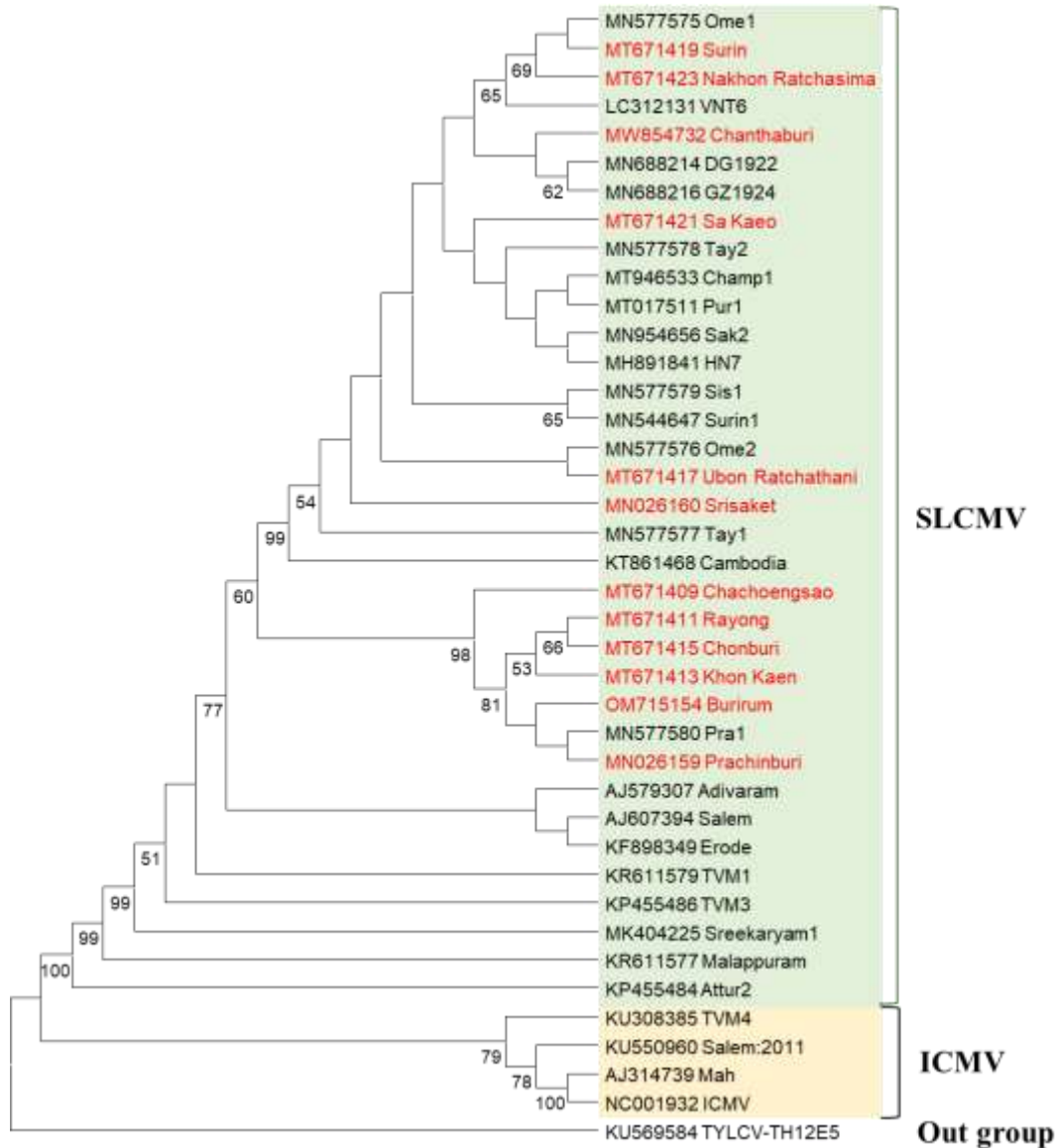
ภาพที่ 1 มันสำปะหลังที่แสดงอาการใบด่างสีเขียวอ่อนหรือเหลืองสลับเขียวเข้ม ใบหงิกงอ และเสียรูปทรงทั่วทั้งต้นที่เกิดจากท่อนพันธุ์หรือเหง้า (ก) และถ่ายทอดโรคด้วยแมลงห้ำขาวยาสูบ บริเวณใบยอดและใบล่างที่ถัดลงมาจากยอดของต้น (ข)



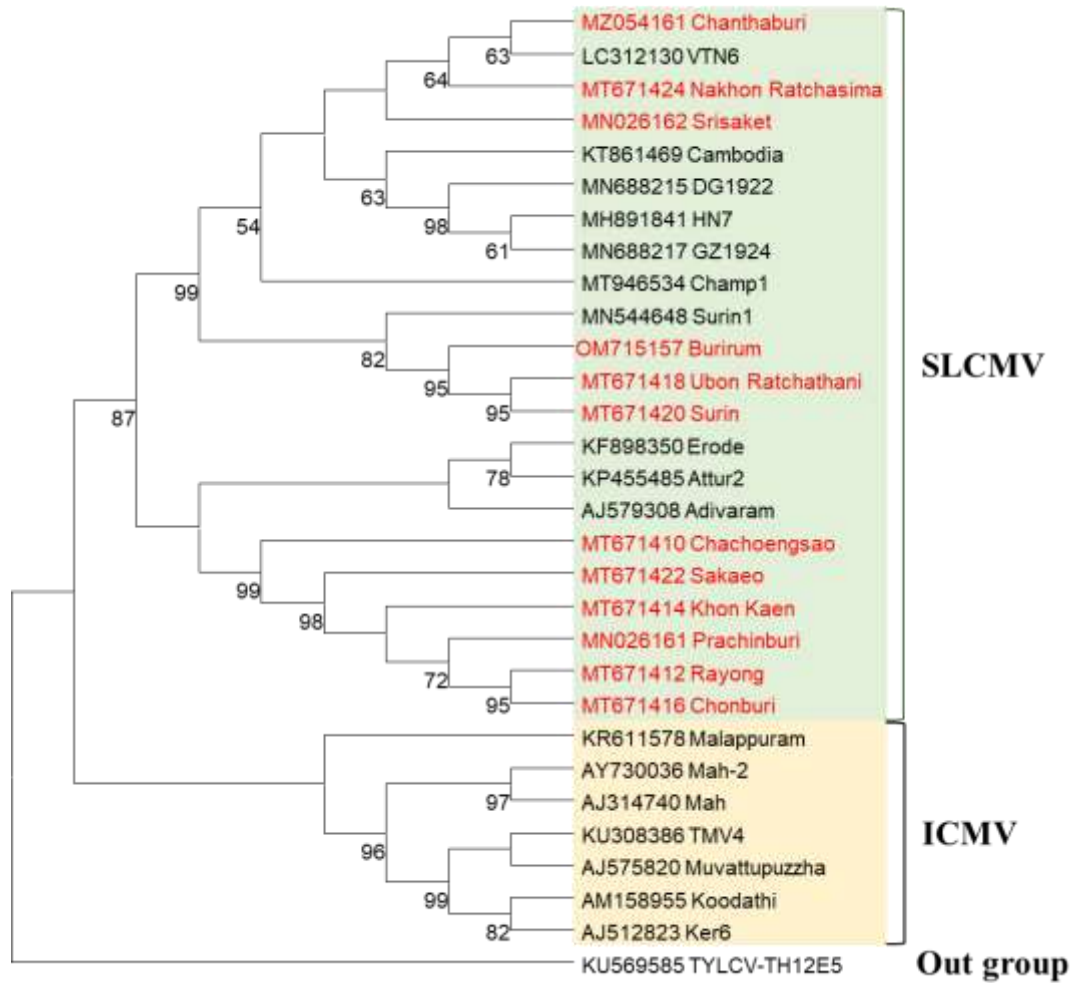
ภาพที่ 2 โครงสร้างจีโนมของเชื้อไวรัส SLCMV ประกอบด้วย DNA-A และ DNA-B ที่เป็นสาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลัง

| | |
|-------------------|---|
| Srisaket | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN* |
| Chanthaburi | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN* |
| Ubon Ratchathani | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN* |
| Sa Kaeo | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN* |
| Surin | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN* |
| Nakhon Ratchasima | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN* |
| Buriram | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*GPTQGS* |
| Prachinburi | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*GPTQGS* |
| Chachoengsao | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*GPTQGS* |
| Khon Kaen | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*GPTQGS* |
| Rayong | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*GPTQGR* |
| Chonburi | LCNPGPNS SYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*GPTQGR* |

ภาพที่ 3 แสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AC1 (Rep.) พบว่ามีจำนวนกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง DNA-A ของเชื้อ SLCMV จำนวน 12 ไอโซเลต (ตัวอักษรสีแดง) ของไทยกับไอโซเลตอื่น ๆ ของเชื้อ SLCMV และ *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) ที่มีรายงานในต่างประเทศ วิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Neighbor-joining ด้วยโปรแกรม MEGA X ใช้ค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% และใช้ข้อมูลของเชื้อ *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCV-TH12E5) เป็น outgroup



ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง DNA-B ของเชื้อ SLCMV จำนวน 12 ไอโซเลต (ตัวอักษรสีแดง) ของไทยกับไอโซเลตอื่น ๆ ของเชื้อ SLCMV และ *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) ที่มีรายงานในต่างประเทศ วิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Neighbor-joining ด้วย โปรแกรม MEGA X ใช้ค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% และใช้ ข้อมูลของเชื้อ *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCV-TH12E5) เป็น outgroup

การผลิตโปรตีนและแอนติบอดีที่จำเพาะ ต่อ immunodominant membrane protein (Imp) ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย

Imp protein and antibody production against phytoplasma causing Sugarcane White Leaf Diseases in bacterial cell system

กาญจนา วาระวิชนี แสนชัย คำห้ำ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Fusion proteins of imp gene (immunodominant membrane protein) from the phytoplasma causal agent of sugarcane whiteleaf disease was produced via bacterial cell system. Imp recombinant gene frameshift translates into 204 amino acid residues and weigh 24 kDa. An average of hydropathicity is -0.287 that indicate the property of soluble. The concentration of recombinant protein is relatively low concentration (0.140 mg/ml). IMP recombinant proteins were used as antigen to immunize polyclonal antibody against sugarcane white leaf disease. The efficacy of the polyclonal antibody SWL-IMP (pAbs SWL-IMP) was found to achieve the highest serum dilution of 1,000 times and showing positive results when examining samples of sugarcane white leaves disease.

Keywords : Sugarcane, Phytoplasma, Polyclonal antibody

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-12-62



บทคัดย่อ

สังเคราะห์โปรตีนลูกผสม(fusion protein) ในระบบเซลล์แบคทีเรียจากส่วนของยีน *imp* (immunodominant membrane protein) ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย แพลนท์ลำดับกรดอะมิโนได้ตรงกรอบการอ่านรหัสจำนวน 204 เรซิดิวส์ โปรตีนลูกผสมมีขนาดประมาณ 24 กิโลดาลตัน โปรตีนลูกผสมสามารถละลายน้ำได้ค่อนข้างดีมีค่า average of hydrophobicity เท่ากับ -0.287 แต่มีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำเพียง 0.140 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับใช้ผลิตแอนติบอดีที่ความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ประสิทธิภาพของโพลีโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMP (pAbs SWL-IMP) ที่ผลิตขึ้นครั้งนี้พบว่าได้ค่าความไวของแอนติบอดีสูงที่สุดที่ 1,000 เท่า และแสดงผลบวกเมื่อตรวจตัวอย่างใบอ้อยที่แสดงอาการใบขาวอย่างชัดเจน

คำหลัก : อ้อย ไฟโตพลาสมา โพลีโคลนอลแอนติบอดี

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค และตัวอย่างพืชปกติ
2. อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งละเอียด (precision balance) 2 และ 4 ตำแหน่ง ตู้แช่แข็ง -20, -40 องศาเซลเซียส (freezer) ตู้ดูดควัน / ตู้ดูดไอสารเคมี (Fume Hood) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000TM Thermal Cycler, BIO-RAD) เครื่อง Gel electrophoresis และ เครื่องวิเคราะห์เจลและบันทึกภาพ (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)
3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่ โกร่งบดตัวอย่าง (mortars and pestles) หลอดไมโครทิวบ์ (Microtube) ขนาด 0.5, 1.5 และ 2 มิลลิลิตร ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tip) ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ชุดสกัดเจลและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPreP GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN) ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป FavorPreP Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN) SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNAPolymerase(Invitrogen) ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp, 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) โปรตีนมาตรฐาน BLUltra Prestained Protein Ladder (BIO-HELIIX, Cat#1BHC-PM001-0500) Agarose gel (SeaKem®) Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Gels, 1.0 mm, 10 well (Invitrogen) สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin, laboratory grade) ชุดไพรเมอร์ (Primer set) พลาสมิดพาหะ pBAD/His A, B, and C vector (Invitrogen) competent cell (E. coli สายพันธุ์ Top 10) (Invitrogen) และ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen)



วิธีการ

1. การเพิ่มบริเวณจดจำของ restriction enzyme site กับไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์โดยเพิ่มบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบ double digest restriction enzyme (adapter) ที่บริเวณ 5' และบริเวณ 3' ของคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *imp* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาและเพิ่มตำแหน่ง stop codon (TAA) บริเวณ 3' เพื่อใช้ประกอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ *imp* gene-adapter ด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000TM Thermal Cycler, BIO-RAD)

2. การสังเคราะห์ *imp* gene-adapter เชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการสังเคราะห์ *imp* gene-adapter เชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยเทคนิค PCR ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH₂O) จำนวน 21 ไมโครลิตร DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific™) จำนวน 25 ไมโครลิตร (0.1 unit/μl) ไพรเมอร์ forward-*XhoI* และ reverse-*EcoRI* อย่างละ 1 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบจำนวน 2 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาที่เตรียมเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000TM Thermal Cycler, BIO-RAD) ตั้งโปรแกรม ดังนี้ ขั้นที่ 1: Pre-denature 94°C นาน 5 นาที ขั้นที่ 2: denature 94°C นาน 30 วินาที ขั้นที่ 3: annealing 55°C นาน 30 วินาที ขั้นที่ 4: Extension 72°C นาน 1 นาที (วนซ้ำขั้นที่ 2 – 4 จำนวน 30 รอบ) ขั้นที่ 5: Post-extension 72°C นาน 10 นาที และขั้นที่ 6: Hold ที่ 15°C และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder แสดงผลและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

3. การตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและโคลนยีนเข้า Expression vector

นำชิ้นยีน *imp* gene-adapter และพลาสมิดพาหะ pBad/HisA Expression vector (fig 1) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI* แบบ Double digestion (FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) ปฏิกิริยารวม 20 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Double digestion ดังนี้

1. ดีเอ็นเอเป้าหมาย (1 μg/μl) / pBAD/His A expression vector (1 μg/μl) จำนวน 5 ไมโครลิตร

2. 10X FastDigest™ Green Buffer จำนวน 5 ไมโครลิตร

3. FastDigest enzyme (*XhoI*) จำนวน 1 ไมโครลิตร

4. FastDigest enzyme (*EcoRI*) จำนวน 1 ไมโครลิตร

5. น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH₂O) จำนวน 8 ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบปฏิกิริยาให้เข้ากันดี แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) นาน 5 นาที และตรวจสอบผลของปฏิกิริยา Double digestion ด้วยเทคนิค gel



electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder แสดงผลและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

4. การโคลนยีน digested *imp* gene-adapter กับ digested pBad/HisA Expression vector

สกัดชิ้นยีน digested *imp* gene-adapter ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดเจลและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPreP GEL/PCR Purification Mini Kit (ตามคู่มือแนะนำ, FAVORGEN) นำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ digested pBad/HisA Expression vector ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase (Promega) ปฏิกริยารวม 10 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบของปฏิกริยา

| | |
|--|-------------------|
| 1. น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH ₂ O) | จำนวน 5 ไมโครลิตร |
| 2. 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase | จำนวน 2 ไมโครลิตร |
| 3. digested <i>imp</i> gene-adapter (8.3 ng) | จำนวน 1 ไมโครลิตร |
| 4. digested pBad/HisA Expression vector (50 ng) | จำนวน 1 ไมโครลิตร |
| 5. T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μl) | จำนวน 1 ไมโครลิตร |

ผสมส่วนประกอบปฏิกริยาให้เข้ากันดี แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และถ่าย พลาสมิดสายผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell) แบบที่เรียก *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) และตรวจสอบโคลนแบบที่เรียกที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR โดยคูไพรเมอร์ pBAD-F/pBAD-R (table 1) และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder แสดงผลและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD) หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่ตรวจแล้วว่าได้รับ พลาสมิดสายผสมดังกล่าวมาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany) และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย เพื่อนำข้อมูลที่ไปทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีนต่อไป

5. การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีน

วิเคราะห์และตรวจสอบคุณสมบัติการละลายน้ำของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) และตรวจสอบสภาพทางกายภาพต่างๆ ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)

6. กระตุ้นการแสดงออกโปรตีนลูกผสมและวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE

การเตรียม starter gene โดยนำโคลนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 จำนวน 1 โคลนี ที่ตรวจสอบแล้วว่าพลาสมิดสายผสมของชิ้นยีน *imp* gene-adapter/6xHisTag ใน pBAD/His A expression vector (Imp recombinant protein) เติบโตในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 10



ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำสารละลาย starter gene ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 20% L-Arabinose ความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 5 ระดับ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนลูกผสม และหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม หลังจากนั้นวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ด้วย TGX Stain-Free FastCast Acrylamine Kit, 12 % (BIO-RAD, Cat#1610185) ด้วยเครื่อง Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD, Cat#1658005) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 120 เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นย้อมแถบโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยสารละลาย Destaining เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดโปรตีนลูกผสมกับแถบโปรตีนมาตรฐาน BLUltra Prestained Protein Ladder (BIO-HELIIX, Cat#1BHC-PM001-0500) ตรวจสอบแถบโปรตีนและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

7. การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสม *imp* gene-adapter /6xHisTag (Imp recombinant protein) เพื่อนำมาใช้เป็น starter gene ตามวิธีการข้อ 6 จากนั้นนำสารละลาย starter gene ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 500 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนด้วยสารละลาย 20% L-Arabinose ตามความเข้มข้นที่เลือกให้เหมาะสม เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่เลือกให้เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนมากที่สุด ทำการตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บตะกอนมาละลายด้วย lysis buffer A นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultra schall BANDELIN SONOPULS HD และแยกสกัดโปรตีน IMP recombinant protein ให้บริสุทธิ์ด้วย ProBond™ Nickel-Chelating Purification System ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ (Novex, Catalog Numbers R801-01) ทำการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

8. การผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลองโดยเตรียมแอนติเจนโปรตีนลูกผสมของ IMP recombinant protein ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 ให้ผสมเข้ากันเป็น emulsion ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (immunized intramuscular) ของกระต่าย (New Zealand White rabbit) ในครั้งแรก สำหรับการฉีดครั้งต่อไป ผสมแอนติเจนกับ Incomplete Freund's adjuvant (IFA) ในอัตราส่วนและปริมาตรเท่าเดิม ใช้ฉีด



สัตว์ทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ รวมอีก 2 ครั้ง หลังจากฉีดสัตว์ทดลองครั้งที่ 2 ทำการเก็บเลือดโดยเจาะเส้นเลือดบริเวณใบหู

9. ตรวจวัดค่าไตเตอร์ที่เหมาะสมของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิต

นำโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ IMP recombinant protein ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ตรวจวัดค่าไตเตอร์ที่เหมาะสม ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยดัดแปลงจากวิธีของ Clark และ Adam (1977) ทำการเจือจางด้วยสารละลาย coating buffer แบบ two-fold dilutions หลังจากนั้นนำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (O.D. 405 nm) ด้วยเครื่อง ELISA reader (Thermo Scientific Multiskan GO with cuvette port)

10. ทดสอบประสิทธิภาพโพลีโคลนอลแอนติบอดี

บดตัวอย่างพืชเป็นโรคใน carbonate coating buffer, pH 9.6 หยดลงในหลุมของโครเพลท (96-microwell plate) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (1X PBST) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เจือจางโพลีโคลนอลแอนติบอดี Imp ที่ผลิตได้ใน conjugate buffer 1: 500 และ 1 : 1,000 หยดลงในหลุมของไมโครเพลท 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเคาะ plate ให้แห้ง เพื่อเติม Goat anti-rabbit IgG with alkaline phosphatase (AP3074, formerly Roche 1814206) ที่เจือจางใน PBS 1 : 3,000 หยดลงในหลุมของไมโครเพลท 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเคาะ plate ให้แห้ง จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เตรียม 1x PNP substrate solution เติมนลงในไมโครเพลท ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (O.D. 405 nm) ด้วยเครื่อง ELISA reader (Thermo Scientific Multiskan GO with cuvette port)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2562-กันยายน 2564
สถานที่ ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดลอง กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืชของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการเพิ่มบริเวณจดจำของ restriction enzyme site กับไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่บริเวณ 5' และบริเวณ 3' ได้แก่ *XhoI* (5'-C/TCGAG -3' 3'-GAGCT/C-5') และ *EcoRI* (5'-G/AATTC-3' 3'-CTTAA/G-5') ตามลำดับ และเพิ่มตำแหน่ง ATG (start codon) บริเวณ 5' และ TAA (stop



codon) บริเวณ 3' ของคู่ไพรเมอร์ และนำคู่ไพรเมอร์ IMP3-F (*XhoI*) และ IMP3-R (*EcoRI*) มาสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอ *imp* gene PstI/EcoRI (*imp* gene adapter) ที่ขนาดประมาณ 500 bp (Table 2) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

2. ผลการสังเคราะห์ *imp* gene-adapter เชื่อมไฟโตพลาสมา ด้วยเทคนิค PCR

นำสารละลายดีเอ็นเอ *imp* gene มาสังเคราะห์เชื่อมไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ไพรเมอร์ IMP3-F (*XhoI*) และ IMP3-R (*EcoRI*) เมื่อตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า แลบดีเอ็นเอ *imp* gene *XhoI/EcoRI* (*imp* gene adapter) ขนาดที่ประมาณ 500 bp (fig 2) ซึ่งขนาดของแลบดีเอ็นเอที่ได้เทียบเท่าหรือใกล้เคียงกับขนาดของ *imp* gene เนื่องจากลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* (C/TCGAG) และ *EcoRI* (G/AATTC) บริเวณปลาย 5' ของคู่ไพรเมอร์มีจำนวนเพียง 6 เบสเท่านั้น จึงไม่ส่งผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงขนาดแลบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

3. ผลการโคลนยีนเข้า Expression vector

ตัดชิ้นยีน *imp* gene-adapter และพลาสมิดพาหะ pBad/HisA Expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI* แบบ Double digestion ทำการเชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase โคลนยีนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 คัดเลือกด้วยเทคนิค colony PCR โดยคู่ไพรเมอร์ pBAD-F/pBAD-R พบว่า โคลนแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมของยีน *imp* gene/6xHisTag จะแสดงแลบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ ~ 800 เบส เมื่อเทียบกับโคลนแบคทีเรียปกติที่ได้รับเฉพาะพลาสมิด Expression vector จะแสดงแลบดีเอ็นเอที่ขนาด 303 เบส (fig 3) เมื่อทำการตรวจตำแหน่ง frame shift ของการแปลรหัสลำดับอะมิโนพบการจัดเรียงกรดอะมิโนได้ถูกต้อง จำนวน 204 เรซิดิวส์ (fig 4) และพบตำแหน่งอะมิโนของ HHHHHH-Polyhistidine Region (6xHisTag) เพื่อประโยชน์สำหรับการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.)

4. การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีน

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) พบว่าโปรตีนของ IMP recombinant protein จำนวน 204 เรซิดิวส์ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ค่อนข้างดี โดยพิจารณาจากจำนวน amino acid position เป็นกลุ่มที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) (แสดงค่าต่ำกว่า 0 หรือค่าเป็น -) มีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) (แสดงมากกว่า 0 หรือค่าเป็น +) และเมื่อพิจารณาสายเปปไทด์ทั้งเส้นแล้วสามารถประเมินได้ว่า Imp recombinant protein ยังคงละลายน้ำได้ค่อนข้างดี เมื่อตรวจสอบสภาพทางกายภาพต่าง ๆ ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) แสดงค่า Grand average of hydropathicity เป็นค่า -0.698 (fig 5)

5. ผลการแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

ผลการแยกสกัดโปรตีนลูกผสม (fusion protein) ให้บริสุทธิ์ด้วยการผสมกับ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) ทำการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน (โปรตีน Imp-Protein ขนาดประมาณ 18 กิโลดาลตัน และโปรตีน pBAD/HisA-6xHisTag ขนาดประมาณ 5 กิโลดาลตัน) วัดความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสมด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Multiskan™ Go, Thermo Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำเพียง 0.140 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีการปนเปื้อนของโปรตีนอื่น ๆ ค่อนข้างมาก โดยทั่วไปความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการฉีดกระต่ายเพื่อแอนติบอดีอยู่ระหว่าง 0.3 – 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (300 – 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สำหรับใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

6. ผลตรวจวัดค่าไตเตอร์โพลีโคลนอลแอนติบอดี

ผลการตรวจวัดค่าไตเตอร์ที่เหมาะสมของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิต ด้วยเทคนิค Indirect ELISA หลังฉีด IMP recombinant protein (Imp-adapter gene/6xHisTag) ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเข้ากล้ามเนื้อให้กระต่ายทดลองพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White) จำนวน 3 ครั้ง เก็บเลือดและแอนติซีรัม รวมจำนวน 1 ครั้งได้ปริมาณน้ำเลือด รวม 10 มิลลิลิตร สามารถให้แอนติซีรัมปริมาตรรวม 2 มิลลิลิตร นำไปทดสอบค่าไตเตอร์ แบบ two-fold dilutions ด้วยเทคนิค indirect ELISA อัตราตั้งแต่ 1:128 - 1:16,384 เท่า เมื่ออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร พบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMP ที่ผลิตให้ค่าความเจือจางสูงสุดที่สามารถแสดงผลของปฏิกิริยาได้ชัดที่ระดับประมาณ 500-1000 เท่า

7. ผลทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ตรวจสอบความจำเพาะโพลีโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMP ต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ด้วยเทคนิค Indirect ELISA โดยเลือกค่าความเจือจางแอนติซีรัมที่ 1:500 เท่า ทำการทดสอบกับน้ำคั้นจากใบอ้อยที่แสดงอาการใบขาวชัดเจนเมื่ออ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1.3

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การสังเคราะห์ *imp* gene *XhoI/EcoRI* (*imp* gene adapter) เชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ด้วยเทคนิค PCR คู่ไพรเมอร์ IMP3-F (*XhoI*) และ IMP3-R (*EcoRI*) แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดที่ประมาณ 500 bp และนำผลผลิต PCR ของ *imp* gene adapter เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว และพลาสมิด pBAD/His A expression มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* และ *EcoRI* (FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) แบบ Double digestion ทำการโคลนเข้ากับพ



ลาสมิติพาหะ digested pBAD/HisA expression vector และตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอลูกผสม *imp*-adapter gene/6xHisTag ด้วยเทคนิค colony PCR ด้วยคูไพรเมอร์ pBAD-F/pBAD-R แสดงพลาสมิติสายผสมแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 800 เบส เมื่อตรวจความถูกต้องของ ตำแหน่งกรอบการอ่านรหัส (frame shift) การแปลรหัสลำดับอะมิโนพบการเรียงตัวของกรดอะมิโนได้อย่างถูกต้อง พบตำแหน่งอะมิโนของ HHHHHH-Polyhistidine Region (6xHisTag) ทำการตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ Imp recombinant protein (fusion protein) เกี่ยวกับคุณสมบัติในการละลายน้ำของโปรตีนโดยใช้โปรแกรม ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) และ ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) พบว่า amino acid position ของ จำนวน 204 เรซิดิวส์ สามารถละลายน้ำได้ค่อนข้างดี โดยพิจารณาจากจำนวน amino acid position พวกเป็นพวกที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) (แสดงค่าต่ำกว่า 0 หรือค่าเป็น -) มีปริมาณมากกว่าพวกที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) (แสดงมากกว่า 0 หรือค่าเป็น +) และแสดงค่า average of hydropathicity เป็นค่าติด - เท่ากับ -0.698 ตามลำดับ ทำการสกัด fusion protein ตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค SDS-PAGE แสดงขนาดประมาณ 24 กิโลดาลตัน เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของแถบโปรตีนมาตรฐาน NOVEX SHARP PH PROTEIN STANDARD, (Invitrogen, USA) เมื่อนำมาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องนาโนดรอป (NanoDrop 8000 Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ได้ความเข้มข้นค่อนข้างต่ำเพียง 0.140 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เนื่องจากมีโปรตีนอื่น ๆ ปนเปื้อน สำหรับใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง ทำการทดสอบค่าไตเตอร์แบบ two-fold dilutions ของโพลีโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMP (pAbs SWL-IMP) ที่ผลิตด้วยเทคนิค indirect ELISA อัตราตั้งแต่ 1:128 - 1:16,384 เท่า เมื่ออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร พบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMP ที่ผลิตให้ค่าความเจือจางสูงสุดที่สามารถแสดงผลของปฏิกิริยาได้ชัดที่ระดับประมาณ 500-1000 เท่า เมื่อตรวจสอบความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ด้วยเทคนิค Indirect ELISA โดยเลือกค่าความเจือจางแอนติซีรัมที่ 1:500 เท่า ทำการทดสอบกับน้ำคั้นจากใบอ้อยที่แสดงอาการใบขาวชัดเจนเมื่ออ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1.3 และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นใบอ้อยปกติ ทั้งนี้ อาจมีข้อจำกัดหากนำไปตรวจสอบกับน้ำคั้นใบอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวใบขาวไม่ชัดเจนหรือเรียกว่าอาการแฝงของโรคได้

และอาจมีข้อจำกัดหากนำไปตรวจสอบกับน้ำคั้นใบอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวไม่ชัดเจนหรือเรียกว่าอาการแฝงของโรคได้ เนื่องจาก pAbs SWL-IMP ที่ทำการผลิตขึ้นในครั้งนี้อาจไม่ได้ทำการทดสอบ



เอกสารอ้างอิง

- Barbara, D. J., Mortor, A., Clark, M. F., and Davies, D. L. 2002. Immunodominant membrane proteins from two phytoplasma in the aster yellows clade (chlorante aster yellow and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology*. 148 : 157-167.
- Blomquist, C. L., Barbara, D. J., Davies, D. L., Clark, M. F., and Kirkpatrick, B. C. 2001. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology*. 147 : 571-580.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Ishii, Y., Hosh, A., Maejima. K., Jung H.-Y., Yamaji, Y., and Namba, S. 2009. Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiol Lett*. 293 : 92-101.
- Konnerth, A., Krczal, G., and Boonrod, K. 2016. Immunodominant membrane proteins of phytoplasmas. *Microbiology*. 162 : 1267–1273.
- Morton, A., Davies, D.L., Blomquist, C.L., and Barbara D.J. 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Microbiology*. 4(2) : 109–114.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Habor Laboratory Press, New York. 545 p.
- Siampour, M., Izadpanah, K., Galetto, L., Salehi, M. and Marzachi, C. 2012. Molecular characterization, phylogenetic, comparison and serological relationship of the Imp protein of several ‘Candidatus Phytoplasma aurantifolia’ strain. *Plant Pathology*. 1-8.
- Seemuller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A. and Goschl, M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol*. 80 : 224-225.
- Shahriyari, F., Safarnejad, M.R., Shamsbkhsh, M. and Ataiee S. 2011. Use of a recombinant protein for development of a DAS-ELISA serological kit for sensitive detection of witches’ broom disease of lime. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S43-S44, ISSN 1721-8861.
- Shahriyari, F., Shams-Bakhsh, M., Safarnejad, M.R., Safaie, N., and Kachoeie, S.A. 2013. Preparation of Antibody Against Immunodominant Membrane Protein (IMP) of Candidatus Phytoplasma. *Iran J Biotech*. 11(1).



Table 1 Shows pBAD-F/pBAD-R Primers.

| Primer Name | Primer Sequences 5' → 3' | bp | Tm °C |
|---------------------|----------------------------------|----|-------|
| pBAD forward primer | 5' ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC 3' | 20 | 50 |
| pBAD reverse primer | 5'GAT TTA ATC TGT ATC AGG 3' | 18 | |

Table 2 Primers for imp gene-adapter synthesis (IMP3-F (XhoI) / IMP3-R (EcoRI)).

| Primer Name | Primer Sequences 5' → 3' | bp | Tm °C |
|-------------------------|---|----|-------|
| IMP3-F (<i>XhoI</i>) | 5' CTATG C/TCGAG ACTACTATGCAAA ATGAAAATTTTT G 3' | 36 | 64-67 |
| IMP3-R (<i>EcoRI</i>) | 5' ATC ATC ACC G/AATTC CTCATTAATTT AATTTCTAATCACT 3' | 40 | |

หมายเหตุ

| | | |
|--------------|-----|-----------------|
| <i>XhoI</i> | คือ | 5' C ↓ TCGAG 3' |
| <i>EcoRI</i> | คือ | 5' G ↓ AATTC 3' |
| START codon | คือ | ATG |
| STOP codon | คือ | TTA |

Map of pBAD/His

The figure below summarizes the features of the pBAD/His vector. Complete sequences for all three pBAD/His vectors are available for downloading at www.invitrogen.com or by contacting Technical Support (see page 28). Details of each multiple cloning site are shown on pages 9-11.

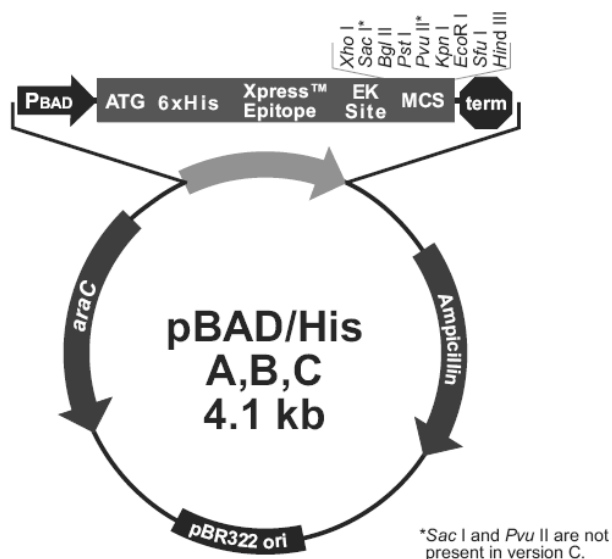


Figure 1 Map of pBAD/His A, B, and C vector with the relevant features of the (source: www.biosubway.com)

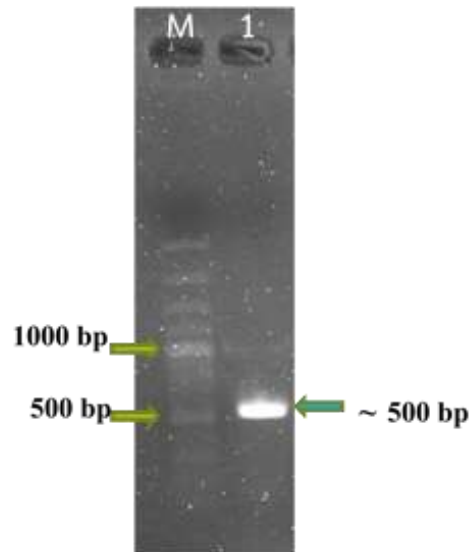


Figure 2 Gel electrophoresis of *imp* gene *Xho*/EcoRI (*imp* gene adapter) using IMP3-F (*Xho*)/IMP3-R (EcoRI)

M = 100 bps DNA Ladder (fermentas®)

1 = Amplicon of *imp* gene adapter showed about 500 bp

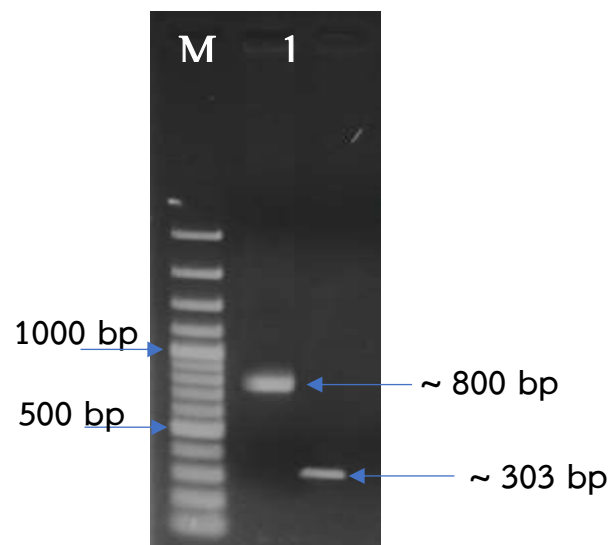


Figure 3 Gel electrophoresis of *imp* gene /6xHisTag plasmid using pBad-F / pBad-R primers by colony PCR

M = 100 bp DNA Ladder (fermentas®)

1 = pBad/HisA Expression vector inserted with *imp* gene /6xHisTag ~ 800 bp

2 = pBad/HisA Expression vector without *imp* gene /6xHisTag 303 bp

5'3' Frame 1

MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSELETT**M**QN
 ENFWYTKKGKIAIITSSVVGFLAILLTIAYYLKWWPFSKTLNEK
 TIKKFEKEIVLKSITEEEVSDADKAEKALKELKGKKSQIEKLLG
 IVEKHNNKSPADKKVKDATIETFNSIVKSIGELKVDKSNYTKSD
 FKDKYNLAADSSKLSTAFSNLKSLEIK

Figure 4 The amino acid sequences of imp gene from sugarcane white leaf phytoplasma with 6xHisTag

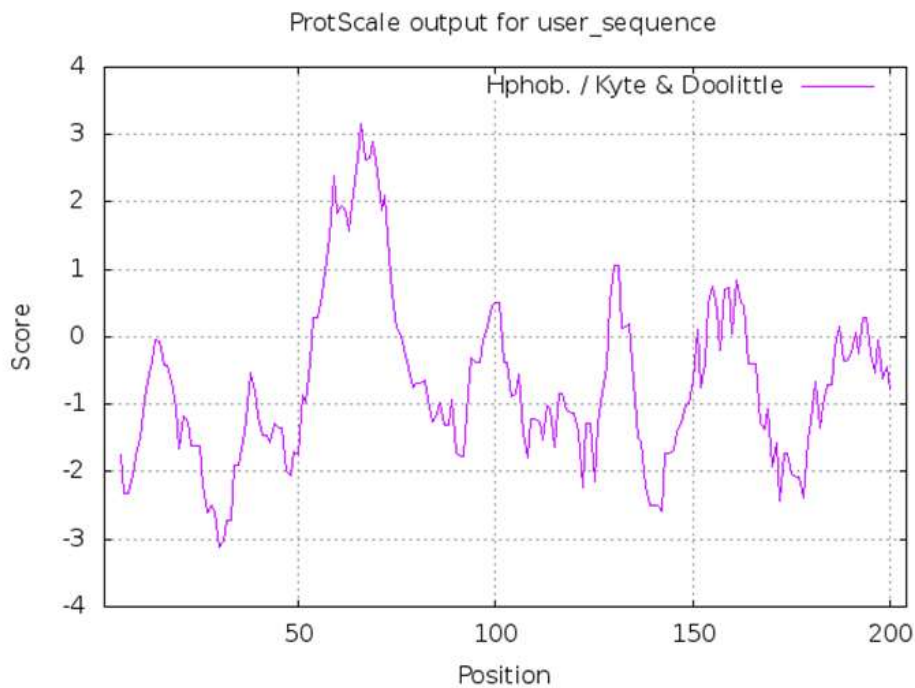


Figure 5 The line graph produced from imp amino acid sequence to estimate the hydrophobicity or hydrophilicity using ProtScale and ProtParam programs.

- Number of amino acids : 204
- Molecular weight : 23.14 kDa
- Theoretical pI : 8.92
- Formula $C_{1035}H_{1649}N_{273}O_{317}S_5$
- Grand average of hydropathicity : -0.698



Figure 6 The two-fold dilution of pAbs-SWL-IMP against sugarcane whiteleaf disease tested with Indirect ELISA

การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
 ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR
 Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in
 Seeds Using Real-time PCR technique

รุ่งนภา ทองเครื่อง ณิชฎิมา โฆษิตเจริญกุล บุรณี พัววงษ์แพทย์
 ทิพวรรณ กันหาญาติ
 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Seeds using Real-time PCR technique. The aimed of this research was develop a sensitive real-time PCR for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) from *Bassica* seed. Conducted experiments from October 2018-September 2021. Bacterial strains and DNA extracts used in this study cultures were stored on culture collection of Department of Agriculture. The conventional PCR assay for detection of black rot from brassicas amplifies 619 bp of Xcc *hrpF* gene and 1.4 kb of the *Brassica* spp. ITS. Primers DLH120 and DLH125 amplified the *hrpF* target and primers DLH109 and DLH112 amplified the *Brassica* spp. ITS target. Two primer pairs were for real-time PCR detection of Xcc: DLH153 and DLH154 amplified a 78 bp target. Primers DLH155 and DLH156 amplified a 100 bp region from *Brassica* spp. Encompassing part of ITS1 and the 5.8s rRNA gene. Primers DLH153-154 produced a discrete 78 bp band with a melt temperature of 85.4 °C from only the Xcc strains. Primers DLH155-156, amplifying a 100 bp segment of the *Brassica* spp. With a melt temperature of 84.5 °C. The sensitivity of real-time PCR assay was amplified from Xcc DNA 500 pg. The real-time analysis of infected seed rates of 1:100, 1:1000 and 1:10000 were analyzed for the presence of Xcc. Conventional PCR analysis of these rates of 1:100 samples. The real-time PCR assay the rapid detection of pathogenic strains of Xcc from *Brassica* seed.

Keywords : black rot disease, seed, detection

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-13-62



บทคัดย่อ

การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจแบคทีเรีย Xcc ที่ติดมากับเมล็ดให้มีประสิทธิภาพ มีความรวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง สามารถตรวจเชื้อในระดับความเข้มข้นต่ำๆ ได้ ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2561 - เดือนกันยายน 2564 การทดลองนี้ได้นำเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคราพืช ของกรมวิชาการเกษตร มาใช้ในการทดลองโดยแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ และนำไปตรวจสอบ ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้คู่มือ DLH120 และ DLH125 เป็นคู่มือที่จำเพาะต่อ Xcc จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hrpF* มีขนาด 619 คู่เบส และใช้คู่มือ DLH109 และ DLH112 เป็นคู่มือที่จำเพาะต่อ *Brassica* spp. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ ITS มีขนาด 1,400 คู่เบส จากการสืบค้นข้อมูลไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ด้วยเทคนิค Real-time PCR คัดเลือกใช้คู่มือ DLH153 และ DLH154 ซึ่งจำเพาะต่อยีน *hrpF* ของแบคทีเรีย Xcc และคู่มือ DLH155 และ DLH156 ที่จำเพาะต่อยีน *ITS* ของ *Brassica* spp. จากผลการทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา Real-time PCR พบว่าคู่มือ DLH153 และ DLH154 ที่จำเพาะต่อยีน *hrpF* ของแบคทีเรีย Xcc มีค่า melt temperature (tm) เท่ากับ 85.4 °C และคู่มือ DLH155 และ DLH156 ที่จำเพาะต่อยีน *ITS* ของ *Brassica* spp. ซึ่งเป็น internal control มีค่า melt temperature (tm) เท่ากับ 84.5 °C มีความไวในการตรวจ DNA ได้ที่ความเข้มข้น 500 พิโคกรัม ผลการใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดค่น้ำพบว่าสามารถตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่ติดมากับเมล็ดค่น้ำได้ในอัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดีที่ 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR พบว่าสามารถตรวจเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดได้ในอัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี เพียงแค่ที่อัตรา 1:100 ส่วนวิธีการแยกเชื้อ Xcc บนอาหาร semi-selective นั้น ไม่สามารถแยกเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดค่น้ำได้ ดังนั้นเทคนิค real-time PCR จึงมีความไว (sensitivity) ที่เหมาะสมต่อการตรวจเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดได้

คำหลัก : โรคน้ำดำ เมล็ดพันธุ์ การตรวจหา

คำนำ

โรคขอบใบทองหรือเน่าดำมีสาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* เป็นโรคที่พบได้ทั่วไปและเป็นปัญหามากกับพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งประกอบด้วย บล็อกโคลี่ (broccoli) กะหล่ำดาว (Brussels sprouts) กะหล่ำปลี (cabbage) กะหล่ำดอก (cauliflower) collards ค่น้ำ (kale) กะหล่ำปม (kohlrabi) มัสตาร์ด (mustard) radish rutabaga และ turnip โรคน้ำดำทำให้ผลผลิตเสียหายค่อนข้างมาก โดยเฉพาะในช่วงที่สภาวะ

แวดล้อมเหมาะสม พืชจะเริ่มแสดงอาการโรคให้เห็นในส่วนใบ โดยใบจะเริ่มเหลืองจากขอบใบแล้วลามลึกเข้ามาในเนื้อใบจนจรดแกนกลางของใบเป็นรูปตัววี (V) เส้นใบบริเวณนี้จะมีสีน้ำตาลดำ ต่อมาจะเกิดอาการแห้งจากขอบใบ ใบเหี่ยวเฉาและหลุดจากต้น เมื่อตัดลำต้นตามขวางจะพบว่าส่วนที่เป็นท่อน้ำ (xylem) เน่ามีสีดำ ในระยะกล้าที่งอกใหม่ ๆ จะเกิดอาการเน่าดำที่ขอบใบเลี้ยง ต่อมาใบเลี้ยงจะเหี่ยวและต้นกล้าตาย นอกจากอาการดังกล่าวแล้ว บางครั้งพบอาการแผลจุดบนใบกับพืชตระกูลกะหล่ำบางชนิด เช่น ผักคะน้า โดยจะเริ่มเกิดจุดแผลขนาดเล็กๆ ต่อมาจุดขนาดใหญ่ขึ้นมีสีน้ำตาล ขนาดประมาณ ๑ มิลลิเมตร และถ้าความชื้นสูงจะปรากฏลักษณะฉ่ำน้ำรอบจุดแผลสีน้ำตาล เมื่อจุดแผลเกิดใกล้ชิดกันทำให้เกิดลักษณะไหม้แห้งตายเป็นหย่อม ๆ เนื้อใบที่เป็นแผลขาดทะลุเป็นรู การแพร่ระบาดของโรคนี้อันตรายและไปได้ไกลที่สุด คือการติดไปกับเมล็ดพันธุ์และแพร่ไปยังต้นกล้าอื่นในแปลงเพาะกล้า ส่วนการเกิดโรคในแปลงเกิดจากต้นกล้าที่ได้รับเชื้อในแปลงเพาะ หรือจากเชื้อที่ติดค้างอยู่ในเศษซากพืชในดิน หรือในพีชอาศัยที่ติดค้างอยู่ในแปลง (volunteer plants) แล้วแพร่กระจายโดยน้ำฝน หรือน้ำที่ใช้รดต้นพืช เชื้อเข้าสู่พืชทางระบบรากทางปากใบ (stomata) ต่อมคายน้ำ (hydathodes) หรือทางแผลแล้วกระจายไปสู่ส่วนต่าง ๆ ทาง xylem เชื้อแพร่กระจายจากต้นเป็นโรคไปยังต้นข้างเคียงโดยไปกับลม ฝน น้ำ ชลประทาน เป็นต้น การระบาดของโรคจะเกิดได้ดีเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม และพืชเกิดบาดแผลโดยแมลงกัดกินหรือแผลจากการเขตรกรรม

การแพร่ระบาดของโรคนี้อันตรายและไปได้ไกลที่สุด คือการติดไปกับเมล็ดพันธุ์และแพร่ไปยังต้นกล้าอื่นในแปลงเพาะกล้า จากการระบาดของพบในปัจจุบันทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรอย่างมาก (ศศิธร, 2545) Berg *et. al.* (2006) ได้พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของผักกาดโดยใช้เทคนิค multiplex real-time PCR พบว่าเทคนิคนี้มีความรวดเร็วใช้เวลาน้อยกว่าการตรวจด้วยเทคนิค PCR มีความเฉพาะเจาะจง และสามารถตรวจเชื้อในปริมาณต่ำได้ จากการพัฒนาเทคนิค real-time PCR ให้สามารถตรวจเชื้อจากเมล็ดได้ เป็นประโยชน์แก่บริษัทที่ผลิตเมล็ดพันธุ์มาก สามารถนำเทคนิคนี้ไปใช้ตรวจสอบเพื่อคัดเลือกเมล็ดพันธุ์และหาวิธีการควบคุมโรค รวมถึงหาวิธีการฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ดได้

เทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาจากข้อจำกัดของเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ (Quantitative) เห็นผลได้แบบทันที (real time & on line) บนหน้าจอคอมพิวเตอร์ (Higuchi *et. al.*, 1992) ในขณะที่เทคนิค PCR ไม่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ และการวิเคราะห์ผลต้องทำในแผ่นวุ้นใช้เวลานานและย้อมด้วยสาร ethidium bromide ที่อันตราย (Reischl and Kochanowski, 1999) เทคนิค Real-time PCR เป็นการพัฒนานำเทคโนโลยี 2 ส่วน ได้แก่ การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจหาดีเอ็นเอในสารละลายโดยใช้สารเรืองแสง (Fluorescence reporters) ต่างๆ และการใช้เครื่อง thermal cyler ซึ่งเป็นเครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มารวมเป็นเครื่อง Real-time PCR โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของซินดีเอ็นเอ

และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้น ณ เวลานั้น (Higuchi *et. al.*, 1992) Mavrodieva *et. al.* (2004) พัฒนาเทคนิค real-time PCR ในการตรวจสอบโรคแคงเกอร์ทุกสายพันธุ์ ที่มีความไว รวดเร็ว และวิเคราะห์ตามเวลาจริงที่เกิดขึ้นในหลอด PCR โดยสามารถนำไปใช้เครื่อง RAPID machine ที่สามารถพกพาไปใช้ในแปลงปลูกได้ นำไปใช้ตรวจสอบโรคแคงเกอร์ในแปลงปลูกโดย สามารถตรวจสอบใบส้มที่เป็นโรคเพียงจุดแผลเล็ก ๆ แผลเดียว โดยมีความไวในการตรวจจับความ เข้มข้นต่ำสุดของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* 10 หน่วยโคโลนี/แผล และเป็นการรายงานผล ครั้งแรกในการใช้วิธีนี้ไปตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนตัวอย่างแห้งโรคพืช ที่เก็บไว้ ตั้งแต่ปี 1912 ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ญัฐิมา และคณะ (2556) ได้พัฒนาการตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ ออกแบบมาจาก ยีน avirulence/pathogenicity (*pthA* gene) ผลการทดสอบพบว่า primer D1/D2 และ primer 2/3 มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A โดย สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่พบ ในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท มีความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA เท่ากับ 5 พิโคกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 81 หน่วยโคโลนี/ มิลลิลิตร ผลการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างโรคแคงเกอร์ที่เก็บมา จากแปลงปลูกส้มโอที่ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย ด้วยเทคนิค real time PCR โดย primer D1/D2 และ primer 2/3 จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจ แบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) ที่ ติดมากับเมล็ดให้ มี ประสิทธิภาพ มีความรวดเร็ว และมีความแม่นยำสูง สามารถตรวจเชื้อในระดับความเข้มข้นต่ำๆ ได้ และเพื่อประโยชน์ในการตรวจเมล็ดพันธุ์ก่อนส่งออก และการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ก่อนปลูก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

เครื่อง real-time PCR (LightCycler480), เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม, เครื่องอเล็ก โโตโพรีซิส, microcentrifuge tube, ชุด kit สำหรับสกัดดีเอ็นเอ, agarose gel, PCR mix, real-time PCR mix

วิธีการ

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์ จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ของกรมวิชาการเกษตร)

2. การแยก genomic DNA ของเชื้อ Xcc ให้บริสุทธิ์



การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ Xcc สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA (nutrient agar) ใช้ลูปฆ่าเชื้อ และเชื้อแบคทีเรียให้เต็มลูป ละลายใน 1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่มีส่วนใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่น (vortex) เติมด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันวางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เย็นในตู้ -20 องศาเซลเซียส จำนวน 378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอน เพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer pH 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

3. การตรวจสอบ genomic DNA ของ Xcc ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

การทดสอบทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ DLH120 : 5'CCGTAGCACTTAGTGCAATG 3' DLH125 : 5'GCATTTCCATCGGTCACGATTG 3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *X. campestris* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนของยีน *hrpF* และใช้คู่ไพรเมอร์ DLH109 : 5'ATGTCGCTCAACACGCTTTC-3' DLH112 : 5'-GTTTTGCGTGTAGCCCTTGC-3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Brassica* spp. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ ITS ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (19 ul reaction mixture + 1 ul genomic DNA) โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส นำ PCR product ที่ได้ไปรันเจลอีแอกโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที

4. การเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา real-time PCR

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR ได้ผลดี มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย Xcc คัดเลือกไพรเมอร์จากนั้นนำลำดับเบสของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดโดยวิธี Real-time PCR โดย Berg et al. (2006) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *X. campestris* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hrpF* และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *X. campestris* from brassica จากส่วนของยีน ITS นำไพรเมอร์มาทดสอบทำปฏิกิริยา real-time PCR

Xcc (*hrpF*)

DLH153 GTAATTGATACCGCACTGCAA

DLH154 CACCGCTCCAGCCATATT

Brassica spp. (ITS)

DLH155 CAACGGATATCTCGGCTCTC

DLH156 TTGCGTTCAAAGACTCGATG

5. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR

การทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ทำในสภาพพลาสติกหลอดขนาด 96 หลุม (LightCycler®480 Multiwell Plate 96, Roche) ใช้ปริมาณรวมของปฏิกิริยา จำนวน 20 ul ประกอบไปด้วย 1X LightCycler 480 Probe Master, Roche Diagnostic (FastStart Taq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP mix (with dUTP instead of dTTP) และ 6.4 mM MgCl₂) สำหรับคู่ probe primer Xcc (*hrpF*) และ Brassica spp. (ITS) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.1- 0.4 uM (ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา) และ 1-5 ul DNA ของ Xcc แล้วนำไปเข้าเครื่อง real-time PCR (LightCycler® 480 System, Roche) โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา real-time PCR ทดสอบหาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม เริ่มที่ 95 C 15 วินาที 95 C 3 วินาที และ 56-66 C 1 นาที (ปรับเปลี่ยนเพื่อให้ได้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา) จำนวน 40 รอบ

6. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

ในการตรวจเชื้อ Xcc เป็นการทดสอบ primer ที่สังเคราะห์ไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้ข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

6.1 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

นำดีเอ็นเอของ Xcc ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม และเซลล์เชื้อแบคทีเรีย Xcc 10⁸ หน่วยโคลน/มิลลิลิตร และเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้แก่ *X. axonopodis* pv *citri*, *X. axonopodis* pv *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv *glycines*, *X. axonopodis* pv *dieffenbachiae*, *X. oryzae* pv *oryzae*, *X. oryzae* pv *oryzicola*, *Erwinia* spp. และเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบคะน้า ทำปฏิกิริยา Real-time PCR กับทั้ง 2 คู่ไพรเมอร์ ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ เพื่อทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา real-time PCR

6.2 ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

นำดีเอ็นเอของ Xcc มาทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย Xcc ที่ความเข้มข้น 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร นำไปทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์

7. ใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคະນ້າ

ปลูกเชื้อ Xcc ลงเมล็ดคະນ້าให้มีปริมาณเชื้อ 10^4 หน่วยโคโลนี/เมล็ด จากนั้นนำเมล็ดคະນ້าที่ติดเชื้อไปเพิ่มในเมล็ดคະนัาที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว โดยเพิ่มในอัตราส่วน 1:100 1:1,000 และ 1:10000 ต่อจำนวนเมล็ดดี 10,000 เมล็ด นำเมล็ดคະนัาที่เตรียมเสร็จแล้วไปแช่ใน 0.85% NaCl (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1,000 เมล็ด) และเติม 0.02 % Tween 20 แช่ 2.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ละลายตะกอนด้วย 0.85% NaCl แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ เปรียบเทียบกับวิธีการนำเมล็ดคະนัาบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดแล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งส่วนตะกอน นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค conventional PCR และการตรวจสอบเชื้อด้วยอาหาร semi-selective สำหรับแยกเชื้อ Xcc

8. ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคະນ້າ

ปลูกเชื้อ Xcc ลงเมล็ดคະนัาให้มีปริมาณเชื้อ 10^4 หน่วยโคโลนี/เมล็ด จากนั้นนำเมล็ดคະนัาที่ติดเชื้อไปเพิ่มในเมล็ดคະนัาที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว โดยเพิ่มในอัตราส่วน 1:100 1:1,000 และ 1:10000 ต่อจำนวนเมล็ดดี 10,000 เมล็ด นำเมล็ดคະนัาที่เตรียมเสร็จแล้วไปแช่ใน 0.85% NaCl (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1,000 เมล็ด) และเติม 0.02 % Tween 20 แช่ 2.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ละลายตะกอนด้วย 0.85% NaCl แล้วทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution 10^{-1} – 10^{-8} นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ เปรียบเทียบกับวิธีการนำเมล็ดคະนัาบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดแล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งส่วนตะกอน นำตัวอย่างที่ได้ทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution 10^{-1} – 10^{-8} แล้วนำไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR

ที่เหมาะสมกับแต่ละคูไพรเมอร์ เพื่อทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคคะน้ำ

9. ใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคคะน้ำที่สุ่มตรวจ

ตัวอย่างเมล็ดคคะน้ำที่จะสุ่มมาตรวจต้องมีจำนวนเมล็ดขั้นต่ำไม่น้อยกว่า 30,000 เมล็ด และทำการแบ่งออกเป็นตัวอย่างย่อย ตัวอย่างละ 10,000 เมล็ด ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association) นำเมล็ดแช่ใน 0.85% NaCl (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1,000 เมล็ด) และเติม 0.02 % Tween 20 แช่ 2.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ตกตะกอน ละลายตะกอนด้วย 0.85% NaCl แล้วทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution $10^{-1} - 10^{-8}$ นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคูไพรเมอร์ เปรียบเทียบกับวิธีการนำตัวอย่างเมล็ดคคะน้ำบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดแล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งส่วนตะกอน นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคูไพรเมอร์ และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค conventional PCR และการตรวจสอบเชื้อด้วยอาหาร semi-selective สำหรับแยกเชื้อ Xcc แช่ในบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดแล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งส่วนตะกอน นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคูไพรเมอร์ และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค conventional PCR และการตรวจสอบเชื้อด้วยอาหาร semi-selective สำหรับแยกเชื้อ Xcc

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานбакเทรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช นักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

นำเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ของกรมวิชาการเกษตร มาเลี้ยงบนอาหาร Wakimoto's medium (PSA) เพื่อใช้ในการทดลอง

2. การแยก genomic DNA ของเชื้อ Xcc ให้บริสุทธิ์

แยก genomic DNA ของเชื้อ Xcc ตามวิธีการสกัด DNA โดยใช้ Phenol : Chloroform และการแยก genomic DNA โดยใช้ชุด PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen จากนั้นนำ genomic DNA ของเชื้อ Xcc ที่แยกได้จากทั้ง 2 วิธี ไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

3. การตรวจสอบ genomic DNA ของ Xcc ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

การทดสอบทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ DLH120 : 5'CCGTAGCACTTAGTGCAATG 3' DLH125 : 5'GCATTTCCATCGGTCACGATTG 3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *X. campestris* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนของยีน *hrpF* และใช้คู่ไพรเมอร์ DLH109 : 5'-ATGTCGCTCAACACGCTTTC-3' DLH112 : 5'-GTTTTGCGTGTAGCCCTTTC-3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Brassica* spp. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนของ ITS ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (19 ul reaction mixture + 1 ul genomic DNA) โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำ PCR product ที่ได้ไปรันเจลอีแอกโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ผลการตรวจด้วยคู่ไพรเมอร์ DLH120/DLH125 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 619 คู่เบส (Figure 1) และผลการตรวจด้วยคู่ไพรเมอร์ DLH109/DLH112 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 1,400 คู่เบส (Figure 2)

4. การเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR ได้ผลดี มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย Xcc คัดเลือกไพรเมอร์และนำลำดับเบสของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ Xcc ดังนี้

Xcc (*hrpF*)

DLH153 GTAATTGATACCGCACTGCAA

DLH154 CACCGCTCCAGCCATATT

Brassica spp. (ITS)

DLH155 CAACGGATATCTCGGCTCTC

DLH156 TTGCGTTCAAAGACTCGATG

5. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR

การทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ทำในสภาพพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler®480 Multiwell Plate 96, Roche) ใช้ปริมาณรวมของปฏิกิริยา จำนวน 20 ul ประกอบไปด้วย 1X LightCycler SYBR Green, Roche Diagnostic (FastStart Taq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP mix (with dUTP instead of dTTP) และ 6.4 mM MgCl₂)

สำหรับคู่ primer DLH153 และ DLH154 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.1- 0.4 uM (ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นเพื่อให้ได้สถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา) และ 1-5 ul DNA ของ Xcc แล้วนำไปเข้าเครื่อง real-time PCR (LightCycler® 480 System, Roche) โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา real-time PCR พบว่าโปรแกรมที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Real time PCR คือ

| Program | cycles | Target (°C) | Hold time (hh:mm:ss) | Ramp Rate (°C/s) | Acquisition mode |
|----------------|--------|-------------|----------------------|-------------------|------------------|
| Pre-incubation | 1 | 95 | 00:02:30 | 4.40 | none |
| Amplification | 30 | 95 | 00:00:20 | 4.40 | none |
| | | 60 | 00:00:20 | 2.20 | none |
| | | 72 | 00:00:15 | 4.40 | none |
| | | 80 | 00:00:15 | 4.40 | single |
| Melting curve | 1 | 95 | 00:00:15 | 4.40 | none |
| | | 40 | 00:00:15 | 2.20 | none |
| | | 95 | 00:00:00 | 0.11 | continuous |
| Cooling | 1 | 40 | 00:00:30 | 2.20 | none |

ในขณะที่ทำปฏิกิริยา SYBR green fluorescence จะแทรกเข้าไปในสาย DNA ที่มีการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ในแต่ละรอบ โดยเครื่องจะตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น และแสดงผลเป็นกราฟเส้นโค้ง (semi log curve) ของ SYBR green fluorescence ที่เกิดสะสมในแต่ละรอบของปฏิกิริยา Real time PCR ซึ่ง crossing point (Cp) ของแต่ละกราฟเส้นโค้งจะแสดงจำนวนรอบถึงระดับการสะสมของ SYBR green fluorescence ในผลผลิต PCR เป้าหมาย (Figure 3) และใช้ค่า melting curve เป็นเกณฑ์ในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีผลผลิต PCR เป้าหมาย พบว่าค่า Tm ของคู่ไพรเมอร์ DLH153 และ DLH154 ที่ความจำเพาะต่อแบคทีเรีย Xcc เท่ากับ 85.4 °C (Figure 4, 5)

6. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

6.1 ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

นำดีเอ็นเอของ Xcc มาทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม นำไปทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ตามสถานะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสม พบว่าปฏิกิริยา real-time PCR มีความไวในการตรวจ DNA ได้ที่ความเข้มข้น 500 พิโคกรัม (Figure 6)

6.2 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยา real-time PCR



ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่าคู่ primer สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย Xcc ได้แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ *X. axonopodis* pv *citri*, *X. axonopodis* pv *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv *glycines*, *X. axonopodis* pv *dieffenbachiae*, *X. oryzae* pv *oryzae*, *X. oryzae* pv *oryzicola*, *Erwinia* spp. และแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบคะน้าได้ (Figure 7)

7. ใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้า

จากผลการใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้าที่ปลูกเชื้อ Xcc ลงเมล็ดปริมาณเชื้อ 10^4 หน่วยโคโลนี/เมล็ด แล้วนำเมล็ดคะน้าที่ติดเชื้อไปเพิ่มในเมล็ดคะน้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว โดยเพิ่มในอัตราส่วน 1:100 1:1,000 และ 1:10,000 ต่อจำนวนเมล็ดดี ผลการตรวจด้วยเทคนิคเทคนิค real-time PCR พบว่าวิธีการนำเมล็ดคะน้าไปแช่ใน 0.85% NaCl (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1,000 เมล็ด) และเติม 0.02 % Tween 20 แช่ 2.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ละลายตะกอนด้วย 0.85% NaCl สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่อัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 ส่วนวิธีการนำเมล็ดคะน้าบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดแล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใสหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทั้งส่วนตะกอน นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่อัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 ได้ผลเช่นเดียวกับวิธีการล้างเมล็ดด้วย 0.85% NaCl เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR พบว่าตรวจพบเชื้อ Xcc ที่ 1:100 จากทั้งสองวิธี แต่การแยกเชื้อ Xcc บนอาหาร semi-selective ไม่สามารถแยกเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดคะน้าได้ (Figure 8)

8. ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้า

จากผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้าโดยนำเมล็ดคะน้าที่ติดเชื้อไปเพิ่มในเมล็ดคะน้าที่ในอัตราส่วน 1:100 1:1,000 และ 1:10,000 นำตัวอย่างที่ได้จากวิธีการแช่และวิธีการบดเมล็ดทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution 10^{-1} - 10^{-8} แล้วนำไปทำปฏิกิริยา real-time PCR พบว่าจากวิธีการแช่เมล็ดคะน้าใน 0.85% NaCl สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่อัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี 1:100 ได้ที่ค่าการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-3} และ 1:1,000 ที่ค่าการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-2} และ 1:10,000 วิธีการบดเมล็ดคะน้าด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่อัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี 1:100 ได้ที่ค่าการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-3} และ 1:1,000 ที่ค่าการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-3} และที่ 1:10,000 (Figure 9)

9. ใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้าที่สุ่มตรวจ

สุ่มตัวอย่างเมล็ดคะน้าที่มีจำหน่ายเป็นการค้าจำนวน 30,000 เมล็ด (น้ำหนักประมาณ 150 กรัม) แบ่งออกเป็น 3 ตัวอย่างย่อย ตัวอย่างละ 10,000 เมล็ด จำนวน 2 ชุด ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association) ชุดที่ 1 นำตัวอย่างเมล็ดไปทำตามขั้นตอนการแช่ใน 0.85% NaCl (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1,000 เมล็ด) แล้วทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution 10^{-1} - 10^{-8} เปรียบเทียบกับชุดที่ 2 นำตัวอย่างเมล็ดคะน้าไปทำตามขั้นตอนการบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 แล้วทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution 10^{-1} - 10^{-8} ผลการตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากตัวอย่างเมล็ดคะน้าทั้งสองชุดที่ความเข้มข้นสูงสุด เมื่อทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution 10^{-1} - 10^{-8} พบว่าตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากตัวอย่างเมล็ดคะน้าทั้งสองชุด เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR และการแยกเชื้อด้วยอาหาร semi-selective พบว่าทั้งสองวิธีตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย Xcc (Figure 10)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาวิธีการตรวจแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าสามารถตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่ติดมากับเมล็ดคะน้าได้ในอัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 (ตาราง 1) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR พบว่าสามารถตรวจเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดได้ในอัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี เพียงแค่อัตรา 1:100 ส่วนวิธีการแยกเชื้อ Xcc บนอาหาร semi-selective นั้น ไม่สามารถแยกเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดคะน้าได้ ดังนั้นเทคนิค real-time PCR จึงมีความไวเหมาะสมที่นำไปใช้เพื่อการตรวจเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

- ศศิธร วุฒินิชย์. 2545. โรคของผักและการควบคุมโรค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. จตุจักร กรุงเทพฯ. 173 น.
- ณัฐริมา ไชยิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ บุรณี พัววงศ์แพทย์ และรุ่งนภา ทองเค็ง. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real-time PCR. หน้า 2863 – 2879. ใน : รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2556 เล่มที่ 4. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Berg, T., L. Tesoriero and D.L. Hailstones. 2006. A Multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. *Letters in Applied Microbiology*. (42) : 624-630.

- Higuchi, R., G. Dollinger, P.S. Walsh and R. Griffith. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* (NY) 10 : 413-417.
- Mavrodieva, V., L. Levy and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology* 94: 61-68.
- Reischi, U. and B. Kochanowski. 1999. Quantitative PCR. In *Method in Molecur Medicine: Quantitative PCR Protocol*. Totowa Press, New Jersey. 3-30.

Table 1 Comparison of sensitivity limits of the *X. campestris* pv. *campestris* conventional PCR and real-time PCR assay.

| Sample | Infection rate | Convention al PCR | Real-time PCR | Real-time PCR Ct Value | |
|------------------------|--------------------|-------------------|---------------|------------------------|--------------------------|
| | | | | <i>Xcc hrpF</i> | <i>Brassica</i> spp. ITS |
| Washed in 0.85% NaCl | 1 : 100 | + | + | 23.83 | 25.00 |
| grinding in PBS buffer | 1 : 100 | + | + | 22.23 | 25.00 |
| Washed in 0.85% NaCl | 1 : 1,000 | - | + | 29.24 | 25.00 |
| grinding in PBS buffer | 1 : 1,000 | - | + | 29.13 | 25.00 |
| Washed in 0.85% NaCl | 1 : 10,000 | - | + | 30.13 | 25.00 |
| grinding in PBS buffer | 1 : 10,000 | - | + | 30.00 | 25.00 |
| Washed in 0.85% NaCl | Naturally infected | - | + | 27.08 | 25.00 |
| grinding in PBS buffer | Naturally infected | - | + | 27.08 | 25.00 |
| Xcc DNA extract | NA | + | + | 17.02 | ND |

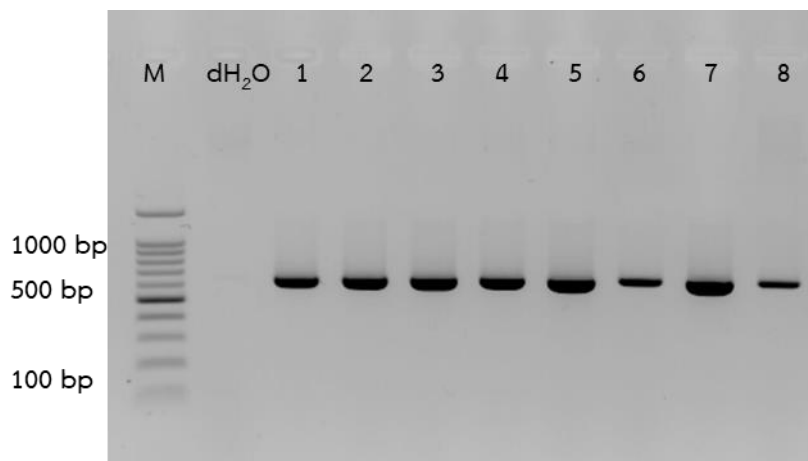


Figure 1 Conventional PCR products separated on 1.5% agarose gel. The 619 bp *hrpF* product is amplified from *Xcc* Lane 1-8, DNA extract from *Xcc*, lane M, 100 bp ladder, lane dH₂O, distilled water

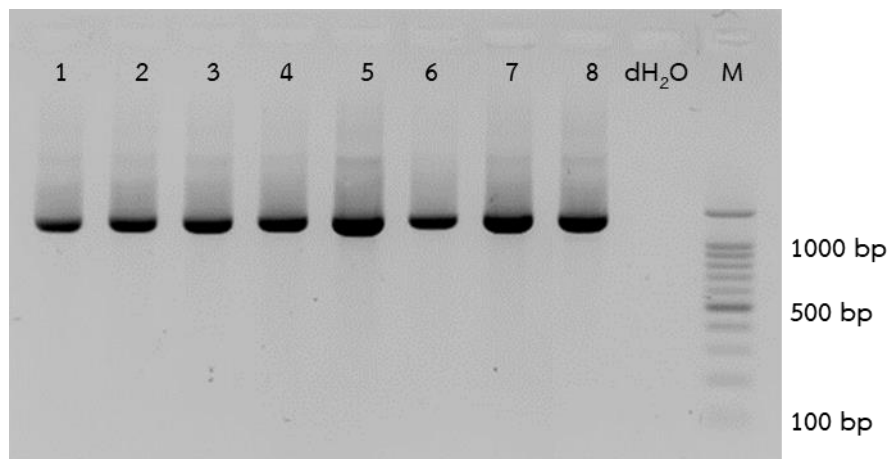


Figure 2 Conventional PCR products separated on 1.5% agarose gel. The 1.4 kb ITS product is amplified from *Brassica spp.* Lane 1-8, DNA extract from plant material, lane M, 100 bp ladder, lane dH₂O, distilled water

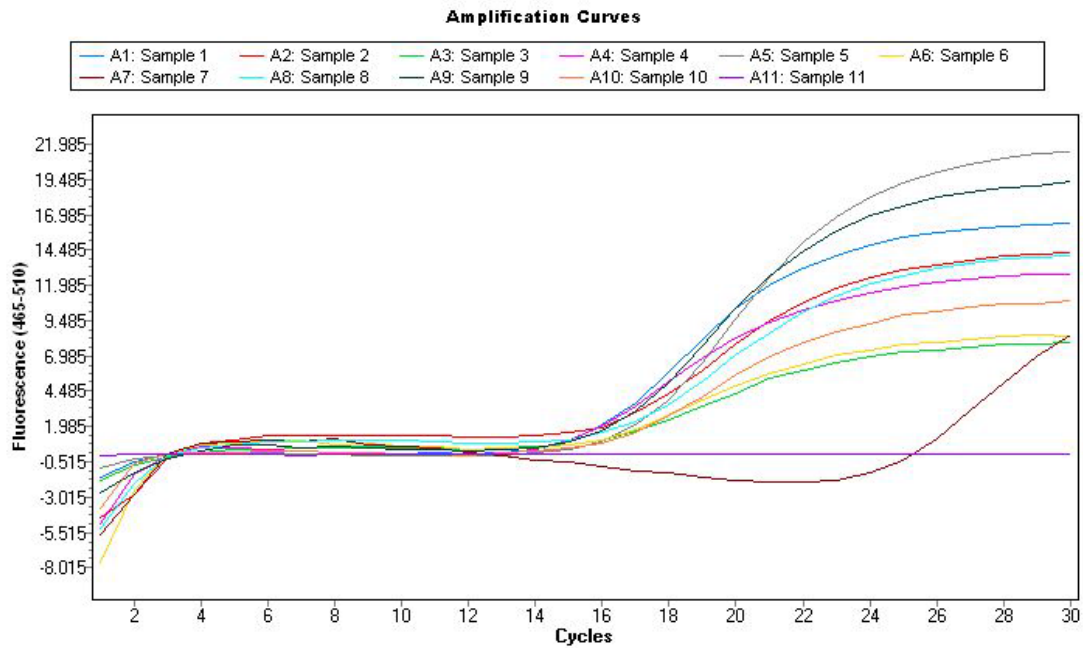


Figure 3 Amplification curves of real-time PCR obtained with positive

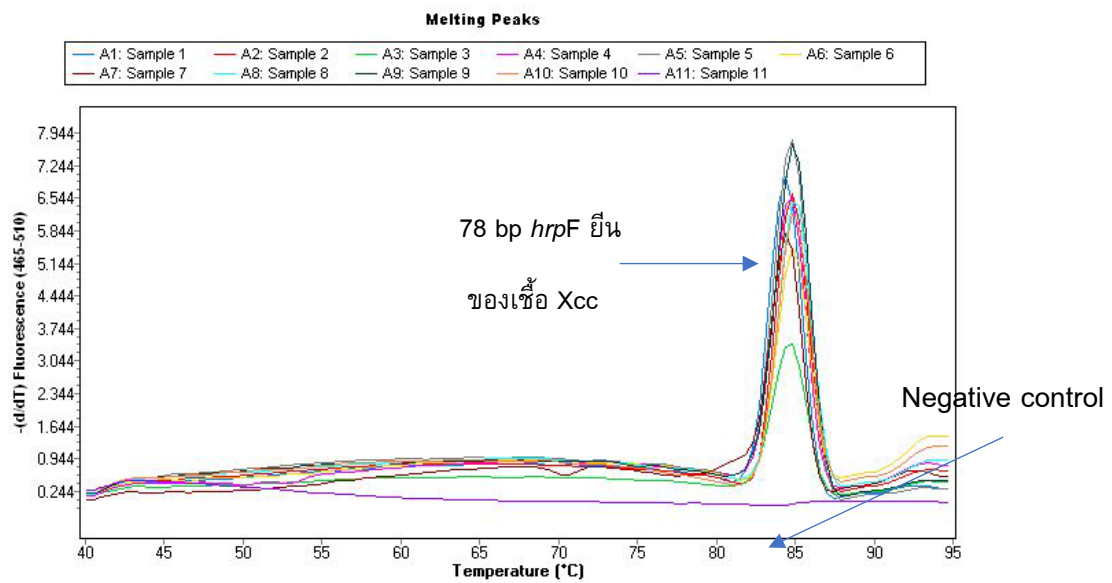


Figure 4 Melt curve analysis of real-time PCR for DLH153-154 product

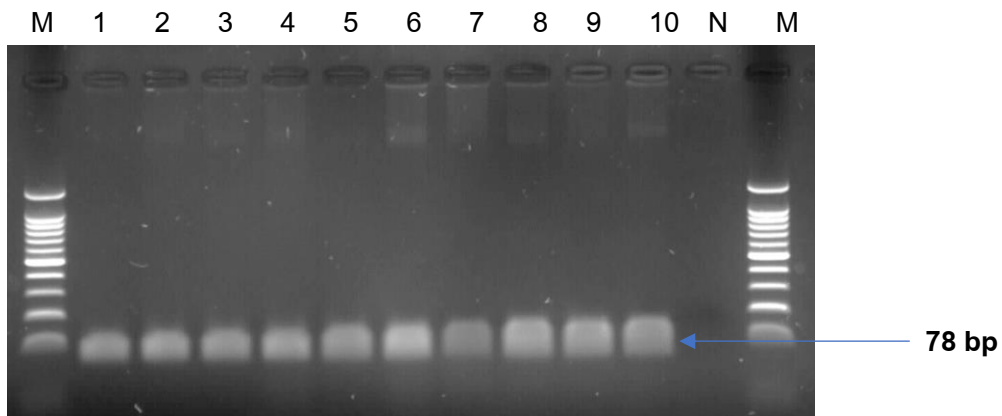


Figure 5 Products of Real-time PCR detection separated on 2% agarose gel of Xcc using the DLH1-154 primer. These primers generated a 78 bp *hrpF* gene

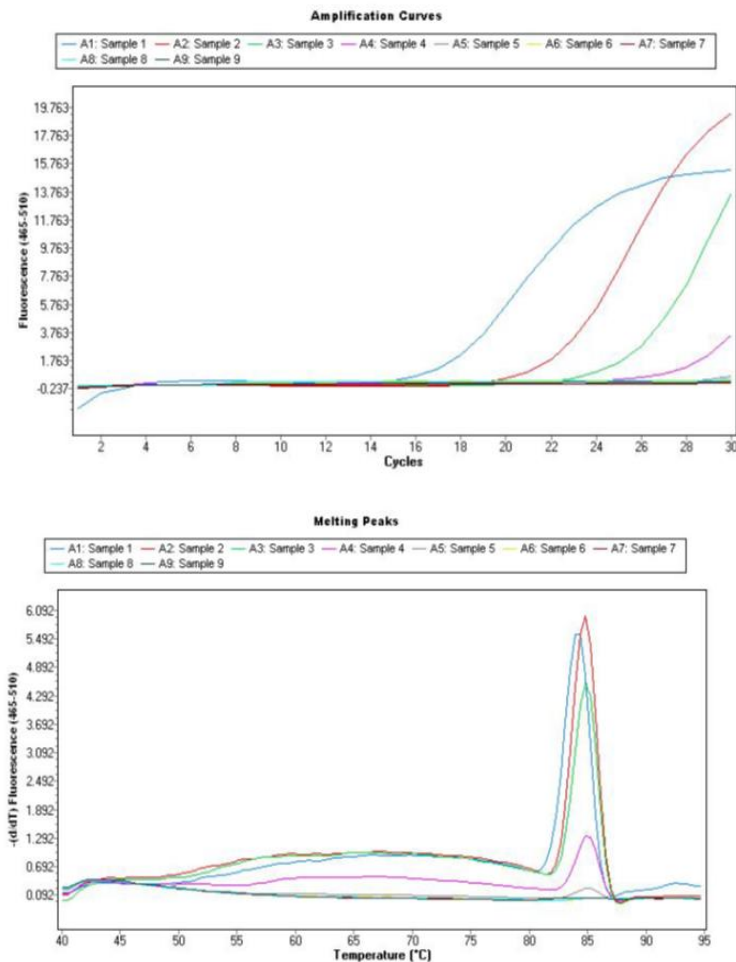


Figure 6 The sensitivity of real-time PCR assay was amplified from DNA extract of Xcc and 10-fold dilution from 50 ng - 100 fg

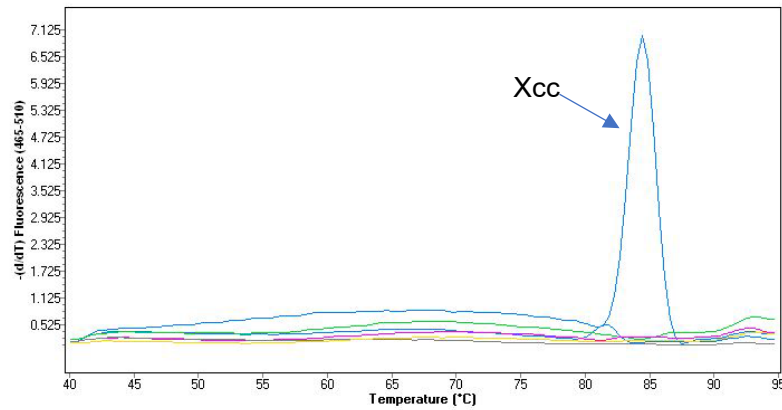


Figure 7 The specificity of real-time PCR detection assay

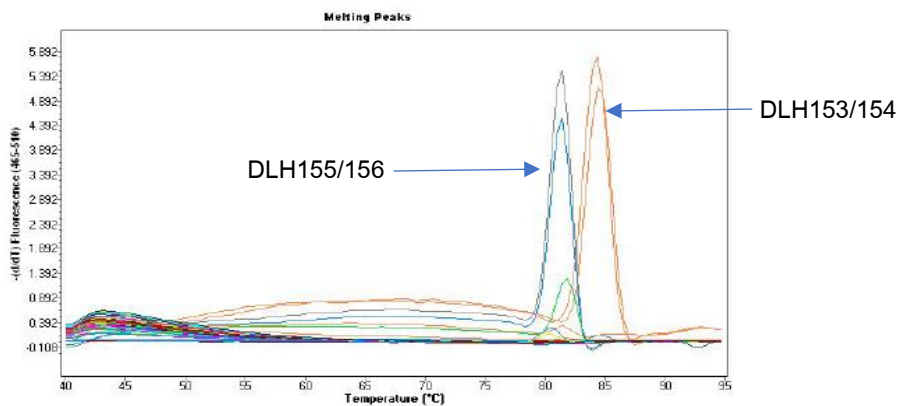


Figure 8 Real-time PCR detection assay using the DLH153-154 primer pair in a SYBR Green I assay. These primers generated a 78 bp *hrpF* product from *Xcc*, had a melt temperature 85.4 °C compared with using the DLH155-156 primer pair in a SYBR Green I assay. These primers generated a 100 bp ITS product from *Brassica* spp. Seed wash extracts, had a melt temperature 84.5 °C

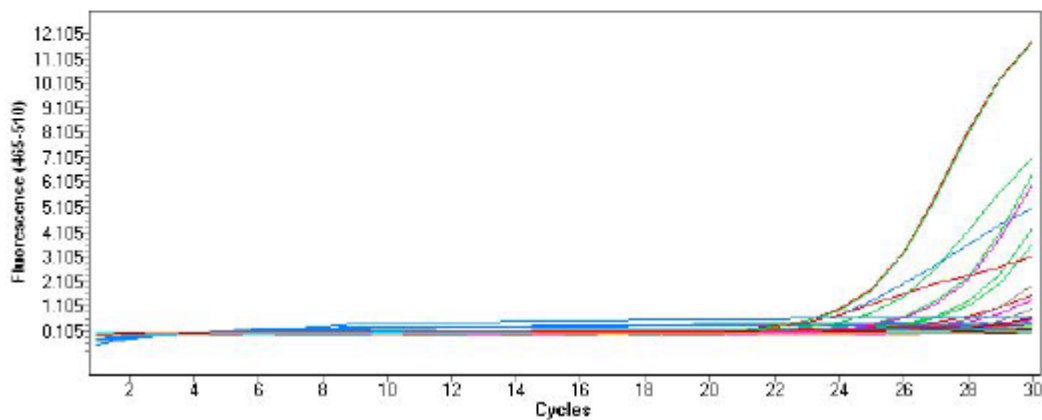


Figure 9 The sensitivity of real-time PCR detection assay

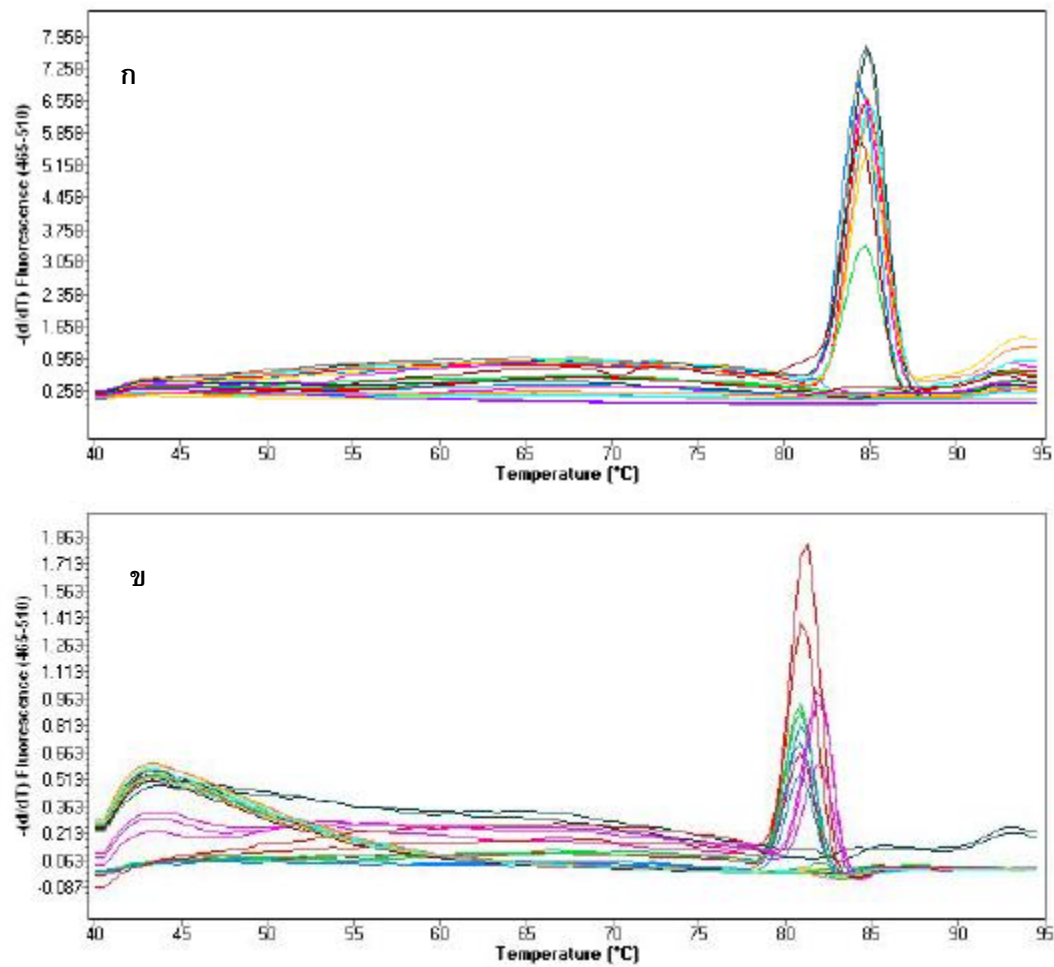


Figure 10 Real-time PCR detection follow ISTA (International Seed Testing Association)

ก) Using the DLH153-154 primer pair in a SYBR Green I assay. These primers generated a 78 bp hrpF product from *Xcc*, had a melt temperature 85.4 $^{\circ}\text{C}$

ข) Using the DLH155-156 primer pair in a SYBR Green I assay. These primers generated a 100 bp ITS product from *Brassica* spp. Seed wash extracts, had a melt temperature 84.5 $^{\circ}\text{C}$

การพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Diptera:Tephritidae)
เพื่อการนำเข้าและส่งออกด้วยไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง

Development diagnostic technique of the economically important fruit fly,
Bactrocera correcta (Diptera: Tephritidae) for benefit of import - export
product using species-specific primer

ยุวรินทร์ บุญทาบ^{1/} ณัฐฐิมา โฆษิตเจริญกุล^{2/} นพรัตน์ จันทร์หอม^{3/} ชุตติกาญจน์ ใจแล^{4/}

^{1/}กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

^{4/}ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

Abstract

The Guava fly, *Bactrocera correcta* Bezzi is endemic to Thailand and causes great economic losses in fruit and vegetable crops. It is a quarantine pest species for many countries which import host commodities from Thailand or are potential new markets for Thai exports. Larvae of guava fly are intercepted by quarantine inspections, but their morphological similarity to other fruit fly species makes identification difficult. Rapid, accurate identification of immature fruit flies associated with imported/exported fresh produce is essential to ensure appropriate biosecurity decisions at quarantine barriers, or where commodities are inspected prior to export. Species-specific primers were designed by amplifying the cytochrome oxidase I (*cox1*) gene to differentiate *B. correcta* for all life stages. The species-specific assay demonstrated high specificity, sensitivity and reliability for *B. correcta* when validated against representatives of 11 species (*Bactrocera correcta*, *B. carambolae*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *Dacus longicornis*, *Z. apicalis*,

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-15-62



Z. caudatus, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* and *Z. tau*). This study demonstrated the feasibility of using species-specific diagnostic tools (utilising 141 base pair sequences) for identifying all life stages of guava fly from populations throughout Thailand. The species-specific primer pair was evaluated on samples intercepted by plant inspections at Suvarnabhumi airport of agricultural products destined for export from Thailand. The primer pairs from this research are accurate, fast and efficient. Thus, they make it possible to detection of Quarantine pests at early points in the production and export pathway. The present study is a model for developing diagnostic techniques for various pests which will in turn: promote trading partner confidence in Thai certification systems and enhance the diversity, quality and value of Thai agricultural products.

Keywords : Diagnostic, fruit flies, Guava fly

บทคัดย่อ

แมลงวันทองฝรั่ง (Guava fly); *Bactrocera correcta* Bezzi เป็นศัตรูพืชที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจกับพืชผักหลากหลายชนิด และเป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก มักพบตัวหนอนแมลงวันผลไม้จากการสุ่มตรวจศัตรูพืชในการส่งออกของประเทศไทย และก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้า จากลักษณะทางสัณฐานของตัวหนอนแมลงวันผลไม้ที่มีคล้ายคลึงกันมากนั้นทำให้การระบุชนิดนั้นทำได้ยาก ดังนั้นการจำแนกชนิดของตัวหนอนแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยเทคนิคที่มีความรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งในการสร้างความเชื่อถือต่อความมั่นคงทางชีวภาพ และด้านการกักกันพืชที่มีการตรวจสินค้าก่อนการส่งออกผลิตผลทางการเกษตร งานวิจัยนี้จึงได้ออกแบบคู่มือจากยีน *Cytochrome c oxidase subunit I (cox1)* ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ทุกระยะการเจริญเติบโต และทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ด้วยการทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera correcta*, *B. carambolae*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *Dacus longicornis*, *Zeugodacus apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* ซึ่งให้ผลบวกเฉพาะ *B. correcta* มีขนาดดีเอ็นเอ 141 คู่เบส และพบว่าสามารถใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย รวมทั้งจากตัวหนอนที่ตรวจพบปนเปื้อนในผักผลไม้ที่ต้องการส่งออกไปขายยังต่างประเทศจากด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิได้อย่างมีประสิทธิภาพ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ทำ



การออกแบบนั้นมีความน่าเชื่อถือ ถูกต้อง แม่นยำ สะดวก ประหยัด และมีประสิทธิภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือวินิจฉัยเพื่อระบุชนิดแมลงวันผลไม้ก่อนการส่งออกผัก ผลไม้ อีกทั้งสามารถเป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ นำไปสู่การสร้างความมั่นใจให้กับประเทศคู่ค้า เพิ่มขีดความสามารถในการส่งออกสินค้าพืชผลทางการเกษตรของประเทศไทยและการเพิ่มมูลค่าของสินค้าเกษตรของไทย

คำหลัก : ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ แมลงวันผลไม้ แมลงวันทองฝรั่ง

คำนำ

ปัจจุบันการนำเข้าและส่งออกผักผลไม้มีมาตรฐานที่สูงขึ้น ดังนั้นหากมีการตรวจพบสิ่งปนเปื้อน โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชที่ติดมากับผลผลิตทางการเกษตร จะต้องมีการตรวจและวิธีการที่เป็นมาตรฐานระดับสากล และวิธีการที่นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดศัตรูพืชนั้นจะต้องมีความสะดวก รวดเร็ว และประหยัด สำหรับประเทศไทยการนำเข้าและส่งออกพืชผัก ผลไม้ในปัจจุบันพบว่า แมลงวันผลไม้ (Tephritid fruit fly) เป็นศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนสูงมาก เนื่องจากแมลงวันผลไม้เพศเมียจะวางไข่ จากนั้นตัวหนอนเจริญเติบโต และกัดกินอยู่ภายในผล ยากต่อการสังเกตเห็น ทำให้มีโอกาสติดไปภายใน ผัก และผลไม้ได้สูง สร้างความเสียหายเป็นอย่างยิ่งในการส่งออก และก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้าตามมาอีกด้วย มีรายงานว่าทั่วโลกพบแมลงวันผลไม้มากกว่า 5,000 ชนิด (Aluja and Norrbom, 1999) แต่ในประเทศไทยพบ แมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* และสกุล *Zeugodacus* สามารถทำลายผลผลิตทางการเกษตรได้หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็น ผักหรือ ผลไม้ และพบว่าแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* Bezzi เป็นศัตรูที่ก่อให้เกิดความเสียหายและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างยิ่งสามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 30 วงศ์ (Family) ใน 60 ชนิด (species) เช่น ชมพู่ มะม่วง ฝรั่ง เชอร์รี่ พุทรา และพริก โดยเฉพาะผลไม้ที่เกษตรกรนิยมปลูกเพื่อการบริโภคภายในประเทศ และส่งออก เช่น ฝรั่ง มะม่วง และ ชมพู่ (White and Elson-Harris, 1992)

ดังนั้นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จัดเป็นหนึ่งในแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญต่อการนำเข้าและส่งออก (Weems and Fasulo, 2011) แต่ปัจจุบันประเทศไทยใช้การตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานภายนอกของตัวเต็มวัยเป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยเพียงเท่านั้น แต่หากมีการสำรวจพบแมลงวันผลไม้ ในระยะไข่ หนอน หรือดักแด้ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันมาก การวินิจฉัยนั้นทำได้ยาก และหากต้องการศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้จากตัวอ่อน จะต้องนำตัวอ่อนมาทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษารายละเอียดจากสัณฐานวิทยาภายนอกในส่วนต่าง ๆ เช่น ส่วนปาก (mouth



hook) และรูหายใจด้านหน้า (anterior spiracles) และปลายท้อง (posterior spiracles) (ยูวรินทร์ และคณะ, 2564) นอกจากนี้หากมีการตรวจพบตัวอ่อนในการส่งออกหรือนำเข้าผลผลิตทางการเกษตรนั้น ผู้ที่ทำการตรวจวินิจฉัยจะต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้ตัวอ่อน หรือดักแต่นั้นเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ชนิดซึ่งค่อนข้างใช้เวลานานและเป็นผลเสียต่อการค้าผักผลไม้ตามมา (Armstrong *et al.*, 1997)

การศึกษาครั้งนี้เป็นการออกแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ให้มีความเหมาะสมและสามารถนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในประเทศไทย โดยเป็นการประยุกต์หลักการพื้นฐานของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction: PCR) กับ species - specific primer จาก DNA Barcode

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd, Switzerland) พร้อมกล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- เครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation XR) รุ่น Universal Hood II (Biorad, USA)
- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง (ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติกกับดักแมลงวันผลไม้ แบบถังเปีย ยก (wet bucket trap) จาก Bugs for Bugs Pty Ltd, Australia สารฟีโรโมนล่อแมลงวันผลไม้ ได้แก่ เมทิล ยูจีนอล (Methyl Eugenol) คิวลัวร์ (CUE lure) และลาติลัวร์ (Lati lure) รวมทั้งโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) สำหรับรักษาคุณภาพของแมลงวันผลไม้ ระหว่างติดกับดักไว้ในแปลงสำรวจ
- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด ได้แก่ ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit) (Bioline, Australia), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Bioline, Australia), Agarose gel (Bioline, Australia) และ TBE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), สารละลาย GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)
- สารเคมี RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) และไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ



วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากพื้นที่การเกษตร โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) โดยเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างภูมิภาคละ 3 จังหวัด ใช้กับดักล่อแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก ซึ่งประกอบด้วยสารล่อ (pheromone) แมลงวันผลไม้ 3 ประเภท ได้แก่ เมทิลยูจินอล (Methyl Eugenol) คิวลัวร์ (CUE lure) และลาติลัวร์ (Lati lure) ผสมสารฆ่าแมลง malathion ในอัตราส่วน 4 : 1 และภายในกับดักบรรจุสารโรไฟลีนไกลคอล เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ติดกับดัก 5 กับดักต่อสารล่อหนึ่งประเภทต่อหนึ่งพื้นที่ เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 - กันยายน พ.ศ. 2562 จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ร่วมกับแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia (Drew and Romig, 2013) และ Keys to the Tropical Fruit Flies of South-East Asia (Tephritidae: Dacinae) (Drew and Romig, 2016) นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ลงในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้มาสกัดดีเอ็นเอ ตามกรรมวิธี Boontop *et al.*, (2016) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bionline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้านขวาจำนวน 3 ข้างของแมลงวันผลไม้ (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Lysis Buffer GL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 20 ชั่วโมง ทำการย่อยสลายตัวอย่างโดยเขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม Lysis Buffer G3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาตร 210 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ตูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอด ISOLATE II Genomic DNA และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ล้างตะกอน โดยการเติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ตามด้วย Wash Buffer GW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ทั้งของเหลวที่เหลือ ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง



ความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ละลายดีเอ็นเอ โดยการเติม Elution Buffer G ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000x g นาน 1 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ universal primer จากยีน *cox1*: LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCA GGGTGACCAAAAATCA) (Folmer *et al.*, 1994) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอ ต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 μ M ไพรเมอร์ LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 μ M ไพรเมอร์ HCO2198 1 ไมโครลิตร สารละลาย GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยนำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดขั้นตอน และเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้ 1) initial-denaturing 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที 2) denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) (โดยในขั้นตอน 2-4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ) และ 5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ที่อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ผสม RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบ ดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้

2.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA เปรียบเทียบกับ นิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ด้วย การ Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ เก็บบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ไว้ใน



ระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* จากแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และสืบค้นข้อมูลแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นศัตรูพืชด้วยกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม chromas (version, 2.33, Technelysium Pty Ltd, Australia) และ BioEdit เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เริ่มจากการหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่มีความแตกต่างกัน (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ระหว่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงโดยอาศัยโปรแกรม Vector NTI (Invitrogen) (<https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>) โดยเลือกความยาวของไพรเมอร์ที่มีขนาด 18 - 25 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบมาวิเคราะห์ dimer hairpin และ false priming sites ด้วยโปรแกรม Oligo (version 6.0) (DBA Oligo, Inc., USA) และนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มาวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงโดยการ BLAST กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล สังเคราะห์คู่ไพรเมอร์จำนวนสองคู่ไพรเมอร์เพื่อใช้จำแนกแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยเทคนิค PCR

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำไพรเมอร์ที่เหมาะสมมาทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานดังต่อไปนี้

4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการสำรวจในประเทศไทย

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ โดยทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ (laboratory samples) ในระยะไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย

4.3 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ (geographical populations) จากตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่เก็บรวบรวมมาจากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย



4.4 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับตัวอย่างที่พบปนเปื้อนในพืช ผัก และผลไม้ที่พบจากการสุ่มตรวจผัก ผลไม้ (intercepted samples) จากเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชที่มีการส่งออก

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5% ผสม RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคูไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยการทำให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ให้บริสุทธิ์ และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- 2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบให้สอดคล้องกับชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม พ.ศ. 2561 - กันยายน พ.ศ. 2564

สถานที่: 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่าง ๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้

การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ด้วยกับดักถังเปียกซึ่งบรรจุสารล่อเมธิลยูจินอลและคิวลัวร์จาก 6 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ของไทย (Figure 1) พบแมลงวันผลไม้ทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae*,



B. correcta, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *D. longicornis*, *Z. apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* นำตัวอย่างที่ได้มาจำแนกชนิดเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

2. การเตรียมดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490/HCO2198 จากยีน *cox1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส (Figure 2) เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (Table1) และจากข้อมูลที่ถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว แสดงว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นสามารถนำดีเอ็นเอจากวิธีการสกัดดังกล่าวมาทดสอบกับไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *Dacus longicornis*, *Zeugodacus apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* และลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้บางส่วนจากฐานข้อมูลของ GenBank มาเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายกันเพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และตรวจหาค่าตำแหน่ง SNPs ด้วยโปรแกรม Vector NTI (invitrogen) พบตำแหน่ง SNPs ที่มีเฉพาะแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เท่านั้น ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไม่พบในแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ เลือกตำแหน่งดังกล่าวมาออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จำนวน 3 เส้น (Forward 1 เส้น และ Reverse 2 เส้น) โดยพบ Forward ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งเริ่มต้นที่ 85 จำนวน 19 คู่เบส และ Reverse 2 เส้น (Table 1) ได้แก่ R1 บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 204 จำนวน 22 คู่เบส (Figure 3) และ R2 บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 456 จำนวน 25 คู่เบส (Figure 4)

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม Oligo พบว่า % GC ของ Forward เท่ากับ 68.4 มีค่า melting temperature (Tm) อยู่ที่อุณหภูมิ 54.2 และ Reverse primers R1 และ R2 เท่ากับ 45.5 และ 36 ตามลำดับ มีค่า melting temperature (Tm) อยู่ที่อุณหภูมิ 50.3 และ 55.4 องศาเซลเซียส (Figure 5 และ Table 1) ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นไม่สามารถจับกันเป็น dimer ได้



ตั้งชื่อไพรเมอร์ที่ออกแบบ Forward และ Reverse แต่ละเส้นดังนี้

1. ไพรเมอร์คู่ที่หนึ่ง (*Bactrocera correcta* Forward1: Bco-F1 และ *Bactrocera correcta* Reverse: Bco-R1) ดังนั้นไพรเมอร์คู่ที่หนึ่งคือ Bco-F1 และ Bco-R1 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ขนาดประมาณ 141 คู่เบส

2. ไพรเมอร์คู่ที่สอง (*Bactrocera correcta* Forward1: Bco-F1 และ *Bactrocera correcta* Reverse: Bco-R2) ดังนั้นไพรเมอร์คู่ที่สองคือ Bco-F1 และ Bco-R2 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ขนาดประมาณ 396 คู่เบส (Table1)

นำดีเอ็นเอต้นแบบของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ (ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย) ที่ได้จากการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ทั้งสองคู่ (Bco-F1-R1 และ Bco-F1-R2) ด้วยเทคนิค PCR มีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย

| Reagents | Volume (μ l) per reaction |
|--|--------------------------------|
| GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) | 10 |
| forward primer (10 μ M) | 1.0 |
| reverse primer (10 μ M) | 1.0 |
| nuclease-Free Water | 6.0 |
| template | 2.0 |
| final volume | 20.0 μ l |

สภาวะปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมสำหรับจำแนกแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยวิธี PCR ปรับ annealing temperature ที่ 53 สำหรับไพรเมอร์คู่ที่ 1 (Bco-F1-R1) และ 55 องศาเซลเซียส สำหรับไพรเมอร์คู่ที่ 2 (Bco-F1-R2) กำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้

| Step | Temperature ($^{\circ}$ C) | Time | Number of cycles |
|-----------------------|-----------------------------|--------|------------------|
| 1. initial-denaturing | 94 | 4 min | 1 |
| 2. denaturing | 94 | 30 sec | } 35 |
| 3. annealing | 53/55 | 30 sec | |
| 4. extension | 72 | 30 sec | |
| 5. final-extension | 72 | 4 min | 1 |



ตรวจสอบขนาด PCR product ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ ทั้ง 2 คู่ ด้วยวิธีการเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วย 1.5% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และอาศัยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าและประจุไฟฟ้า พบขนาด PCR product ของ Bco-F1 กับ Bco-R1 ขนาด 141 คู่เบส (Figure 6) และ Bco-F1 กับ Bco-R2 ขนาด 396 คู่เบส (Figure 7)

นำ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Macrogen นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์จากไพรเมอร์คู่ที่ 1 (Table 2) และไพรเมอร์คู่ที่ 2 (Table 3) บันทึกในฐานข้อมูล Genbank และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการ Blast พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % (Table 4 และ 5) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบทั้ง 2 คู่ นั้นมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* แต่การบันทึกข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank เพื่อจัดทำ accession number นั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บันทึกลงในฐานข้อมูล Genbank จะต้องมีการตัดส่วนหัวและส่วนท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการซ้อนทับกันของพีค (peak) บนโครมาโทแกรม (Chromatogram) เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง ดังนั้นไพรเมอร์คู่ที่ 1 นั้น จึงมีขนาด 80 คู่เบส และไพรเมอร์คู่ที่ 2 นั้น จึงมีขนาด 330 คู่เบส และนิวคลีโอไทด์ที่สามารถบันทึกในฐานข้อมูล Genbank นั้น ต้องมีขนาดยาวไม่น้อยกว่า 200 คู่เบส ดังนั้นจึงไม่สามารถลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์คู่ที่ 1 ที่ได้ทำการออกลงในฐานข้อมูล Genbank ได้

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

จากคุณสมบัติของไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสม และสามารถนำไปพัฒนาใช้ต่อไป เช่น Real Time polymerase chain reaction หรือ quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) นั้น ไพรเมอร์ที่สามารถนำมาใช้ได้นั้น ควรเป็นไพรเมอร์สั้น ๆ และไม่ควรมีขนาดเกิน 150 คู่เบส (life technologies, 2022) ดังนั้นจึงเลือกไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบคือ Bco-F1 และ Bco-R1 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

การทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *Dacus longicornis*, *Zeugodacus apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งสองคู่ (Bco-F1 และ Bco-R1) และตรวจวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ขนาด 141 คู่เบส ผลการตรวจสอบคู่ไพรเมอร์ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ



แมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ (Figure 8) และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และมีความถูกต้อง 100% แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ (Bco-F1 และ Bco-R1) ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* มีความเหมาะสม สำหรับการนำไปใช้จำแนกชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ออกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

4.2. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ต่อระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ

จากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ Bco-F1 และ Bco-R1 ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยเทคนิค PCR ต่อตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่เลี้ยงจากห้องปฏิบัติการในระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ระยะละ 10 ตัวอย่าง รวมเป็นจำนวน 40 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอขนาด 141 คู่เบส ในทุกระยะการเจริญเติบโต (Figure 9) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบนั้นสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และมีความถูกต้อง 100%

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ (geographical populations)

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบกับตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จาก 6 ภูมิภาคของไทย ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ทำการทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ภูมิภาคละ 50 ตัวอย่าง /ชนิด (รวมทั้งหมด 300 ตัวอย่าง) ผลที่ได้สามารถยืนยันได้ว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากภูมิภาคต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี (Figure 10) และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และมีความถูกต้อง 100%

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับตัวอ่อนที่พบปนเปื้อนในการส่งออก (intercepted samples)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับตัวอ่อนที่พบปนเปื้อนจากการสุ่มตรวจผัก ผลไม้ (intercepted samples) โดยเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช



ทำอากาศยานสุวรรณภูมิ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ชมพู่ ถั่วฝักยาว มะไฟ น้อยหน่า มะม่วง ลิ้นจี่ จำนวน ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง (Figure 11 และ Table 6) นำตัวอย่างหนอนที่ตรวจพบในตัวอย่างพืชชนิดต่าง ๆ มาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* (Bco-F1 กับ Bco-R1) พบแถบดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 141 คู่เบส จากตัวอย่างตัวหนอนที่พบการปนเปื้อนในชมพู่มะม่วงที่ต้องการส่งออกไป ประเทศอังกฤษ และสวิตเซอร์แลนด์ (Figure 12) ยืนยันความถูกต้องโดยการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ให้ผลการตรวจสอบบวกต่อคู่ไพรเมอร์ Bco-F1 และ Bco-R1 วิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม และทำการเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูล GenBank พบความเหมือนที่ 99 - 100% แสดงให้เห็นว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

และจากการนำตัวหนอนที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างบางส่วนมาเลี้ยงไว้เพื่อให้เป็นตัวเต็มวัย และจัด จำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าผลที่ได้จากการจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานนั้น สอดคล้องกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะเจาะจงต่อการ ตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* มีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำไปใช้ในการ ตรวจสอบแมลงวันผลไม้ที่เป็นศัตรูพืชกักกันในพืชผัก และผลไม้ ก่อนการส่งออกไปยังต่างประเทศ

การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* นี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งก่อนหน้านี้ ยูรินทร์ และคณะ (2564) ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง ต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* เป็นครั้งแรกของโลก แต่สำหรับไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* นั้น ประเทศจีนโดย Jiang et al., (2013) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความ เฉพาะเจาะจง และนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ตรวจพบจากชมพู่ที่ ส่งออกไปจากประเทศไทย แต่เมื่อนำมาทดสอบกับแมลงวันฝรั่ง *B. correcta* ที่ได้จากกับดักพีโรโมน และ จากการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตรนั้น พบปัญหาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งต้องมีการ ปรับส่วนผสมและสภาวะปฏิกิริยา PCR ให้มีเหมาะสมที่จะนำมาใช้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ ต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญกับพืชเศรษฐกิจ และมักพบปนเปื้อนไปกับ สินค้าเกษตร ดังนั้นการตรวจจำแนกชนิดด้วยความแม่นยำ ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับของสากลนั้นมีความ จำเป็นอย่างยิ่ง ผลลัพธ์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง



B. correcta ซึ่งใช้เพียงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ทำ PCR และอิเล็กโตรโฟรีซิส เท่านั้น และสามารถตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ทุกระยะการเจริญเติบโต (ไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย) และสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ภายในระยะเวลา 2 – 3 ชั่วโมง ซึ่งในการตรวจวินิจฉัยแบบดั้งเดิมนั้นในการจำแนกชนิดตัวหนอนแมลงวันผลไม้จะต้องใช้ประสบการณ์และความชำนาญของนักอนุกรมวิธาน เนื่องจากจะต้องมีการทำสไลด์ถาวรของตัวหนอน หรือต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้เติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 3 - 4 สัปดาห์ ในการเลี้ยงเพื่อให้เป็นตัวเต็มวัย ก่อให้เกิดผลกระทบต่อ การนำเข้าผักและผลไม้ระหว่างประเทศอีกด้วย

ดังนั้นไพรเมอร์ที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้จึงก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวินิจฉัยชนิดศัตรูพืช งานด้านการกักกันพืช และการส่งออกผักผลไม้ของประเทศไทย เนื่องจากเป็นการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของไทยให้มีความสะดวก รวดเร็ว แม่นยำ และถูกต้องตามมาตรฐานสากล นอกจากนี้ ผลลัพธ์จากงานวิจัยนี้จะเป็นต้นแบบและสามารถนำไปต่อยอดพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทย สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ อีกด้วย อีกทั้งยังสามารถนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไปพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช อย่างเช่น Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), Multiplex PCR, Real-time PCR, Recombinase polymerase amplification (RPA) หรือชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ หรือพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบในภาคสนาม ลดขั้นตอนความยุ่งยาก และมีค่าใช้จ่ายที่ลดน้อยลง ถือเป็นการสร้างและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมของประเทศ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณณัฐมน แก้วนุ้ย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และ ดร. กตัญญู ฑิตตา ดำช่วย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้ให้ความช่วยเหลือ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

ยุวรินทร์ บุญทาบ ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนศิริ จอมสุรางค์ ดวงธิดา และ สิทธิสิโรตม แก้วสวัสดิ์. 2563. การจำแนกชนิดตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด. วารสารวิชาการเกษตร. 38(3): 293-306.



- Aluja, M. and Norrbom, A. 1999. Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior. Crc Press. 846 pp.
- Armstrong, K.F., Cameron, C.M. and E.R., Frampton. 1997. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: a rapid diagnostic technique for quarantine application. *Bull. Entomol. Res.* 87: 111–118.
- Boontop, Y. 2016. *Natural variation and biogeography of the melon fruit fly, Zeugodacus cucurbitae (Diptera: Tephritidae), in Southeast-Asia and the West-Pacific*. Ph.D. Thesis. Queensland University of Technology, Australia.
- Drew, R. A. I. and Romig, M. C. 2013. Tropical Fruit Flies (Tephritidae Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia. CABI.
- Drew, R.A.I. and S, Raghu. 2002. The fruit fly fauna (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the rainforest habitat of the Western Ghats, India. *Raffles Bull. Zool.* 50: 327–352.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology.* 3(5): 294-299.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *In Nucleic Acids Symposium Series,41*, 95-98.
- Jiang, F., Li, Z. H., Deng, Y. L., Wu, J. J., Liu, R. S., and N. Buahom. 2013. Rapid diagnosis of the economically important fruit fly, *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) based on a species-specific barcoding cytochrome oxidase I marker. *Bull. Entomol. Res.* 103(03): 363-371.
- life technologies. 2022. Real-time PCR handbook. Available. **ผิดพลาด! การอ้างอิงไฮเปอร์ลิงก์ไม่ถูกต้อง.** (December 5, 2021)
- Weems, H.W. and T.R. Fasulo. 2011. Guava Fruit Fly, *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Insecta: Diptera: Tephritidae). University of Florida IFAS Extension, EENY200/IN357.
- White, I.M. and Elson-Harris, M.M. 1992. Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics. Wallingford, Oxon, UK, CAB International.



Table 1 Nucleotide of sequences and properties of broad-spectrum primer set used in *Bactrocera correcta* screening in this study primer (primer name, sequences, position, no. of base pair, temperature (Tm), % GC and size of PCR product).

| No. | Primer name | Sequences | Position | No. of base pair | Tm | %GC | Size of PCR product |
|-----|--------------|---------------------------|-----------|------------------|------|------|---------------------|
| 1 | Forward (F1) | CTAGGACACCCCGAGCAC | (85-103) | 19 | 54.2 | 68.4 | 141 |
| 2 | Reverse (R1) | CAGTATTAGGGGACAAGTCAA | (204-225) | 22 | 50.3 | 45.5 | |
| 3 | Reverse (R2) | TCGCATGTTAATAACGGTTGTGATA | (456-480) | 25 | 55.4 | 36 | |

Table 2 Nucleotide sequence analysis the 83 bp DNA fragments from 10 guava fly samples amplified by species-specific primers (Bco-F1 and Bco-R1).

| No. | Scientific name | Nucleotide sequence |
|-----|--------------------|---|
| 1. | <i>B. correcta</i> | GCACATGCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGG TTTGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGA |
| 2. | <i>B. correcta</i> | GCACATGCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGA |
| 3. | <i>B. correcta</i> | GCACATGCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGA |
| 4. | <i>B. correcta</i> | GCGCATGCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGA |
| 5. | <i>B. correcta</i> | GCACATGCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGG TTTGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGA |
| 6. | <i>B. correcta</i> | GCACATGCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGA |
| 7. | <i>B. correcta</i> | GCACATGCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGA |
| 8. | <i>B. correcta</i> | GCACATGCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGA |
| 9. | <i>B. correcta</i> | GCACATGCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGAT TTTGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGA |
| 10. | <i>B. correcta</i> | GCACATGCTTTGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGAT TTTGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGA |



Table 3 Table 2 Nucleotide sequence analysis of the 330 bp DNA fragments from 10 guava fly samples amplified by species-specific primers (Bco-F1 and Bco-F2).

| No. | Scientific name | Nucleotide sequence |
|-----|--------------------|---|
| 1 | <i>B. correcta</i> | TGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAA TTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATAT AGCATTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTA CATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAAC AGTTTACCCTCCCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCAGTTGAT CTAGCTATTTTCTCACTCCACTTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTTATCACAACCGTT |
| 2 | <i>B. correcta</i> | TGTAACAGCGCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAA TTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATAT AGCATTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTA CATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAAC AGTTTACCCTCCCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGAT CTTGCTATTTTCTCACTCCACTTAGCCGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTTATCACAACCGTT |
| 3 | <i>B. correcta</i> | TGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAA TTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATAT AGCATTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTA CGTTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAAC AGTTTACCCTCCCCTATCATCTATTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGAT CTAGCTATTTTCTCACTCCACTTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTTATCACAACCGTT |
| 4 | <i>B. correcta</i> | TGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAA TTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATAT AGCATTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTA CATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAAC AGTTTACCCTCCCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGAT CTAGCTATTTTCTCACTCCACTTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTTATCACAACCGTT |



Table 3 Table 2 Nucleotide sequence analysis of the 330 bp DNA fragments from 10 guava fly samples amplified by species-specific primers (Bco-F1 and Bco-F2).(continue)

| No. | Scientific name | Nucleotide sequence |
|-----|--------------------|--|
| 5 | <i>B. correcta</i> | TGTAACAGCGCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAA TTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATAT AGCATTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCCTTCCCTTA CATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAAC AGTTTACCCTCCCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGAT CTTGCTATTTTCTCACTCCACTTAGCCGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTTATCACAACCGTT |
| 6 | <i>B. correcta</i> | TGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAA TTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATAT AGCATTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCCTTCCCTTA CGTTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAAC AGTTTACCCTCCCCTATCATCTATTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGAT CTAGCTATTTTCTCACTCCACTTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTTATCACAACCGTT |
| 7 | <i>B. correcta</i> | TGTAACAGCGCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAA TTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATAT AGCATTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCCTTCCCTTA CATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAAC AGTTTACCCTCCCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGAT CTTGCTATTTTCTCACTCCACTTAGCCGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTTATCACAACCGTT |
| 8 | <i>B. correcta</i> | TGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAA TTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATAT AGCATTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCCTTCCCTTA CATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAAC AGTTTACCCTCCCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGAT CTAGCTATTTTCTCACTCCACTTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTTATCACAACCGTT |



Table 3 Table 2 Nucleotide sequence analysis of the 330 bp DNA fragments from 10 guava fly samples amplified by species-specific primers (Bco-F1 and Bco-F2). (continue)

| No. | Scientific name | Nucleotide sequence |
|-----|--------------------|---|
| 9 | <i>B. correcta</i> | TGTAACAGCGCATGCTTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAA TTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGTCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATAT AGCATTTCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTA CATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGTTGAAC AGTTTACCCTCCCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGAT CTTGCTATTTTCTCACTCCACTTAGCCGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTTATCACAACCGTT |
| 10 | <i>B. correcta</i> | TGTAACAGCACATGCTTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAA TTGGAGGGTTTGGAAATTGACTTGTCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATAT AGCATTTCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTA CATTACTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGTTGAAC AGTTTACCCTCCCCTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGAT CTAGCTATTTTCTCACTCCACTTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTTATCACAACCGTT |



Table 4 Nucleotide sequence analysis of the 141 bp DNA fragments (Bco-F1 and Bco-F1) from 20 guava fly samples amplified by species-specific primers compared with the GenBank database.

| No. | Guava fly with Acc. no. in GenBank | Voucher specimens | Primer | Samples with Acc. No | %Identity |
|-----|--|----------------------|--------|-------------------------|-----------|
| 1 | N/A | EMBT(SS)0601 | Bco-F1 | MN255894.1 | 100% |
| 2 | N/A | EMBT(SS)0602 | Bco-F1 | MN016975.1 | 100% |
| 3 | N/A | EMBT(SS)0603 | Bco-F1 | MN016974.1 | 100% |
| 4 | N/A | EMBT(SS)0604 | Bco-F1 | MH125331.1 | 100% |
| 5 | N/A | EMBT(SS)0605 | Bco-F1 | MF095191.1 | 100% |
| 6 | N/A | EMBT(SS)0606 | Bco-F1 | MF970799.1 | 100% |
| 7 | N/A | EMBT(SS)0607 | Bco-F1 | MF970794.1 | 100% |
| 8 | N/A | EMBT(SS)0608 | Bco-F1 | MF970791.1 | 100% |
| 9 | N/A | EMBT(SS)0609 | Bco-F1 | KU669692.1 | 100% |
| 10 | N/A | EMBT(SS)0610 | Bco-F1 | KU669315.1 | 100% |
| 11 | N/A | EMBT(SS)0611 | Bco-F1 | KU669308.1 | 100% |
| 12 | N/A | EMBT(SS)0612 | Bco-F1 | KU669300.1 | 100% |
| 13 | N/A | EMBT(SS)0613 | Bco-F1 | KJ879920.1 | 100% |
| 14 | N/A | EMBT(SS)0614 | Bco-F1 | KJ879918.1 | 100% |
| 15 | N/A | EMBT(SS)0615 | Bco-F1 | KJ879899.1 | 100% |
| 16 | N/A | EMBT(SS)0616 | Bco-F1 | KJ879861.1 | 100% |
| 17 | N/A | EMBT(SS)0617 | Bco-F1 | KJ879859.1 | 100% |
| 18 | N/A | EMBT(SS)0618 | Bco-F1 | KJ879823.1 | 100% |
| 19 | N/A | EMBT(SS)0619 | Bco-F1 | KJ879812.1 | 100% |
| 20 | N/A | EMBT(SS)0620 | Bco-F1 | KJ879811.1 | 100% |



Table 5 Nucleotide sequence analysis of the 396 bp DNA fragments (Bco-F1 and Bco-F2) from 20 guava fly samples amplified by species-specific primers compared with the GenBank database.

| No. | Guava fly with Acc. no. in GenBank | Voucher specimens | Primer | Samples with Acc. No | %Identity |
|-----|--|----------------------|--------|-------------------------|-----------|
| 1 | MW715009 | EMBT(SS)0601 | Bco-F2 | MF095192.1 | 100% |
| 2 | MW715010 | EMBT(SS)0602 | Bco-F2 | MF970796.1 | 100% |
| 3 | MW715011 | EMBT(SS)0603 | Bco-F2 | KU669314.1 | 100% |
| 4 | MW715012 | EMBT(SS)0604 | Bco-F2 | KJ879875.1 | 100% |
| 5 | MW715013 | EMBT(SS)0605 | Bco-F2 | MW715009.1 | 100% |
| 6 | MW715014 | EMBT(SS)0606 | Bco-F2 | JX297523.1 | 100% |
| 7 | MW715015 | EMBT(SS)0607 | Bco-F2 | MF095193.1 | 100% |
| 8 | MW715016 | EMBT(SS)0608 | Bco-F2 | MF970798.1 | 100% |
| 9 | MW715017 | EMBT(SS)0609 | Bco-F2 | MF970795.1 | 100% |
| 10 | MW715018 | EMBT(SS)0610 | Bco-F2 | MF970793.1 | 100% |
| 11 | MW821404 | EMBT(SS)0611 | Bco-F2 | KU669297.1 | 100% |
| 12 | MW821405 | EMBT(SS)0612 | Bco-F2 | KJ879886.1 | 100% |
| 13 | MW821406 | EMBT(SS)0613 | Bco-F2 | KJ879885.1 | 100% |
| 14 | MW821407 | EMBT(SS)0614 | Bco-F2 | KJ879819.1 | 100% |
| 15 | MW821408 | EMBT(SS)0615 | Bco-F2 | MW715017.1 | 100% |
| 16 | MW821409 | EMBT(SS)0616 | Bco-F2 | MW715015.1 | 100% |
| 17 | MW821410 | EMBT(SS)0617 | Bco-F2 | MW715013.1 | 100% |
| 18 | MW821411 | EMBT(SS)0618 | Bco-F2 | MW715010.1 | 100% |
| 19 | MW821412 | EMBT(SS)0619 | Bco-F2 | JX297524.1 | 100% |
| 20 | MW821413 | EMBT(SS)0620 | Bco-F2 | DQ116265.1 | 100% |



Table 6 Detection of *Bactrocera correcta* Intercepted using species-specific primer (Bco-F1 and Bco-R1). The details of intercepted fruits, scientific name, exporting country, number of samples, results and scientific name of fruit fly were intercepted at plant quarantine, Suvarnabhumi airport, Bangkok, Thailand.

| Intercepted fruits | Scientific name (Host plants) | Exporting country | No. of samples | Results | Scientific name (Fruit flies) |
|--------------------|----------------------------------|-------------------|----------------|---------|-------------------------------|
| 1 Rose apple | <i>Syzygium samarangense</i> | England | 10 | + | <i>B. correcta</i> |
| 2 Yard long bean | <i>Vigna unguiculata</i> L. | England | 10 | - | <i>Z. cucurbitae</i> |
| 3 Ramble Bambi | <i>Baccaurea ramiflora</i> Lour. | Spain | 10 | - | <i>B. carambolae</i> |
| 4 Custard apple | <i>Annona reticulate</i> L. | China | 10 | - | <i>B. dorsalis</i> |
| 5 Mango | <i>Mangifera indica</i> L. | Switzerland | 10 | + | <i>B. correcta</i> |
| 6 Lychee | <i>Litchi chinensis</i> Sonn | Switzerland | 10 | - | <i>B. dorsalis</i> |
| 7 Custard Apple | <i>Annona reticulate</i> L. | Denmark | 10 | - | <i>B. dorsalis</i> |
| 8 Yard long bean | <i>Vigna unguiculata</i> L. | Switzerland | 10 | - | <i>Z. cucurbitae</i> |
| Total | | | 80 | | |



Figure 1 Locations of sampling sites in the six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) at which fruit flies were collected

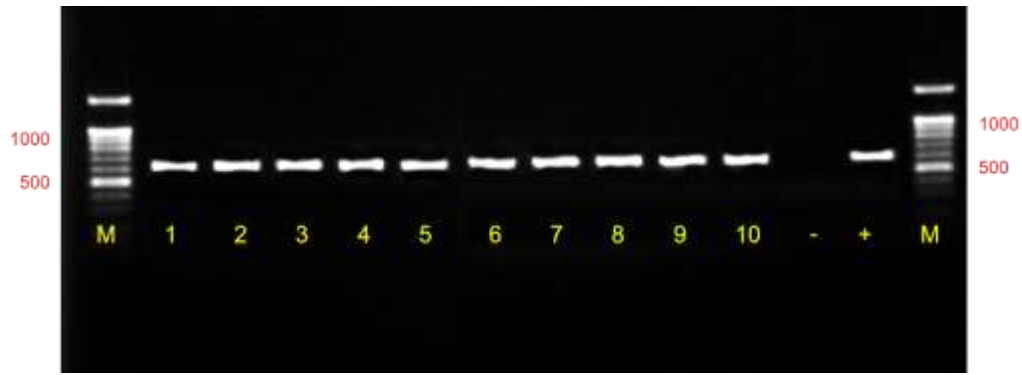


Figure 2 PCR results using the *cox1* (LCO1490/HCO2198) universal primer pair.

Lane 1 = *B. carambolae* Lane 2 = *B. dorsalis* Lane 3 = *B. latifrons*
 Lane 4 = *B. umbrosa* Lane 5 = *B. correcta* Lane 6 = *D. longicornis*
 Lane 7 = *Z. caudatus* Lane 8 = *Z. apicalis* Lane 9 = *Z. cilifer*
 Lane 10 = *Z. tau* Lane 11 = Negative (ddH₂O)
 Lane 12 = Positive (*B. correcta*)

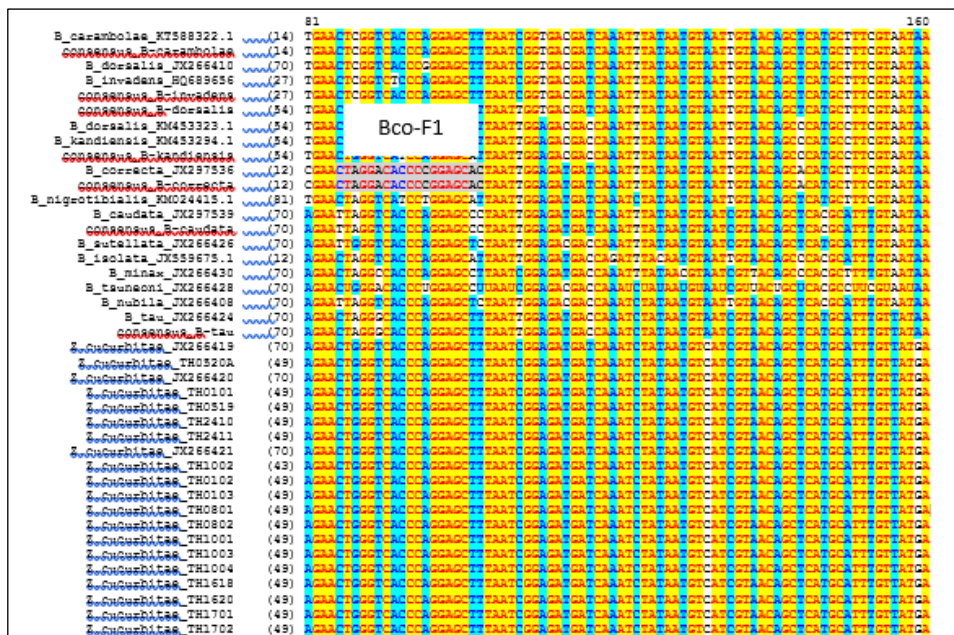


Figure 3 Alignment of the nucleotide sequence regions of *cox1* gene on fruit flies. Consensus sequences were used to design broad-spectrum primers for *Bactrocera correcta*. Nucleotide sequences of Bco-F1 primers are highlighted

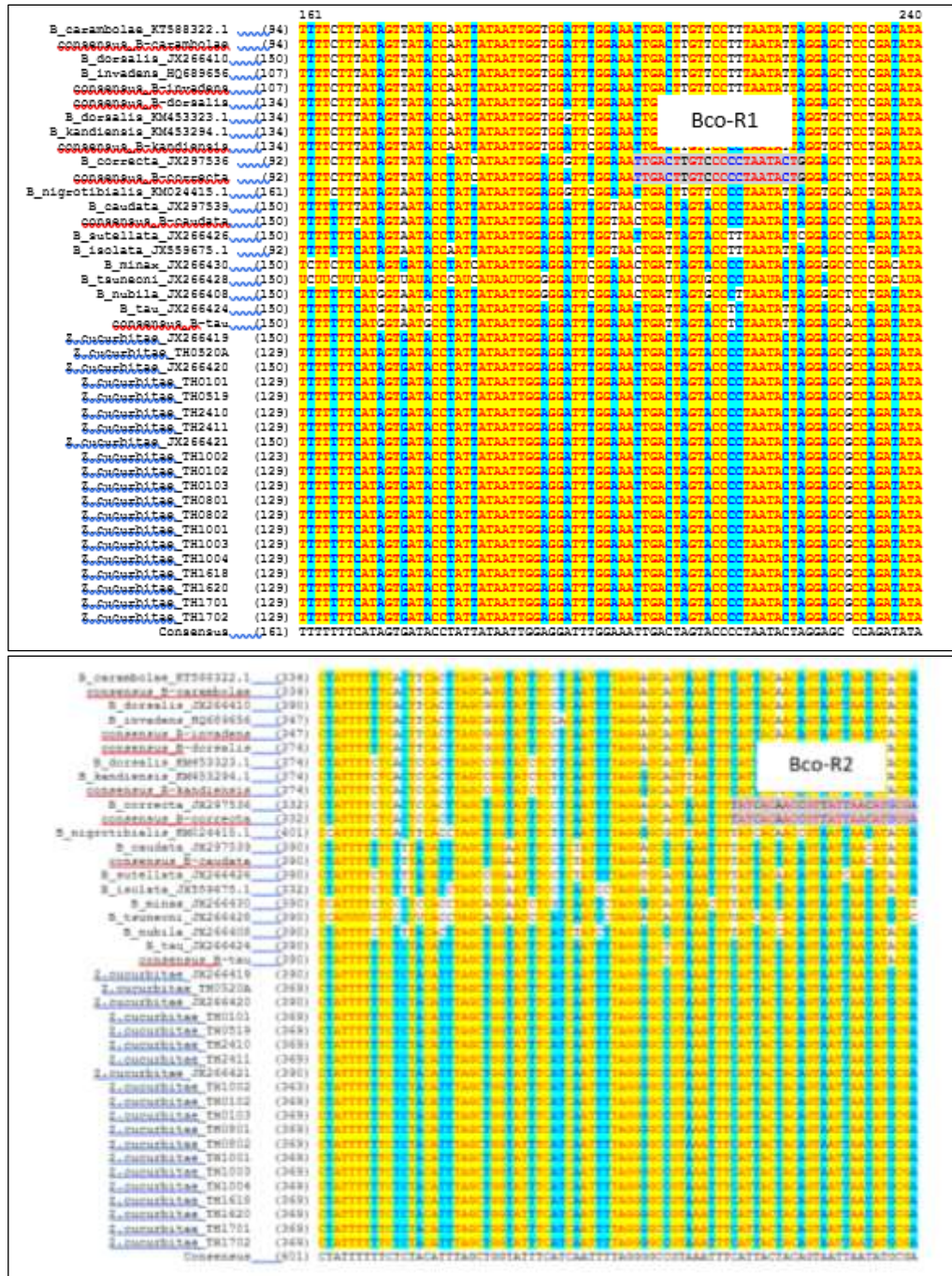
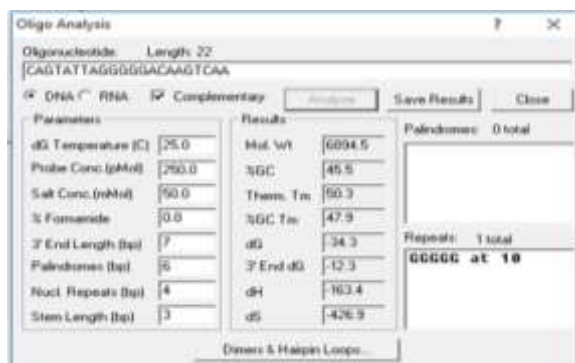


Figure 4 Alignment of the nucleotide sequence regions of *cox1* gene on fruit flies. Consensus sequences were used to design broad-spectrum primers for *Bactrocera correcta*. Nucleotide sequences of Bco-R1 and Bco-R2 primers are highlighted





(A)



(B)



(C)

Figure 5 Species specific primer of *Bactrocera correcta* from Oligo programme.

(A) Forward (F1): CTAGGACACCCCGGAGCAC (85-103)

(B) Reverse (R1): CAGTATTAGGGGGACAAGTCAA (204-225)

(C) Reverse (R2): TCGCATGTTAATAACGGTTGTGATA (456-480)

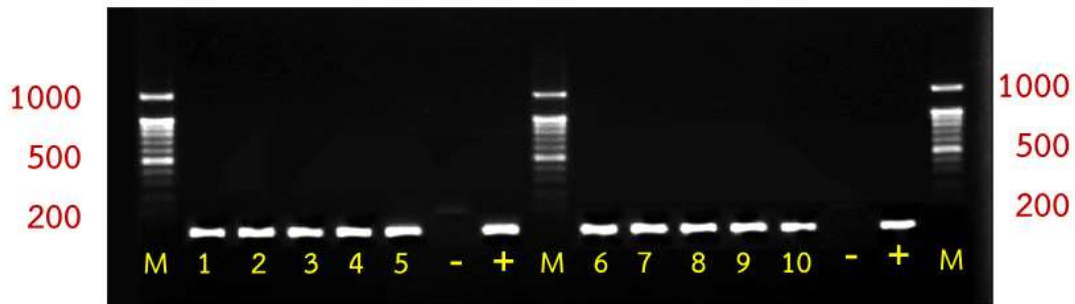


Figure 6 DNA from all stage of *Bactrocera correcta* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *B. correcta* -specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1. Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker.

Lane 1 - 2 = eggs

Lane 3 - 5 = larvae

Lane 6 - 7 = pupae

Lane 8 - 10 = adults

Lane - = Negative (ddH₂O) Lane + = Positive (*B. correcta*)

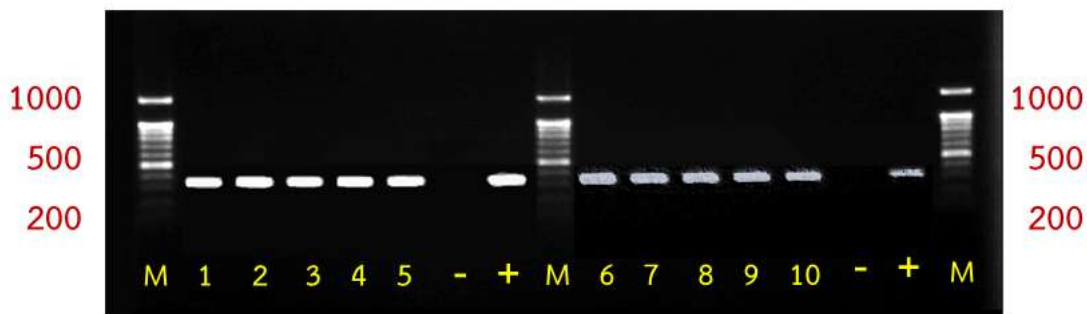


Figure 7 DNA from all stage of *Bactrocera correcta* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *B. correcta* -specific primer pair Bco-F1 and Bco-R2. Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker.

Lane 1 - 2 = eggs

Lane 3 - 5 = larvae

Lane 6 - 7 = pupae

Lane 8 - 10 = adults

Lane - = Negative (ddH₂O) Lane + = Positive (*B. correcta*)

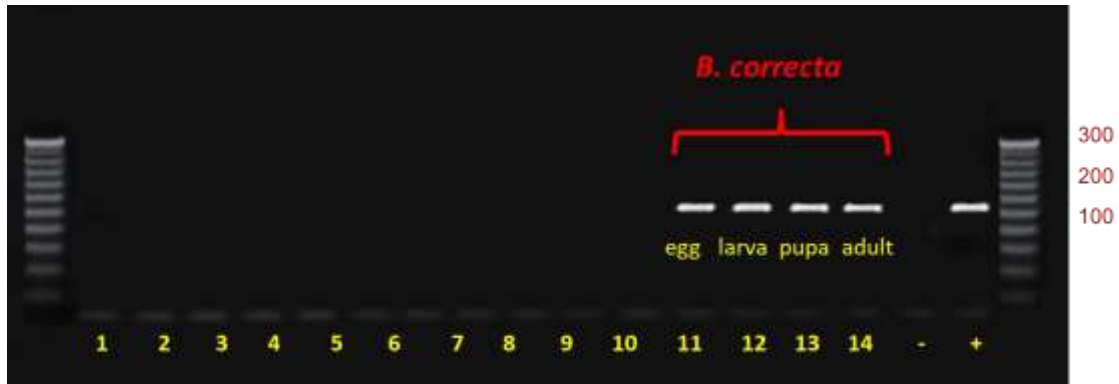


Figure 8 Specificity testing of the *Bactrocera correcta* -specific primer pair (Bco-F1 and Bco-R1).

Lane 1 = *B. carambolae* Lane 2 = *B. dorsalis* Lane 3 = *B. Latifrons*
 Lane 4 = *B. umbrosa* Lane 5 = *D. longicornis* Lane 6 = *Z. apicalis*
 Lane 7 = *Z. caudatus* Lane 8 = *Z. cucurbitae* Lane 9 = *Z. cilifer*
 Lane 10 = *Z. tau* Lane 11-14 = *B. correcta*
 Lane 15 = Negative (ddH₂O) Lane 16 = Positive (*B. correcta*)

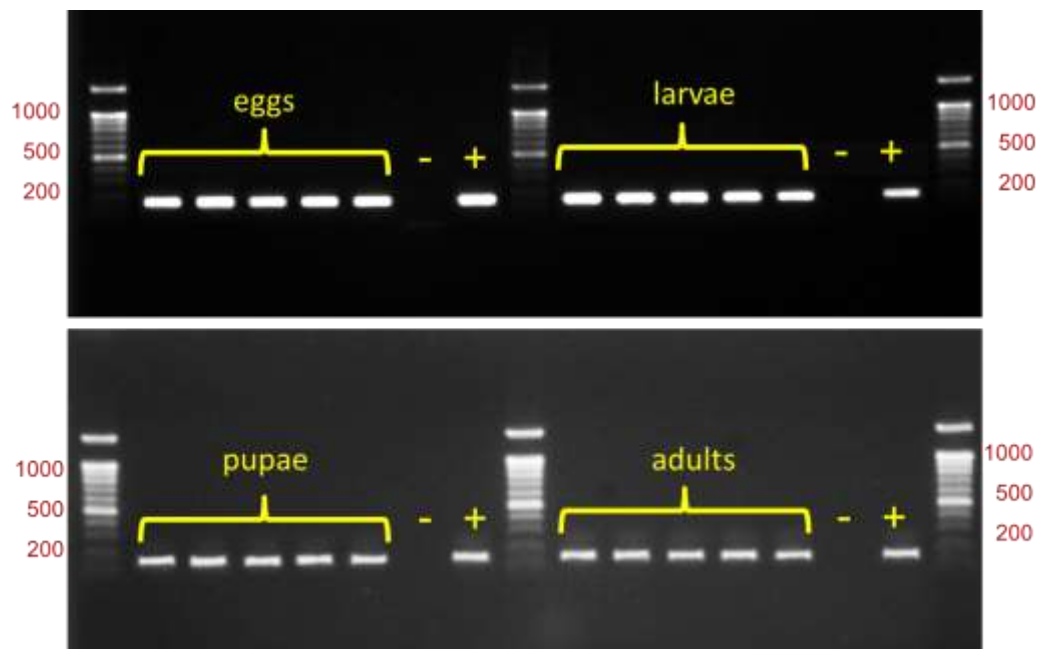


Figure 9 DNA from all stage of *Bactrocera correcta* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *B. correcta* -specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1. Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker

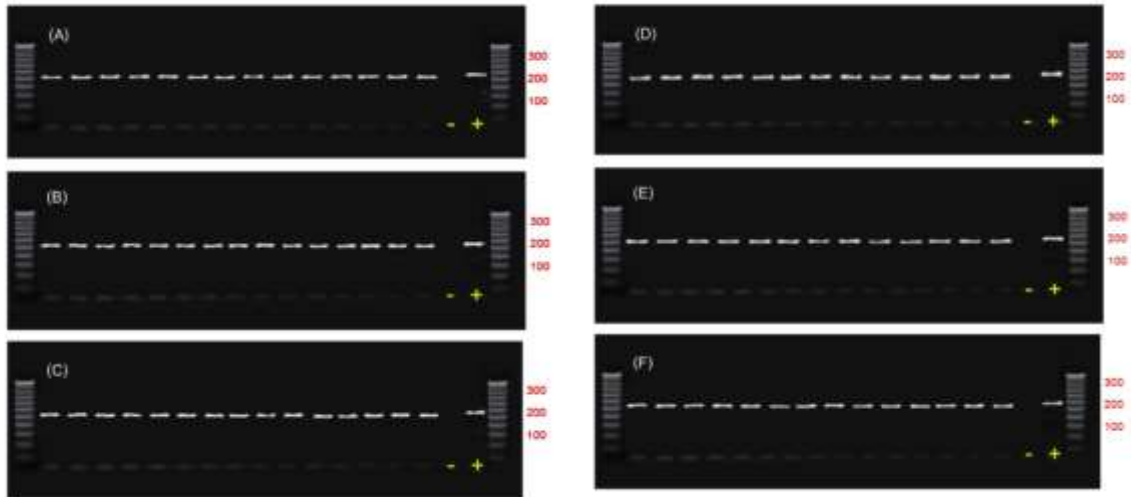


Figure 10 DNA of *Bactrocera correcta* from six Thai biogeographical regions (A=North, B=Central, C=South, E=West, F=Northeast and G=East) was amplified using the *B. correcta* -specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1. Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker



Figure 11 Fruit fly larvae were intercepted by plant inspections at Suvarnabhumi airport of agricultural products destined for export from Thailand

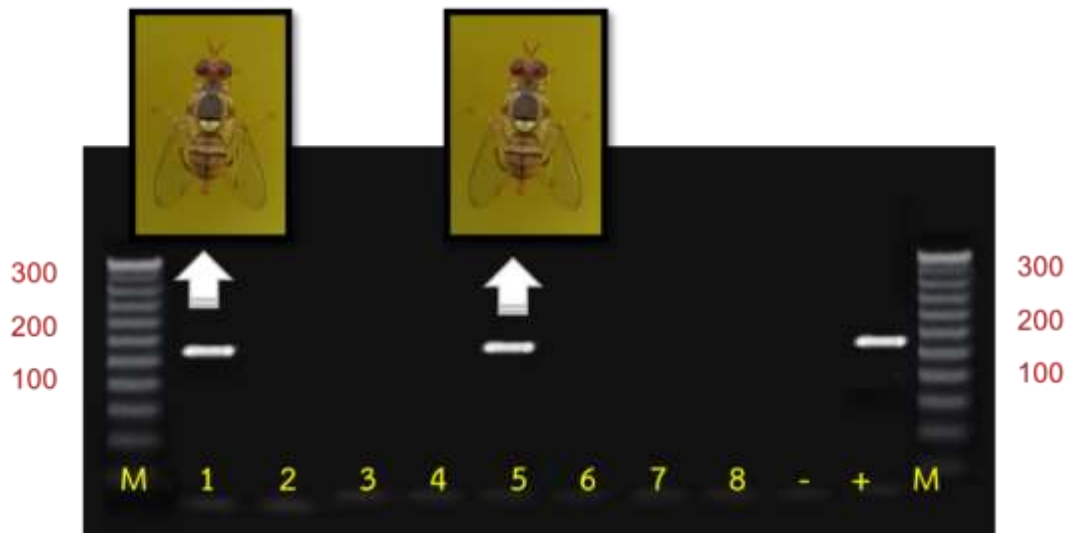


Figure 12 DNA from unknown larvae species was amplified using the *Bactrocera correcta* specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1.

Lanes 1- 8: intercepted fruit fly larvae.

Lane 9: negative (ddH₂O)

Lane 10: *B. correcta* positive control sample.

Lane M: D2000 Marker

การใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii*
 Multiplex PCR for Simultaneous Detection of *Meloidogyne incognita*,
M. javanica, *M. arenaria* and *M. enterolobii*

ไตรเดช ช่ายทอง อังคณา พวงเงินมาก ธิติยา สารพัฒน์
 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Development of multiplex PCR for the detection of 4 important root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* and *M. enterolobii* was carried out at Nematology Section, Plant Pathology Group, Plant Protection Research and Development Office during 2020-2021. Soil samples were collected from 60 fields in the northern part of Thailand and Ubon Ratchathani Province. Tomato seedlings were planted in the soil sample in which root-knot nematodes were found to increase nematode number and subsequently pure nematode population were prepared by rearing from single eggmass. Root-knot nematodes population from 21 soil samples were identified as *M. incognita* and *M. javanica* based on morphology of perineal patterns and PCR using specific primers. There was no *M. arenaria* found in all soil samples, therefore *M. arenaria* is not available for multiplex PCR experiment. *M. enterolobii* populations were obtained from culture collection. Optimum multiplex PCR condition was determined using specific primer sets for *M. incognita*, *M. javanica* and *M. enterolobii* including *Meloidogyne* universal primers and the expected PCR product size were obtained. The developed multiplex PCR technique can detect *M. incognita*, *M. javanica* and *M. enterolobii* in one reaction with high accuracy even in the DNA extracted from root gall.

Keywords : plant parasitic nematode, root knot disease, plant pest detection, molecular techniques

รหัสสารทดลอง 03-31-60-01-02-00-16-63



บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้เทคนิค multiplex PCR มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่สำคัญ 4 ชนิดในคราวเดียว คือ *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* ดำเนินการที่กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ในปี พ.ศ. 2563-2564 โดยเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ภาคเหนือ และจังหวัดอุบลราชธานี รวม 60 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ด้วยวิธี Decanting and Sieving with Baermann's tray ตรวจหาตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยปลุกมะเขือเทศลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบตัวอ่อน เพื่อให้ตัวอ่อนระยะที่สองที่อยู่ในดินเข้าทำลายรากและเจริญเติบโตสร้างกลุ่มไข่ จากนั้นเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมโดยเริ่มจาก 1 กลุ่มไข่เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกจากตัวอย่างดิน 21 ตัวอย่าง โดยใช้ลักษณะรูปร่างส่วนกัน พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* *M. javanica* จากนั้นตรวจสอบยืนยันด้วยวิธี PCR โดยใช้คูไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 2 ชนิดพบว่าได้ผลตรงกับการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา จากการเก็บตัวอย่างดินไม่พบไส้เดือนฝอยรากปม *M. arenaria* และไม่มีไส้เดือนฝอยรากปมชนิดนี้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของกลุ่มงานไส้เดือนฝอย จึงไม่สามารถทำการทดสอบไส้เดือนฝอยรากปมชนิดนี้ได้ สำหรับไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ใช้ประชากรไส้เดือนฝอยจากงานเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของกลุ่มงานไส้เดือนฝอย ทดสอบหาสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR โดยเลือกใช้คูไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมและเฉพาะเจาะจงต่อชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* พบว่าเทคนิค multiplex PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดตรงตามเป้าหมาย และสามารถจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ได้ในการทำปฏิกิริยาคั้งเดียว มีความแม่นยำในการตรวจ และพบที่สามารถตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืชได้

คำหลัก : ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช โรครากปม การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช เทคนิคอณูชีววิทยา

คำนำ

โรครากปมทำความเสียหายต่อพืชหลายชนิดในประเทศไทย ไส้เดือนฝอยรากปมชนิดสำคัญที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในประเทศไทยคือ *Meloidogyne incognita* และ *M. javanica* โดยพบว่าไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* แพร่ระบาดทำความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจหลายชนิด การสำรวจทั่วภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และบางส่วนของภาคเหนือ พบไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* เข้าทำลายพืชต่าง ๆ มากถึง 60 ชนิด (สืบศักดิ์, 2538) ไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานการพบในประเทศไทยคือ *M. arenaria*, *M. exigua*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. microcephala* และ *M. naasi* (สืบศักดิ์, 2538) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบไส้เดือนฝอยราก



ปม *M. enterolobii* ในสวนฝรั่ง จ. นครปฐม ในปี พ.ศ. 2555 ซึ่งตรวจยืนยันโดยใช้ esterase phenotype และ PCR ในยีนส่วนไมโทคอนเดรีย (Jindapunnapat, 2012) ซึ่งไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* เป็นไส้เดือนฝอยที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงมาก (highly virulent and pathogenic) สามารถเข้าทำลายพืชที่มีความต้านทานต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้ หลายประเทศให้ความสำคัญต่อไส้เดือนฝอยรากปมชนิดนี้ รวมทั้งสหภาพยุโรปที่ได้บรรจุไส้เดือนฝอยรากปมชนิดนี้ในบัญชีรายชื่อศัตรูพืชควบคุมประเภท A2 (ศัตรูพืชที่พบในอาณาเขตของสหภาพยุโรป) การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมให้ถูกต้องมีความสำคัญต่อการวางแผนการป้องกันกำจัด อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้สัณฐานวิทยาทำได้ยาก เนื่องจากลักษณะบางอย่างของไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังมีความแปรปรวนของลักษณะต่าง ๆ ภายในประชากรของไส้เดือนฝอยชนิดเดียวกันอีกด้วย จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยามาช่วยในการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ เทคนิค Multiplex PCR ได้มีการนำมาใช้ตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปมหลายชนิดพร้อม ๆ กัน แต่ยังไม่มียางานการใช้เทคนิคนี้ในประเทศไทย รวมทั้งยังไม่มีรายงานการใช้ตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* and *M. enterolobii* พร้อม ๆ กัน จึงควรมีการนำเทคนิค Multiplex PCR มาพัฒนาเพื่อใช้ตรวจไส้เดือนฝอยรากปมที่สำคัญทั้ง 4 ชนิดของประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องปั่นเหวี่ยง สไลด์ กระจกปิด สไลด์ ถ้วยนับตัวอย่าง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องอเล็กโตรโพรีซิส microcentrifuge tube, PCR tube, pipette tip, ชุด kit สำหรับสกัดดีเอ็นเอ, agarose gel, gel star, PCR buffer, PCR mix

วิธีการ

เตรียมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* สำหรับการทดสอบ

ประชากรไส้เดือนฝอยรากปม 4 ชนิด คือ *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* ที่ใช้ในการทดลองบางส่วนจะนำมาจากงานเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ของกรมวิชาการเกษตร และการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากพื้นที่เพาะปลูกที่มีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม

การเก็บตัวอย่างดิน และรากพืช

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชที่มีรายงานว่า เป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยรากปม โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตรโดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดิน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว คลุกเคล้าเข้าด้วยกันให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ และชนิดพืชปลูก รวมทั้งเก็บตัวอย่างราก หรือส่วนของพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมหากพบในพื้นที่

การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและพืช

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน 250 กรัมโดยวิธีการกวนตัวอย่างดินในน้ำสะอาด และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แยกไส้เดือนฝอยรากปมจากพืช โดยการคีบกลุ่มไข่จากรากหรือส่วนของพืชโดยตรง

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม และเตรียมประชากรไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาที่อายุ 1 เดือนปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมในกระถาง หลังจากนั้น 45 วัน ล้างรากมะเขือเทศด้วยน้ำสะอาด เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยใช้ปากคีบๆ กลุ่มไข่ 1 กลุ่มแช่ในน้ำสะอาดในถ้วยนับตัวอย่าง ตรวจดูการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์ หากเป็นตัวอย่างรากที่มีกลุ่มไข่ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่มาแช่ในน้ำกลั่น ตรวจดูการฟักของตัวอ่อนระยะที่สอง แล้วนำไปเทใส่ในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบฆ่าเชื้อ เตรียมตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยคีบกลุ่มไข่วางลงบนตะแกรงไนลอนที่แช่อยู่ในน้ำสะอาดในจานเลี้ยงเชื้อ ได้ตัวอ่อนระยะที่สองในน้ำสะอาดสำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอ

การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานโดยเปรียบเทียบลักษณะรูปร่างของส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพสเมีย (perineal patterns) เปรียบเทียบลักษณะ ความกว้างยาวและสัดส่วนของอวัยวะต่าง ๆ ของไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สองประกอบในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะรูปร่างส่วนก้นในการจำแนกได้ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากตำราและรายงานตีพิมพ์

จำแนกตัวอ่อนระยะที่สองด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา โดยใช้ Molecular Diagnostic Key ที่จัดทำขึ้นโดย Adam *et al.* (2007) การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ตามเอกสารที่แนบมากับผลิตภัณฑ์

เชื้อใส่เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตรบนสไลด์แก้ว ตัดตัวใส่เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช้ส่วนปลายของ pipette tip ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ใน อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟชนิด 750 วัตต์ นาน 6 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Adam *et al.* (2007)

ทดสอบคู่ไพรเมอร์ต่าง ๆ และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR ในการตรวจสอบใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii*

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR

ทดสอบคู่ไพรเมอร์ต่าง ๆ ตามตารางที่ 1 กับตัวอย่างใส่เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด และทดสอบหาสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR โดยการปรับองค์ประกอบและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา จำนวนรอบของปฏิกิริยา ปรับ annealing temperature ในช่วง 58-66°C โดยเพิ่มขึ้นทีละ 1°C และแต่ละ annealing temperature ปรับ extension time 30, 60, 90 และ 120 วินาที ปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ในช่วง 0.02-0.4 M และ dNTP 0.02, 0.06, 0.1, 0.2 0.3, 0.4 และ 0.5 mM (Hu *et al.*, 2011)

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ multiplex PCR ในการตรวจสอบใส่เดือนฝอยรากปม 4 ชนิด

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างระยะที่สองของใส่เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* ชนิดละอย่างน้อย 5 ไอโซเลต ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ multiplex PCR ที่ได้

ทดสอบความสามารถในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืช

ปลูกเชื้อต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่พยายุ 1 เดือน ที่ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตรบรรจุดินอบฆ่าเชื้อ ด้วยตัวอย่างใส่เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 จำนวน 200 ตัวต่อกระถาง โดยใช้ใส่เดือนฝอยรากปมทั้ง 4 ชนิด และใช้การปลูกเชื้อโดยใช้น้ำเปล่าเป็นวิธีการเปรียบเทียบ สกัดดีเอ็นเอจากปมรากมะเขือเทศ 15 20 และ 30 วันหลังปลูกเชื้อ 10 ปมต่อราก ของต้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื้อด้วยใส่เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด สำหรับวิธีการที่ปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า จะตัดชิ้นส่วนรากมาสกัดดีเอ็นเอ ตรวจสอบตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย multiplex PCR

การบันทึกข้อมูล

ผลการจำแนกชนิดใส่เดือนฝอยรากปมทั้งทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมและความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยา multiplex PCR ผลการตรวจปมรากพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของใส่เดือนฝอยรากปมชนิดต่าง ๆ

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

- เปรียบเทียบผลขององค์ประกอบและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา จำนวนรอบของปฏิกิริยา annealing temperature, extension time และ dNTP
- เปรียบเทียบผลการตรวจไล่เดือนฝอยรากปมชนิดต่าง ๆ ด้วย multiplex PCR
- เปรียบเทียบผลการตรวจปมรากพืชที่ระยะเวลาต่าง ๆ ด้วย multiplex PCR

เวลาและสถานที่

| | |
|---------|--|
| เวลา | เริ่มต้น ตุลาคม 2563 สิ้นสุด กันยายน 2564 |
| สถานที่ | ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไล่เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร |

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เตรียมไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* สำหรับการทดสอบ

เลี้ยงเพิ่มปริมาณไล่เดือนฝอยรากปมจากประชากรไล่เดือนฝอยที่เก็บรักษาไว้ ในงานเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมไล่เดือนฝอยศัตรูพืช เก็บตัวอย่างดินเพิ่มเติมจากพื้นที่ภาคเหนือ และจังหวัดอุบลราชธานีรวม 60 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) แยกไล่เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ตรวจสอบตัวอย่างไล่เดือนฝอยรากปม เลี้ยงเพิ่มปริมาณไล่เดือนฝอยรากปม โดยปลูกมะเขือเทศลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบตัวอย่างไล่เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ตัวอย่างที่อยู่ในดินเข้ารากและเจริญเติบโตสร้างกลุ่มไข่ จากนั้นเลี้ยงไล่เดือนฝอยรากปมโดยเริ่มจาก 1 กลุ่มไข่ เพื่อให้ได้ประชากรไล่เดือนฝอยรากปมที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบชนิดไล่เดือนฝอยรากปมที่แยกจากตัวอย่างดิน 21 ตัวอย่าง โดยใช้ลักษณะรูปร่างส่วนกัน พบว่าเป็นไล่เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* ทดสอบคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไล่เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิดพบว่าได้ผลตรงกับการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา จากการเก็บตัวอย่างดินไม่พบไล่เดือนฝอยรากปม *M. arenaria* และ *M. enterolobii* จึงไม่มีไล่เดือนฝอยรากปม *M. arenaria* สำหรับใช้ในการทดลอง ส่วน *M. enterolobii* ใช้ประชากรไล่เดือนฝอยจากการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไล่เดือนฝอยสาเหตุโรคพืชของกลุ่มงานไล่เดือนฝอยสำหรับทดลอง

ทดสอบคู่ไพรเมอร์ต่าง ๆ และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR ในการตรวจสอบไล่เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii*

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR โดยเลือกใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมและเฉพาะเจาะจงต่อชนิดไล่เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ร่วมกับคู่ universal primer MF 5'-GGGGATGTTTGGAGGCAGATTTG-3' และ MR 5'-AACCGCTTCGGACTTCCACAG-3' ซึ่งเป็นคู่ไพรเมอร์ internal control สำหรับตรวจไล่เดือน

ฝอยรากปม (ตารางที่ 2) ทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR โดยปรับองค์ประกอบและปริมาณของ สารเคมีที่ใช้การทำปฏิกิริยาให้มีปริมาตรรวม 35 μ l โดยใช้คูไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด จำนวน 5 คู่ (ตารางที่ 2) ปรับความเข้มข้นของแต่ละคูไพรเมอร์ในช่วง 0.02-0.4 mM, ความเข้มข้น ของ $MgCl_2$ 1.5, 1.8, 2.0, 2.5 และ 3.0 mM, ความเข้มข้นของ dNTPs 0.06, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mM จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเตรียมปฏิกิริยา (ตารางที่ 3) หาสถานะของปฏิกิริยาที่ เหมาะสมโดยการปรับอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของปฏิกิริยา โดยปรับ annealing temperature ในช่วง 58-66°C โดยเพิ่มขึ้นทีละ 1°C และแต่ละ annealing temperature ปรับ extension time 30, 60, 90 และ 120 วินาที พบว่าการใช้ denature temperature 94°C เวลา 1 นาที annealing temperature 64°C เวลา 30 วินาที และ extension temperature 68°C เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ เป็นสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา multiplex PCR (ตารางที่ 4)

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ multiplex PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม 4 ชนิด

จากการทดสอบสถานะปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ได้ ในการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดตรงตามเป้าหมาย และสามารถจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ได้ในการทำปฏิกิริยาคั้งเดียว (ภาพที่ 1) การทดสอบการตรวจตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ชนิดละ 5 ไอโซเลต โดยใช้ดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ เป็น negative control พบว่าเทคนิค multiplex PCR มีความแม่นยำในการตรวจ (ภาพที่ 2)

ทดสอบความสามารถในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืช

การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืช ที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยแต่ละชนิด คือ *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* สกัดดีเอ็นเอจากปมรากมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด ที่ 15 20 และ 30 วันหลังปลูกเชื้อ ชนิดละ 10 ปม นำไปตรวจด้วยวิธี multiplex PCR พบว่าสามารถตรวจสอบไส้เดือนฝอยทุกชนิดทุกช่วงเวลาได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เทคนิค multiplex PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดตรงตามเป้าหมาย และสามารถจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ได้ในการทำปฏิกิริยาคั้งเดียว มีความจำเพาะเจาะจงและแม่นยำในการตรวจ และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืชได้

เอกสารอ้างอิง

- บัญชา ชินศรี. 2553. การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ในแหล่งปลูกพริกทางเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคอณูชีวโมเลกุล. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2538. *ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย*. สำนักพิมพ์รั้วเขียว กรุงเทพฯ. 275 หน้า.
- Adam, M.A.M., M.S. Phillips and V.C. Blok. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*. 56: 190-197.
- Castagnone-Sereno, P.2012. *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*): profile of an emerging, highly pathogenic, root-knot nematode species. *Nematology*. 14: 133-138.
- Elling, A. 2013. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. *Phytopathology*. 103: 1092-1102.
- Esbenshade, P.R., and A.C. Triantaphyllou. 1990. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*. 22: 10-5.
- Harris, T.S., L.J. Sandal., and T.O. Powers. 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. *Journal of Nematology*. 22: 518-24.
- Hu, M.X., K., Zhuo, and J.L. Liao. 2011. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls. *Phytopathology*. 101: 1270-1277.
- Hunt, D.J., and Z.A. Handoo. 2009. Taxonomy, identification and principal species. pp. 55-97. In : Perry RN, Moens M & Starr JL., eds. *Root-Knot Nematodes*. CAB International, Wallingford (UK).
- Jindapunnapat, K. 2012. *Development of the molecular markers for species identification of Root-Knot Nematode infesting guava in Thailand*. Master of Science (Plant Pathology), Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University.
- Karssen G, J. Liao,Z. Kan, E.Y. van Heese, and L.J. den Nijs. 2012. On the species status of the root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* Rammah & Hirschmann, 1988. *ZooKeys*. 77: 67-77.

- Kiewnick, S., M. Dessimoz, and L. Franck. 2009. Effects of the Mi-1 and the N root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. *Journal of Nematology*. 41: 134-139.
- Kiewnick S, S., Wolf, M. Willareth, and J.E. Frey. 2013. Identification of the tropical root-knot nematode species *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using a multiplex PCR assay. *Nematology*. 15: 891-894.
- Meng, Q.P., H. Long, and J.H. Xu. 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica*. 34: 204-210.
- Powers, T.O., and T.S. Harris. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* spp. *Journal of Nematology*. 25: 1-6.
- Randig, O., F. Leroy, M. Bongiovanni, and P. Castagnone-Sereno. 2001. RAPD characterization of single females of the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *European Journal of Plant Pathology*. 107: 639-43.
- Williamson, V.M., E.P. Caswell-Chen, B.B. Westerdahl, F.F. Wu, and G. Caryl, 1997. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Journal of Nematology*. 29: 9-15.
- Zijlstra, C., D.T.H.M. Donkers-Venne, and M. Fargette. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology*. 2: 847-53.



Table 1 Root-knot nematodes detected in soil samples.

| No. | Plant | N | E | Root-knot nematode detection | Root-knot nematode species |
|-----|---------------|-------------|-------------|------------------------------|---|
| 1 | chili | 15.4325 | 104.8208333 | present | <i>M. javanica</i> |
| 2 | chili | 15.43194444 | 104.8213889 | present | <i>M. javanica</i> |
| 3 | chili | 15.41361111 | 104.7869444 | not present | - |
| 4 | chili | 15.43 | 104.8208333 | not present | - |
| 5 | chili | 15.42972222 | 104.8208333 | not present | - |
| 6 | chili | 15.435 | 104.8186111 | present | <i>M. javanica</i> |
| 7 | mulberry | 15.435 | 104.8186111 | present | <i>M. incognita</i> <i>M. javanica</i> |
| 8 | mulberry | 15.1475 | 104.9008333 | present | <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> |
| 9 | mulberry | 15.14777778 | 104.9008333 | present | <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> |
| 10 | celery | 15.14777778 | 104.9008333 | present | <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> |
| 11 | white mugwort | 15.1475 | 104.9011111 | present | <i>M. javanica</i> |
| 12 | tomato | 15.1475 | 104.9011111 | present | <i>M. javanica</i> |
| 13 | green oak | 15.1475 | 104.9011111 | not present | - |
| 14 | chili | 15.14777778 | 104.9011111 | not present | - |
| 15 | green oak | 15.14777778 | 104.9011111 | present | <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> |
| 16 | green oak | 15.24527778 | 104.9936111 | not present | - |
| 17 | eggplant | 15.24527778 | 104.9933333 | not present | - |
| 18 | chili | 15.00222222 | 104.7877778 | present | <i>M. javanica</i> |
| 19 | chili | 15.00194444 | 104.7883333 | not present | - |
| 20 | stink weed | 15.00166667 | 104.7880556 | present | <i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i> |
| 21 | grass | 15.00694444 | 104.7844444 | not present | - |
| 22 | chili | 15.00111111 | 104.7855556 | not present | - |
| 23 | green oak | 14.99722222 | 104.7938889 | present | <i>M. incognita</i> |
| 24 | mulberry | 14.99722222 | 104.7947222 | present | <i>M. incognita</i> |
| 25 | chili | 15.22 | 104.9341667 | present | <i>M. incognita</i> |
| 26 | rice | 15.21972222 | 104.9344444 | not present | - |
| 27 | rice | 15.08277778 | 104.5361111 | not present | - |
| 28 | chili | 15.06527778 | 104.5422222 | not present | - |
| 29 | chili | 15.07138889 | 104.5494444 | present | <i>M. incognita</i> |
| 30 | chili | 15.15944444 | 104.5813889 | not present | - |
| 31 | chili | 15.21527778 | 104.5372222 | not present | - |
| 32 | chili | 15.21555556 | 104.5388889 | not present | - |
| 33 | chili | 15.21527778 | 104.5394444 | not present | - |
| 34 | chili | 15.21666667 | 104.5494444 | not present | - |
| 35 | chili | 15.21 | 104.5380556 | not present | - |
| 36 | rice | 14.92666667 | 104.3486111 | not present | - |



Table 1 Root-knot nematodes detected in soil samples. (continue)

| No. | Plant | N | E | Root-knot nematode detection | Root-knot nematode species |
|-----|----------|-------------|-------------|------------------------------|----------------------------|
| 37 | chili | 14.92666667 | 104.3488889 | not present | - |
| 38 | Chili | 14.96916667 | 104.2469444 | not present | - |
| 39 | chili | 14.92166667 | 104.2002778 | not present | - |
| 40 | tobacco | 20.22777778 | 99.895 | not present | - |
| 41 | tobacco | 20.23111111 | 99.85666667 | present | <i>M. javanica</i> |
| 42 | chili | 20.23111111 | 99.89833333 | present | <i>M. javanica</i> |
| 43 | tobacco | 20.23138889 | 99.89861111 | present | <i>M. incognita</i> |
| 44 | guava | 20.23166667 | 99.89888889 | not present | - |
| 45 | cucumber | 20.23138889 | 99.89916667 | not present | - |
| 46 | banana | 20.27972222 | 99.9575 | not present | - |
| 47 | banana | 20.18777778 | 100.0358333 | not present | - |
| 48 | banana | 20.18722222 | 100.0327778 | not present | - |
| 49 | banana | 20.16194444 | 99.97944444 | not present | - |
| 50 | banana | 19.73194444 | 99.62472222 | present | <i>M. incognita</i> |
| 51 | banana | 19.43972222 | 99.50138889 | not present | - |
| 52 | banana | 19.30888889 | 99.41805556 | not present | - |
| 53 | banana | 19.37722222 | 99.17166667 | not present | - |
| 54 | banana | 19.37138889 | 99.17805556 | not present | - |
| 55 | chili | 19.36694444 | 99.18333333 | not present | - |
| 56 | tobacco | 19.36666667 | 99.18611111 | not present | - |
| 57 | banana | 19.13611111 | 99.16527778 | present | <i>M. incognita</i> |
| 58 | banana | 19.09138889 | 99.00027778 | not present | - |
| 59 | banana | 19.02055556 | 98.98055556 | not present | - |
| 60 | chili | 19.0175 | 98.98222222 | not present | - |

Table 2 Primers used in the experiment.

| Species | Sequence of primers | Size | References |
|--|---|---------|-------------------------------|
| <i>Meloidogyne</i> spp. (universal primer) | MF 5'-GGGGATGTTTGAGGCAGATTTG-3' MR 5'-AACCGCTTCGGACTTCCACCAG-3' | 500bp | Hu <i>et al.</i> (2011) |
| <i>Meloidogyne incognita</i> | Mi-F 5'-GTGAGGATTCAGCTCCCCAG-3' Mi-R 5'-ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC-3' | 1,000bp | Hu <i>et al.</i> (2011) |
| <i>Meloidogyne javanica</i> | Fjav 5'-GGTGCGGATTGAACTGAGC-3' Rjav 5'-CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC-3' | 700bp | Meng <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Meloidogyne arenaria</i> | Far 5'-TCGGCGATAGAGGTAATGAC-3' Rar 5'-TCGGCGATAGACTACAAACT-3' | 420bp | Zijlstra <i>et al.</i> (2000) |
| <i>Meloidogyne enterolobii</i> | Me-F 5'-AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG-3' Me-R 5'-TCAGTTCAGGCAGGATCAACC-3' | 200bp | Long <i>et al.</i> (2006) |

Table 3 Chemical used in multiplex PCR reaction.

| component | Final conc. | 1X |
|--|-------------|--------------|
| 5x Gotaq Flexi (Promega, Inc.) | 1X | 7 ul |
| 25mM MgCl ₂ (Promega, Inc.) | 2.5 mM | 3.5 ul |
| dNTP (Promega, Inc.) | 0.4 mM | 1.4 ul |
| MF | 0.07 uM | 0.245 ul |
| MR | 0.07 uM | 0.245 ul |
| Me-F | 0.12 uM | 0.525 ul |
| Me-R | 0.12 uM | 0.525 ul |
| Mi-F | 0.24 uM | 0.840 ul |
| Mi-R | 0.24 uM | 0.840 ul |
| Fjav | 0.245 uM | 0.875 ul |
| Rjav | 0.245 uM | 0.875 ul |
| Far | 0.24 uM | 0.840 ul |
| Rar | 0.24 uM | 0.840 ul |
| Taq DNA Polymerase (Promega, Inc.) | 0.5 U/ul | 0.28 ul |
| Template DNA | | 3 ul |
| dH ₂ O | | 13.17 ul |
| Total volume | | 35 ul |

Table 4 Optimum multiplex PCR condition.

| | | | |
|--------------------------|-------|------------|-------------|
| Step 1 : hot-start | 95°C | 5 minutes | 1 cycle |
| Step 2 : denaturation | 94°C | 1 minutes | } 35 cycles |
| annealing | 64 °C | 30 seconds | |
| extension | 68°C | 1 minutes | |
| Step 3 : final extension | 72°C | 5 minutes | } 1 cycle |



Table 5 Detection of *M. incognita*, *M. javanica* and *M. enterolobii* in the DNA extracted from root galls inoculated with each root-knot nematode at 15 20 and 30 days after inoculation.

| Days after inoculation | Detection (%) | | |
|------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| | <i>M. incognita</i> | <i>M. javanica</i> | <i>M. arenaria</i> |
| 15 | 100 | 100 | 100 |
| 20 | 100 | 100 | 100 |
| 30 | 100 | 100 | 100 |

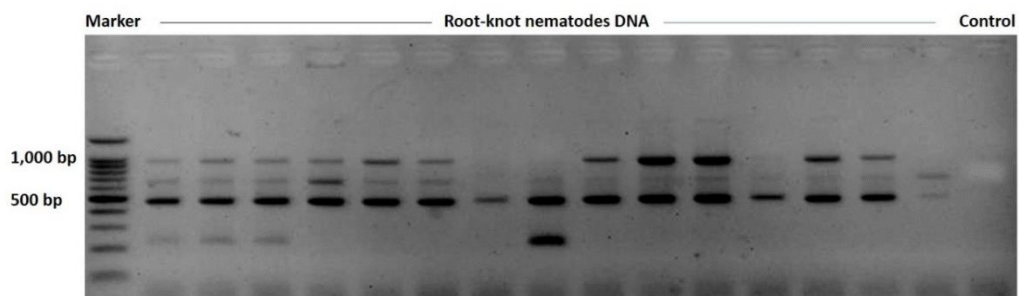


Figure 1 Multiplex PCR test of mixed root-knot nematodes DNA showed expected PCR product size. (*Meloidogyne* internal control 500 bp, *M. incognita* 1,000 bp, *M. javanica* 700 bp and *M. enterolobii* 200 bp)

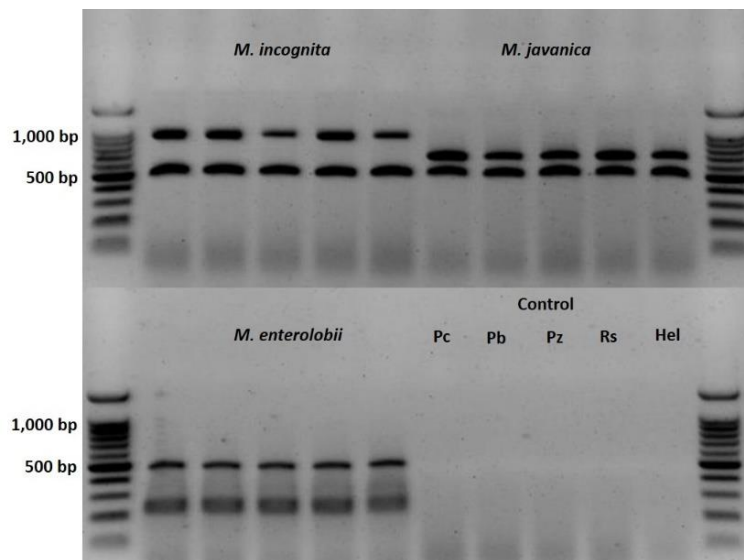


Figure 2 Specificity test of multiplex PCR with different isolates of *M. incognita*, *M. javanica* and *M. enterolobii* using *Pratylenchus coffeae*, *P. brachyurus*, *P. zaeae*, *Radopholus similis* and *Helicotylenchus* sp. DNA as negative control

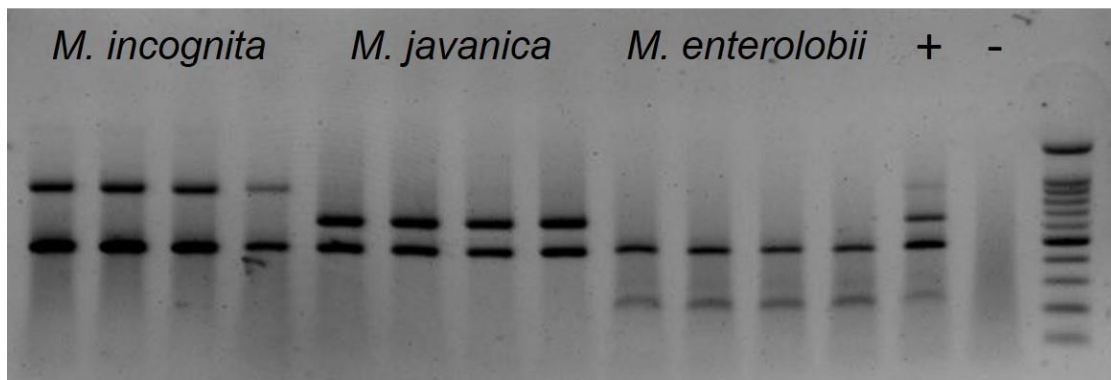


Figure 3 Efficiency of multiplex PCR for the detection of *M. incognita*, *M. javanica* and *M. enterolobii* in DNA extracted from root gall (*Meloidogyne* internal control 500 bp, *M. incognita* 1,000 bp, *M. javanica* 700 bp and *M. enterolobii* 200 คู่ bp)

การผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบไวรัส
Leek yellow stripe virus (LYSV)

Development of Lateral flow test strip for detecting
Leek yellow stripe virus (LYSV)

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล แสนชัย คำหล้า
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Development of LYSV lateral flow test strip by extracting Immuno gamma-globulin (IgG) (LYSV-IgG) without antiserum and labeling 40 nm colloidal gold (Gold conjugated IgG) for virus detection agent shown on the test line and use goat anti rabbit-IgG (GAR) antibody shown control line on a type AE 98 Fast of nitrocellulose membrane (NCM) for complementary of ready-made test kit. When used test-kit tested for disease of LYSV in garlic leaf juice with a 1:10 dilution of TBS-T buffer, The result of the positive with red-purple band shown in 5-6 minutes without false positive reactions from buffered and normal garlic leaf juice and effectively for used in the field.

Keywords : test kit, Lateral flow test strip, *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-17-63



บทคัดย่อ

การพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip ของเชื้อ LYSV โดยการสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) (LYSV-IgG) ออกจากแอนติซีรัมและนำมาติดฉลากด้วย colloidal gold ขนาด 40 นาโนเมตร (Gold conjugated IgG) สำหรับใช้เป็นตัวตรวจจับไวรัสให้แสดงปฏิกิริยาที่แถบทดสอบ (test line) และใช้แอนติบอดีชนิด goat anti rabbit-IgG (GAR) แสดงปฏิกิริยาของแถบควบคุม (control line) อยู่บนแผ่น nitrocellulose membrane (NCM) ชนิด AE 98 Fast ประกอบกันเป็นชุดตรวจสำเร็จรูป เมื่อนำไปทดสอบใช้ตรวจหาเชื้อ LYSV ในน้ำคั้นใบกระเทียมเป็นโรคด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T เจือจาง 1:10 พบว่าเกิดแถบสีแดงม่วงที่เป็นผลบวก อ่านผลได้ในเวลา 5-6 นาที โดยไม่เกิดปฏิกิริยาแบบ false positive กับน้ำคั้นจากใบกระเทียมปกติและบัฟเฟอร์ สามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำหลัก : ชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

คำนำ

พืชสกุลกระเทียม (*Allium* spp.) อยู่ในวงศ์ Alliaceae เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ต่างจากพืชผักในสกุลอื่น ๆ ซึ่งส่วนมากเป็นพืชใบเลี้ยงคู่มีแหล่งปลูกทั่วโลก พืชสกุลหอมกระเทียม ได้แก่ หอมหัวใหญ่ (Onion, *A. cepa* L.) Potato Onion (*A. cepa* var. *aggregatum* G. Don) หอมแดง และหอมแบ่ง (Shallot, *A. ascalonicum* L.) กระเทียม (Garlic, *A. sativum* L.) เป็นต้น ในประเทศไทยพืชสกุลหอมกระเทียมที่ปลูกมากและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ หอมหัวใหญ่ หอมแดง กระเทียม เป็นพืชที่เกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวันของไทยแทบทุกครัวเรือน ใช้ปรุงเป็นอาหาร ทำยา และเครื่องสำอาง นอกจากปลูกเพื่อบริโภคภายในประเทศแล้ว ยังส่งออกขายในต่างประเทศทำรายได้ให้เกษตรกรอย่างมาก กระเทียมมีพื้นที่ปลูกทางภาคเหนือ คือ จังหวัดเชียงราย พะเยา ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ตาก แพร่ น่าน อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ จังหวัดนครพนม ศรีสะเกษ ชัยภูมิ และนครราชสีมา ในปี พ.ศ. 2551 มีพื้นที่ปลูกรวม 87,411 ไร่ ได้ผลผลิต 85,648 ตัน ส่งออกจำนวน 199.2 ตัน มีมูลค่าการส่งออก 8.2 ล้านบาท (กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2545) วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี (2557) กล่าวว่า กระเทียมเป็นไม้ล้มลุก สูง 30-60 เซนติเมตร มีกลิ่นแรง มีหัวใต้ดินแบบ Tunic bulb ลักษณะกลมแป้น เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 เซนติเมตร มีแผ่นเยื่อสีขาวหรือสีม่วงอมชมพูหุ้มอยู่ 3-4 ชั้น ซึ่งลอกออกได้ แต่ละหัวมี 6-10 กลีบ กลีบเกิดจากตาซอกใบของใบอ่อน ลำต้นลดรูปลงไปมาก ใบเดี่ยว (Simple leaf) ขึ้นมาจากดิน เรียงซ้อนสลับแบนเป็นแถบแคบ กว้าง 0.5-2.5 เซนติเมตร ยาว 30-60 เซนติเมตร ปลายแหลมแบบ Acute ขอบเรียบและพับทบเป็นสันตลอดความยาวของใบ โคนแผ่เป็นแผ่นและเชื่อมติดกันเป็นวงหุ้มรอบใบที่อ่อนกว่าและก้านช่อดอก ทำให้เกิดเป็นลำต้นเทียม ปลายใบสีเขียวและสีจะค่อยๆ จางลงจนกระทั่งถึงโคนใบ ส่วนที่หุ้มหัวอยู่มีสีขาวหรือขาวอมเขียว ช่อดอกแบบช่อซี่ร่ม (Umbel) ประกอบด้วยตะเกียงรูปไข่เล็กๆ จำนวนมากอยู่

ปะปนกับดอกขนาดเล็กซึ่งมีจำนวนน้อย มีใบประดับใหญ่ 1 ใบ ยาว 7.5-10 เซนติเมตร ลักษณะบางใส แห้ง เป็นจะงอยแหลมหุ้มช่อดอกขณะที่ยังตูมอยู่ แต่เมื่อช่อดอกบานใบประดับจะเปิดอ้าออกและห้อยลงรองรับช่อดอกไว้ ก้านช่อดอกเป็นก้านโตด เรียบ รูปทรงกระบอกตัน ยาว 40-60 เซนติเมตร ดอกสมบูรณ์เพศ กลีบรวม 6 กลีบ แยกจากกันหรือติดกันที่โคน รูปใบหอกปลายแหลม ยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร สีขาวหรือขาวอมชมพู เกสรเพศผู้ 6 อัน ติดที่โคนกลีบรวม อับเรณูและก้านเกสรเพศเมีย ยื่นขึ้นมาสูงกว่าส่วนอื่นๆ ของดอก รังไข่ 3 ช่อง แต่ละช่องมีอวุล 1-2 เม็ด ผลเล็กเป็นกระเปาะสั้น ๆ รูปไข่หรือค่อนข้างกลม มี 3 พู เมล็ดเล็ก สีดำ ปัจจุบันมีการปลูกกระเทียมเพิ่มมากขึ้นและต้องประสบปัญหาการระบาดของโรคในแปลงปลูก ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย รวมทั้งไวรัส ส่งผลกระทบต่อผลผลิตและคุณภาพของกระเทียม ซึ่งโรคไวรัสที่พบบ่อยและมีความสำคัญในแปลงปลูก คือ เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เป็นเชื้อในกลุ่ม Potyviruses เมื่อกระเทียมติดเชื้อไวรัส LYSV ในแปลงปลูกสามารถเข้าทำลายต้นหอมได้ถึง 100% (Bos, 1983) ส่วนการสูญเสียผลผลิตในกระเทียมสูงถึง 60% และสูงถึง 84% เมื่อติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นในกลุ่ม potyvirus ร่วมด้วย อัตราการงอกในกระเทียมได้รับผลกระทบและลดลงถึง 60% (Lot *et al.*, 1998) ซึ่งเชื้อไวรัส LYSV มีเพลี้ยอ่อน *Myzus persicae* และ *Aphis fabae* เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ ทำให้เกิดการแพร่ระบาดในแปลงปลูกและเป็นแมลงปากดูดที่มีความสำคัญต่อการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส (Lunello *et al.*, 2002) ซึ่งเมื่อเชื้อ LYSV เข้าทำลายในกระเทียม จะทำให้เกิดแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบ และเป็นขีด ๆ มีขนาดเล็กสีเหลืองและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบ ส่งผลต่อการสูญเสียผลผลิตพืช Allium โดยเฉพาะอย่างยิ่งไถ่ฐาน (รูปที่ 1) แต่ไม่ได้จำกัดอยู่ในพื้นที่นี้ ในบางกรณีใบทั้งหมดสามารถเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Bos *et al.*, 1978) งานทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์พัฒนาวิธีการตรวจโรคอย่างง่ายเพื่อนำไปใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge และ เครื่อง Spectrophotometer
- เครื่องสเปรย์และเครื่องตัด BIO DOT
- แอนติซีรัม polyclonal antibody ของเชื้อ Leek yellow stripe virus (LYSV)
- ตู้แช่แข็ง -20 และ -80 0C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA เช่น Goat Anti-Rabbit+Phosphatase, non-fat milk, FR-TR salt และ Nitrocellulose membrane เป็นต้น
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้สำเร็จรูป เช่น Colloidal gold, goat anti-rabbit IgG (GAR), Sucrose และ fiber glass เป็นต้น

วิธีการ

1. การเตรียมแอนติซีรัมและการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

นำแอนติซีรัม polyclonal antibody ของกลุ่มงานไวรัสวิทยาที่ได้ผลผลิตไว้ใช้ในงานวิจัยมาทำการสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้น IgG ของเชื้อ LYSV โดยนำแอนติซีรัมมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตรา 1:10 ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม ammonium sulphate ที่อิ่มตัว ในอัตราส่วน 1:1 กวนเบาๆ แล้วบ่มปฏิกิริยาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยง ตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แล้วละลายตะกอนด้วย ½ phosphate buffer saline (PBS) แล้ว dialyse ใน ½ PBS ปริมาตร 1 ลิตร ที่เติม Sodium azide (NaN₃) อัตรา 0.05% ทำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 4 ชั่วโมง เก็บสารละลาย IgG และนำไปวัดความเข้มข้นโปรตีนของ IgG ด้วย Spectrophotometer ที่ O.D. 280 nm แล้วปรับให้ IgG มีความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปทดสอบคุณภาพในการทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสในน้ำคั้นใบพืช ด้วยเทคนิค NCM-ELISA (nitrocellulose ELISA) ก่อน นำ IgG ไปติดฉลากกับอนุภาคทอง (สุรณีและคณะ, 2532 ก.; สุรณีและคณะ, 2532 ข.)

2. การทดสอบประสิทธิภาพ IgG ของ LYSV ด้วยเทคนิค Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immunosorbent assay (NCM-ELISA)

นำตัวอย่างใบพืชที่ต้องการตรวจสอบใส่ในถุงพลาสติก เติม Extraction buffer (0.02 M Tris, 0.2 M NaN₃, 0.2% Na₂SO₃, pH 7.5) ในอัตราส่วน (ใบพืช : บัฟเฟอร์ = 1:5) แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียด ทำการวางรูปแบบของแผ่น Nitrocellulose membrane (NCM) ขนาด 0.45 µm ชนิด High bone N⁺ ด้วยการตีเป็นช่องตารางสี่เหลี่ยม (ขนาด 1X1 ตารางเซนติเมตร) ทำเครื่องหมายที่ตารางของตัวแผ่น NCM หัวท้ายเพื่อเรียงลำดับตัวอย่างจาก 1 ถึงตัวอย่างสุดท้าย นำแผ่น NCM พร้อมกับวางกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับแผ่น NCM แช่ใน TBS (0.02M Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นซับแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 ขึ้นมาพร้อมกับแผ่น NCM ที่แช่ไว้ด้วยกัน วางลงบนแผ่นกระดาษกรองแผ่นใหม่ที่แห้งและมีขนาดใหญ่กว่า โดยใช้ pasteur pipette ที่สะอาดรีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง ทำการหยดตัวอย่างน้ำคั้นพืช 1 หยด หรือประมาณ 20-25 ไมโครลิตร ลงในช่องตารางบนแผ่น NCM ตามรูปแบบที่วางไว้ เมื่อหยดตัวอย่างเสร็จแล้วซับแผ่น NCM ออกมาวางบนกระดาษสะอาดผึ่งไว้ประมาณ 10-20 นาที นำแผ่นตัวอย่างที่แห้งแล้วแช่ลงในกล่องสี่เหลี่ยมที่มี blocking buffer (2% non fat milk ใน TBS pH 7.5) อยู่ 10 มิลลิลิตร + 0.8 มิลลิลิตร ของ 25% titonx100 แช่นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30°C หลังจากนั้นเท blocking buffer ออก ใส่ส่วนผสมของ IgG ของ LYSV ที่ละลายอยู่ใน blocking buffer ใหม่ ในอัตรา 1:500 แช่แผ่น NCM นั้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30°C แล้วจึงล้างแผ่น NCM ด้วย TBS-Tween 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที เทส่วนผสม Goat anti-rabbit conjugated Alkaline phosphatase (SIGMA A7778) ที่เจือจางเป็น 1:3000 ในสารละลาย blocking buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย

TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที แล้วเทส่วนผสม substrate (ละลาย 0.25% AS- MX จำนวน 1 มิลลิลิตร ใน 5 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl, pH 8.2 และละลายสาร Fast red TR-salt (FR-TR) ใน 6 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl, pH 8.2 เทส่วนผสมทั้ง 2 รวมกัน แล้วเทลงในกล่องแช่แผ่น NCM เขย่าเบา ๆ) รอแสดงผลของปฏิกิริยาประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาเห็นสีชมพูชัดเจนแล้วเท substrate ออก แล้วเทน้ำกลั่นลงแทน เพื่อเป็นการล้างและหยุดปฏิกิริยา

3. การติดสลาก IgG ของ LYSV ด้วยอนุภาคทอง

ติดสลาก IgG (LYSV-IgG) ด้วยอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร ตามวิธีการของสุรณีและคณะ (2547) โดยกวนผสมสารแขวนลอยอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร (บริษัทแปซิฟิกไบโอเทค ประเทศไทย) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับ IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมสารละลาย 10% bovine serum albumin (BSA) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กวนต่อไปอีก 1 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยไปปั่นเพื่อตกตะกอน gold labeled IgG ที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที นาน 40 นาที ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ (passive gold diluent buffer) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วัดความเข้มข้นของ gold labeled IgG ที่ O.D. 540 ให้มีค่าเท่ากับ 0.48-0.5 ทำการเติม sucrose ในอัตรา 20 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเบา ๆ ให้ละลายจนหมด ทำการเตรียม Conjugate Release pad (CRP) ด้วยการพ่นปริมาณ Gold labeling IgG ของ LYSV ลงบนแผ่น CRP ซึ่งเป็นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) ในปริมาณ 2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำ CRP ของ Gold labeling IgG ของ LYSV มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5x15 เซนติเมตร เก็บในสภาพแห้งที่มีความชื้นไม่เกิน 40 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปประกอบเป็น dipstick

4. การเตรียม test line

เตรียมแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยพ่น LYSV-IgG (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นแถบทดสอบ (test line)

5. การเตรียม control line

พ่น goat anti-rabbit IgG หรือ GAR (SIGMA Co.) ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:3 เท่า ที่ตำแหน่งถัดจากแถบทดสอบขึ้นไปประมาณ 0.5 เซนติเมตร ในอัตรา 1.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร สำหรับใช้เป็นแถบควบคุม (control line) นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (สุรณีและคณะ, 2547)

6. การทดสอบคัดเลือกชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ LYSV บนเส้น test line

ทดลองใช้แผ่น nitrocellulose membrane (NCM) 3 ชนิด ได้แก่ AE 98 Fast, AE 99 และ AE 100 ใช้เครื่องพ่นสารละลายควบคุมปริมาณ ทำการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร/ไมโครลิตร/เซนติเมตร เป็นเส้น control line ใช้ IgG ของ LYSV พ่นเป็น test line ในปริมาณ 1.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ตามลำดับ ลงบนแผ่นเมมเบรน โดยเส้น

ทั้ง 2 มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร และจัดให้อยู่กึ่งกลางของแผ่น NCM ที่มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร นำแผ่นที่พ่น IgG แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ (เส้น control line เป็นเส้นที่มีไว้ตรวจสอบการไหลของสารละลายทั้งหมดในชุดตรวจสอบว่ามีความสมบูรณ์ โดยปรากฏเป็นเส้นสีแดงเกิดจากปฏิกิริยาของ GAR กับ IgG ที่ผลิตมาจากกระต่ายและติดสลาگونูภาคทอง)

7. การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

ทดลองใช้บัฟเฟอร์ ที่แตกต่างกัน 7 ชนิด บดตัวอย่างพืช คือ PBS pH 7.4, PBS-T pH 7.4, TBS pH 7.4, TBS-T pH 7.4, extraction buffer 1 pH 8.6, extraction buffer 2 pH 7.5, general extraction buffer pH 7.4 (Agdia)

8. การประกอบและตรวจสอบ

นำ NCM บน Plastic Backing polyester ที่อบแห้งแล้ว มาลอกกระดาษปิดกาออก วางแผ่น Conjugate Release pad (CRP) ที่เป็น fiber glass ที่มี Gold labeled IgG และอบแห้งแล้ว เกย ด้านล่างให้เกยทับแผ่น NCM 1 มิลลิเมตร ปิดทับ Conjugate Release pad ด้วย แผ่นรองรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) ที่เป็น fiber glass โดยให้เกยแผ่น CRP ประมาณ 1 มิลลิเมตร ปิดลงไปจนถึงปลายของแผ่น Backing พอดี วางแผ่นซับน้ำอย่างหนา (Wicking paper) เกยทับไว้ ด้านบนของแผ่น nitrocellulose membrane (NCM) ประมาณ 1 มิลลิเมตร ทาบไปจนสุดปลาย ด้านบนของ Backing ตัดออกเป็น strip ด้วยเครื่องตัดแบบอัตโนมัติ ให้มีความกว้าง 0.4 เซนติเมตร และเก็บไว้ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ที่อุณหภูมิห้องและแห้ง

9. การทดสอบประสิทธิภาพของ Lateral flow test strip ในการตรวจสอบเชื้อ LYSV

ทำการทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ Lateral flow test strip ในการตรวจสอบเชื้อ LYSV โดยบดใบกระเทียมที่เป็นโรคในบัฟเฟอร์สำหรับบดตัวอย่าง (grinding buffer ประกอบด้วย คือ PBS pH 7.4, PBS-T pH 7.4, TBS pH 7.4, TBS-T pH 7.4, extraction buffer 1 pH 8.6, extraction buffer 2 pH 7.5, general extraction buffer pH 7.4 (Agdia)) เจือจางน้ำคั้นของใบกระเทียมที่เป็นโรคด้วยบัฟเฟอร์ เริ่มจาก 1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600 จนถึง 1:3,200 เท่า รวม 7 ระดับความเจือจาง นำ Lateral flow test strip มาจุ่มตรวจสอบ อ่านผลของปฏิกิริยาใน 3-5 นาที

เวลาและสถานที่

| | |
|----------|---|
| ระยะเวลา | เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2563 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2564 |
| สถานที่ | ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ |

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อนำ Immuno gamma-globulin (IgG) ของ LYSV มาปรับให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และทำการทดสอบคุณภาพของ IgG

ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการตรวจสอบไวรัส LYSV โดยวิธี NCM-ELISA พบว่า IgG ที่ผลิตได้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้และมีค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA คือ 1:1,000 นำ IgG ที่เตรียมได้ไป conjugate กับสารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (colloidal gold) ได้เป็น IgG ที่ติดสลากรด้วยอนุภาคทอง (gold conjugated IgG or gold particle labeled IgG) เป็นสี cherry red เนื่องจากอนุภาคของทอง ที่มีลักษณะ monodisperse colloid ที่มีความคงตัวและมีขนาดประมาณ 40 nm มีความไวและคงรูปเมื่อนำไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส (Hampton *et al.*, 1990) เมื่อทดลองหยอด Gold labeling IgG ปริมาณ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร พบว่าที่อัตรา 1.5-2.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ให้ปฏิกิริยาของสีที่เส้น test line ชัดเจนใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นที่ 2.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร จะมีปริมาณของ Gold labeling IgG มากเกินไป ทำให้เกิดการไหลกลับลงมาที่ control line และ test line ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงได้เลือกใช้อัตรา 2.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร จากนั้นทำการเตรียมแผ่น Conjugate Release pad (CRP) ด้วยการใช้เครื่องสเปร์ Bio dot หัวสเปร์รี่ Air jet ลงบนแผ่น CRP ปริมาณ 2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้ง ที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5x15 เซนติเมตร แล้วนำไปเก็บไว้ในกล่องดูดความชื้นที่แห้ง ความชื้นไม่เกิน 40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นได้นำแผ่น nitrocellulose membrane (NCM) เปรียบเทียบกัน 3 ชนิด คือ AE 98 Fast, AE 99 และ AE 100 มาทำเส้น test line และ control line โดยใช้เครื่องสเปร์ Bio dot หัวสเปร์รี่ Bio jet พร้อมกัน 2 หัว โดยหัวสเปร์รี่ที่ 1 พ่น Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 เป็นเส้น control line อัตรา ในอัตรา 1.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร และหัวสเปร์รี่ที่ 2 พ่น IgG ของ LYSV เป็นเส้น test line อัตรา 1.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร จากนั้นนำไปอบแห้งที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำแผ่น CRP ที่ติดสลากรด้วยอนุภาคทอง และแผ่น NCM ที่ได้สเปร์รี่เส้น test line และ control line มาประกอบเป็นชุดตรวจสอบ บนแผ่น backing โดยประกอบร่วมกับแผ่น Sample pad และแผ่น Absorbent pad รวมเป็นชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip และเมื่อนำชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip ทดสอบด้วยการตรวจสอบเชื้อไวรัสจากน้ำคั้นใบกระเทียมที่แสดงอาการโรคใบต้นกระเทียมปกติ พร้อมเปรียบเทียบชนิดของ sample buffer ต่อปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบโดยใช้บัฟเฟอร์ จำนวน 7 ชนิด พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีใน nitrocellulose membrane (NCM) ชนิด AE 98 Fast แม้มีความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจนเท่าที่ควรบนเส้น test line ของชุดตรวจสอบ และทำปฏิกิริยาบนเส้น control line เกิดได้เร็วที่สุด (ตารางที่ 1) ส่วนบัฟเฟอร์ที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาบนเส้น control line และไม่เกิดปฏิกิริยาแบบ false positive คือเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line หรือปฏิกิริยาข้ามนั้นคือบัฟเฟอร์ TBS-T และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีที่ control line พบว่าการใช้ TBS-T ให้ผลดีที่สุดถึงแม้จะจาง แต่ไม่ทำให้เกิด false positive คือเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ส่วนเมื่อใช้บัฟเฟอร์ชนิดอื่นที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบนั้น จะไม่เหมาะสมกับตัวอย่างพืชและมี background สีเข้มและสกปรกและเกิด false positive และเมื่อทดสอบกับพืชปกติด้วยการใช้บัฟเฟอร์ TBS-T บดใบกระเทียม ไม่ทำให้เกิด false positive เช่นกัน (ภาพที่ 6) และในการทดสอบ

ประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาไวรัส LYSV ในน้ำคั้นที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ กัน เมื่อนำ Lateral flow test strip มาจุ่มตรวจสอบ อ่านผลของปฏิกิริยาใน 5-6 นาที พบว่าชุด Lateral flow test strip สามารถตรวจพบไวรัสได้ ที่ความเข้มข้นของน้ำคั้น ที่เจือจาง 1:10 ซึ่งให้สีแดงม่วงของปฏิกิริยาที่ไม่เข้มมากแต่ดีกว่าเมื่อเทียบกับระดับเจือจางอื่น จึงสรุปว่าชุด Lateral flow test strip มีความไวในการตรวจ LYSV ในน้ำคั้นตัวอย่างที่อัตรา 1:10 ชัดเจนที่สุดในเส้น test line เช่นเดียวกับ control line ภายในระยะเวลาประมาณ 5-6 นาที โดยที่ตัวอย่างน้ำคั้นไปกระเทียมปกติ ปรากฏเฉพาะ control line ทั้งนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เส้น test line ยังไม่ชัดเจนเท่าที่ควร อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการสกัด IgG ของ LYSV ที่ใช้สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวในการตกตะกอน IgG แล้วทำการ dialyse ใน ½ PBS นั้น อาจเนื่องมาจากแอมโมเนียมซัลเฟตละลายออกไปไม่หมด จึงมีผลกับการ conjugate IgG กับอนุภาคทอง เนื่องจาก colloidal gold ตกตะกอน ทำให้การ conjugate IgG และอนุภาค ทองไม่ตีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจึงไม่ชัดเจน ทั้งนี้อาจต้องนำ IgG ไป dialyse ใน ½ PBS ซ้ำ เพื่อให้ IgG สะอาดและมีคุณภาพขึ้น นอกจากนี้ในขั้นตอนการเตรียม Gold conjugated IgG เวลาที่มีผลต่อการเชื่อมต่อ (conjugate) การกวนสารละลายของ IgG และสารละลายอนุภาคทอง แวนลอย เมื่อเติม BSA แล้วทำการกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคทองจับกับ IgG ดีขึ้น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส LYSV นี้ สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างน้ำคั้นไปกระเทียมที่เป็นโรค ที่ความเข้มข้น 1:10 โดย test line และ control line ขึ้นแถบภายในระยะเวลาประมาณ 5-6 นาที ซึ่งเทคนิคการตรวจสอบ Lateral flow test strip นี้ สามารถนำมาปรับใช้ในการผลิตเป็นชุดตรวจสอบอย่างง่าย GLIFT kit เพื่อตรวจหาไวรัส LYSV ในสภาพแปลงปลูกให้กับนักวิชาการ และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องได้ทั้งยังช่วยในการคัดเลือกและตรวจสอบกระเทียมก่อนนำไปใช้ในการผลิตหัวพันธุ์กระเทียมปลอดโรคหรือการปรับปรุงพันธุ์กระเทียมได้ด้วยโดยสามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยได้ด้วยตนเอง และสามารถใช้เป็นเครื่องมือภาคสนาม ที่เกษตรกรสามารถนำไปใช้ตรวจไวรัสได้สะดวก ง่ายและราคาไม่แพง เพียงบดตัวอย่างพืชด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ในถุงพลาสติก จุ่ม Lateral flow test strip ลงในน้ำคั้นพืช อ่านผลได้ใน 5-6 นาที ทำให้เกษตรกรสามารถทราบได้ทันทีว่าเป็นโรคหรือไม่ ทั้งยังเป็นการควบคุมการแพร่ระบาดของไวรัสได้อย่างรวดเร็วยิ่งขึ้น ซึ่งการตรวจสอบเชื้อไวรัสเพื่อการวินิจฉัยโรคมักมีด้วยกันหลายวิธี ซึ่งต้องพิจารณาหลายวิธีประกอบกัน และควรหาวิธีการใหม่ๆ ที่ง่ายและรวดเร็วมาช่วยเพิ่มการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น เทคนิคการตรวจสอบด้วยวิธี lateral flow test เป็นวิธีหนึ่งทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยโรค ซึ่งการใช้แอนติบอดีที่มาจากแอนติเจนชนิดเดียวกันจะมีความเฉพาะเจาะจงในการจับติดกัน และการเคลื่อนย้ายของของเหลวในลักษณะ capillary จากล่างขึ้นสู่บน หรือจากซ้ายไปขวาในลักษณะ lateral flow จะช่วยให้แอนติเจนหรือตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบเคลื่อนย้ายเข้าหาแอนติบอดี (Haber and Knapen, 1989; Tsuda

et.al.,1992 and Tseda et.al.,1993) เมื่อเป็นชนิดเดียวกันย่อมเกิดปฏิกิริยาบน strip สังเกตเห็นแถบสี (band) ของอนุภาคและมีคุณสมบัติสามารถต่อเชื่อมกับแอนติซีรัมได้ ปฏิกิริยานี้ถูกกำหนดให้ไปเกิดขึ้นบน strip ชัดเจน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ใช้เวลาในการตรวจสอบเพียง 5-10 นาที

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยโรคพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 2545. *โรคผักและการป้องกันกำจัด*. 138 หน้า.
- วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2557. *กระเทียม*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : <http://th.wikipedia.org/wiki/กระเทียม> (2 มิถุนายน 2557)
- สุรณี กิริติยะอังกูร ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร. 2547. ชุดตรวจสอบโรคไวรัสในกล้วยไม้. *วารสารโรคพืช*. ปีที่ 18 เล่มที่ 12: 1-14.
- สุรณี กิริติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. 2532 ก. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค *Cymbidium mosaic virus* ของกล้วยไม้หวายลูกผสมและสาวน้อยต้นระบำ. หน้า 115-122. ใน : *รายงานประจำปี 2532*. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- สุรณี กิริติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร และนวลจันทร์ ดีมา. 2532 ข. การตรวจ *Cymbidium mosaic virus* ด้วยวิธี DOT-ELISA และ DAS-ELISA. *วารสารวิชาการเกษตร*. 7(1-3): 38-43.
- Bos, L. 1983. Viruses and virus diseases of *Allium* species. *Acta Horticulturae* 127: 11-29.
- Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H., and Maat, D.Z. 1978. *Leek yellow stripe virus* and its Relationships to *Onion yellow dwarf virus* - characterization, ecology, and possible control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 84(5): 185-204.
- Eric, M., Jessica, K., Marek, S., and Qiyin, F. 2020. Review-Point-of-Care Urinalysis with Emerging Sensing and Imaging Technologies. *Journal of The Electrochemical Society*. 167.
- Haber, S. and H. Knapen, 1989. Filter paper sero-assay (FiPSA) : A rapid, sensitive technique for sero -diagnosis of plant viruses. *Can. J. plant Pathol.* 11:109-113.
- Hampton, H., E. Ball, and S. De Boer. 1990. *Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens : Laboratory Manual*. Amer Phytopathological Society. 389 p.

- Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., and Delecalle, B. 1998. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant Disease* 82(12): 1381-1385.
- Lunello, P., Ducasse, D.A., Heiguera, M., Nome, S.F., and Conci, V.C. 2002. An Argentinean isolate of Leek yellow stripe virus from leek can be transmitted to garlic. *Journal of Plant Pathology* 84(1): 11-17.
- Tsuda, S., kameya-lwaki, M., hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M., and Tomaru, K. 1992. A novel detection and Identification technique for plant viruses; Rapid Immunofilter paper assay (RIPA). *Plant Dis.* 76: 466-469
- Tsuda, S., kameya-lwaki, M., hanada, K., Kouda, Y., Hikata, M., Fujisawa I and Tomaru, K. 1993. Simultaneous Diagnosis for Plants Infected with Multiple viruses Employing Rapid Immunefilter Paper Assay (RIPA) with Two-Step method' Multi-RIPA. *Ann. phythopath. Soc. Japan* 59: 200-203.

Table 1 Different types of nitrocellulose membranes were compared.

| Line \ NCM | AE 100 | AE 99 | AE 98 Fast |
|--------------|--------|-------|------------|
| LYSV | + | + | +++ |
| Control line | ++ | ++ | +++ |

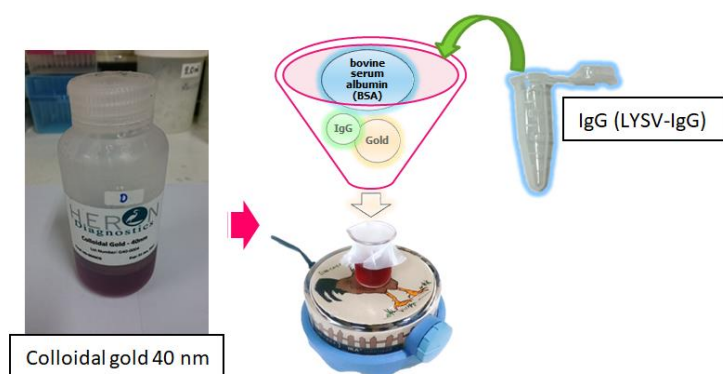


Figure 1 40nm gold particles and gold conjugated IgG preparation



Figure 2 LYSV-IgG spray (concentration 1 mg/ml), volume 1.5 $\mu\text{L}/\text{cm}$. (test line) and goat anti-rabbit IgG or GAR (SIGMA Co.) spray diluted 1:3 times, volume 1.0 $\mu\text{L}/\text{cm}$. (control line) with Bio jet spray head

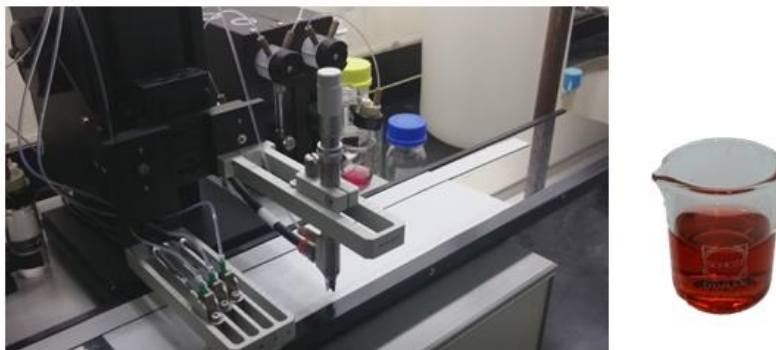


Figure 3 Spray LYSV Gold labeling IgG onto a 2.0 $\mu\text{L}/\text{cm}$ Conjugate Release pad (CRP). With Air head jet spray

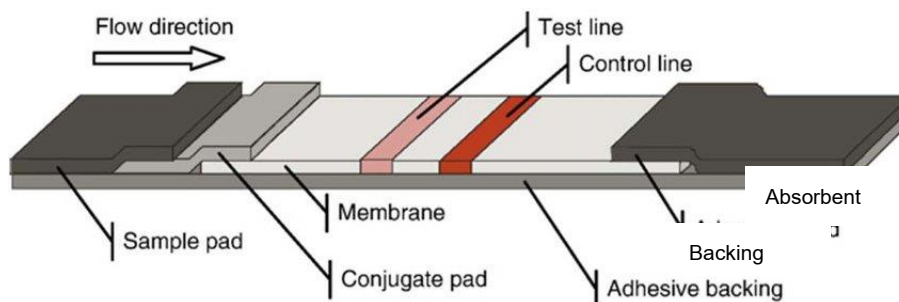


Figure 4 Assemble and inspect the lateral flow test strip (Eric *et al.*, 2020)



Figure 5 Bio dot automatic cutting machine cuts strips with a width of 0.4 cm

| ชนิด mem. | ชนิด buffer | Borate* , gold pH 7.3 |
|------------|-------------|-----------------------|
| AE 98 Fast | PBS | PBS |
| | PBS-T | PBS-T |
| | TBS | TBS |
| | TBS-T | TBS-T |
| | Ext-Agdia | Agdia |
| | Ext-ELISA | ELISA |
| | Ext-Buffer | Ext-Buffer |
| | | M, TBS-T |

Figure 6 Comparison of 7 buffer solutions on nitrocellulose membrane type AE 98 Fast

การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน
Assessment of Phytosanitary Measures for Papaya Seeds
Imports from Taiwan

วาสนา รุ่งสว่าง ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ วันเพ็ญ ศรีชาติ โสภณ มีอำนาจ
จันทร์พิศ เดชหามาตย์ สุนทรทิพย์ สมบัติ
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Notification of Department of Agriculture Re: Conditions for Import of Papaya Seeds from Taiwan B.E. 2562 (2019), which is effective from March 13, 2019. Therefore, it is a new condition, the study is needed to confirm the efficacy of the phytosanitary measures imposed after the papaya seeds imported from Taiwan into the country. The process of document verification, packaging label and transporting products imported at the port, sampling of papaya seeds, Inspection and detection of the pests that may be attached to imported papaya seeds and the assessment of phytosanitary measures for Papaya Seeds Imports from Taiwan. After the enforcement of the conditions there were 3 shipments of papaya seeds imported from Taiwan. The results found that all 3 shipments showed of the complete and correct documents. The containers and the labels are followed the conditions. And tested and found free from any pests or quarantine pests on the papaya seeds. Considering the assessment criteria of the phytosanitary measures for the papaya seed imports from Taiwan were effective. This study during 2020 – 2021, found that the Notification of Department of Agriculture Re: Conditions for Import of Papaya Seeds from Taiwan B.E. 2562 (2019) is effective for enforcing.

Keywords : Phytosanitary measures, Imports, Papaya seeds, Taiwan

รหัสการทดลอง 03-04-59-01-03-00-04-63



บทคัดย่อ

ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน พ.ศ. 2562 ซึ่งมีผลใช้บังคับตั้งแต่ 13 มีนาคม 2562 เนื่องจากเป็นเงื่อนไขใหม่ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อเป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพของมาตรการสุขอนามัยพืชที่กำหนดหลังจากมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวันมาในราชอาณาจักร โดยดำเนินการตรวจสอบเอกสาร ฉลากบรรจุภัณฑ์ และการขนส่งสินค้าเกษตรนำเข้า ณ จุดนำเข้า การสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะละกอ การตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์มะละกอนำเข้า และการประเมินประสิทธิภาพมาตรการสุขอนามัยพืช ในทุกรายการที่มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน ภายหลังการบังคับใช้เงื่อนไขฯ มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวันจำนวน 3 รายการ ผลการตรวจสอบพบว่าทั้ง 3 รายการแสดงเอกสารครบถ้วนและถูกต้อง ภาชนะบรรจุและฉลากเป็นไปตามเงื่อนไขข้อกำหนด และไม่พบศัตรูพืชหรือศัตรูพืชกักกันติดมากับเมล็ดพันธุ์มะละกอดังกล่าว เมื่อพิจารณาตามหลักเกณฑ์การประเมินประสิทธิภาพมาตรการสุขอนามัยพืชพบว่า มาตรการสุขอนามัยพืชที่บังคับใช้สำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวันมีประสิทธิภาพ ดังนั้น จากการศึกษาวิจัยการประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน ในช่วงปี พ.ศ. 2563 – 2564 พบว่า ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน พ.ศ. 2562 มีประสิทธิภาพในการบังคับใช้

คำหลัก : มาตรการสุขอนามัยพืช, การนำเข้า, เมล็ดพันธุ์มะละกอ, ไต้หวัน

คำนำ

กรมวิชาการเกษตรได้ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าสิ่งต้องห้าม และได้กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชหรือกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าสำหรับสิ่งต้องห้ามนั้น ซึ่งอาศัยอำนาจตามความในมาตรา 8 (2) และมาตรา 10 แห่งพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 โดยออกเป็นประกาศกรมวิชาการเกษตร กำหนดเงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ เพื่อให้ประเทศผู้ส่งออกต้องปฏิบัติตามนั้น มะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นพืชเมืองร้อนที่สามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งไต้หวันเป็นแหล่งปรับปรุงพันธุ์มะละกอที่สำคัญ จึงมีผู้สนใจขออนุญาตนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวันเข้ามาเพื่อการค้า ตามมาตรา 8(2) แห่งพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม กำหนดให้การนำเข้าหรือนำเข้าผ่านสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้าหรือเพื่อกิจการอื่นต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช จึงมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวันเข้ามาเพื่อการค้า และได้มีการออกเป็นประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน พ.ศ. 2562 ซึ่งมีผลใช้บังคับตั้งแต่ 13 มีนาคม 2562 เป็นต้นไป เป็นที่เรียบร้อยแล้ว แต่ประเทศไทยยังไม่เคยมีการศึกษาผลหรือประสิทธิภาพของการดำเนินมาตรการทางสุขอนามัยพืชเมล็ดพันธุ์มะละกอ กรมวิธี กำจัดศัตรูพืช ว่าหลังจากที่กำหนดบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยพืชดังกล่าวแล้วมีประสิทธิภาพในการป้องกัน ควบคุม มิให้มีศัตรูพืชหรือศัตรูพืชกักกันติดมากับสินค้าเกษตรที่อนุญาต



ให้นำเข้าได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่ ทั้งนี้จากรายการการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์มะละกอนำเข้าจากไต้หวัน พบศัตรูพืชที่มีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะละกอได้จำนวน 10 ชนิด ดังนี้ แมลง 1 ชนิด ได้แก่ *Araecerus fasciculatus* รา 8 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Choanephora cucurbitarum*, *Colletotrichum truncatum*, *Glomerella cingulate*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora nicotianae* และ *Rhizopus stolonifer* และไวรัส 1 ชนิด ได้แก่ *Tobacco ringspot virus* (TRSV) ซึ่งศัตรูพืชที่มีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวันและเป็นศัตรูพืชที่กักกัน คือ ไวรัส TRSV และได้มีการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าเพื่อลดความเสี่ยงของไวรัส TRSV ก่อนการส่งออก (วาริรัตน์ และคณะ, 2562) ตามประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้ามะละกอจากไต้หวัน พ.ศ. 2562 ซึ่งมีผลใช้บังคับตั้งแต่ 13 มีนาคม 2562 เป็นต้นไป จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อเป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพของมาตรการสุขอนามัยพืชหรือเงื่อนไขที่กำหนดหลังจากมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวันมาในราชอาณาจักร หากมีการตรวจพบศัตรูพืชหรือศัตรูพืชกักกันตามที่กำหนดในมาตรการสุขอนามัยพืชหรือเงื่อนไขก็แสดงว่ามาตรการที่กำหนดไว้ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ หรือผู้ส่งออกไม่ได้ปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเข้มงวด เพื่อที่จะดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชใหม่ หรือการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชหรือเงื่อนไขใหม่ ให้มีความเหมาะสม และสอดคล้องกับสภาพการณ์

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์มะละกอ
2. วัสดุวิทยาศาสตร์ ประกอบด้วย
 - หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
 - หลอดไมโครทิวป์ ขนาด 2.0 มิลลิลิตร
 - ทิปดูดสารละลาย ขนาด 10 ไมโครลิตร
 - ทิปดูดสารละลาย ขนาด 200 ไมโครลิตร
 - ทิปดูดสารละลาย ขนาด 1 มิลลิลิตร
 - โกร่งบดตัวอย่าง
 - โถบดเมล็ดพันธุ์ ขนาด 40 มิลลิลิตร สำหรับใช้กับเครื่องบด Tube Mill, IKA®
3. สารเคมี ประกอบด้วย
 - สารละลาย General Extraction Buffer (GEB)
 - ชุดตรวจสำเร็จรูป AGDIA ELISA kit สำหรับเชื้อไวรัส *Tobacco ring spot virus* (TRSV)
 - ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy® Plant Mini Kit of QIAGEN)



- ชุดเอนไซม์สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (INVITROGEN Superscript III One-step RT-PCR system with Platinum Taq)
- สารละลายไพโรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง
- พงอะกาโรล (agarose gel)
- สารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution)
- สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder)

4. วัสดุสำนักงาน ประกอบด้วย

- ถังพลาสติก
- กระดาษกรอก
- ปากกามาร์กเกอร์

5. อุปกรณ์และเครื่องมือ ประกอบด้วย

- เครื่องบดละเอียด (Tube Mill, IKA®)
- เครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสง ELISA reader (Accu Reader⁺)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (MIKRO 120 centrifuge, Hettich®)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, memmert)
- ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส (freezer, SANYO)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermocycler, eppendorf)
- เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis, BIO-RAD)
- เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation, BIO-RAD)

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การตรวจสอบเอกสาร/ ฉลาก บรรจุภัณฑ์ และการขนส่ง/เก็บรวบรวมข้อมูลสินค้าเกษตรนำเข้า ณ จุดนำเข้า (2563-2564)

ตรวจสอบเอกสารที่มาพร้อมกับสินค้าเกษตรนำเข้า ดังนี้ (1) ใบอนุญาตนำเข้า (2) ใบรับรองสุขอนามัยพืชที่มีการระบุข้อความตามเงื่อนไขการนำเข้า เช่น ชนิดพืช สายพันธุ์ ปริมาณ/จำนวน วันที่ออกใบรับรองสุขอนามัยพืช แหล่งผลิต/ประเทศต้นทาง การกำจัดศัตรูพืช และข้อความรับรองพิเศษ เช่น รายชื่อศัตรูพืชกักกันที่เกี่ยวข้อง และมาตรการสุขอนามัยพืชที่ประเทศผู้ส่งออกดำเนินการกับพืชเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน เป็นต้น (3) เอกสารอื่น ๆ เช่น หนังสือรับรองว่าเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวมิใช่พืชติดต่อสารพันธุกรรม ผลรายงานการตรวจสอบศัตรูพืชกักกัน (4) ตรวจสอบบรรจุภัณฑ์เป็นไปตามข้อกำหนดหรือไม่ เช่น วัสดุที่ใช้ทำเป็นบรรจุภัณฑ์ ลักษณะบรรจุภัณฑ์ปิดมิดชิด ไม่มีการปะปนของ ดิน ทราาย และชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบ ก้าน เศษซากพืช เป็นต้น (5) ตรวจสอบฉลาก ต้องแสดงข้อมูลที่จำเป็นบนบรรจุภัณฑ์ตามที่กำหนดในเงื่อนไข เช่น ชื่อพืช และสายสายพันธุ์



เป็นต้น (6) เส้นทางและวิธีการขนส่ง (ทางบก ทางน้ำ ทางอากาศ) และจุดที่สินค้าเข้า ชื่อด่านตรวจพืชที่นำเข้า วันที่นำเข้า เป็นต้น

ขั้นตอนที่ 2 การสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะละกอ (2563-2564)

การสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะละกอนำเข้าจากไต้หวัน ตามมาตรฐานของ International Seed Testing Association (ISTA, 2018) โดยทำการสุ่มตัวอย่าง ณ จุดนำเข้า โดยทำการสุ่มตัวอย่างที่ด่านตรวจพืชที่นำเข้า หรือกลุ่มวิจัยการกักกันพืช เพื่อตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ นำตัวอย่างที่สุ่มเก็บมาตรวจสอบศัตรูพืชหรือศัตรูพืชกักกัน หรือสิ่งอื่นใดที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน หรือพาหะที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ และเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูพืชกักกันที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Tobacco ringspot virus* (TRSV)

ขั้นตอนที่ 3 การตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์มะละกอนำเข้า (2563-2564)

การตรวจสอบศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะละกอในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการดังนี้

1. ตรวจสอบและจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืช (weed) โดยการตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) โดยทำการคัดแยกองค์ประกอบทางกายภาพ ได้แก่ เมล็ดพืชบริสุทธิ์ เมล็ดพืชอื่น และสิ่งเจือปน นำแต่ละส่วนมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และจำแนกชนิดเมล็ดวัชพืช

2. การตรวจสอบแมลงและไร (Insect and mite) โดยการตรวจสอบด้วยตาเปล่าหรือกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและสูงมาตรวจสอบโดยนำตัวอย่างแมลงที่เก็บได้ แช่ในแอลกอฮอล์ 95% เพื่อใช้จำแนกชนิด และ นำตัวอย่างไรที่เก็บได้ ทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอโดยใช้น้ำยา Hoyer's อบที่อุณหภูมิ 40 °C ประมาณ 7 วัน เพื่อใช้จำแนกชนิด

3. ตรวจสอบเชื้อรา (Fungi) ด้วย Blotter method จำนวน 400 เมล็ด กลุ่มตัวอย่างละ 25 เมล็ด โดยการนำเมล็ดที่วางไว้ในภาชนะและให้ความชื้นวางใต้แสง near ultra violet (NUV) โดยให้แสงสลับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน และตรวจจำแนกชนิดของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำและกำลังขยายสูงต่อไป

4. แยกตรวจสอบจำแนกเชื้อแบคทีเรีย (Bacteria) ด้วย Dilution plate method เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) หรืออาหารกึ่งเฉพาะเจาะจง เช่นอาหาร yeast peptone glucose agar (YPGA) หรือ yeast extract-dextrose-calcium carbonate (YDC) และตรวจจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

5. ตรวจสอบเชื้อไวรัส (Virus) ดำเนินการดังนี้

5.1 ตรวจสอบด้วยเทคนิค Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยตรวจสอบจากเมล็ดพันธุ์มะละกอโดยตรง โดยใช้เมล็ดพันธุ์มะละกอจำนวน 3,000 เมล็ด แบ่งเป็นตัวอย่างย่อย (sub-sample) จำนวน 15 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างมีจำนวน 200 เมล็ด และตรวจสอบโดยใช้ชุดแอนติบอดีสำเร็จรูปของ Agdia® ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรัส TRSV โดยชุดควบคุม (control) ประกอบด้วย ตัวควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control; TRSV positive,



Agdia®) ตัวควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control; papaya healthy, Agdia®) และตัวควบคุมที่เป็น blank (สารละลาย GEB) ดำเนินการตามขั้นตอนและวิธีการของชุดตรวจสอบสำเร็จรูป Agdia ตามขั้นตอนดังนี้

5.1.1 เตรียม ELISA plate โดยการเติมสารละลาย Capture antibody - Anti-TRSV ที่ความเข้มข้น 1:200 (ปริมาตรของแอนติบอดีต่อบัฟเฟอร์ Carbonate coating) ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

5.1.2 เตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบ โดยการนำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ ผักกาดหอมที่เตรียมไว้ไปชั่งน้ำหนักและนำไปปั่นละเอียดด้วยเครื่องบดเมล็ดพันธุ์ (Tube-mill, IKA®) จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ Extraction ลงไปในเมล็ดพันธุ์ที่บดละเอียดแล้วด้วยอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักของเมล็ดต่อปริมาตรของบัฟเฟอร์) จะได้สารละลายเมล็ดสำหรับการนำไปตรวจสอบ

5.1.3 นำ ELISA plate ในข้อ 5.1.1 มาทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBST wash ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยการใส่สารลงไปในแต่ละหลุม บ่มไว้ 3-5 นาที ทิ้งสารโดยการคว่ำเพลทและตบบนกระดาษซับ จากนั้นทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ก่อนดำเนินการในขั้นถัดไป

5.1.4 นำสารละลายเมล็ดจากข้อ 5.1.2 ใส่ลงในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5.1.5 นำ ELISA plate ในข้อ 5.1.4 มาทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBST wash ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยการใส่สารลงไปในแต่ละหลุม บ่มไว้ 3-5 นาที ทิ้งสารโดยการคว่ำเพลทและตบบนกระดาษซับ จากนั้นทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ก่อนดำเนินการในขั้นถัดไป

5.1.6 เติมสารละลาย Alkaline phosphatase enzyme conjugate - Anti-TRSV ที่ความเข้มข้น 1:200 (ปริมาตรของแอนติบอดีต่อบัฟเฟอร์ ECI) ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5.1.7 นำ ELISA plate ในข้อที่ 5.1.6 มาทำการล้างด้วยบัฟเฟอร์ PBST wash ปริมาตร 400 ไมโครลิตรต่อหลุม โดยการใส่สารลงไปในแต่ละหลุม บ่มไว้ 3-5 นาที ทิ้งสารโดยการคว่ำเพลทและตบบนกระดาษซับ จากนั้นทำซ้ำอีก 3 ครั้ง ก่อนดำเนินการในขั้นถัดไป

5.1.8 เติมสารละลายฟอสเฟต ที่ความเข้มข้นของสารซับสเตรท (PNP) 1 มิลลิกรัมต่อบัฟเฟอร์ PNP ปริมาตร 1 มิลลิตร ลงไปในแต่ละหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ในที่มืด) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5.1.9 ตรวจสอบผลโดยการตรวจดูการเปลี่ยนสีด้วยตาเปล่า และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; O.D.) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสง (ELISA reader) โดยหลุมที่สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และให้ค่า O.D. มากกว่า 2 เท่าของตัวควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control; papaya) จะบ่งชี้ว่าตัวอย่างนั้นพบเชื้อไวรัส TRSV ในขณะที่เดียวกันหากไม่พบการเปลี่ยนสี และให้ค่า O.D. น้อยกว่า 2 เท่าของตัวควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control; papaya) จะบ่งชี้ว่าตัวอย่างนั้นไม่พบเชื้อไวรัส TRSV



5.2 ตรวจสอบด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ตรวจสอบจากตัวอย่าง 2 ลักษณะ ได้แก่ (1) เมล็ดพันธุ์มะละกอ จำนวน 3,000 เมล็ด แบ่งเป็น 15 ตัวอย่าง ๆ ละ 200 เมล็ด และ (2) นำเมล็ดไปเพาะเป็นต้นกล้า จำนวน 200 ต้น แบ่งเป็น 10 ตัวอย่าง ๆ ละ 20 ต้น จากนั้นนำตัวอย่างไปสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) และตรวจหาเชื้อไวรัส TRSV ด้วยเทคนิค RT-PCR

5.2.1 สกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) ตามขั้นตอนดังนี้

1. (1) นำส่วนของสารละลายเมล็ดพันธุ์มะละกอที่เหลือการตรวจสอบในเทคนิค ELISA มาใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ โดยนำสารละลายเมล็ดปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RLT (เติมสาร 2-mercaptoethanol แล้ว) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน (vortex mix)

1. (2) นำตัวอย่างที่ต้นกล้ามะละกอทำให้ละเอียดร่วมกับสารละลาย General Extraction Buffer (GEB) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร จากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ RLT (เติมสาร 2-mercaptoethanol แล้ว) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน (vortex mix)

2. เทใส่ลงใน spin column (สีม่วง) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดของเหลวใต้ spin column ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย absolute ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอด

3. เทของเหลวทั้งหมดใส่ลงใน spin column (สีชมพู) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งของเหลวใต้ spin column

4. เติมบัฟเฟอร์ RW1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งของเหลวใต้ spin column

5. เติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำอีกครั้ง)

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วย้าย spin column (เฉพาะชิ้นที่อยู่ด้านใน) ใส่ลงในหลอดใหม่ จากนั้นเติม RNase-free water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงไปบริเวณกึ่งกลางเมมเบรน (membrane) ตั้งทิ้งไว้นาน 2 นาที

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ของเหลวที่ได้ในขั้นตอนนี้คือ สารละลายอาร์เอ็นเอ (Total RNA) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอกการนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

5.2.2 ตรวจหาเชื้อไวรัส TRSV ด้วยเทคนิค RT-PCR ตามขั้นตอนดังนี้

1. ใช้คู่มือวิธีการตรวจหาเชื้อไวรัส TRSV จำนวน 2 คู่ ดังนี้



คู่ที่ 1 เป็น universal primers ที่จำเพาะกับไวรัสในกลุ่มของ *Nepovirus* NepoA-F-Flap (5'-AATAAATCATAAACDTCWGARGGITAYCC-3') และ NepoA-R (5'-RATDCCYACYTGRCWIGGCA-3') (OEPP/EPPO *Bulletin*, 2017) ที่อุณหภูมิของ annealing เท่ากับ 55 องศาเซลเซียส และให้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ขนาด 340 bp คู่ที่ 2 เป็น specific primers ที่จำเพาะกับไวรัส TRSV TRSV-F (5'-CTTGCGGCCCAAATCTATAA-3') และ TRSV-R (5'-ACTTGTGCCAGGAGAGCTA-3') (Jossey and Babadoost, 2006) ที่อุณหภูมิของ annealing เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส และให้ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ขนาด 348 bp. เพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยวิธีการแบบ One-step RT-PCR ดังนี้

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

| | | |
|---------------------------------------|------|-----------|
| น้ำกลั่นหนึ่งขวด | 8.5 | ไมโครลิตร |
| 2X Reaction Mix | 12.5 | ไมโครลิตร |
| 10 μ M Forward primer | 1.0 | ไมโครลิตร |
| 10 μ M Reverse primer | 1.0 | ไมโครลิตร |
| SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix | 1.0 | ไมโครลิตร |
| Total RNA | 1.0 | ไมโครลิตร |

นำตัวอย่างเข้าเครื่องพีซีอาร์ (thermal cycler) และกำหนดโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

| | | | | | |
|-----------|-------------------|--------|-----|-----------|--------------------------|
| ขั้นที่ 1 | cDNA synthesis | 50 °C | นาน | 30 นาที | 1 รอบ |
| ขั้นที่ 2 | pre- denaturation | 94 °C | นาน | 3 นาที | 1 รอบ |
| ขั้นที่ 3 | denaturation | 94 °C | นาน | 30 วินาที | |
| ขั้นที่ 4 | annealing | (*) °C | นาน | 30 วินาที | 35 รอบ (ขั้นที่ 3 ถึง 5) |
| ขั้นที่ 5 | extension | 72 °C | นาน | 30 วินาที | |
| ขั้นที่ 6 | post-extension | 72 °C | นาน | 10 นาที | 1 รอบ |
| ขั้นที่ 7 | hold | 20 °C | นาน | 10 นาที | 1 รอบ |

หมายเหตุ (*) อุณหภูมิที่ใช้ขึ้นอยู่กับแต่ละคู่มือ

3. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตโฟเรซิส (Gel electrophoresis)

โดยเตรียมสารละลายเจลที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE และเติมสารย้อมสี ดีเอ็นเอ RedSafe ลงในเจลที่อัตราส่วน 5 ไมโครลิตรในสารละลายเจล 100 มิลลิตร รันเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นตรวจสอบแถบดีเอ็นเอในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Document และบันทึกภาพ

6. เพาะเมล็ดพันธุ์ (Seed symptom test) อย่างน้อย 1,000 เมล็ด เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 8 สัปดาห์เพื่อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติของต้นพืชในโรงเรือน หากพบอาการผิดปกติให้ทำการแยกเชื้อและจำแนกชนิด



ขั้นตอนที่ 4 การประเมินประสิทธิภาพมาตรการสุขอนามัยพืช (2564)

นำผลการดำเนินงานในขั้นตอนที่ 1 และ 3 มาใช้ประกอบการประเมินประสิทธิภาพมาตรการสุขอนามัยพืชที่บังคับใช้ สำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวันหากผลการดำเนินงานในขั้นตอนที่ 1 พบว่าประเทศผู้ส่งออกได้ปฏิบัติตามมาตรการสุขอนามัยพืชได้ถูกต้องตามที่กำหนด จึงจะนำผลการตรวจสอบศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน (ขั้นตอนที่ 3) มาพิจารณา ซึ่งมีหลักเกณฑ์ในการพิจารณา ดังนี้

การประเมินประสิทธิภาพมาตรการสุขอนามัยพืชที่บังคับใช้สำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน

| ผลการตรวจสอบศัตรูพืชกับเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน | ผลการประเมินประสิทธิภาพมาตรการสุขอนามัยพืช |
|---|--|
| 1. ไม่พบศัตรูพืชกักกันที่มีชีวิต | มีประสิทธิภาพ |
| 2. พบศัตรูพืชกักกันที่มีชีวิตตามแนบท้ายประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน พ.ศ. 2562 จำนวน 1 ครั้ง | ไม่มีประสิทธิภาพควรมีการทบทวน |
| 3. พบศัตรูพืชกักกันชนิดอื่นที่มีชีวิตนอกเหนือจากแนบท้ายในประกาศฯ ที่ไม่มีวิธีการกำจัด (ในเงื่อนไขการนำเข้าอนุญาตให้มีการกำจัดศัตรูพืชกักกันนอกเหนือจากที่ระบุในเงื่อนไขที่ประเทศไทยหากมีวิธีการกำจัด) | |
| 4. พบศัตรูพืชกักกันชนิดอื่นที่มีชีวิตนอกเหนือจากแนบท้ายในประกาศฯ และมีวิธีการกำจัด (ต้องกำจัดก่อนอนุญาตให้นำเข้า โดยจำนวนครั้งที่พบมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 5 ของจำนวนครั้ง (shipment) ที่นำเข้า) | |

หมายเหตุ กรณีตรวจพบสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่ไม่เป็นศัตรูพืชกักกันหลายครั้ง ต้องบันทึกข้อมูลชนิดที่พบเพื่อวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและทบทวนมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าต่อไป

เวลาและสถานที่

เดือนตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ภายหลังการประกาศและบังคับใช้เงื่อนไขการนำเข้ามะละกอจากไต้หวัน พ.ศ. 2562 ซึ่งมีผลใช้บังคับตั้งแต่ 13 มีนาคม 2562 เป็นต้นไป มีการแจ้งขอนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน ในช่วงปี พ.ศ. 2562-2564 จำนวน 3 รายการที่ดำเนินการถูกต้องตามเงื่อนไขข้อกำหนดและได้รับการ



อนุญาตให้นำเข้ามาในราชอาณาจักรได้ โดยทั้ง 3 รายการมีการขอนำเข้าโดยผู้นำเข้ารายเดียวกันคือ บริษัท เพื่อนเกษตรกร จำกัด และนำเข้าทางด้านตรวจพืชทำกาศยานเชียงใหม่ (Table 1) จากการตรวจเอกสารการยื่นขอนำเข้าซึ่งประกอบไปด้วย ใบอนุญาตนำเข้า, ใบรับรองสุขอนามัยพืชที่มีการระบุข้อความตามเงื่อนไขการนำเข้า, หนังสือรับรองว่าเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวมิใช่พืชตัดต่อสารพันธุกรรม, ลักษณะของบรรจุภัณฑ์ที่ปิดมิดชิด ไม่มีการปะปนของ ดิน ทราาย และชิ้นส่วนของพืช, ลักษณะของฉลากบนบรรจุภัณฑ์แสดงข้อมูลที่ตามที่กำหนดในเงื่อนไข รวมไปถึงเส้นทางและวิธีการขนส่ง ทุก รายการแสดงเอกสารถูกต้องและครบถ้วน (Table 2)

การตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์มะละกอนำเข้าจากไต้หวัน โดยวิธีการต่างๆ ผลการตรวจของทั้ง 3 รายการ คือ ไม่พบการปะปนของเมล็ดวัชพืชและแมลงในการนำเข้า, ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราหรือแบคทีเรียมากับเมล็ดพันธุ์มะละกอดังกล่าว และอาการผิดปกติของเมล็ดพันธุ์มะละกอที่ทำการปลูกดูอาการ (Seedling symptom test) (Table 3) และการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันตามประกาศฯ คือ *Tobacco ringspot virus* (TRSV) นั้น พบว่าเมล็ดพันธุ์มะละกอที่นำเข้าจากไต้หวันทั้ง 3 รายการ ตรวจไม่พบเชื้อไวรัส TRSV ซึ่งให้ผลตรงกันทั้งการตรวจสอบจากเมล็ดพันธุ์มะละกอโดยตรวจด้วยวิธี ELISA และวิธี RT-PCR และให้ผลสอดคล้องกับการตรวจสอบจากต้นกล้ามะละกอด้วยวิธี RT-PCR เช่นเดียวกัน (Table 4)

จากการดำเนินการตามขั้นตอนวิธีการ ทั้งในเรื่องของการตรวจสอบเอกสาร การตรวจดูบรรจุภัณฑ์และฉลาก การสุ่มตัวอย่าง และการตรวจสอบทั้งศัตรูพืชและศัตรูพืชกักกันในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะละกอนำเข้าจากไต้หวันทั้ง 3 รายการ ไม่พบศัตรูพืชและศัตรูพืชกักกันติดมากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว ดังนั้น เมื่อพิจารณาตามหลักเกณฑ์การประเมินประสิทธิภาพมาตรการสุขอนามัยพืช พบว่า มาตรการสุขอนามัยพืชที่บังคับใช้สำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวันมีประสิทธิภาพ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาวิจัยการประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน ในช่วงปี พ.ศ. 2563 – 2564 พบว่า ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน พ.ศ. 2562 มีประสิทธิภาพในการบังคับใช้

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ คุณปรียพรรณ พงศาพิชณ์ คุณวันเพ็ญ ศรีชาติ คุณโสภา มีอำนาจ และคุณสุคนธ์ทิพย์ สมบัติ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำงานวิจัย รวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการเก็บตัวอย่าง ขอขอบคุณมากค่ะ



เอกสารอ้างอิง

- วาริรัตน์ สมประทุม วรัญญา มาลี ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ พรทิพย์ แยมสุวรรณ ณีรัฐพร อุทัยมงคล อุดร อุณหวุฒิ. 2562. การกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะละกอจากไต้หวัน. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- Acosta Leal, R. and R. Rodriguez Montessoro. 1989. *Dependent tobacco ringspot virus transmission through Myzus persicae Sulzer in Cucurbitaceae*. (Online). Available. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=MX19930036228>. (August 21, 2017).
- Ann, P.J., I.T. Wong, J.N. Tsai and H.C. Huang. 2012. New records of Phytophthora diseases of Chinese medicinal herbs in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*. 21(2): 65-77.
- Jossey S. and Babadoost M. 2006. First report of *Tobacco ringspot virus* in pumpkin (*Cucurbita pepo*) in Illinois. *Plant Disease* 90, 1361. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2017. PM 7/2 (2) *Tobacco ringspot virus*. 47: 135–145.

Table 1 Data of papaya seeds imported from Taiwan.

| Imported date | COMPANY | PORT | VARIETY | AMOUNT |
|---------------|-----------|---|--------------------------|-------------|
| 1 JUL 2019 | KNOWN-YOU | Chiangmai International Airport Plant Quarantine Station | KNOWN-YOU NO.1 (0784) | 2.4 KGS. |
| | | | RED LADY (0786) | 12 KGS. |
| 14 FEB 2020 | KNOWN-YOU | Chiangmai International Airport Plant Quarantine Station | RED LADY (0786) | 34.984 KGS. |
| 18 NOV 2021 | KNOWN-YOU | Chiangmai International Airport Plant Quarantine Station | RED LADY (0786) | 10 KGS. |



Table 2 The document of each papaya seed imported from Taiwan.

| Imported date | PQ NO. | CHECK LISTS** | | | | | | |
|---------------|------------|---------------|-----|-----|-----|-----|---------|-----------------------|
| | | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | Others |
| 1 JUL 2019 | 62I - 0742 | / | / | / | / | / | Airport | PC No. VP507081514609 |
| 14 FEB 2020 | 63I - 0139 | / | / | / | / | / | Airport | PC No. VP507090147101 |
| 18 NOV 2021 | 64I - 1362 | / | / | / | / | / | Airport | PC No. VP5070013803A5 |

Remark **Check lists

(1) Import license
(2) Phytosanitary certificate
(3) Non-GMOs certificate
(4) Packaging; do not contaminate of soil, sand and plant parts
(5) Labeling; showed the correct of data and followed the conditions
(6) Transportation
/, the document or the import conditions are fulfilled
-, the document or the import conditions are not fulfilled

Table 3 Results of interception on papaya seeds imported from Taiwan.

| Imported date | PQ NO. | Interception of pests on papaya seeds | | | | | Seedling symptom test |
|---------------|------------|---------------------------------------|-------------------|---------------|-------------------|--|-----------------------|
| | | WEED Inspection | INSECT Inspection | FUNGI Blotter | BACTERIA Dilution | | |
| 1 JUL 2019 | 62I - 0742 | Not detected | Not detected | Not detected | Not detected | | Normal |
| 14 FEB 2020 | 63I - 0139 | Not detected | Not detected | Not detected | Not detected | | Normal |
| 18 NOV 2021 | 64I - 1362 | Not detected | Not detected | Not detected | Not detected | | Normal |

Table 4 Results of *Tobacco ringspot virus* (TRSV) detection by ELISA and RT-PCR methods.

| Imported date | PQ NO. | TRSV detection | | |
|---------------|------------|----------------|--------------|--------------|
| | | BY ELISA | BY RT-PCR | |
| | | SEED | SEED | SEEDLING |
| 1 JUL 2019 | 62I - 0742 | Not detected | Not detected | Not detected |
| 14 FEB 2020 | 63I - 0139 | Not detected | Not detected | Not detected |
| 18 NOV 2021 | 64I - 1362 | Not detected | Not detected | Not detected |



ภาคผนวก

สารละลาย General Extraction Buffer; 1X GEB

| | | | |
|--|-------|------|-----------|
| GEB powder (agdia®) | จำนวน | 16.5 | กรัม |
| Tween-20 | จำนวน | 10 | มิลลิลิตร |
| ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหนึ่งขวดเพื่อให้ครบ | | 500 | มิลลิลิตร |



วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้
Bactrocera dorsalis (Hendel) ในส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเพื่อการส่งออก
 Research and Development of Heated Air Quarantine Treatment for
 Pummelo Khao Tang Kwa Variety for Control Fruit Flies for Export

พุดิพงษ์ เพ็งฤกษ์ สลักจิต พานคำ รัชฎา อินทรกำแหง ชัยณรัตน์ สนศิริ
 มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ปวีณา บุษยาเทียน พงษ์ศักดิ์ จิณฤทธิ
 กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The impact of injury on Pummelo; Khao Tang Kwa Quality. After modified vapor heat treatment (MVHT) at a temperature 46, 47 and 48 °C for 0, 1 and 2 h, stored at 10 °C for 7 days. The pummelo was heated at higher temperature and time there was a statistically different percentage of weight loss at 46°C at 2 hours, 47 and 48°C. Skin color loss of pummelo peel the color values were measured in the L* a* b* system and found that the values were statistically different. The color of the peel of heated grapefruit is slightly more yellow than that of unheated pummelo. Black spots were also found in pummelo that were heated at 48 °C for 2 hours. Sweetness or total soluble solid and titrated acidity It was found that heated pummelo and unheated pummelo there were no statistical differences. Therefore, assessing the damage of the steam treatment process in export simulation by air and sea to determine the storage period affecting pummelo quality, pummelo was baked at 46 °C for 30 minutes and stored at 10 °C for 7 and 14 days. It was found that the percentage of weight loss The values of pummelo preserved at 7 and 14 days were statistically different. Skin color loss of pummelo peel color measurement in the L* a* b* system of pummelo stored at 7 and 14 days showed that the color change of the peel of heat treated pummelo was yellowish. Unheated pummelo but no black dots found this is a condition caused by oil glands that crack the peel of

รหัสการทดลอง 03-04-59-03-01-00-05-62



the pummelo. total soluble solid and titrated acid content of pummelo stored at 7 and 14 days were not statistically different. Therefore, a temperature of 46 °C for no more than 1 h should be used in modified vapor heat treatment of Khao Tang Kwa for export because it is the temperature and time period that does not cause any change in quality.

The experiment was carried out to determine the heat tolerance of the first instar larvae of *B. dorsalis* (Hendel), the most tolerance stage to Modified Vapor Heat Treatment (MVHT) between Khao Tang Kwa and Thong Dee pummelo. The preliminary disinfestation test was to treat infested both pummelo cultivars with MVHT at 46 °C for 0:00, 0:10, 0:20 and 0:30 minutes respectively. The intermediate scale disinfestation test, The results showed that oriental fruit fly first instar larvae infested in Khao Tang Kwa pummelo was less tolerance to MVHT than infested in Thong Dee pummelo. MVHT of fruit temperature 46 °C for 0:20 minutes was sufficient to completely kill all the oriental fruit fly first instar larvae in Khao Tang Kwa compared to the Thong Dee. without any difference effective In the eradication of fruit fly first instar larvae at 46 °C for 20 min, the number of fruit fly first instar larvae in pummelo was not less than 100 percent. Approximately 1,632 were all dead. Small scale disinfestation test to kill not less than 3,000 fruit flies in all pummelo. Pummelo is MVHT at 46 °C for 0:00, 0:10 and 0:20 minutes. Remove the pummelo from the VHT chamber and reduce the temperature of the pummelo by air for 1 hour and Keep the grapefruit in a temperature controlled room at 25-27 °C for 5 days. Check fruit flies survived after 5 days. It was found that the MVHT at 46°C for 0 min was able to kill 6,156 *B. dorsalis* aged fruit fly first instar larvae 6,156 in Khao Tang Kwa pummelo. Large scale disinfestation test to kill not less than 30,000 fruit flies in all pummelo. Pummelo is MVHT at 46 °C for 0:30 minutes. By inoculation of fruit fly first instar larvae in Khao Tang Kwa pummelo by artificial infestation method and forced infestation method. it was found that 48 and 24 unheated pomelo fruits survived 6,992 and 7,492. Heat-treated pomelos 144 and 72 not found fruit flies survived. In large scale efficacy test of this treatment schedule, none of the treated 43,452 first instar larvae survived.

Keywords : Pummelo Khao Tang Kwa Variety, modified vapor heat treatment



บทคัดย่อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลส้มโอขาวแตงกวา หลังจากอบไอน้ำปรับสภาพ ความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่อุณหภูมิ 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่าส้มโอได้รับความร้อน ที่อุณหภูมิและเวลา เพิ่มสูงขึ้น มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักแตกต่างกันทางสถิติ ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ที่ 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 47 และ 48 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนสีของเปลือกส้มโอ โดยวัดค่าสีในระบบ $L^* a^* b^*$ พบว่ามีค่าแตกต่างกันทางสถิติ สีของเปลือกผลส้มโอ ที่ได้รับความร้อนจะเป็นสีที่ค่อนข้าง เหลืองมากกว่าส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน และยังพบจุดดำ (black spot) ในส้มโอที่ผ่านความร้อนที่ อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ค่าความหวานหรือปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และ ค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ พบว่าส้มโอที่ได้รับความร้อนกับส้มโอที่ไม่ได้รับความร้อน ไม่มีค่าแตกต่าง กันทางสถิติ จึงทำการประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำ ในสภาพจำลองการส่งออก ทาง เครื่องบินและทางเรือ เพื่อทราบถึงระยะเวลาการเก็บรักษาที่มีผลต่อคุณภาพผลส้มโอโดยเลือกอบส้ม โอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บไว้รักษาที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 และ 14 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ของส้มโอที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน มีค่าแตกต่างกัน ทางสถิติ การเปลี่ยนสีของเปลือกส้มโอ วัดค่าสีในระบบ $L^* a^* b^*$ ของส้มโอที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน พบว่า การเปลี่ยนสีของเปลือกผลส้มโอที่ได้รับความร้อนจะเป็นสีที่ค่อนข้างเหลือง มากกว่า ส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน แต่ไม่พบจุดดำ ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากต่อมน้ำมันที่เปลือกของผล ส้มโอแตก ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และ ค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ ของส้มโอที่เก็บรักษาที่ ระยะเวลา 7 และ 14 วัน พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้น ควรใช้อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ระยะเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง ในการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา เพื่อการส่งออก เพราะเป็นช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านคุณภาพ

การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเทียบกับพันธุ์ทองดี โดยใช้หนอนวัย 1 เพื่อเป็นตัวแทนของ แมลง อบเป็นเวลานานที่แตกต่างกัน ดังนี้ ระยะเวลาอบนาน 0, 10, 20 และ 30 นาที พบว่า วิธีการ อบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์สามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอพันธุ์ขาว แตงกวาเทียบกับพันธุ์ทองดี โดยไม่มีความแตกต่างกัน มีประสิทธิภาพ ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สามารถกำจัดหนอนวัย 1 ในผลส้มโอได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน ไม่น้อยกว่า ประมาณ 1,632 ตัว ตายทั้งหมด การทดสอบ ประสิทธิภาพวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว ในผลส้มโอให้ตายทั้งหมด อบส้มโอด้วยวิธีอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่ 46 °C นาน 0 10 และ 20 นาที เมื่ออบส้มโอ ครบตามระยะเวลาที่กำหนด นำส้มโอออกจากตู้อบไอน้ำ และลดอุณหภูมิส้มโอด้วยวิธีเป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส้มโอในห้องควบคุมอุณหภูมิ



ที่ 25-27 °C นาน 5 วัน จึงนำมาตรวจการรอดชีวิตของแมลงวันผลไม้ พบว่า วิธีอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่ 46 °C นาน 0 นาที สามารถกำจัดหนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* วัยที่ 1 ในส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา จำนวน 6,156 ตัว จากนั้นจึงทำการศึกษาการยีนย่นประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอขาวแตงกวา ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว ในผลส้มโอให้ตายทั้งหมด เพื่อประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการอบไอน้ำในผลส้มโอขาวแตงกวา ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยวิธีการใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอขาวแตงกวา และ วิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอขาวแตงกวา พบว่า ส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 48 และ 24 ผล มีแมลงรอดชีวิต จำนวน 6,992 และ 7,492 ตัว ส้มโอที่ผ่านความร้อน จำนวน 144 และ 72 ผล ไม่พบแมลงรอดชีวิต ผลการประเมินประสิทธิภาพกระบวนการกำจัดแมลงวันผลไม้ ดังกล่าวสามารถกำจัด หนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้จำนวนประมาณ 43,452 ตัว ใน ผลส้มโอตายทั้งหมด ซึ่งได้มาตรฐานกำหนดของวิธีกำจัดศัตรูพืชด้วยกัน

คำหลัก : ส้มโอขาวแตงกวา อบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

คำนำ

ปัจจุบันการขยายตัวทางการค้าระหว่างประเทศเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การนำเข้าและส่งออกผลไม้ ที่มีความเสี่ยงสูงจากแมลงศัตรูพืชด้วยกันจะแพร่ระบาดจากประเทศหนึ่งไปยังอีกประเทศหนึ่ง เป็นปัญหาสำคัญในการนำเข้าผลไม้ของประเทศที่มีความเข้มงวดทางด้านกักกันพืชเช่น ประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากประเทศไทยเป็นแหล่งแพร่ระบาดของศัตรูพืช สำคัญด้านกักกันพืชหลายชนิด ได้แก่แมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis* complex) โดยกระทรวงเกษตร ป่าไม้และประมงญี่ปุ่น (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, MAFF) กำหนดให้การขออนุญาตนำเข้าสิ่งต้องห้าม ต้องยื่นเสนอแผนการวิจัยการกำจัดแมลงวันผลไม้ก่อนการส่งออกให้กับ (MAFF) พิจารณาตรวจสอบ ตามขั้นตอนในการวิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้เป็นไปตามข้อกำหนด ตรงตามมาตรฐานวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช ได้แก่ การอบไอน้ำ เป็นวิธีการใช้ความร้อนในการกำจัดแมลงวันผลไม้

วิธีการอบไอน้ำ (Vapor heat treatment, VHT) เป็นกรรมวิธีให้ความร้อนกับผลไม้โดยอาศัยการหมุนเวียน ไอน้ำร้อนผ่านผลไม้ อากาศร้อนจะอยู่ในสภาพอิ่มตัวด้วยไอน้ำ (Saturated condition) ความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ตลอดเวลา วิธีการนี้เริ่มใช้เป็นครั้งแรกที่สหรัฐอเมริกาเมื่อปี พ.ศ. 2472 เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ 2 ชนิด ในผลส้ม คือ แมลงวันผลไม้ *Ceratitidis capitata* (Wiedemann), และแมลงวันผลไม้ *Anastrepha ludens* (Loew) ต่อมามีการศึกษาวิจัยวิธีอบไอน้ำกับส้ม แอปเปิล ท้อ สาลี่ และ พลับ ที่ประเทศออสเตรเลีย ส้ม พลัม และมะม่วง ที่ประเทศไต้หวัน มะม่วงและฝรั่ง ที่ประเทศเปอร์โตริโก แอปเปิล อโวคาโด พริกยักษ์ ถั่ว ถั่วลิสง มะม่วง



มะละกอ แตง อุ่น ท้อ สาเล่ ปลับ ปลัม ทับทิม มะเขือเทศ ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา (Jones, 1939) วิธีอบไอน้ำเป็นวิทยาการด้านการกำจัดศัตรูพืชที่ประสบความสำเร็จในระยะเริ่มแรก แต่อย่างไรก็ดี ความสนใจได้ ลดน้อยลงเมื่อมีการคิดค้นวิธีรมผลไม้ด้วยสารเคมี เอธิลีนไดโบรไมด์ และ เมธิลโบรไมด์ จนกระทั่งหลังจากการห้ามใช้สารเคมีเอธิลีนไดโบรไมด์รมผลไม้กำจัดแมลงวันผลไม้เมื่อปี พ.ศ. 2527 วิธีอบไอน้ำจึงกลับมาได้รับความสนใจใหม่อีกครั้งหนึ่ง ประเทศญี่ปุ่นกลายเป็นผู้นำในด้านการพัฒนา อุปกรณ์เครื่องอบไอน้ำทั้งขนาดเล็กสำหรับงานวิจัยและขนาดใหญ่ระดับการค้าที่ทันสมัยควบคุมการทำงานด้วยระบบคอมพิวเตอร์ ปัจจุบัน เครื่องอบไอน้ำซึ่งใช้เทคโนโลยีของญี่ปุ่นมีใช้อยู่ในหลายประเทศ ได้แก่ ญี่ปุ่น (เกาะโอกินาวา) ฟิลิปปินส์ ไทย สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย

นอกจากนี้ยังมี วิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้น (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT) เป็นกรรมวิธีการให้ความร้อนกับผลไม้จะอาศัยวิธีอบอากาศร้อนร่วมกับวิธีอบไอน้ำ โดยช่วงแรกจะให้ความร้อนกับผลไม้ด้วยวิธีอบอากาศร้อน อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 50-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออุณหภูมิในผลไม้เพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่ง จึงปรับเปลี่ยนการให้ความร้อนเป็นวิธีอบไอน้ำ อากาศร้อนจะมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ วิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ยังไม่มีกรวิจัยอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเครื่องตู้อบความร้อนต้องมีอุปกรณ์ที่ทันสมัยสำหรับควบคุมระดับความชื้นสัมพัทธ์ได้อย่างเที่ยงตรง แต่อย่างไรก็ดี ประเทศไทยมีอุปกรณ์เครื่องตู้อบความร้อนขนาดเล็กสำหรับงานวิจัย ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง สามารถให้ความร้อนกับผลไม้ได้ทั้งสองกรรมวิธีที่กล่าวมาแล้ว ยังมีการวิจัยพัฒนากระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่มีประสิทธิภาพกับมะม่วงผ่านการยอมรับจากหน่วยงานกักกันพืชของประเทศญี่ปุ่น ให้ใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และ *B. cucurbitae* ในผลมะม่วง 4 พันธุ์ คือ หนังกกลางวัน น้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง ก่อนส่งออกไปจำหน่ายประเทศญี่ปุ่น (Unahawutti *et al.*, 1991)

Furusawa *et al.*, (1984) ศึกษาการอบไอน้ำกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะเขือ (eggplant) โดยใช้อบไอน้ำขนาดเล็กสำหรับงานทดลองซึ่งมีห้องบรรจุผลไม้ขนาด 1.14 ลบ.ม. และทดลองกับแมลงวันผลไม้ระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้ในผลมะเขือที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด ผลการทดลองพบว่า ในขณะที่ห้องบรรจุผลไม้มีมะเขือบรรจุอยู่ 30 กก./ลบ.ม. ไข่แมลงวันผลไม้ในผลมะเขือจำนวน 321,960 ฟอง ถูกกำจัดทั้งหมดเมื่อผ่านการอบไอน้ำซึ่งประกอบด้วยการใช้เวลานานประมาณ 70 นาที ให้ความร้อนเพิ่มอุณหภูมิภายในสุดผลมะเขือขึ้นไปถึง 43 องศาเซลเซียส และคงความร้อนภายในผลมะเขือที่อุณหภูมิ 43 ถึง 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง โดยมะเขือที่ผ่านกระบวนการอบไอน้ำนี้มีคุณภาพไม่แตกต่างไปจากผลมะเขือที่ไม่ผ่านความร้อน

Sunagawa *et al.*, (1987) ศึกษาการใช้วิธีอบไอน้ำกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะม่วงปลูกที่เกาะโอกินาวา ประเทศญี่ปุ่น ผลการทดลองปรากฏว่า ไข่อายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 23,320 ฟอง หนอนวัยที่ 1 จำนวน 30,994 ตัว หนอนวัยที่ 2 จำนวน 13,512 ตัว และหนอนวัยที่ 3 จำนวน



14,966 ตัว ในผลมะม่วงจะตายทั้งหมดเมื่อผ่านการอบไอน้ำโดยคงความร้อนภายในสุดผลที่อุณหภูมิ 43.5 ± 0.5 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง โดยกระบวนการอบไอน้ำดังกล่าวนี้ไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพ จากการสังเกตพบว่ามะม่วงจะแสดงอาการเสียหายจากความร้อนเมื่อคงความร้อนภายในผลที่อุณหภูมิ 47.5 ± 0.5 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง

Sunagawa *et al.*, (1988) ได้แนะนำให้ใช้วิธีอบไอน้ำเป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะระ โดยใช้แมลงวันผลไม้อายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 71,928 ฟอง ในผลมะระตายทั้งหมด เมื่อผ่านการอบไอน้ำจนกระทั่งอุณหภูมิภายในสุดผลมะระคงอยู่ที่ 45 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ถึงแม้ว่าที่อุณหภูมิดังกล่าวนี้จะมีมะระบางส่วนเสียหายจากความร้อน แต่ก็สามารถควบคุมความเสียหายหลัง การอบไอน้ำได้ ด้วยวิธีเก็บมะระไว้ในห้องอุณหภูมิตั้งระหว่าง 10 - 20 องศาเซลเซียส

Iwata *et al.*, (1990) ยังได้วิจัยพัฒนากระบวนการอบไอน้ำเพื่อใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลแตง (Netted melon) ปลูกที่เกาะโอกินาวา โดยใช้แมลงวันผลไม้จำนวนประมาณ 140,356 ฟอง ในผลแตงตายทั้งหมดเมื่อผ่านการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียสจนกระทั่งอุณหภูมิภายในสุดผลคงอยู่ที่ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 นาที กระบวนการอบไอน้ำดังกล่าวนี้ไม่มีผลกระทบต่อค่าการสูญเสียน้ำหนัก pH ปริมาณน้ำตาลและรสชาติของผลแตง ถ้าอุณหภูมิผลเพิ่มสูงขึ้นถึง 47 องศาเซลเซียสเปลือกของผลแตงจะปรากฏรอยแผลสีน้ำตาล หรือเกิดการยุบตัวของเนื้อแต่อย่างไรก็ดี คุณภาพของเนื้อและน้ำของผลแตงไม่ได้รับผลกระทบ

Unahawutti *et al.*, (1986) ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และ *B. cucurbitae* ระยะไข่และหนอนวัยต่างๆ ในผลมะม่วงพันธุ์หนึ่งกลางวันของประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อส่งออกมะม่วงไปยังประเทศญี่ปุ่น ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าแมลงวันผลไม้หนอนวัยที่ 1 เป็นระยะการเจริญเติบโตที่ทนทานต่อการอบไอน้ำมากที่สุด ในสภาพที่ภายในห้องอบไอน้ำมีอุณหภูมิของอากาศ 47.5 องศาเซลเซียสและความชื้นสัมพัทธ์ 98 เปอร์เซ็นต์สามารถกำจัดหนอนแมลงวันผลไม้วัยที่ 1 ประมาณ 99,252 ตัว ซึ่งอยู่ภายในผลมะม่วงได้ทั้งหมดเมื่ออุณหภูมิภายในสุดผลของผลมะม่วงเพิ่มขึ้นถึง 46.5 องศาเซลเซียสและปล่อยให้คงอยู่ที่ระดับอุณหภูมินี้ต่อไปอีกนาน 10 นาที ขณะที่ภายในห้องอบไอน้ำบรรจุมะม่วง 150 กก./ลบ.ม. ระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิภายในสุดของผลมะม่วงทั้งหมดให้ถึง 46.5 องศาเซลเซียสใช้เวลาประมาณ 110 นาที วิธีกรอบไอน้ำสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ทั้ง 2 ชนิด อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ทำให้คุณภาพของมะม่วงพันธุ์หนึ่งกลางวันเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ กระบวนการอบไอน้ำนี้ผ่านการยอมรับจากหน่วยงานกักกันพืชของประเทศญี่ปุ่น ให้ใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม 2529 และรัฐบาลญี่ปุ่นแก้ไขข้อกำหนดในกฎหมายกักกันพืชอนุญาตให้นำเข้ามะม่วงพันธุ์หนึ่งกลางวันจากประเทศไทยตั้งแต่วันที่ 1 มีนาคม 2530 (อุตร และคณะ, 2530, 2531)



หลังจากประสบความสำเร็จในการพัฒนากระบวนการอบไอน้ำกำจัดแมลงวันผลไม้ในมะม่วงพันธุ์หนึ่งกลางวัน ได้มีการศึกษาความเป็นไปได้ที่จะใช้กระบวนการอบไอน้ำสำหรับมะม่วงหนึ่งกลางวันกับมะม่วงชนิดอื่นอีก 3 พันธุ์ คือ น้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง (Unahawutti *et al.*, 1991) ผลการศึกษาด้านความเสียหายของผลมะม่วงจากความร้อนพบว่า การสูญเสียน้ำหนักของมะม่วงทั้งสามพันธุ์ที่ผ่านการอบไอน้ำน้อยกว่ามะม่วงไม่อบไอน้ำ ปริมาณน้ำตาลและความเป็นกรดไม่แตกต่างกันระหว่างมะม่วงอบไอน้ำและไม่อบไอน้ำ มะม่วงแสดงอาการของโรคแอนแทรกโนสและโรคเน่าขี้ผลอย่างรุนแรงมีแนวโน้มลดน้อยลงในมะม่วงอบไอน้ำ การอบไอน้ำทำให้เกิดความเสียหายจากความร้อนขึ้นภายในผลมะม่วงทั้ง 3 พันธุ์ ซึ่งแสดงอาการให้เห็น 2 ลักษณะคือ จุดสีขาว (White spot) และเนื้อมะม่วงแตกเป็นรูพรุนสีขาวลักษณะคล้ายฟองน้ำ (Spongy tissue) ลักษณะผิดปกติดังกล่าวนี้ไม่ปรากฏอาการให้สังเกตเห็นได้จากทางกายภาพและไม่แสดงอาการให้เห็นจนกว่ามะม่วงสุก (อุตร และคณะ, 2536)

นอกจากมะม่วงแล้ว ยังมีรายงานการศึกษาวิจัยการใช้วิธีอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมังคุด อุตร และคณะ (2537) รายงานว่า วิธีอบไอน้ำทำให้มังคุดเสียหายอย่างรุนแรงซึ่งแสดงอาการให้เห็นหลายลักษณะดังนี้ คือ การพัฒนาของสีเปลือกผิดปกติผลแข็ง เนื้อยุบตัวลงเป็นหลุม เนื้อแตกเป็นรูพรุนลักษณะคล้ายฟองน้ำ เนื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล นอกจากนี้ ความร้อนยังทำให้มังคุดอ่อนแอเพิ่มมากขึ้นต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชหลังเก็บเกี่ยว เมื่อมังคุดได้รับความร้อนอุณหภูมิสูงขึ้นหรือเป็นระยะเวลาขึ้น มังคุดมีแนวโน้มของการสูญเสียน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น ความเป็นกรดสูงขึ้น ขณะที่ปริมาณน้ำตาลลดลง ในปี พ.ศ. 2549 กลุ่มวิจัยการกักกันพืช ได้วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอพันธุ์ทองดีได้สำเร็จโดยใช้วิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของส้มโอ (อุตร และคณะ, 2549) สลักจิต และคณะ (2551) ได้ศึกษาความทนทานต่อความร้อนของผลเงาะต่อกรรมวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ พบว่า หนอนวัยที่ 1 มีความทนทานต่อความร้อนมากที่สุด การศึกษาคุณภาพของผลเงาะหลังผ่านความร้อนด้วยวิธีการ MVHT และ VHT โดยการเพิ่มอุณหภูมิภายในสุดผลเงาะให้คงอยู่ที่ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 0 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่าผลเงาะหลังการผ่านความร้อนด้วยวิธีการ VHT แสดงอาการเปลือกและขนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลน้อยกว่าวิธีการ MVHT มลนิภา และคณะ (2555) ได้ศึกษาด้านความเสียหายของมะละกอด้วยวิธีการอบไอน้ำ (VHT) เปรียบเทียบกับวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) พบว่ามะละกอกที่ผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง จะแสดงความเสียหายทางกายภาพที่ผิว โดยเกิดรอยบุ๋ม (pitting) และภายในผลเกิดอาการขำ และนิ่ม (flesh softening) เนื่องจากความร้อนอย่างเด่นชัด ในขณะที่มะละกอกที่ผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่อุณหภูมิ และระยะเวลาดังกล่าว พบการเปลี่ยนแปลงของสีผิวที่ผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (skin yellowing) ใกล้เคียงกับมะละกอกที่ไม่ผ่านความร้อนวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะละกอกมากกว่าวิธีการ



อบไอน้ำ (VHT) นอกจากนี้ มลนิภา และคณะ (2555) ศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ระยะไข่ และหนอนวัยต่าง ๆ ในผลมะละกอด้วยวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) เพื่อกำหนดระยะเวลาการเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุดพบว่าหนอนวัยที่ 1 เป็นวัยที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด โดยที่หนอนวัยที่ 1 ตายทั้งหมดที่อุณหภูมิ 46.5 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในมะละกอฟันธุ์ฮอลแลนด์

จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยวิธีการอบไอน้ำมี วัตถุประสงค์หลักเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ซึ่งทำลายอยู่ภายในผลไม้ แต่อย่างไรก็ดี นอกจากความร้อนจะสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้แล้วยังส่งผลกระทบต่อความเสียหายทางคุณภาพของผลไม้ จากการศึกษาเมื่อปี 2562 พบว่าวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์กับส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเพื่อการส่งออกที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ระยะเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง นั้น เป็นช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านคุณภาพ เมื่อทราบอุณหภูมิและระยะเวลาในการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวและอายุการเก็บรักษาผลไม้ แล้วนั้น วัตถุประสงค์ในการทดลองนี้คือ ต้องศึกษาวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ด้วยความร้อนที่มีประสิทธิภาพตามมาตรฐานด้านกักกันพืช สำหรับการส่งออก ซึ่งทำลายอยู่ภายในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา เพื่อหาว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวและอายุการเก็บรักษาผลไม้ นั้นสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ซึ่งทำลายอยู่ภายในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาได้หรือไม่

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาจากสวนที่ปลูกเป็นการค้าเพื่อการส่งออกได้มาตรฐานมีใบรับรองสวน (GAP) จากกรมวิชาการเกษตร
2. ผลส้มโอพันธุ์ทองดี จากสวนที่ปลูกเป็นการค้าเพื่อการส่งออกได้มาตรฐานมีใบรับรองสวน (GAP) จากกรมวิชาการเกษตร
3. แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
4. ตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็ก “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) รุ่นEHK-1000B และEHK-1000D
5. ตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดใหญ่สำหรับการค้าส่งออก “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Current Module type) รุ่นEHK-300MPC ของ บริษัท King Fresh Farm



6. เครื่องลดอุณหภูมิผลไม้อัตโนมัติ “Sanshu” shower cooling system (differential pressure type) รุ่น SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan
7. เครื่องวัดสีผลไม้ Komica Minol TA รุ่น CR-10 Plusert
8. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ Refractometer Atago PAL-BX ACID 1
9. เครื่องวัดปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ Titrator mettlertoledo DL53 Titrator
10. อ่างน้ำร้อน (water bath; Yamato, model: DK-43)
11. พรอทวัดความร้อนมาตรฐาน (standard thermometer)
12. ที่เจาะรู (cock borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร
13. กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
14. เครื่องใช้ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ เช่น จานทดลอง (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร กระจกพลาสติก และอุปกรณ์อื่นๆ เช่น ปิเปต (pipettes) หลอดทดลอง (test tube) บีกเกอร์ (beaker) หลอดหยด (dropper) ปากคีบ (forceps) ฆ้องสลิค กระจกกรองสีดำ พู่กัน หนั่งยาง และผ้าขาวบาง

วิธีการ

1. การศึกษาความเสียหายจากความร้อนของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา

- 1.1 สืบค้นฐานข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์ ชีววิทยาของส้มโอ

สืบค้นฐานข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์ ชีววิทยาของส้มโอเพื่อใช้ในการทดลอง ส้มโอ พันธุ์ขาวแตงกวาโดยสืบค้นข้อมูลจากเอกสารตำราวิชาการเกี่ยวกับชีววิทยา พื้นที่ปลูก และข้อมูลอื่น ๆ ที่สำคัญของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในงานทดลอง

- 1.2 สำรวจและคัดเลือกผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาที่ได้มาตรฐานเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

คัดเลือกผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา จากสวนที่ปลูกเป็นการค้าเพื่อการส่งออก ในระบบเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP) ของกรมวิชาการเกษตร จากจังหวัดชัยนาท และพิจิตร สำหรับนำมาใช้ในงานทดลอง ขนาดของผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาที่ใช้ทดลอง น้ำหนัก 1,300 - 1,500 กรัม/ผล (ส้มโอขนาดกลาง) ซึ่งมีปริมาณผลผลิตสูงเหมาะสมต่อการส่งออก นำมาเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นของกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช เพื่อรักษาคุณภาพของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา โดยน้ำหนักผลของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาที่ใช้ในการทดลองใช้เกณฑ์ดังนี้ เล็ก 1,100-1,300 กรัม, กลาง 1,300-1,500 กรัม และ ใหญ่ 1,500-1,700 กรัม

- 1.3 ทดสอบประสิทธิภาพของตู้อบไอน้ำเพื่อเตรียมความพร้อมของอุปกรณ์ก่อนการทดลอง

ทดสอบความเที่ยงตรงของแท่งวัดอุณหภูมิและความชื้น (sensor calibration) ดำเนินการด้วยตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงวันผลไม้ ขนาดทดลอง จำนวน 2 เครื่อง ก่อนที่จะเริ่มทำการทดลอง แท่งวัดอุณหภูมิที่ติดตั้งภายในตู้อบไอน้ำทั้งหมดจะต้องนำมาตรวจสอบความเที่ยงตรง และปรับค่าความคลาดเคลื่อนอุณหภูมิที่วัดได้ของแท่งวัดอุณหภูมิแต่ละแท่ง โดยตรวจสอบเปรียบเทียบกับพรอทวัดความร้อนมาตรฐาน ซึ่งมีวิธีการดังนี้



กลุ่มแห่งวัดอุณหภูมิตั้งหมตรวมทั้งปรอทวัดอุณหภูมิมাত্রฐาน ลงในเครื่องอ่างน้ำร้อน ตั้งค่าอ่างน้ำร้อนให้มีอุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ปรอทวัดอุณหภูมิมাত্রฐานจะแสดงค่าอุณหภูมิจริงของน้ำในอ่างน้ำร้อน อ่านค่าอุณหภูมิของแห่งวัดอุณหภูมิตั้งหมตร จากเครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้น (hybrid recorder; Chino, model: LE series และ FTH, model: FLE-073504E) ทั้งนี้ตู้อบไอน้ำจะติดตั้งอุปกรณ์ พิเศษคือ ชุดปรับค่าความต้านทานกระแสไฟฟ้า (correction resistance unit) ซึ่งเป็นอุปกรณ์สำหรับปรับค่า อุณหภูมิที่แห่งวัดอุณหภูมิตั้งหมตร อ่านได้ ทำการปรับค่าให้เท่ากับค่าอุณหภูมิที่อ่านได้จากปรอทวัดอุณหภูมิมাত্রฐาน ที่ 46 องศาเซลเซียส และแห่งวัดความชื้น ปรับค่าให้เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ การทดสอบความเที่ยงตรงของแห่งวัดอุณหภูมิตั้งหมตรจะเสร็จสิ้น เมื่อแห่งวัดอุณหภูมิตั้งหมตรแสดงค่าอุณหภูมิที่ 46 องศาเซลเซียส และแห่งวัดความชื้น อ่านค่าได้เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าไม่เปลี่ยนแปลง เมื่ออุณหภูมิคงที่จึง เริ่มการบันทึกอุณหภูมิตั้งหมตรเป็นระยะเวลาาน ติดต่อกัน 20 นาที

1.4 ศึกษาความเสียหายจากความร้อนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา

ศึกษาความเสียหายจากความร้อนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา โดยลักษณะความเสียหายของส้มโอหลังจากผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) เป็นกรรมวิธีที่ให้ความร้อนกับส้มโอ โดยอาศัยวิธีการอบไอน้ำ (VHT) ร่วมกับวิธีการอบอากาศร้อน (Hot air treatment, HAT) โดยช่วงแรกจะให้ความร้อนกับส้มโอด้วยวิธีการอบอากาศร้อน (HAT) อากาศร้อนที่หมุนเวียนผ่านส้มโอจะมีความชื้นสัมพัทธ์ 50-80 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิในส้มโอเพิ่มขึ้นถึง 43 องศาเซลเซียส แล้วจึงปรับเปลี่ยนเป็นวิธีการอบไอน้ำ (VHT) ซึ่งอากาศร้อนจะอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ มีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (อุตร, 2541; อุตรและคณะ, 2549; Unahawutti *et al.*, 2006) ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องตู้อบไอน้ำ กำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดทดลอง จำนวน 2 เครื่อง

โดยตั้งค่าอุณหภูมิสูงสุดของอากาศภายในห้องบรรจุผลไม้ เท่ากับ 47, 48 และ 49 องศาเซลเซียส ตามลำดับการทดลอง และระดับความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ ก่อนอุณหภูมิภายในผลส้มโอ 43 องศาเซลเซียส เท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ และหลังอุณหภูมิภายในผลส้มโอ 43 องศาเซลเซียส จะมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

ในการทดลองใช้ส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) น้ำหนัก $1,400 \pm 25$ กรัม/ผล จำนวน 3 ผล/อุณหภูมิที่ทำการศึกษ วางไว้ในกระบะชั้นล่างสุด ใช้เป็นตัวแทนแสดงอุณหภูมิของส้มโอทั้งหมด ภายในตู้อบไอน้ำ เมื่อส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ จำนวน 3 ผล มีอุณหภูมิคงอยู่ที่ 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 1 และ 2 ชั่วโมง แสดงว่าขณะนั้นส้มโอที่ใช้ทดลองทั้งหมดในตู้อบไอน้ำมีอุณหภูมิอยู่ในระดับเดียวกันกับส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ

ส้มโอที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนัก 1,300 - 1,500 กรัม/ผล (ส้มโอขนาดกลาง) จำนวนประมาณ 120 ผล ส้มโอที่ผ่านความร้อน treatment จำนวน 12 ผล/ซ้ำ และส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน



control จำนวน 4 ผล/ซ้ำ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ/อุณหภูมิที่ทำการศึกษา ก่อนการอบส้มโอ จะต้องทำการบันทึกข้อมูลน้ำหนักและถ่ายรูปส้มโอทุกครั้ง

หลังจากที่อบส้มโอครบตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่กำหนดไว้ นำส้มโอที่ผ่านความร้อนออกจากตู้อบไอน้ำ ลดอุณหภูมิส้มโอทันทีโดยวิธีการเป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้

จากนั้นนำผลส้มโอ บรรจุใส่ในกล่องกระดาษขนาด 36x50x45 เซนติเมตร มีรูระบายอากาศ โดยรอบกล่อง แบบเดียวกับที่ใช้ในการส่งออก และนำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด นำส้มโอทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนมาประเมินความเสียหายจากความร้อน โดยใช้หลักเกณฑ์พิจารณาและดำเนินการในหัวข้อต่างๆ ดังต่อไปนี้

1.4.1 การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)

การประเมินเปอร์เซ็นต์การสูญเสียผลส้มโอ คำนวณจากน้ำหนักผลส้มโอเริ่มต้นและหลังอบไอน้ำ ดังสมการ ต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละการสูญเสีย} = \frac{\text{น้ำหนักผลปกติก่อนอบไอน้ำ} - \text{น้ำหนักผลหลังอบไอน้ำ}}{\text{น้ำหนักผลปกติก่อนอบไอน้ำ}} \times 100$$

1.4.2 การเสียสภาพสีผิว (skin color loss)

ประเมินสีผิวผลส้มโอหลังอบไอน้ำ โดยทำการวัดด้วยเครื่อง Konica Minolta รุ่น CR-10 Plusher ทำการวัดรอบลูก 5 จุด ด้วย ระบบสี CIE L*a*b* โดย

L* ใช้กำหนดค่าความสว่าง L เป็น 0 สีที่ได้จะมีมืดเป็นสีดำ L เป็น 100 สีที่ได้จะสว่างเป็นสีขาว

a* ใช้กำหนดสีแดง หรือสีเขียว a เป็น +วัตถุมีสีออกแดง a เป็น -วัตถุมีสีออกเขียว

b* ใช้กำหนดสีเหลือง หรือสีน้ำเงิน b เป็น +วัตถุมีสีออกเหลือง b เป็น -วัตถุมีสีออกน้ำเงิน

1.4.3 ค่าความหวานหรือปริมาณค่าของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total solutions solid: TSS)

วิเคราะห์ค่าความหวาน หรือ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยชั่งตัวอย่างส้มโอ 50 กรัม นำเนื้อไปคั้นน้ำแล้วกรองด้วยผ้าขาวบางขนาด ขนาด 35-48 เมช จากนั้นนำน้ำคั้นที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Refractometer Atago PAL-BX 1 บันทึกค่าความหวาน มีหน่วยเป็น องศาบริกซ์ ($^{\circ}$ Brix)

1.4.4 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity content: TA)

ชั่งตัวอย่างส้มโอ 50 กรัม นำเนื้อไปคั้นน้ำ แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางขนาด ขนาด 35-48 เมช จากนั้นนำน้ำคั้นที่เตรียมได้มาผสมกับสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 N วิเคราะห์ด้วยเครื่อง auto titrator acidity Mettler Toledo รุ่น DL53 Titrator ค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้มีหน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์ (%)

1.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของส้มโอในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบิน และทางเรือ



ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดใหญ่สำหรับการค้าส่งออก “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Current Module type) รุ่นEHK-300MPC ของ บริษัท King Fresh Farm สัมโอที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนัก 1,300-1,500 กรัม/ผล สัมโอที่ผ่านความร้อน (treatment) จำนวน 24 ผล/ตู้ โดยตำแหน่งการวางผลสัมโอในตู้แตกต่างกัน คือ ตำแหน่งบน กลาง และล่าง ตำแหน่งละ 8 ผล (7 วัน 4 ผล และ 14 วัน 4 ผล) ที่เหลือจะใส่ สัมโอ (filler) ทุกชั้นบนพาเลตของตู้อบความร้อน ทั้ง 6 ชั้นๆละ 24 ผล และสัมโอที่ไม่ผ่านความร้อน (control) จำนวน 8 ผล ก่อนอบ สัมโอจะต้องชั่งน้ำหนักของผลสัมโอ ทำการบันทึกข้อมูลน้ำหนักและถ่ายรูปสัมโอทุกครั้ง สำหรับการวัดอุณหภูมิผลสัมโอที่ทดลองอาศัยการวัดจากเซ็นเซอร์ที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิผลสัมโอ (sensor fruit) จำนวน 3 ผล โดยวางตามตำแหน่ง บน กลาง ล่าง ของพาเลต ตรงกับตำแหน่งที่วาง สัมโอที่ผ่านความร้อน (treatment) ให้อุณหภูมิภายในสุดผลคงอยู่ที่ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (เซ็นเซอร์กำหนดอุณหภูมิสัมโอจะต้องอ่านค่าได้ 46 องศาเซลเซียส ครบทั้ง 3 เส้น) หลังจากทีอบสัมโอครบตามอุณหภูมิและระยะเวลาที่กำหนดไว้ ทำการลดอุณหภูมิสัมโอทันทีโดยวิธีการเป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง ภายในตู้อบความร้อน นำสัมโอทดลองทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน บรรจุใส่ในกล่องกระดาษขนาด 36x50x45 เซนติเมตร ด้านยาวทั้งสองข้างเจาะรูกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร พร้อมทั้งปิดด้วยผ้าตาข่าย จำนวน 4 รูเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส โดยเก็บไว้ในสภาพจำลองการเลียนแบบการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

บันทึกข้อมูล เมื่อครบกำหนดระยะเวลา 7 และ 14 วัน นำผลสัมโอออกมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางด้านคุณภาพ และบันทึกข้อมูล เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 4

2. การศึกษาประสิทธิภาพวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลสัมโอพันธุ์ชาวแตงกวา

2.1 รวบรวมแมลงวันผลไม้ สายพันธุ์ *Bactrocera dorsalis*

รวบรวมแมลงวันผลไม้ สายพันธุ์ *Bactrocera dorsalis* จากแหล่งปลูกฝรั่ง ในพื้นที่ จังหวัดปทุมธานี และ สมุทรสาคร โดยนำผลฝรั่งที่มีรอยการทำลายของแมลงวันผลไม้ สุกแก่ที่ร่วงหล่นมาใส่กระบะที่มี ซีลี้อย ปล่อยให้หนอนแมลงวันผลไม้ออกมาเข้าดักแด่ และนำดักแด่มาใส่กรงเพื่อรอให้ตัวอ่อนเจริญเป็นตัวเต็มวัยเพื่อทำการจำแนกชนิด คัดแยกเฉพาะแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* แล้วนำตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้เลี้ยงด้วยอาหารเทียม ในสภาพห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง เพื่อใช้ในงานทดลองขั้นต่อไป

2.2 ศึกษาเทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์แมลงวันผลไม้เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอสำหรับใช้ทดลอง

แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดใช้เทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยง ขยายพันธุ์ตามวิธีการของ Watanabe et al., (1973) และอุดร (2541)



สภาพห้องเลี้ยงแมลง: ห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้เป็นห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้นและแสงสว่าง ห้องเลี้ยงแมลงมีขนาด 3.5x4.6x2.3 เมตร อุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65 ± 5 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่างภายในห้องได้จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lights) จำนวน 20 หลอด ติดตั้งบนเพดานห้องเลี้ยงแมลง มีระยะรอบของความมืดและสว่าง (light-dark cycle) เป็น 12:12 ชั่วโมง ไฟจะสว่างในช่วงเวลา 6:00-18:00 นาฬิกา ภายใน ห้องเลี้ยงแมลงติดหลอดไฟขนาด 15 วัตต์ จำนวน 1 หลอด ให้แสงสลัว (dim light) เป็นเวลานาน 15 นาที ก่อนและหลังที่ไฟในห้องเลี้ยงแมลงจะสว่างเพื่อช่วยกระตุ้นให้แมลงวันผลไม้ผสมพันธุ์

ตัวเต็มวัย: เลี้ยงแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยกรงใหญ่ จำนวนประมาณ 20,000 ตัว/กรง และกรงเล็ก จำนวนประมาณ 2,000 ตัว/กรง กรงเลี้ยงแมลงมีขนาด 65.5x69.0x77.0 เซนติเมตร และ 35x50x35 เซนติเมตร ทำด้วย มุงลวดตาข่ายอลูมิเนียมขนาด 16 มิลลิเมตร ภายในกรงมีจานพลาสติกบรรจุอาหาร สำหรับตัวเต็มวัย ซึ่งประกอบด้วย สวนผสมโดยน้ำหนักดังนี้ น้ำตาล 10 ส่วน เอ็นไซม์โปรตีนไฮโดรไลเซส (enzymatic protein hydrolysate; Amber series 100) 1 ส่วน และยีสต์เอ็กแทรก (yeast extract) 1 ส่วน การให้น้ำจะใช้ขวดพลาสติกทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 เซนติเมตร สูง 7.5 เซนติเมตร ฝาขวดเจาะรูขนาด 1 มิลลิเมตร จำนวน 3 รู วิธีให้น้ำจะคว่ำขวดน้ำลงบนกระดาษกรองซึ่ง วางอยู่บนหลังกรงเลี้ยงแมลง หลังจากเลี้ยงแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยครบ 6 สัปดาห์ แมลงที่เหลือในกรง ทั้งหมดจะถูกนำไปทำลายและทำความสะอาดกรงเลี้ยงแมลง เพื่อเตรียมไว้สำหรับใส่แมลงในรุ่นต่อไป ในระหว่างการทดลองจะต้องมีแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยอายุต่างๆ กันเพื่อเตรียมไว้ใช้ในการทดลอง กรง ใหญ่ไม่น้อยกว่า 5 กรง และกรงเล็ก ไม่น้อยกว่า 10 กรง

วิธีการเก็บไข่: เก็บไข่แมลงวันผลไม้เมื่อตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 15 วัน โดยใช้กระบอกลูกพลาสติก ขนาด 7x17 เซนติเมตร ดานข้างเจาะรูขนาด 0.4 มิลลิเมตร ประมาณ 80-100 รู เพื่อให้แมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยเพศเมียแทงอวัยวะวางไข่ผ่านรูจากดานข้างเขาไปวางไข่ภายใน กระบอกลูกพลาสติกในการเก็บไข่แต่ละครั้งจะใส่น้ำส้ม ประมาณ 30 มิลลิลิตร ไข่ในกระบอกลูกเก็บไข่เพื่อกระตุ้นให้แมลงมาวางไข่ในขณะเดียวกันยังจะให้ความชื้นภายในกระบอกลูกพลาสติกป้องกันไม่ให้ไข่ของแมลงแห้งและแตก รวบรวมไข่แมลงด้วยวิธีเติมน้ำสะอาดในกระบอกลูกพลาสติกเก็บไข่แล้วเขย่าเบาๆ เพื่อให้ไข่ที่ติดอยู่ดานข้างภายในกระบอกลูกหลุด ใช้พินสอลินขนาด 150 มิลลิเมตร แยกไข่ออกจากน้ำสม รวบรวมไข่ทั้งหมดที่ได้ออกในน้ำกลั่นเก็บไว้ในถ้วยแก้ว (beaker) ขนาด 200 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำไข่ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเทียมพร้อมทั้งตรวจหาอัตราการฟักไข่ด้วยวิธีสุ่มไข่จำนวน 100 ฟอง วางไข่ให้กระจายบนถ้วยอาหารเทียมพร้อมทั้งตรวจหาอัตราการฟักไข่ด้วยวิธีสุ่มไข่จำนวน 100 ฟอง วางไข่ให้ฟักเป็นตัวหนอน 2 วัน

ระยะหนอน: เลี้ยงหนอนแมลงวันผลไม้ด้วยอาหารเทียมบนสูตรชาวโปดปอน อาหารเทียมสำหรับ ระยะหนอนประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้ข้าวโพดบด 50 กรัม กระดาษชำระ 3 กรัม น้ำกลั่น 85 มิลลิเมตร น้ำตาล 5 กรัม brewer's yeast 5 กรัม butyl p-hydroxybenzoate 0.15 กรัม HCl



(conc.) 0.2 มิลลิเมตร นำอาหารเทียมประมาณ 900 กรัม ใส่ในถาดพลาสติกขนาด 23x32x5 เซนติเมตร ตัดกระดาษชำระขนาด 5.5x11.0 เซนติเมตร จำนวน 2 ชั้น วางไวบนอาหารเทียม ไซ หลอดดูดขนาด 1 มิลลิเมตร ตวงไซจำนวน 0.4 มิลลิเมตร แลวนำไปวางบนกระดาษชำระ เกลี่ยไซ ด้วยพู่กันใหญ่กระจายทั่วๆ กันบนกระดาษชำระ ด้วยวิธีการนี้จะช่วยให้หนอนไม่แกงแยงอาหารกันเมื่อ ฟก ออกจากไซ ปดถาดอาหารเทียมด้วยถาดเปล่าอีกหนึ่งใบ เพื่อให้ภายในมีความชื้น ซึ่งเป็นสิ่ง จำเป็นมาก สำหรับไซจะฟกออกเป้นหนอน นำถาดอาหารเก็บไว้ในห้องเลี้ยงแมลงจนกระทั่งหนอน เจริญเติบโต เต็มที่ ระยะดักแด: หนอนแมลงวันผลไม้เจริญเติบโตเต็มที่พร้อมที่จะเขาดักแดภายใน 6 วัน เปดฝา ครอบถาดอาหารเทียม และย้ายไปวางไว้ในภาชนะสำหรับให้แมลงเขาดักแด ซึ่งเป็นกระบะ พลาสติก ขนาด 43x74x23 เซนติเมตร ภายในบรรจุ ไข่ เลี้ยง ขนาด 20 เมช พรมน้ำให้ชื้น พอประมาณสำหรับให้ หนอนเขาดักแด หนอนวัย 3 ที่เจริญเติบโตเต็มที่พร้อมจะเขาดักแดจะดีตัว ออกจากอาหารเทียมและ เขาดักแดในไข่เลี้ยง ก่อนที่ดักแดจะออกเป้นตัวเต็มวัยประมาณ 2 วัน ไซตระแกรงขนาด 20 เมช รอน แยกเอาดักแดออกจากไข่เลี้ยง คัดดักแดที่ไม่สมบูรณ์หรือตายทิ้งให้ หมด นำดักแดที่สมบูรณ์จำนวน ประมาณ 20,000 และ 2,000 ดักแด ใส่ในถาดพลาสติก ขนาด 23x32x5 เซนติเมตร แลวนำไปวางไว้ในกรงเลี้ยงแมลงที่เตรียมไวรอให้ออกเป้นตัวเต็มวัย

การควบคุมคุณภาพแมลง: แมลงวันผลไม้ซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการจะต้องมีความแข็งแรง เพื่อที่ข้อมูลจากผลการศึกษาวิจัยจะได้ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบคุณภาพ ของแมลงเป้นประจำ โดยในการเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่นจะตรวจสอบอัตราการฟกไซ (hatching rate) อัตราการออกเป้นตัวเต็มวัย (emerging rate) น้ำหนักของดักแด และอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio)

2.3 วิธีเตรียมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 สำหรับใช้ในการทดลอง

สมโอที่ใช้ในการทดลอง คือ สมโอพันธุ์ขาวแตงกวา ผลสมโอมีขนาดกลางน้ำหนัก 1,100-1,300 กรัม/ผล โดยตรวจสอบสภาพความผิดปกติของผลสมโอ ซึ่งสมโอทุกผลจะต้องไม่มีร่องรอยการ ทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือรอยแตกบนผลสมโอ การเตรียมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 เก็บไซจากแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยซึ่งเลี้ยงไว้ใน ห้องปฏิบัติการตามวิธีการข้างตน รวบรวมไซที่ ไตวางไวบนผ้าที่ชุ่มน้ำ เก็บไว้ในกล่องพลาสติกขนาด 12x18x4.5 เซนติเมตร แลวนำไปไว้ในห้องเลี้ยง แมลงเป้นเวลา 2 วัน เมื่อไซฟกออกเป้นหนอนวัย 1 ไซตะแกรงรอนแยกหนอนวัย 1 ออกจากเปลือกไซ ย้ายหนอนวัย 1 ใส่ในน้ำกลั่น เก็บไว้ในถ้วยแก้ว (beaker) ขนาด 200 มิลลิลิตร ไซ หลอดดูด สารละลาย (dropper) ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดหนอนวัย 1 นำไปใส่ไว้ในจานแก้ว (petri-dish) ขนาด 10x2 เซนติเมตร พร้อมทั้งนับหนอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.4 การศึกษาเทคนิคและวิธีการเตรียมผลสมโอพันธุ์ขาวแตงกวาเพื่อใช้ในการทดลอง

ในการทดลองใช้สมโอขนาดกลางน้ำหนัก 1,100-1,300 กรัม/ผล ทำการทดลองโดยไซที่เจาะ รู (cock borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร เจาะรูบนผลสมโอ จำนวน 3 รู ให้ลึกจนถึง



กึ่งกลางผล รูที่ 1 เจาะตรงตำแหน่งขั้วผลใหญ่ทะลุแกนกลางผล รูที่ 2 เจาะตามตรงกัน ขามกับรูที่ 1 ส่วนรูที่ 3 เจาะบริเวณด้านข้างผลใหญ่เลยจากส่วนครึ่งบนของผล สำหรับ เหตุผลในการเจาะรูที่ 2 ตรงบริเวณส่วนโตของผลนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ของเหลวที่เกิดขึ้นจากการ กินของหนอนแมลงวันผลไม้ในผลสมโอสามารถไหลออกมาได้ ซึ่งจะทำให้ภายในผลสมโอมีสภาพเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวันผลไม้ ดึงแกนกลางซึ่งติดกับปลายที่เจาะรูออกจากผล จากนั้นแคะเมล็ดภายในผลสมโอออกให้หมด ซึ่งพร้อมที่จะใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลสมโอ จำนวน 200 ตัว/ผล โดยใส่หนอนวัย 1 ลงบนเนื้อสมโอภายในผลตรงบริเวณที่เจาะรูไว้ ทางด้านข้าง อุดรูทั้งหมดด้วยสำลีเพื่อป้องกันไม่ให้หนอนวัย 1 เล็ดลอดออกจากผล นำสมโอใส่ในถุงผ้า ปิดปากถุงวางลงบนแป้นรองสมโอ เพื่อให้ของเหลวภายในผลสมโอซึ่งเกิดจากเนื้อสมโอถูก หนอนกินไหลออกจากผลซึมผ่านรูที่เจาะไว้ วิธีนี้จะช่วยให้มีอัตราการรอดชีวิตของแมลงวันผลไม้ในผล สมโอสูงขึ้น วางไว้ในกระเบ พลาสติกขนาด 36x54x15 เซนติเมตร คลุมด้วยผ้าปิด กระเบ นำสมโอเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 5 วัน ตรวจผลการทดลอง

2.5 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเทียบกับพันธุ์ทองดีในระดับ Small Scale

การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเทียบกับพันธุ์ทองดี ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็ก จำนวน 2 เครื่อง ใช้ส้มโอพันธุ์ทองดีเป็นตัวเปรียบเทียบกับส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา โดยใช้หนอนวัย 1 เพื่อเป็นตัวแทนของแมลงในการเตรียมส้มโอให้มีแมลงวันผลไม้ภายในผล (artificial infestation method) ตามวิธีการของอุดรและคณะ (2549) และ Unahawutti et al. (2006) ส้มโอที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนัก 1,300-1,500 กรัม/ผล (ส้มโอขนาดกลาง) ใช้ส้มโอทั้งหมดจำนวน 108 ผล นำส้มโอทดลองเข้าเครื่องตู้อบความร้อน วางเรียงส้มโอที่ทำการใส่หนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอ ผลละ 200 ตัว จำนวน 4 ผล/ถาด อบส้มโอ โดยการอบเป็นเวลานานที่แตกต่างกัน ดังนี้ ระยะเวลาอบนาน 0, 10, 20 และ 30 นาที แต่ละระยะเวลาที่กำหนดมีส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) จำนวน 48 ผล และมีส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับ (control) ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 12 ผล ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.6 ศึกษาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดในการกำจัดแมลงวันผลไม้ ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา ในระดับ Small Scale

- ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็กจำนวน 2 เครื่อง
- ในการทดลองการกำจัดแมลงด้วยความร้อนโดยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเพื่อทดสอบกระบวนการอบไอน้ำที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว ในผลส้มโอให้ตายทั้งหมด ประเทศญี่ปุ่นอนุญาตให้นำเข้าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555



เป็นต้นมา โดยการเตรียมส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา ให้มีแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัยที่ 1 อยู่ภายในผล ใช้วิธีใส่หนอนวัยที่ 1 ที่ต้องการลงในผลส้มโอ (Artificial infestation method) การเตรียมหนอนวัยที่ 1 ดำเนินการตามรายละเอียดในอุตรและคณะ (2549) และ Unahawutti et al. (2006)

- ใส่หนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวน 200 ตัว/ผล ส้มโอที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนัก 1,300-1,500 กรัม/ผล จำนวนประมาณ 36 ผล (ส้มโอขนาดกลาง) ส้มโอที่ผ่านความร้อน treatment จำนวน 12 ผล/ตู้ และส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน control จำนวน 4 ผล ก่อนการอบส้มโอจะต้องทำการบันทึกข้อมูลน้ำหนักส้มโอ อบส้มโอด้วยวิธีอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT)

- โดยช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลส้มโอขึ้นถึง 43 องศาเซลเซียส อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจึงปรับเปลี่ยนเป็นอากาศร้อนที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์โดยอบส้มโอให้อุณหภูมิภายในสุดผลเพิ่มขึ้นถึง 46 องศาเซลเซียส และคงความร้อนไว้ที่ 46 องศาเซลเซียส ไซระยะเวลาในการอบนาน 0, 10 และ 20 นาที การวัดอุณหภูมิผลส้มโอวัดจากส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) จำนวน 3 ผล

- แต่ละระยะเวลาที่กำหนดมีส้มโอที่ผ่าน ความร้อน (treatment) จำนวน 36 ผล และมีส้มโอที่ใช่เป็นตัว เปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 12 ผล

- เมื่ออบส้มโอครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่กำหนดให้นำส้มโอที่ผ่านความร้อนออกจากตู้อบไอน้ำและลดอุณหภูมิส้มโอทันทีด้วยวิธีเป่าด้วยลมนาน 1 ชม. ในเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ จากนั้นเก็บส้มโอหลังผ่านความร้อนแล้วในห้องควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิประมาณ 25-27 องศาเซลเซียส (ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ)

3. การศึกษายืนยันประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาในระดับ Large scale

ทดลองนี้ใช้รูปแบบการทำลายของแมลงวันผลไม้ 2 รูปแบบ คือ ใช้วิธีการใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอ (artificial infestation method) และใช้วิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอ (forced infestation method) แต่ละวิธีมีรายละเอียดดังนี้

รูปแบบที่ 1 การทำลายโดยวิธีการใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอ (artificial infestation method) ใส่หนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวน 200 ตัว/ผล ส้มโอที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนัก 1,100-1,300 กรัม/ผล ใช้ส้มโอทดลอง จำนวน 240 ผล แยกเป็นส้มโอที่ผ่านความร้อน จำนวน 180 ผล และส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 60 ผล นำส้มโอทั้งหมดเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิโดยมีอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำส้มโอไปใช้ในการทดลอง

รูปแบบที่ 2 การทำลายโดยวิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอ (forced infestation method)



เจาะรูด้วยเข็มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร บนผลส้มโอ จำนวน 10 รู/ผล ให้ทะลุเปลือกไปถึงเนื้อ เพื่อบังคับให้แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ตัวเต็มวัยเพศเมียแทงอวัยวะวางไข่เข้าไปวางไข่ในผลส้มโอผ่านรูที่เจาะไว้ ใช้ส้มโอทดลอง จำนวน 80 ผล แยกเป็นส้มโอที่ผ่านความร้อน จำนวน 60 ผล และส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 20 ผล นำไปวางไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาดเล็กที่มีแมลงวันผลไม้ ตัวเต็มวัย จำนวนประมาณ 2,000 ตัว ใช้ระยะเวลาในการให้แมลงวางไข่นาน 1 ชม. นำส้มโอทั้งหมดเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ โดยมีอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำส้มโอไปใช้ในการทดลอง

- ออบส้มโอในสภาพของตู้อบความร้อนมีปริมาณส้มโอ (Low load and Full load) แบ่งส้มโอที่มีแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 ที่อยู่ภายในผล ทั้ง 2 วิธี ออกเป็น 4 ส่วน เลือกส้มโอทดลองที่ได้จากวิธีการใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอ และวิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอ 1 ส่วน จำนวน 6 และ 2 ผล เก็บไว้สำหรับใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ไม่ผ่านความร้อน

- ส้มโอส่วนนี้จะใช้สำหรับการประมาณจำนวนแมลงทั้งหมดในส้มโอ ที่ผ่านความร้อน เนื่องจากว่าจำนวนแมลงที่มีชีวิตในส้มโอที่ผ่านความร้อนนั้นไม่สามารถที่จะทำการตรวจสอบได้โดยตรง สำหรับส้มโออีก 3 ส่วน แบ่งจำนวนเท่าๆ กัน ใส่ในภาชนะบรรจุผลไม้แบบกระเบะพลาสติก แข็งทนความร้อนขนาด 36x70x15 ซม. กระเบะเดียวกัน จำนวน 3 กระเบะ ในแต่ละกระเบะมีส้มโอทดลองโดยวิธีการใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอ จำนวน 6 ผล/กระเบะ และวิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอ จำนวน 2 ผล/กระเบะ และใส่ส้มโอที่ไม่ใช้ในการทดลอง (filler fruit) เฉลี่ยจำนวนเท่าๆ กัน ในกระเบะบรรจุผลไม้ทั้ง 3 และ 9 กระเบะ

- นำไปวางซ้อนลงบนกระเบะซึ่งบรรจุส้มโอทดลอง ในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้อบความร้อน มีปริมาณส้มโอ 50 และ 100% (Low load and Full load) ของความจุตู้ นำส้มโอเข้าเครื่องตู้อบความร้อนเพื่อประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 โดยให้มีแมลงทดลองจำนวนไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว นำข้อมูลไปคำนวณหาอัตราการตายที่แท้จริง (Corrected mortality) โดยอาศัยสูตรของ Abbott (Abbott, 1925)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินงาน : ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

สถานที่ทำการวิจัย : สวนส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา ของนายชัชชัย ทับทอง ม. 8 ต. นางลิ้อ อ.เมือง จ.ชัยนาท และ สวนของ นายเชาว์ อินหันต์ ม.3 ต.โพธิ์ประทับช้าง อ.โพธิ์ประทับช้าง จ.พิจิตร ห้องทดลอง กลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และ บริษัท คิง เฟรช ฟาร์ม จำกัด



ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาความเสียหายจากความร้อนของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา

1.1 ส้มโอ พันธุ์ขาวแตงกวา (Kao Tang Kwa Variety) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Citrus maxima* (Burm.) Merr. ชื่อสามัญ pummelo, shaddock อยู่ในชั้น Dicotyledonae อันดับ Rutales วงศ์ Rutaceae

พื้นที่ผลิตผล ปี 2562 ส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา จากแหล่งปลูกทั่วประเทศ คือ จังหวัด กำแพงเพชร, ชัยนาท, ตาก, นครราชสีมา, นครสวรรค์, นนทบุรี, บุรีรัมย์, ปราจีนบุรี, พิจิตร, พิษณุโลก, เพชรบูรณ์, ลพบุรี, ลำปาง, สงขลา, สระบุรี, สิงห์บุรี, สุโขทัย, อ่างทอง, อุตรดิตถ์ และ อุทัยธานี มีพื้นที่ปลูกทั้งหมด เท่ากับ 3,854.5 ไร่ ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 2,350.81 กิโลกรัม/ไร่ (ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านเกษตร online กรมส่งเสริมการเกษตร, 2563)

ลักษณะทางชีววิทยา ส้มโอขาวแตงกวา สามารถขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ตอนกิ่ง เสียบยอด และทาบกิ่ง การให้ผลผลิตเริ่มให้ผลเมื่ออายุต้นส้มโอประมาณ 4 ปี จะออกดอกและติดผลในปริมาณ มากอยู่ 2 ช่วง ได้แก่ ดอกที่ออกเดือน ธันวาคม – มกราคม จะเก็บเกี่ยวช่วงเดือนสิงหาคม – กันยายน เรียกว่า “ส้มปี” และดอกที่ออกเดือน สิงหาคม – กันยายน จะเก็บเกี่ยวประมาณเดือนมีนาคม – เมษายน เรียกว่า “ส้มทวาย” ผลผลิตโดยเฉลี่ยประมาณ 40 - 70 ผล/ต้น/ปีขึ้นอยู่กับอายุของต้นส้มโอ ผลลักษณะทรงกลมแป้น มีจุก ก้นป้านถึงเว้าเล็กน้อย ขนาดผลปานกลาง มีเมล็ดฝังอยู่ระหว่างเนื้อ มากกว่า 1 เมล็ด มีเปลือกบาง

ลักษณะทางนิเวศวิทยา ส้มโอ เป็นไม้ผลในเขตกึ่งร้อน มีการปลูกกระจายตามภูมิภาคต่างๆ และประเทศไทยมีพันธุ์ส้มโอที่หลากหลาย พันธุ์ขาวแตงกวา เป็นพันธุ์หนึ่งที่นิยมปลูก บริเวณภาค กลางของประเทศไทย สามารถปลูกได้ดี ในดินเกือบทุกชนิด พื้นที่ปลูกที่ท่าโสมโอเจริญองงามดีผล ดก และมีคุณภาพดี ควรปลูกในพื้นที่ดินโปร่ง ร่วนซุย มีอินทรีย์วัตถุอยู่มาก ระบายน้ำได้ดี ถ้าเป็นดิน เหนียวต้องยกทรง เพื่อให้มีการระบายน้ำได้ดี ควรมีระดับน้ำใต้ดินไม่น้อยกว่า 4 ฟุต น้ำไม่ขังแฉะ ดิน มีความเป็นกรด-ด่างประมาณ 5.5-6 น้ำต้องได้รับสม่ำเสมอปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยพละ 1,500-2,000 มิลลิเมตร และอุณหภูมิที่เหมาะสมเฉลี่ยประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ลำต้น เป็นไม้ยืนต้น มีสีน้ำตาล มีหนามเล็ก ๆ สูง 5-10 เมตร กิ่งก้านมีขน มักมีหนามแหลม ใบ ใบประกอบ มีใบย่อยใบเดี่ยว ออกสลับ รูปรีหรือรูปไข่กลับ เป็นแผ่น หนาสีเขียวเข้ม โคนก้านใบมีหูใบแผ่ออกเป็นรูปหัวใจ แผ่นใบเหมือน มะกรูด คือแบ่งใบเป็น 2 ตอน แต่ขนาดใบใหญ่กว่า ใบหนาแข็ง มีสีเขียวแก่ มีกลิ่นหอม ดอก ออกเป็นช่อสั้นหรือดอกเดี่ยว กระจาย ตามซอกใบและปลายยอด มีดอกย่อยหลายดอกตามบริเวณง่ามใบ กลีบดอกเป็นสีขาว เหมือนกับดอก ส้มทุกชนิด ปลายกลีบมนมี 4 กลีบ กลีบดอกมีเกสร 20-25 อัน ผล ขณะยังเล็กจะมีขนอ่อนปกคลุม เห็นชัดเจน ขนาดกลางกลมแป้น ผิวผลเมื่อยังอ่อนมีสีเขียว เมื่อโตเต็มที่เส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 14-18 ซม. เมื่อแก่จัดเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง ผิวของผลไม่เรียบ ผิวของเปลือกผลมีต่อมน้ำมัน ละเอียดกระจายทั่วผล ภายในผลเป็นช่องๆ มีแผ่นบาง ๆ สีขาวกั้นเนื้อให้แยกออกจากกันเนื้อมีสีขาว



เนื้อในที่เป็นถุงน้ำ เป็นสีครีมออกเหลืองหรือสีน้ำตาล เนื้อแต่ละส่วนเรียกว่า "กลีบ" มีรสหวานหรือหวานอมเปรี้ยว เมล็ด มีสีขาวเหลือง ผิวเมล็ด จะมีลักษณะเป็นร่องลึก ใน 1 ผลมีมากกว่า 1 เมล็ด

ลักษณะประจำพันธุ์ ส้มโอขาวแตงกวา มีแหล่งกำเนิดที่จังหวัดชัยนาท แหล่งปลูกที่สำคัญคือ จังหวัดชัยนาท, พิจิตร, กำแพงเพชร, นครสวรรค์ และอุทัยธานี ผลทรงกลมแป้น มีจุด ก้นปานถึงเว้าเล็กน้อย ขนาดผลทั่วไป น้ำหนัก 816-1,580 กรัม ความสูงผล 12-16 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 14-16 ซม. เปลือกมีผิวเรียบสีเขียวมีต่อมน้ำมันละเอียด เปลือกหนาปานกลาง 1.8-2.7 ซม. เนื้อหรือกึ่งมีสีขาวอมเหลือง มีขนาดใหญ่ เกาะตัวไม่ร่วน แท้กรอบไม่แฉะน้ำเนื้อกึ่งเบียดกันค่อนข้างแน่น จำนวน 12-15 กลีบ/ผล มีรสหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อยมีเมล็ดน้อยถึงไม่มีเลย (สำนักงานส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรที่ 1 จังหวัดชัยนาท, 2563) (ณรงค์ และคณะ, 2558)

1.2 แหล่งผลิตและขนาดผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาสำหรับใช้ในการทดลอง

คัดเลือกผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา สำหรับใช้ในงานทดลอง จากสวนที่ปลูกเป็นการค้าเพื่อการส่งออก ในระบบเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP) ของกรมวิชาการเกษตร จากจังหวัดชัยนาท และพิจิตร คือ สวนของนายชัชชัย ทับทอง หมายเลข GAP กษ 03-9001-36075103136 จำนวนพื้นที่ปลูก 16 ไร่ อยู่ที่ ม.8 ต.นางลือ อ.เมือง จ.ชัยนาท และ สวนของนายเชาว์ อินหันต์ หมายเลข GAP กษ 03-9001-36443653136 จำนวนพื้นที่ปลูก 5.75 ไร่ ม.3 ต.โพธิ์ประทับช้าง อ.โพธิ์ประทับช้าง จ.พิจิตร (Figure 1)

ขนาดของผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา 1,300 - 1,500 กรัม/ผล (ส้มโอขนาดกลาง) ซึ่งมีปริมาณผลผลิตสูง เหมาะสมต่อการส่งออก นำมาเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นของกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชด้วยกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช เพื่อรักษาคุณภาพของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา เพื่อนำมาใช้ในขั้นตอนการทดลองต่อไป โดยน้ำหนักผลของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาที่ใช้ในการทดลอง แบ่งน้ำหนักได้ดังนี้ เล็ก 1,100-1,300 กรัม, กลาง 1,300-1,500 กรัม และ ใหญ่ 1,500-1,700 กรัม

1.3 ทดสอบความเที่ยงตรงของแท่งวัดอุณหภูมิและความชื้น (sensor calibration) จากการปรับค่าความเที่ยงตรงของแท่งวัดอุณหภูมิ ตรวจสอบเปรียบเทียบกับปรอทวัดอุณหภูมิมาตรฐาน โดยจุ่มแท่งวัดอุณหภูมิทั้งหมดรวมทั้งปรอทวัดอุณหภูมิมาตรฐานลงในอ่างน้ำร้อน ตั้งค่าอ่างน้ำร้อนให้มีอุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เมื่อปรอทวัดอุณหภูมิมาตรฐานคงที่ 46 องศาเซลเซียส ดำเนินการปรับค่าความเที่ยงตรงของแท่งวัดอุณหภูมิทั้งหมดและแท่งวัดความชื้น ที่ชุดปรับค่าความต้านทานกระแสไฟฟ้า ให้แท่งวัดอุณหภูมิทั้งหมดสามารถคงอุณหภูมิที่ 46 องศาเซลเซียส และแท่งวัดความชื้นสามารถคงที่ 100 เปอร์เซ็นต์ จึงเริ่มการบันทึก

พบว่า แท่งวัดอุณหภูมิทั้งหมดสามารถคงอุณหภูมิที่ 46 องศาเซลเซียส และแท่งวัดความชื้นคงที่ 100 เปอร์เซ็นต์ จากเครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้น (hybrid recorder) ที่อ่านค่าได้ทุก 5 นาที โดยมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงเป็นระยะเวลาติดต่อกันในช่วงเวลานาน 20 นาที ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของ กระทรวงเกษตร ป่าไม้และประมงญี่ปุ่น (Table 1) (Figure 2)



1.4 ศึกษาความเสียหายจากความร้อนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาการประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อส้มโอ โดยส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) และ ส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่อุณหภูมิ 46 47 และ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาที่ใช้ในการอบส้มโอ รวมทั้งน้ำหนัก ส้มโอกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน Table 2 (Figure 3)เมื่อสิ้นสุดการให้ความร้อนลดอุณหภูมิผลส้มโอโดยวิธีเป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำส้มโอทดลองทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน บรรจุใส่ในกล่องกระดาษลูกฟูก สำหรับการส่งออกจริง เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน Figure 4 เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำส้มโอทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนมาประเมินความเสียหายจากความร้อน พบว่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ทั้งสองซ้ำที่ระยะเวลา 0 และ 1 ชั่วโมง เมื่ออบไอน้ำส้มโอที่อุณหภูมิสูงขึ้นและระยะเวลาเพิ่มขึ้น พบว่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักแตกต่างกันทางสถิติ ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ทั้งสองซ้ำที่ 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 47 และ 48 องศาเซลเซียส ทั้งสองซ้ำ 0, 1 และ 2 ชั่วโมง (Table 3)

การเปลี่ยนสีของเปลือกส้มโอ โดยวัดค่าสีในระบบ $L^* a^* b^*$ พบว่ามีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0, 1 และ 2 ชั่วโมง พบว่าส้มโอได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นและระยะเวลาเพิ่มขึ้น ในทั้งสองซ้ำของทุกอุณหภูมิ จะทำให้ค่าความสว่าง L^* มีค่าเพิ่มสูงขึ้น ค่า a^* ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงของสีจากเขียวไปเป็นแดงนั้น มีค่าเป็นบวกเพิ่มขึ้น ค่า b^* ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีน้ำเงินไปเป็นสีเหลืองมีค่าเพิ่มสูงขึ้น การเปลี่ยนสีของเปลือกผลส้มโอที่ได้รับความร้อนจะเป็นสีที่ค่อนข้างเหลืองมากกว่าส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน และส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ยังพบจุดดำ (black spot) ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากต่อมน้ำมันที่เปลือกของผลส้มโอแตก (damaged oil gland) เมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิสูงและคงความร้อนไว้เป็นระยะเวลานาน (Table 4-6) (Figure 5 and 6)

ค่าความหวานหรือปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และ ค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ พบว่าส้มโอที่ได้รับความร้อนกับส้มโอที่ไม่ได้รับความร้อน ไม่มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ โดยส้มโอที่ได้รับความร้อนมีค่าความหวานและ ค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ ลดน้อยลง ในทุกระดับอุณหภูมิที่ทำการศึกษ (Table 7 and 8) สอดคล้องกับ ชัยฉัตรนและคณะ (2562) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และ อุตรและคณะ (2549) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางคุณภาพของส้มโอพันธุ์ทองดี หลังอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ พบว่าการเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของส้มโอที่ผ่านความร้อนมีการสูญเสียน้ำหนักมากกว่าส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน ปริมาณน้ำตาล และ ค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน การเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอที่ผ่านความร้อนที่



อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง จะเปลี่ยนสีจากเดิมที่มีสีเขียว เปลี่ยนเป็นสีที่ค่อนข้างเหลือง มากกว่าส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อนและส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 และ 47 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง โดยที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง พบจุดดำ (black spot) เช่นกัน

1.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของส้มโอในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบิน และทางเรือ (Figure 5) การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อส้มโอ โดยส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) และส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดใหญ่สำหรับการค้าส่งออก “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Current Module type) รุ่น EHK-300MPC ของ บริษัท King Fresh Farm ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ระยะเวลาที่ใช้ในการอบส้มโอ รวมทั้งน้ำหนักส้มโอกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน (Table 9) เมื่อสิ้นสุดการให้ความร้อนลดอุณหภูมิผลส้มโอโดยวิธีเป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำส้มโอทดลองทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน บรรจุใส่ในกล่องกระดาษลูกฟูก สำหรับการส่งออกจริง โดยเก็บไว้ในสภาพจำลองการเลียนแบบการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 และ 14 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำส้มโอทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนมาประเมินความเสียหายจากความร้อน จากการทดลอง พบว่า เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ของส้มโอที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ระหว่างส้มโอที่ได้รับความร้อนกับส้มโอที่ไม่ได้รับความร้อน เนื่องจากการทดลองในเครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดใหญ่สำหรับการค้าส่งออก ผลไม้จะเกิดการสูญเสียน้ำหนักมากกว่าตู้อบความร้อนขนาดเล็กสำหรับทดลอง

ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และ ค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ ของส้มโอที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ระหว่างส้มโอที่ได้รับความร้อนกับส้มโอที่ไม่ได้รับความร้อน (Table 10 and 11)

การเปลี่ยนสีของเปลือกส้มโอ วัดค่าสีในระบบ $L^* a^* b^*$ ของส้มโอที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน พบว่ามีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ระหว่างส้มโอที่ได้รับความร้อนกับส้มโอที่ไม่ได้รับความร้อน โดยค่าความสว่าง L^* มีค่าเพิ่มสูงขึ้น ค่า a^* ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงของสีจากเขียวไปเป็นแดง นั้น มีค่าเป็นบวกเพิ่มขึ้น ค่า b^* ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีน้ำเงินไปเป็นสีเหลือง มีค่าเพิ่มสูงขึ้น จากการสังเกตลักษณะภายนอก พบว่าการเปลี่ยนสีของเปลือกผลส้มโอที่ได้รับความร้อนจะเป็นสีที่ค่อนข้างเหลืองมากกว่าส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อนที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 14 วัน และตำแหน่งการวางผลส้มโอที่ได้รับความร้อนมากที่สุด คือด้านล่าง จะมีสีเปลือกเป็นสีเหลืองมากกว่าด้านบน แต่ไม่พบจุดดำ (black spot) ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากต่อมน้ำมันที่เปลือกของผลส้มโอแตก (damaged oil gland) (Table 12 and 13)



2. การศึกษาประสิทธิภาพวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา

2.1 รวบรวมแมลงวันผลไม้ สายพันธุ์ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)

ได้แมลงวันผลไม้ สายพันธุ์ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) จากแหล่งปลูกฝรั่ง ในพื้นที่จังหวัดปทุมธานี และ สมุทรสาคร (Figure 8) โดยนำผลฝรั่งที่มีรอยการทำลายของแมลงวันผลไม้สุกแก่ที่ร่วงหล่นมาใส่กระบะที่มี ซีลี้อย ปลอ่ยให้หนอนแมลงวันผลไม้ออกมาเข้าดักแด้ และนำดักแด้มาใส่กรงเพื่อรอให้ตัวอ่อนเจริญเป็นตัวเต็มวัยเพื่อทำการจำแนกชนิด คัดแยกเฉพาะแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* (Hendel) แล้วนำตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้เลี้ยงด้วยอาหารเทียม ในสภาพห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง เพื่อใช้ในงานทดลองขั้นต่อไป (Figure 9)

2.2 ศึกษาเทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์แมลงวันผลไม้เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอสำหรับใช้ทดลอง

ได้เทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* (Hendel) โดยใช้สูตรอาหารเทียม ข้าวโพดบด ของ Watanabe et al., (1973) เตรียมอาหาร สำหรับ 500 กรัม ดังนี้ Maize 200 g, sugar 20 g, Brewer's yeast 20 g, Tissue 12 g, Butyl p-hydroxy benzoate 0.6 g, HCl (conc.) 0.9 ml. and distilled water 340 ml. จากนั้น ใส่ไข่แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ในหองเลี้ยงแมลงวันผลไม้เป็นหองที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้นและแสง สว่าง ภายในหองเลี้ยงแมลงวันผลไม้ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 65-70 เปอร์เซ็นต์ (Figure 10.)

หนอนแมลงวันผลไม้เจริญเติบโตเต็มที่พร้อมที่จะเขาดักแด้ภายใน 6 วัน เปิดฝา ครอบถาดอาหารเทียม และย้ายไปวางไว้ในภาชนะสำหรับให้แมลงเขาดักแด้ ซึ่งเป็นกระบะพลาสติก ขนาด 43x74x23 เซนติเมตร ภายในบรรจุ ซีลี้อย ขนาด 20 เมช พรหมน้ำให้ขึ้นพอประมาณสำหรับให้หนอนเขาดักแด้ หนอนวัย 3 ที่เจริญเติบโตเต็มที่พร้อมจะเขาดักแด้จะติดตัวออกจากอาหารเทียมและเขาดักแด้ในซีลี้อย ก่อนที่ดักแด้จะออกเป็นตัวเต็มวัยประมาณ 2 วัน ไซตระแกรงขนาด 20 เมช รอนแยกเอาดักแด้ออกจากซีลี้อย คัดดักแด้ที่ไม่สมบูรณ์หรือตายทิ้งให้หมด นำดักแด้ที่สมบูรณ์จำนวนประมาณ 20,000 และ 2,000 ดักแด้ ใส่ในถาดพลาสติก ขนาด 23x32x5 เซนติเมตร แลวนำไปวางไว้ในกรงเลี้ยงแมลงที่เตรียมไว้ออกเป็นตัวเต็มวัย จากการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ พบว่า แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีความแข็งแรงตามมาตรฐานงานทดลองและสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้มากกว่า 50,000 ตัว ซึ่งเพียงพอเพื่อใช้สำหรับงานทดลองการกำจัดแมลงด้วยความร้อนในการกำจัดแมลงวัน ผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

2.3 วิธีเตรียมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 สำหรับใช้ในการทดลอง ได้หนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* วัย 1 จากการ เก็บไข่จากแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยซึ่งเลี้ยงไว้ในหองปฏิบัติการตามวิธีการของตน รวบรวมไข่ที่ ไตวางไวบนผ้าที่ชุ่มน้ำ เก็บไว้ในกล่องพลาสติกขนาด



12x18x4.5 เซนติเมตร แลวนำไปไว้ในห้องเลี้ยง แผลงเป็นเวลา 2 วัน เมื่อไขพอกออกเป็นหนอนวัย 1 ไข่ตะแกรงร่อนแยกหนอนวัย 1 ออกจากเปลือกไข่ ย้ายหนอนวัย 1 ใส่ในน้ำกลั่น เก็บไว้ในถ้วยแก้ว (beaker) ขนาด 200 มิลลิลิตร ไข่ หลอดดูดสารละลาย (dropper) ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดหนอนวัย 1 นำไปใส่ไว้ในจานแก้ว (petri-dish) ขนาด 10x2 เซนติเมตร พร้อมทั้งนับหนอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เตรียมสำหรับใช้ทดลองขั้นต่อไป

2.4 การศึกษาเทคนิคและวิธีการเตรียมผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเพื่อใช้ในการทดลองใช้ที่เจาะรู (cock borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร เจาะรูบนผลส้มโอ จำนวน 3 รู ให้ลึกจนถึงกึ่งกลางผล รูที่ 1 เจาะตรงตำแหน่งขั้วผลให้ทะลุแกนกลางผล รูที่ 2 เจาะด้านตรงกันข้ามกับรูที่ 1 ส่วน รูที่ 3 เจาะบริเวณด้านข้างผลให้อยู่เลยจากส่วนครึ่งบนของผล ตึงแกนกลาง ซึ่งติดกับปลายที่เจาะรูออกจากผล แคระเมล็ดภายในผลส้มโอออก (Figure 11.) นำส้มโอวางไว้ซึ่งพร้อมที่จะใส่หนอนวัย 1 แผลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอ จำนวน 200 ตัว/ผล โดยใส่หนอนวัย 1 ลงบนเนื้อส้มโอภายในผลตรง บริเวณที่เจาะรูไว้ทางด้านข้าง อุดรูทั้งหมดด้วยสำลีเพื่อป้องกันไม่ให้หนอนวัย 1 เล็ดลอดออกจากผล นำส้มโอใส่ใน ถุงผ้าปิดปากถุงวางลงบนเบ้ารองส้มโอเพื่อให้ของเหลวภายในผลส้มโอซึ่งเกิดจากเนื้อส้มโอถูกหนอนกินไหลออก จากผลส้มโอซึมผ่านรูที่เจาะไว้ วางไว้ในกระบะพลาสติกขนาด 36x54x15 เซนติเมตร คลุมด้วยผ้าปิดกระบะ (Figure 12 and 13.)

หลังจากนั้นนำส้มโอเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 5 วัน ตรวจผลการทดลอง จากการทดลอง พบว่า เทคนิคการ inoculation หนอนวัย 1 โดยเจาะรูบนผลส้มโอ 3 รู (ด้านบน ข้าง และล่าง) หนอนวัย 1 มีอัตราการรอดชีวิตสูงและสามารถเจริญเติบโตอยู่ภายในผลส้มโอได้ 87 เปอร์เซ็นต์ (Table 14)

2.5 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเทียบกับพันธุ์ทองดีในระดับ Small Scale

ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเทียบกับพันธุ์ทองดี ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็ก จำนวน 2 เครื่อง ใช้ส้มโอพันธุ์ทองดีเป็นตัวเปรียบเทียบกับส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา โดยใช้หนอนวัย 1 เพื่อเป็นตัวแทนของแมลงในการเตรียมส้มโอให้มีแมลงวันผลไม้ภายในผล (artificial infestation method) ตามวิธีการของอุดรและคณะ (2549) และ Unahawutti *et al.* (2006) ส้มโอที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนัก 1,300-1,400 กรัม/ผล (ส้มโอขนาดกลาง) ใช้ส้มโอทั้งหมดจำนวน 108 ผล นำส้มโอทดลองเข้าเครื่องตู้อบความร้อน วางเรียงส้มโอที่ทำการใส่หนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอ ผลละ 200 ตัว จำนวน 4 ผล/ถาด อบส้มโอ โดยการอบเป็นเวลานานที่แตกต่างกัน ดังนี้ ระยะเวลาอบนาน 0, 10, 20 และ 30 นาที แต่ละระยะเวลาที่กำหนดมีส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) จำนวน 48 ผล และมีส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับ (control) ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 12 ผล ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Figure 14)



ระยะเวลาที่ใช้ในการอบสมโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10, 20 และ 30 นาที รวมทั้งน้ำหนัก สมโอกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน (Table 15 and 16) จากการทดลอง 3 ครั้ง พบว่า สมโอที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 12 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 1,632 ตัว แสดงว่าในสมโอจำนวน 48 ผล ซึ่งจะผ่านความร้อนแต่ละระยะเวลาที่กำหนด มีแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 รอดชีวิต จำนวน 34 ตัว/ผล

เมื่อนำสมโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10, 20 และ 30 นาที มาตรวจจำนวนหนอนแมลงวันผลไม้ พบอัตราการตายของหนอนวัย 1 ใน สมโอพันธุ์ทองดี เฉลี่ยเท่ากับ 99.50, 99.88, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ และขาวแตงกวา เฉลี่ยเท่ากับ 99.44, 99.83, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตามลำดับ (Table 17 and 18)

2.6 ศึกษาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา ในระดับ Small Scale

ในการทดลองการกำจัดแมลงด้วยความร้อนโดยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเพื่อทดสอบกระบวนการอบไอน้ำที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว (Small scale) ในผลส้มโอให้ตายทั้งหมด ประเทศญี่ปุ่นอนุญาตให้นำเข้าตั้งแต่ปี พ.ศ.2555 เป็นต้นมา โดยการเตรียมส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา ให้มีแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัยที่ 1 อยู่ภายในผล ใช้วิธีใส่หนอนวัยที่ 1 ที่ต้องการลงในผลส้มโอ (Artificial infestation method) การเตรียมหนอนวัยที่ 1 ดำเนินการตามรายละเอียดในอุตรและคณะ (2549) และ Unahawutti et al. (2006) ใส่หนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวน 200 ตัว/ผล ส้มโอที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนัก 1,300-1,500 กรัม/ผล จำนวนประมาณ 48 ผล (ส้มโอขนาดกลาง) ส้มโอที่ผ่านความร้อน treatment จำนวน 12 ผล/ตู้ และส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน control จำนวน 4 ผล ก่อนการอบส้มโอจะต้องทำการบันทึกข้อมูลน้ำหนักส้มโอ อบส้มโอด้วยวิธีอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่ 46 องศาเซลเซียส ไซระยะเวลาในการอบนาน 0, 10 และ 20 นาที (Figure 15.) แต่ละระยะเวลาที่กำหนดมีสมโอที่ผ่าน ความร้อน (treatment) จำนวน 36 ผล และมีสมโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 12 ผล ทำการทดลองจำนวน 3 ครั้ง ระยะเวลาที่ใช้ในการอบสมโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10 และ 20 นาที รวมทั้งน้ำหนัก สมโอกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน (Table 19 and 20) จากการทดลอง 3 ครั้ง พบว่า สมโอที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 12 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 2,052 ตัว แสดงว่าใน สมโอจำนวน 36 ผล ซึ่งจะผ่านความร้อนแต่ละระยะเวลาที่กำหนด มีแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 รอดชีวิต จำนวน 57 ตัว/ผล อัตราการตายของหนอนวัย 1 ในส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา เฉลี่ยเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกระยะเวลาในการอบไอน้ำ (Table 21)

จากการทดลองจึงประมาณการไตวาสมโอซึ่งผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส แต่ละระยะเวลาที่กำหนดจะมีหนอนที่รอดชีวิตได้จำนวนไม่น้อยกว่าประมาณ 6,156 ตัว ผลการตรวฉบับจำนวนแมลงในผลสมโอ จากการทดลองปรากฏว่า หนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ในผลสมโอตาย



ทั้งหมดเมื่อคงความรอนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานตั้งแต่ 0 นาทีขึ้นไป กระบวนการกำจัดแมลงดังกล่าวนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้ตามข้อกำหนดของวิธีการกำจัดศัตรูพืชตามกักกันพืช ดังนั้นควรจะได้มีการทดสอบการศึกษายืนยันกระบวนการกำจัดแมลงดังกล่าวข้างต้น เพื่อใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชตามกักกันพืชสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในสมโกลก่อนการส่งออก

3. การศึกษายืนยันประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาในระดับ Large scale จากการยืนยันประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา ระดับจำนวนแมลงทดลองไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว (Large scale) จากรูปแบบการทำลายของแมลงวันผลไม้ ทั้ง 2 รูปแบบ คือ ใช้วิธีการใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอ (artificial infestation method) (Figure 12) และใช้วิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอ (forced infestation method) (Figure 16) โดยระยะเวลาที่ใช้ในการอบสมโอ รวมทั้งน้ำหนัก สมโอ กำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน (Table 22 and 23)

ในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้อบความร้อน มีปริมาณส้มโอ 50 % (Low load) โดยรูปแบบ artificial infestation method มีสมโอที่ผ่าน ความรอน (treatment) จำนวน 72 ผล และมี สมโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความรอนจำนวน 24 ผล และรูปแบบ forced infestation method มีสมโอที่ผ่าน ความรอน (treatment) จำนวน 36 ผล และมีสมโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความรอนจำนวน 12 ผล จากทำการทดลองจำนวน 6 ซ้ำ เมื่อครบกำหนดระยะเวลาในการเก็บรักษา นำส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มาตรวจจำนวนหนอนแมลงวันผลไม้ พบว่า

รูปแบบ artificial infestation method สมโอที่ไม่ผ่านความรอน จำนวน 24 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 3,771 ตัว แสดงว่าในสมโอจำนวน 72 ผล ซึ่งจะผ่านความรอน มีแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 รอดชีวิต จำนวน 52 ตัว/ผล

รูปแบบ forced infestation method สมโอที่ไม่ผ่านความรอน จำนวน 12 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 3,611 ตัว แสดงว่าในสมโอจำนวน 36 ผล ซึ่งจะผ่านความรอน มีแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 รอดชีวิต จำนวน 100 ตัว/ผล (Figure 17.)

พบอัตราการตายของหนอนวัย 1 ในส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา เฉลี่ยเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 2 รูปแบบของการใส่แมลงวันผลไม้ และมีค่าประมาณการในการกำจัดแมลงวันผลไม้ทั้ง 2 รูปแบบของการใส่แมลงวันผลไม้ ตาม Abbott (Abbott, 1925) เท่ากับ 22,146 ตัว (Table 24)

ในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้อบความร้อน มีปริมาณส้มโอ 100 % (Full load) โดยรูปแบบ artificial infestation method มีสมโอที่ผ่าน ความรอน (treatment) จำนวน 72 ผล และมีสมโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความรอนจำนวน 12 ผล และรูปแบบ forced infestation method มีสมโอที่ผ่านความรอน (treatment) จำนวน 36 ผล และมีสมโอที่ใช้เป็นตัว



เปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความรอนจำนวน 12 ผล จากทำการทดลองจำนวน 6 ซ้ำ เมื่อครบกำหนดระยะเวลาในการเก็บรักษา นำส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มาตรวจจำนวนหนอนแมลงวันผลไม้ พบว่ารูปแบบ artificial infestation method ส้มโอที่ไม่ผ่านความรอน จำนวน 24 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 3,221 ตัว แสดงว่าในส้มโอจำนวน 72 ผล ซึ่งจะผ่านความรอน มีแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 รอดชีวิต จำนวน 44 ตัว/ผล

รูปแบบ forced infestation method ส้มโอที่ไม่ผ่านความรอน จำนวน 12 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 3,881 ตัว แสดงว่าในส้มโอจำนวน 36 ผล ซึ่งจะผ่านความรอน มีแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 รอดชีวิต จำนวน 107 ตัว/ผล (Figure 18.)

พบอัตราการตายของหนอนวัย 1 ในส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา เฉลี่ยเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ทั้ง 2 รูปแบบของการใส่แมลงวันผลไม้ และมีค่าประมาณการในการกำจัดแมลงวันผลไม้ทั้ง 2 รูปแบบของการใส่แมลงวันผลไม้ ตาม Abbott (Abbott, 1925) เท่ากับ 21,306 ตัว (Table 25) (Figure 19.)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาความเสียหายจากความร้อนการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา อบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่อุณหภูมิ 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักแตกต่างกันทางสถิติ ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ทั้งสองซ้ำที่ 2 ชั่วโมง อุณหภูมิ 47 และ 48 องศาเซลเซียส ทั้งสองซ้ำ 0, 1 และ 2 ชั่วโมง การเปลี่ยนสีของเปลือกส้มโอ โดยวัดค่าสีในระบบ $L^* a^* b^*$ พบว่ามีค่าแตกต่างกันทางสถิติ สีของเปลือกผลส้มโอที่ได้รับความร้อนจะเป็นสีที่ค่อนข้างเหลืองมากกว่าส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน และยังพบจุดดำ (black spot) ในส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ค่าความหวาน และ ค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ พบว่าไม่มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ โดยส้มโอที่ได้รับความร้อน จะมีค่าความหวานและค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ ลดน้อยลง

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของส้มโอในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ โดยอบส้มโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 และ 14 วัน พบว่า เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ของส้มโอที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ การเปลี่ยนสีของเปลือกส้มโอ วัดค่าสีในระบบ $L^* a^* b^*$ ของส้มโอที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน เกิดการเปลี่ยนสีของเปลือกผลส้มโอที่ได้รับความร้อนจะเป็นสีที่ค่อนข้างเหลืองมากกว่า ส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน จากการสังเกตลักษณะภายนอก พบว่าการเปลี่ยนสีของเปลือกผลส้มโอที่ได้รับความร้อนจะเป็นสีที่ค่อนข้างเหลืองมากกว่าส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 14 วัน และตำแหน่งการวางผลส้มโอที่ได้รับความร้อนมากที่สุด คือด้านล่าง จะมีสีเปลือกเป็นสีเหลืองมากกว่าด้านบน แสดงให้เห็นว่าเมื่อส้มโอได้รับความร้อนและระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นสีเปลือกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเพิ่มขึ้น และไม่พบจุดดำ (black



spot) ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากต่อมน้ำมันที่เปลือกของผลส้มโอแตก (damaged oil gland) รวมทั้งไม่พบความแตกต่างของค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และ ค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ ระหว่างส้มโอที่ได้รับความร้อนกับส้มโอที่ไม่ได้รับความร้อน ที่ระยะเวลาในการเก็บรักษาในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ ดังนั้น ควรใช้อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที ในการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ของส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเพื่อการส่งออก เพราะเป็นช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านคุณภาพ

ในการศึกษาประสิทธิภาพวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา ต้องเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ สายพันธุ์ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ให้ได้โดยใช้เทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณให้เพียงพอสำหรับใช้ทดลองขั้นต่อไป โดยใช้ สูตรอาหารเทียม ข้าวโพดบด ของ Watanabe *et al.*, (1973) และเตรียมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 โดย รวบรวมไข่ที่ได้จากกระบอกพลาสติกวางไวบนผ้าที่ชุ่มน้ำ เก็บไว้ในกล่องพลาสติกขนาด 12x18x4.5 เซนติเมตร แลวนำไปไว้ในห้องเลี้ยง แมลงเป็นเวลา 2 วันเมื่อไขฟักออกเปนนอนวัย 1 ไข่ตะแกรงร่อนแยกหนอนวัย 1 ออกจากเปลือกไข่ ย้ายหนอนวัย 1 ใส่ในน้ำกลั่น เก็บไว้ในถาดแก้ว (beaker) ขนาด 200 มิลลิลิตร และได้วิธีการเตรียมผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเพื่อใช้ในการทดลอง ไข่ที่เจาะรู (cock borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร เจาะรูบนผลส้มโอจำนวน 3 รู ใหญ่ถึงกึ่งกลางผล รูที่ 1 เจาะตรงตำแหน่งขั้วผลใหญ่ทะลุแกนกลางผล รูที่ 2 เจาะด้านตรงกัน ขามกับรูที่ 1 สนวนรูที่ 3 เจาะบริเวณด้านข้างผลใหญ่อยู่เลยจากสวนครึ่งบนของผล ใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอ จำนวน 200 ตัว/ผล โดยใส่หนอนวัย 1 ลงบนเนื้อส้มโอภายในผลตรงบริเวณที่เจาะรูไว้ ทางด้านข้าง อุดรูทั้งหมดด้วยสำลีเพื่อป้องกันไม่ให้หนอนวัย 1 เล็ดลอดออกจากผล นำส้มโอใส่ในถุงผ้า ปิดปากถุงวางลงบนแป้นรองส้มโอ เพื่อให้ของเหลวภายในผลส้มโอซึ่งเกิดจากเนื้อส้มโอถูก หนอนกินไหลออกจากผลซึมผ่านรูที่เจาะไว้ ตรวจสอบผลการทดลองจากการทดลอง พบว่า เทคนิคและวิธีการเตรียมผลส้มโอ เพื่อใช้ในการทดลองวิธีการดังกล่าว หนอนวัย 1 มีอัตราการรอดชีวิตสูงและสามารถเจริญเติบโตอยู่ภายในผลส้มโอได้ 87 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเทียบกับพันธุ์ทองดี โดยใช้หนอนวัย 1 เพื่อเป็นตัวแทนของแมลง อบเป็นเวลานานที่แตกต่างกัน ดังนี้ ระยะเวลาอบนาน 0, 10, 20 และ 30 นาที แต่ละระยะเวลาที่กำหนดมีส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) จำนวน 48 ผล และมีส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 12 ผล ทำการทดลอง 3 ซ้ำ พบว่า ส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 12 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 1,632 ตัว เมื่อนำส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10, 20 และ 30 นาที พบอัตราการตายของหนอนวัย 1 ในส้มโอพันธุ์ทองดีเฉลี่ยเท่ากับ 99.50, 99.88, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ และขาวแตงกวา เฉลี่ยเท่ากับ 99.44, 99.83, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



และจากการทดสอบ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาในระดับแมลงทดลองจำนวนไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว (Small Scale) ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10 และ 20 นาที พบว่าสมโอที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 12 ผล มีแมลงวันผลไม้ รอดชีวิต จำนวน 2,052 ตัว แสดงว่าในสมโอจำนวน 36 ผล ที่ผ่านความร้อนแต่ละระยะเวลาที่กำหนด มีแมลงวันผลไม้ หนอนวัย 1 รอดชีวิต จำนวน 57 ตัว/ผล อัตราการตายของหนอนวัย 1 ในส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา เฉลี่ยเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ในทุกระยะเวลาในการอบไอน้ำ แสดงว่าการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ตั้งแต่ 0 นาที เป็นต้นไป สามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา ตายทั้งหมด มีค่าประมาณการในการกำจัดแมลงวันผลไม้ ตาม Abbott (Abbott, 1925) เท่ากับ 6,156 ตัว

ดังนั้นจึงทำการทดสอบในระดับแมลงทดลองจำนวนไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว (Large Scale) ในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้อบความร้อน มีปริมาณส้มโอ 50 % (Low load) และ 100 % (Full load) เพื่อกำจัดแมลงวัน *B. dorsalis* ให้ได้ตามข้อกำหนด ของวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช พบว่า การอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส 30 นาที

โดยวิธีการใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอขาวแตงกวา และ วิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอขาวแตงกวา พบว่า สมโอที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 48 และ 24 ผล มีแมลงรอดชีวิต จำนวน 6,992 และ 7,492 ตัว สมโอที่ผ่านความร้อน จำนวน 144 และ 72 ผล ไม่พบแมลงรอดชีวิต ผลการประเมินประสิทธิภาพกระบวนการกำจัดแมลงวันผลไม้ ดังกล่าวสามารถกำจัด หนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้จำนวนประมาณ 43,452 ตัว ใน ผลส้มโอตายทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ช่วงแรกจะให้ความร้อนด้วยวิธีอบอากาศร้อนที่หมุนเวียนภายในตู้อบไอน้ำจะมีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 50-80 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิภายในตู้เพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งและอุณหภูมิภายในผลส้มโอมีอุณหภูมิที่ 43 องศาเซลเซียส จึงปรับเปลี่ยนการให้ความ ร้อนเป็นวิธีอบไอน้ำ อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ (saturated condition) ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ กระบวนการอบส้มโอดังกล่าวนี้มีประสิทธิภาพสูงได้ระดับมาตรฐานที่ ยอมรับเป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช เพื่อใช้กำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ และหนอนวัยต่างๆ ในส้มโอ ก่อนการส่งออก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณบุคลากร กลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จนกระทั่งการทดลองสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี



เอกสารอ้างอิง

- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2555. *วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันทองด้วยความร้อนในผลมะละกอเพื่อการส่งออก. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาศัตรูพืชหมดปัญหาเมื่ออารักขาถูกวิธี. 7-9 สิงหาคม 2555. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 100 หน้า.*
- สลักจิต พานคำ, มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ และชัยรัตน์ สนศิริ. 2551 *ความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ระยะไข่และหนอนในผลเงาะต่อวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์* ผลงานวิจัยฉบับเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- สลักจิต พานคำ, มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ และชัยรัตน์ สนศิริ. 2551 *ศึกษาวิธีการเตรียมเงาะทดลองในสภาพที่มีไข่และหนอนของแมลงวันผลไม้ Oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) อยู่ภายในผล* ผลงานวิจัยฉบับเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- สลักจิต พานคำ และ จารุวรรณ จันทรา. 2551 *ความเสียหายของเงาะจากวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อน* ผลงานวิจัยฉบับเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- อุดร อุณหุฒิ, มานะ พุ่มทอง, รัชฎา อินทรกำแหง, วลัยกร วรวิศิษฎ์ธำรง, นवलนิสา ตั้งสัจจะกุล, จำลอง เจตนะจิตร, ประเทือง ศรีสุข และ บุญชอบ ภัทรรุจี. 2530. *ความสำเร็จของกรมวิชาการเกษตรในการส่งมะม่วงไปประเทศญี่ปุ่น*. ฝ่ายวิชาการกักกันพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 106 หน้า.
- อุดร อุณหุฒิ, มานะ พุ่มทอง, ประเทือง ศรีสุข และ บุญชอบ ภัทรรุจี. 2531. *การส่งมะม่วงพันธุ์หนึ่งกลางวันอบไอน้ำไปประเทศญี่ปุ่นเป็นครั้งแรก*. ฝ่ายวิชาการกักกันพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 113 หน้า.
- อุดร อุณหุฒิ, มานะ พุ่มทอง, รัชฎา อินทรกำแหง, วลัยกร วรวิศิษฎ์ธำรงและประเทือง ศรีสุข. 2536. *การศึกษาความต้านทานต่อความร้อนของหนอนแมลงวันผลไม้วัยที่ 1 ในมะม่วงหนึ่งกลางวันน้ำดอกไม้ แรดและพิมเสนแดง*. วารสาร วิชาการเกษตร. 11: 133-147.
- อุดร อุณหุฒิ, วลัยกร วรวิศิษฎ์ธำรง, รัชฎา อินทรกำแหง, มานะ พุ่มทองและประเทือง ศรีสุข. 2536. *คุณภาพมะม่วงน้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง หลังจากผ่านกระบวนการอบไอน้ำ*. วารสาร วิชาการเกษตร. 11: 31-44.
- อุดร อุณหุฒิ, วลัยกร รัตนเดชากุลและพิทวัฒน์ อ่อนทองกลาง. 2537. *ผลกระทบของกรรมวิธีกำจัดแมลงในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวด้วยความร้อนต่อคุณภาพของผลมังคุด*. รายงานผลงานวิจัยประจำปี พ.ศ. 2537. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.
- อุดร อุณหุฒิ, สลักจิต พานคำ, ชัยรัตน์ สนศิริ, มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์, ชุตติมา อ้อมกิ่ง, จารุวรรณ จันทรา และรัชฎา อินทรกำแหง. 2549. *การวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับ*



กำจัดแมลงวันผลไม้ในส้มโอเพื่อส่งออก. ผลงานวิจัยเพื่อพัฒนาเป็นผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2549 กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 125-143.

Furusawa, K., T. Sugimoto and T. Gaja. 1984. *The effectiveness of vapor heat treatment against the melon fly, Dacus cucurbitae Coquillett, in eggplant and fruit tolerance to the treatment.* Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 20: 17-24.

Iwata, M., K. Sunagawa, K. Kume and A. Ishikawa. 1990. *Efficacy of vapor heat treatment on netted melon infested with melon fly, Dacus cucurbitae Coquillett (Diptera: Tephritidae).* Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 26: 45-49.

Jones, W. 1939. *The influence of relative humidity on the respiration of papaya at high temperatures.* Proceeding of the American Society for Horticultural Science. 37: 700-705.

MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries). 2010. *Summary of proposed Revisions to the Enforcement Ordinance of the Plant Protection Law and Concerned Public Notice Retrieved.* (Online). Available. http://www.members.wto.org/crnattachments/2010/sps/JPN/10_4194_00_e.pdf (February 1, 2012).

Miyazaki, I. 2010. *How to prepare the technical report on vapor heat disinfestations test. In: Report of the thermal treatment for the disinfestations of fruit flies. Naha Plant Protection Station, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Okinawa International Centre. Japan International Cooperation Agency.* Japan. 30 pp.

Sunagawa, K., K. Kume and R. Iwaizumi. 1987. *The effectiveness of vapor heat treatment against the melon fly, Dacus cucurbitae Coquillett, in mango and fruit tolerance to the treatment.* Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 23:13-20.

Sunagawa, K., K. Kume, A. Ishikawa, T. Sugimoto and K. Tanabe. 1988. *Efficacy of vapor heat treatment for bitter momordica fruit infested with melon fly, Dacus cucurbitae (Coquillett) (Diptera :Tephritidae).* Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 24:1-5.

Unahawutti, U., C. Chettanachitara, M. Poomthong, P. Konson, E. Smitasiri, C. Lapasathukool, W. Worawisitthumrong and R. Intarakumheng. 1986. *Vapor heat treatment for 'Nang Klarngwun' mango, Mangifera indica Linn., infested with eggs and larvae of*



the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel and the melon fly, *Dacuscucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division. Agricultural Regulatory Division. Department of Agriculture. Bangkok. 108 pp.

Unahawutti, U., M. Poomthong, R. Intarakumheng, W. Worawisitthumrong, C. Lapasathukool, E. Smitasiri, P. Srisook and C. Ratanawaraha. 1991. Vapor heat as plant quarantine treatment of 'Nang klarngwan', 'Nam Dorkmai', 'Rad' and 'Pimsen Daeng' mangoes, Infested with fruit flies (Diptera: Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries for approved of quarantine treatment on Thai mangoes to be exported to Japan. Tech. Plant Quarant. Sub Div., Agr. Regulat. Div., Dept. of Agr., Bangkok. 342 p.

Unahawutti, U., S. Phankum, M. Srimartpirom, C. Ormking, C. Sonsiri, J. Chantra, and R. Intarakumheng. 2006. Heated-air quarantine treatment for pummelo infested with oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries for approval of quarantine treatment on Thai pummelo to be exported to Japan. Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture. Bangkok. 135 pp.

Table 1 Calibration factor obtained from each sensor of the vapor heat treatment system.

| Time | Temp (°C) and RH (%) from each sensor (No.) ¹ | | | | | | | |
|--------------------------------|--|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| 10:30 | 46.0 | 100 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 |
| 10:35 | 46.0 | 100 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 |
| 10:40 | 46.0 | 100 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 |
| 10:45 | 46.0 | 100 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 |
| 10:50 | 46.0 | 100 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 |
| Correction factor ² | ±0.0 | ±0.0 | ±0.0 | ±0.0 | ±0.0 | ±0.0 | ±0.0 | ±0.0 |

^{1/} The test was conducted by dipping all into constant temperature water bath at 46 °C. Fruit sensors (No.1, 6 - 11) and RH sensor (No.2)

^{2/} Correction factor = True Value - Measured Value



Table 2 Time for center of pomelo to attain 46.0 47.0 48.0 °C for various holding times during modified vapor heat treatment more than 90% RH.

| Temp (°C) | Load factor (kg/cum) | Rep. | Sensor fruit weight (g) | | | Time (h) ^{1/} | | |
|-----------|----------------------|------|-------------------------|----------|----------|------------------------|------|------|
| | | | | | | 46°C | 47°C | 48°C |
| 46 | 21.53 | 1 | 1,387.38 | 1,382.33 | 1,375.61 | 5:15 | | |
| | 21.59 | 2 | 1,394.25 | 1,381.99 | 1,398.65 | 5:30 | | |
| 47 | 21.71 | 1 | 1,424.62 | 1,413.34 | 1,416.95 | | 6:05 | |
| | 21.57 | 2 | 1,376.17 | 1,400.06 | 1,422.16 | | 6:20 | |
| 48 | 21.56 | 1 | 1,381.11 | 1,401.01 | 1,423.92 | | | 6:41 |
| | 21.61 | 2 | 1,385.11 | 1,381.56 | 1,377.14 | | | 6:34 |

^{1/} Time for center of only 3 sensor fruits to attain target temperature

Table 3 Weight loss (%) of pomelo treated with modified vapor heat treatment center temperature 46.0, 47.0 and 48.0 °C more than 90% RH. for various holding times and 7 days chamber 95% RH at 10 °C.

| Temp (°C) | Rep | N | Average Weight loss (%) | | | |
|-----------|-----|-----------------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|---------|
| | | | Control | 0 min. | 1 hr. | 2 hr. |
| 46 | 1 | 4 | 4.25 | 4.59 | 4.75 | 5.54 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 0.57 ^{ns} | 0.86 ^{ns} | 2.74 * |
| | 2 | 4 | 4.22 | 4.33 | 4.50 | 5.46 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 1.27 ^{ns} | 1.46 ^{ns} | 3.80 * |
| 47 | 1 | 4 | 4.25 | 5.21 | 5.55 | 6.58 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 2.54 * | 3.68 * | 13.11 * |
| | 2 | 4 | 4.36 | 5.23 | 5.62 | 6.12 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 3.13 * | 4.47 * | 3.60 * |
| 48 | 1 | 4 | 4.38 | 5.46 | 6.30 | 6.45 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 5.07 * | 5.83 ** | 7.36 ** |
| | 2 | 4 | 4.26 | 5.76 | 6.33 | 6.61 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 2.58 * | 4.70 * | 3.90 * |

* p < 0.05 = significant, ** p < 0.01 = significant and ns= not significant



Table 4 Color rating L* of pomelo fruits after subjecting to modified vapor heat treatment (MVHT) of >90 % RH during dry pre-heating period at 46 47 48 °C center temperature for various holding times and 7 days storage at 10 °C and 95 % RH.

| Temp (°C) | Rep | N | Color rating L* of pomelo fruits | | | |
|-----------|-----|-----------------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | Control | 0 min. | 1 hr. | 2 hr. |
| 46 | 1 | 4 | 48.81 | 49.40 | 51.38 | 51.79 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 0.23 ^{ns} | 1.79 ^{ns} | 2.26 ^{ns} |
| | 2 | 4 | 51.34 | 51.56 | 52.04 | 52.40 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 0.15 ^{ns} | 0.73 ^{ns} | 0.62 ^{ns} |
| 47 | 1 | 4 | 47.90 | 50.23 | 52.58 | 54.00 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 1.53 ^{ns} | 4.66 [*] | 4.19 [*] |
| | 2 | 4 | 51.55 | 51.80 | 53.31 | 53.84 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 0.46 ^{ns} | 3.00 [*] | 3.47 [*] |
| 48 | 1 | 4 | 48.33 | 54.45 | 54.60 | 55.82 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 2.85 [*] | 5.07 [*] | 5.66 [*] |
| | 2 | 4 | 50.10 | 53.18 | 55.35 | 55.64 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 2.49 [*] | 3.49 [*] | 4.17 [*] |

* p < 0.05 = significant ns= not significant

Table 5 Color rating a* of pomelo fruits after subjecting to modified vapor heat treatment (MVHT) of >90 % RH during dry pre-heating period at 46 47 48 °C center temperature for various holding times and 7 days storage at 10 °C and 95 % RH.

| Temp (°C) | Rep | N | Color rating a* of pomelo fruits | | | |
|-----------|-----|-----------------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | Control | 0 min. | 1 hr. | 2 hr. |
| 46 | 1 | 4 | -3.27 | -3.17 | -2.85 | -2.61 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 0.16 ^{ns} | 0.85 ^{ns} | 1.80 ^{ns} |
| | 2 | 4 | -3.64 | -2.93 | -2.12 | -1.87 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 1.07 ^{ns} | 2.30 ^{ns} | 2.19 ^{ns} |
| 47 | 1 | 4 | -4.83 | -4.13 | -1.26 | -1.11 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 0.96 ^{ns} | 3.29 [*] | 4.72 [*] |
| | 2 | 4 | -3.45 | -2.52 | -1.53 | -1.62 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 1.52 ^{ns} | 3.06 [*] | 2.49 [*] |
| 48 | 1 | 4 | -3.85 | -1.57 | -1.40 | -1.23 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 3.75 [*] | 5.16 [*] | 3.77 [*] |
| | 2 | 4 | -2.72 | -0.23 | 0.40 | 0.99 |
| | | t-test Control vs Treatment | | 3.08 [*] | 3.89 [*] | 3.88 [*] |

* p < 0.05 = significant ns= not significant



Table 6 Color rating b^* of pomelo fruits after subjecting to modified vapor heat treatment (MVHT) of >90 % RH during dry pre-heating period at 46 47 48 °C center temperature for various holding times and 7 days storage at 10 °C and 95 % RH.

| Temp (°C) | Rep | N | Color rating a^* of pomelo fruits | | | |
|-----------|-----|---|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | Control | 0 min. | Treatment 1 hr. | Treatment 2 hr. |
| 46 | 1 | 4 | 30.70 | 32.12 | 32.20 | 32.43 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 1.13 ^{ns} | 1.16 ^{ns} | 1.37 ^{ns} |
| | 2 | 4 | 32.09 | 32.93 | 33.12 | 34.03 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 0.54 ^{ns} | 0.62 ^{ns} | 1.01 ^{ns} |
| 47 | 1 | 4 | 31.67 | 32.11 | 34.01 | 34.75 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 0.46 ^{ns} | 3.00* | 2.88* |
| | 2 | 4 | 32.89 | 33.03 | 35.62 | 36.37 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 0.12 ^{ns} | 3.18* | 2.68* |
| 48 | 1 | 4 | 32.97 | 36.03 | 36.50 | 39.50 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 2.53* | 3.59* | 4.29* |
| | 2 | 4 | 32.42 | 39.52 | 41.45 | 41.66 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 2.58* | 3.21* | 3.12* |

* $p < 0.05$ = significant ns= not significant

Table 7 Total soluble solid (TSS) (°Brix) of pomelo treated with modified vapor heat treatment center temperature 46.0, 47.0 and 48.0 °C of >90 % RH for various holding times and 7 days storage at 10 °C and 95 % RH.

| Temp (°C) | Rep | N | Total soluble solid (TSS) (°Brix) | | | |
|-----------|-----|---|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | Control | 0 min. | Treatment 1 hr. | Treatment 2 hr. |
| 46 | 1 | 4 | 13.18 | 12.70 | 13.78 | 12.68 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 0.74 ^{ns} | 0.79 ^{ns} | 0.90 ^{ns} |
| | 2 | 4 | 13.08 | 11.93 | 13.10 | 12.68 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 1.88 ^{ns} | 0.04 ^{ns} | 0.55 ^{ns} |
| 47 | 1 | 4 | 10.33 | 9.88 | 9.88 | 9.90 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 1.13 ^{ns} | 1.95 ^{ns} | 2.20 ^{ns} |
| | 2 | 4 | 10.15 | 9.80 | 9.85 | 9.98 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 1.13 ^{ns} | 0.73 ^{ns} | 0.37 ^{ns} |
| 48 | 1 | 4 | 10.38 | 9.80 | 9.83 | 9.83 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 1.40 ^{ns} | 1.34 ^{ns} | 1.58 ^{ns} |
| | 2 | 4 | 10.28 | 10.00 | 9.83 | 9.83 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 1.06 ^{ns} | 2.22 ^{ns} | 1.87 ^{ns} |

ns= not significant



Table 8 Titrate Acidity (TA) (%) of pomelo treated with modified vapor heat treatment center temperature 46.0, 47.0 and 48.0 °C of >90 % RH for various holding times and 7 days storage at 10 °C and 95 % RH.

| Temp (°C) | Rep | N | Titrate Acidity (TA) (%) | | | |
|-----------|-----|---|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | Control | 0 min. | 1 hr. | 2 hr. |
| 46 | 1 | 4 | 0.97 | 0.90 | 0.82 | 0.82 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 0.74 ^{ns} | 1.67 ^{ns} | 2.09 ^{ns} |
| | 2 | 4 | 0.55 | 0.51 | 0.51 | 0.49 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 0.83 ^{ns} | 0.98 ^{ns} | 1.03 ^{ns} |
| 47 | 1 | 4 | 0.63 | 0.60 | 0.61 | 0.61 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 0.65 ^{ns} | 0.19 ^{ns} | 0.35 ^{ns} |
| | 2 | 4 | 0.73 | 0.72 | 0.70 | 0.70 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 0.84 ^{ns} | 1.74 ^{ns} | 0.73 ^{ns} |
| 48 | 1 | 4 | 0.48 | 0.43 | 0.43 | 0.42 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 2.08 ^{ns} | 2.02 ^{ns} | 2.17 ^{ns} |
| | 2 | 4 | 0.56 | 0.53 | 0.50 | 0.49 |
| | | | t-test Control vs Treatment | 0.34 ^{ns} | 0.87 ^{ns} | 1.18 ^{ns} |

ns= not significant

Table 9 Time for center of pomelo to attain 46.0 °C for 0:30 minutes during modified vapor heat treatment in commercial export simulation test.

| Method of transportation | Rep. | Loading (kg/cum.) | Position sensor fruit | Sensor fruit weight (g) | Time for fruit center to reach 46.0 °C 0:30 (h) ^{1/} |
|--------------------------|------|-------------------|-----------------------|-------------------------|---|
| Air shipment | 1 | 149.17 | Top | 1,393.58 | 6:55 |
| Sea shipment | | | Middle | 1,390.02 | 6:40 |
| | | | Bottom | 1,393.28 | 6:00 |
| Air shipment | 2 | 147.01 | Top | 1,390.13 | 6:50 |
| Sea shipment | | | Middle | 1,391.35 | 6:40 |
| | | | Bottom | 1,399.85 | 6:50 |

^{1/}Time for center of only 3 sensor fruits to attain target temperature.



Table 10 Air transportation: Quality of pomelo fruits treated with proposed heat quarantine treatment at center temperature 46.0 °C for 0:30 minutes and 7days chamber at 10 °C.

| Item | N | Treatment | | | |
|---------------------|---|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | Control | Top | Middle | Bottom |
| Weight loss | 8 | 3.87 | 5.06 | 5.86 | 6.20 |
| (%) | | t-test Treatment vs control | 3.51* | 5.22* | 6.62* |
| Total soluble solid | 8 | 11.98 | 12.63 | 12.86 | 12.03 |
| (TSS) (°Brix) | | t-test Treatment vs control | 1.64 ^{ns} | 1.97 ^{ns} | 0.12 ^{ns} |
| Titrate Acidity | 8 | 0.58 | 0.80 | 0.72 | 0.67 |
| (TA) (%) | | t-test Treatment vs control | 1.91 ^{ns} | 1.43 ^{ns} | 0.75 ^{ns} |

* p < 0.05 = significant, ns= not significant

Table 11 Sea transportation: Quality of pomelo fruits treated with proposed heat quarantine treatment at center temperature 46.0 °C for 0:30 minutes and 14 days chamber at 10 °C.

| Item | N | Treatment | | | |
|---------------------|---|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | Control | Top | Middle | Bottom |
| Weight loss | 8 | 5.77 | 7.03 | 7.31 | 8.16 |
| (%) | | t-test Treatment vs control | 2.94* | 4.74* | 7.29* |
| Total soluble solid | 8 | 11.73 | 11.61 | 12.08 | 11.43 |
| (TSS) (°Brix) | | t-test Treatment vs control | 0.37 ^{ns} | 0.99 ^{ns} | 1.21 ^{ns} |
| Titrate Acidity | 8 | 1.09 | 0.79 | 0.65 | 1.08 |
| (TA) (%) | | t-test Treatment vs control | 1.37 ^{ns} | 2.11 ^{ns} | 0.03 ^{ns} |

* p < 0.05 = significant, ns= not significant



Table 12 Color rating (L*a*b*) of Air transportation: Quality of pomelo fruits treated with proposed heat quarantine treatment at center temperature 46.0 °C for 0:30 minutes and 7 days chamber at 10 °C.

| Color rating | Treatment | Average | Average | t-test |
|--------------|-----------|------------------|-----------------|--------------------|
| | | Before Treatment | After Treatment | (Before vs After) |
| L* | Control | 47.39 | 48.61 | 0.58 ^{ns} |
| | Top | 46.97 | 51.85 | 5.63* |
| | Middle | 45.20 | 53.14 | 5.77* |
| | Bottom | 49.31 | 58.83 | 7.05* |
| a* | Control | -5.32 | -3.97 | 3.89* |
| | Top | -5.15 | -2.57 | 5.86* |
| | Middle | -5.06 | -2.07 | 5.70* |
| | Bottom | -4.29 | 3.33 | 5.97* |
| b* | Control | 26.28 | 31.54 | 6.25* |
| | Top | 25.75 | 33.85 | 8.70* |
| | Middle | 28.15 | 36.43 | 4.92* |
| | Bottom | 28.22 | 42.51 | 9.38* |

* p < 0.05 = significant, ns= not significant

Table 13 Color rating (L*a*b*) of Sea transportation: Quality of pomelo fruits treated with proposed heat quarantine treatment at center temperature 46.0 °C for 0:30 minutes and 14 days chamber at 10 °C.

| Color rating | Treatment | Average | Average | t-test |
|--------------|-----------|------------------|-----------------|-------------------|
| | | Before Treatment | After Treatment | (Before vs After) |
| L* | Control | 49.14 | 54.80 | 9.30* |
| | Top | 45.70 | 53.01 | 14.18* |
| | Middle | 49.55 | 59.13 | 9.96* |
| | Bottom | 45.55 | 57.39 | 10.97* |
| a* | Control | -5.35 | -2.69 | 5.59* |
| | Top | -5.46 | -1.97 | 6.04* |
| | Middle | -4.57 | 2.07 | 10.93* |
| | Bottom | -5.13 | 2.89 | 10.40* |
| b* | Control | 28.00 | 36.59 | 13.94* |
| | Top | 24.84 | 36.25 | 11.51* |
| | Middle | 29.25 | 43.18 | 27.13* |
| | Bottom | 26.25 | 41.74 | 14.65* |

* p < 0.05 = significant, ns= not significant



Table 14 Number of lava survival rate after inoculation 5 day.

| Number pummelo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | Average |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|
| Number of larva survival rate | 181 | 167 | 177 | 180 | 164 | 182 | 168 | 173 | 174 (87%) |

Table 15 Time for center of pummelo to attain 46.0 °C for various holding times during modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test.

| Rep. | Load factor (kg/cum.) | Sensor fruit weight (g) | | | Time (min.) ^{1/} | | | |
|------|-----------------------|-------------------------|----------|----------|---------------------------|------|------|------|
| | | | | | 0:00 | 0:10 | 0:20 | 0:30 |
| 1 | 11.37 | 1,389.3 | 1,388.66 | 1,400.76 | 6.31 | 6.41 | 6.51 | 7.01 |
| 2 | 11.18 | 1,396.75 | 1,394.28 | 1,393.76 | 6.27 | 6.37 | 6.47 | 6.57 |
| 3 | 10.75 | 1,378.82 | 1,381.17 | 1,420.31 | 6.29 | 6.39 | 6.49 | 6.59 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.

Table 16 Time for center of pummelo to attain 43.0 and 46.0 °C during modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test.

| Rep. | Time for fruit center to reach 43.0 °C (h) ^{1/} | Time for fruit center to reach 46.0 °C (h) ^{1/} | Time form 43.0 to 46.0 °C (h) ^{1/} |
|---------|--|--|---|
| 1 | 4.08 | 6.31 | 2.23 |
| 2 | 4.12 | 6.27 | 2.15 |
| 3 | 4.20 | 6.29 | 2.09 |
| Average | 4.13 | 6.29 | 2.16 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.



Table 17 Mortality^{1/} of first instar of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in pummelo (Thong Dee) treated with modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test.

| Treatment ^{2/} | Number of treated (larvae) | Number of alive (larvae) | Number of dead (larvae) | Corrected mortality (%) ^{3/} |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Control | 1,200 | 805 | 395 | 0 |
| 46.0 °C + 0 min. | 1,200 | 4 | 1,196 | 99.00 |
| 46.0 °C + 10 min. | 1,200 | 1 | 1,199 | 99.00 |
| 46.0 °C + 20 min. | 1,200 | 0 | 1,200 | 100 |
| 46.0 °C + 30 min. | 1,200 | 0 | 1,200 | 100 |

^{1/}Combined data of 3 replicates.

^{2/}Treatment: 2 fruits infested with 200 individuals/fruit. Control: 2 fruits infested with 200 individuals/fruit.

^{3/}Mortality is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925).

(Mortality rate (%) = $\frac{\text{Survival rate of control} - \text{Survival rate of treated lot}}{\text{Survival rate of control}} \times 100$)

Survival rate of control

Table 18 Mortality^{1/} of first instar of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in pummelo (Khao Tang Kwa) treated with modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test.

| Treatment ^{2/} | Number of treated (larvae) | Number of alive (larvae) | Number of dead (larvae) | Corrected mortality (%) ^{3/} |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Control | 1,200 | 827 | 373 | 0 |
| 46.0 °C + 0 min. | 1,200 | 5 | 1,195 | 99.00 |
| 46.0 °C + 10 min. | 1,200 | 2 | 1,198 | 99.00 |
| 46.0 °C + 20 min. | 1,200 | 0 | 1,200 | 100 |
| 46.0 °C + 30 min. | 1,200 | 0 | 1,200 | 100 |

^{1/}Combined data of 3 replicates.

^{2/}Treatment: 2 fruits infested with 200 individuals/fruit. Control: 2 fruits infested with 200 individuals/fruit.

^{3/}Mortality is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925).

(Mortality rate (%) = $\frac{\text{Survival rate of control} - \text{Survival rate of treated lot}}{\text{Survival rate of control}} \times 100$)

Survival rate of control



Table 19 Time for center of pummelo to attain 46.0 °C for various holding times during modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test.

| Rep. | Load factor (kg/cum.) | Sensor fruit weight (g) | | | Time (min.) ^{1/} | | |
|------|--------------------------|-------------------------|----------|----------|---------------------------|------|------|
| | | | | | 0:00 | 0:10 | 0:20 |
| 1 | 20.55 | 1,280.25 | 1,295.76 | 1,311.08 | 5.50 | 6.00 | 6.10 |
| 2 | 20.84 | 1,283.40 | 1,283.72 | 1,287.22 | 5.40 | 5.50 | 6.00 |
| 3 | 22.41 | 1,304.66 | 1,305.93 | 1,306.36 | 5.30 | 5.40 | 5.50 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.

Table 20 Time for center of pummelo to attain 43.0 and 46.0 °C during modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test.

| Rep. | Time for fruit center to reach 43.0 °C (h) ^{1/} | Time for fruit center to reach 46.0 °C (h) ^{1/} | Time form 43.0 to 46.0 °C (h) ^{1/} |
|---------|---|---|--|
| 1 | 3.50 | 5.57 | 2.07 |
| 2 | 4.00 | 5.40 | 1.40 |
| 3 | 4.10 | 5.30 | 1.20 |
| Average | 4.27 | 5.42 | 1.56 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.

Table 21 Mortality^{1/} of first instar of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in pummelo (Khao Tang Kwa) treated with modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test.

| Treatment ^{2/} | Number of treated (larvae) | Number of alive (larvae) | Number of dead (larvae) | Corrected mortality (%) ^{3/} |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--|
| Control | 2,400 | 2,052 | 348 | 0 |
| 46.0 °C + 0 min. | 2,400 | 0 | 2,400 | 100 |
| 46.0 °C + 10 min. | 2,400 | 0 | 2,400 | 100 |
| 46.0 °C + 20 min. | 2,400 | 0 | 2,400 | 100 |

^{1/}Combined data of 3 replicates.

^{2/}Treatment: 2 fruits infested with 200 individuals/fruit. Control: 2 fruits infested with 200 individuals/fruit.

^{3/}Mortality is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925).



Table 22 Time for center of pummelo to attain 46.0 °C for 0:30 minutes during modified vapor heat treatment in large scale disinfestation test. (Low load: 61.50 - 69.00 kg/cum)

| Rep. | Load factor (kg/cum.) | Sensor fruit weight (g) | | | Time (min.) ^{1/} | |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------------|----------|----------|---------------------------|------|
| | | | | | 0:00 | 0:30 |
| Low load: 66.56 - 69.00 kg/cum. | | | | | | |
| 1 | 69.00 | 1,411.02 | 1,414.72 | 1,416.09 | 5.18 | 5.48 |
| 2 | 66.80 | 1,383.53 | 1,383.83 | 1,394.07 | 5.40 | 6.10 |
| 3 | 67.40 | 1,384.08 | 1,385.81 | 1,386.53 | 5.25 | 5.55 |
| 4 | 66.50 | 1,405.67 | 1,408.43 | 1,409.50 | 5.43 | 6.13 |
| 5 | 68.00 | 1,383.38 | 1,387.07 | 1,396.98 | 5.25 | 5.55 |
| 6 | 68.50 | 1,388.92 | 1,396.85 | 1,412.85 | 5.27 | 5.57 |
| Full load: 123.50 - 129.50 kg/cum. | | | | | | |
| 1 | 123.50 | 1,393.15 | 1,393.67 | 1,399.56 | 6.15 | 6.45 |
| 2 | 128.50 | 1,421.53 | 1,423.36 | 1,424.40 | 6.47 | 7.17 |
| 3 | 128.50 | 1,390.05 | 1,390.71 | 1,396.40 | 6.10 | 6.40 |
| 4 | 129.50 | 1,402.63 | 1,404.58 | 1,407.88 | 7.15 | 7.45 |
| 5 | 125.50 | 1,408.85 | 1,410.98 | 1,416.68 | 6.21 | 6.51 |
| 6 | 128.00 | 1,404.00 | 1,408.38 | 1,415.66 | 6.39 | 7.09 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.



Table 23 Time for center of pummelo to attain 43.0 and 46.0 °C during modified vapor heat treatment in large scale disinfestation test.

| Rep. | Time for fruit center to reach 43.0 °C (h) ^{1/} | Time for fruit center to reach 46.0 °C (h) ^{1/} | Time from 43.0 to 46.0 °C (h) ^{1/} |
|------------------------------------|--|--|---|
| Low load: 66.56 - 69.00 kg/cum. | | | |
| 1 | 3.21 | 5.18 | 1.57 |
| 2 | 3.31 | 5.40 | 2.09 |
| 3 | 3.30 | 5.25 | 2.35 |
| 4 | 3.34 | 5.43 | 2.09 |
| 5 | 3.25 | 5.25 | 2.00 |
| 6 | 3.33 | 5.27 | 2.34 |
| Average | 3.29 | 5.30 | 2.07 |
| Full load: 123.50 - 129.50 kg/cum. | | | |
| 1 | 4.32 | 6.39 | 2.07 |
| 2 | 4.36 | 6.47 | 2.11 |
| 3 | 4.15 | 6.10 | 1.95 |
| 4 | 4.15 | 7.15 | 3.00 |
| 5 | 4.23 | 6.21 | 1.98 |
| 6 | 4.32 | 6.39 | 2.07 |
| Average | 4.25 | 6.45 | 2.19 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.



Table 24 Survival^{1/} of first instar of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in pummelo (Khao Tang Kwa) treated with modified treated vapor heat treatment at 46 ° C for 0:30 minutes in large scale disinfestation test.

| Rep. | Infestation method | No. test fruit | | No. alive individual in control (larvae) | Estimated treated population (larvae) | No. survivors |
|---------------------------------|--------------------|----------------|-------------------------|--|---------------------------------------|---------------|
| | | Control | Treatment ^{2/} | | | |
| Low load: 66.56 - 69.00 kg/cum. | | | | | | |
| 1 | Larval inoculation | 4 | 12 | 536 | 1,608 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 560 | 1,680 | 0 |
| 2 | Larval inoculation | 4 | 12 | 736 | 2,208 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 599 | 1,797 | 0 |
| 3 | Larval inoculation | 4 | 12 | 562 | 1,686 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 525 | 1,575 | 0 |
| 4 | Larval inoculation | 4 | 12 | 670 | 2,010 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 594 | 1,782 | 0 |
| 5 | Larval inoculation | 4 | 12 | 668 | 2,004 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 665 | 1,995 | 0 |
| 6 | Larval inoculation | 4 | 12 | 599 | 1,797 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 668 | 2,004 | 0 |
| Total | | 36 | 108 | 7,382 | 22,146 | 0 |

1/ Combined data of 6 replicates.

2/ Treatment: 72 fruits (Larval inoculation) infested with 200 individuals/fruit.

Control: 24 fruits (Larval inoculation) infested with 200 individuals/fruit.

Treatment: 36 fruits (Forced infestation).

Control: 12 fruits (Forced infestation).



Table 25 Survival^{1/} of first instar of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in pummelo (Khao Tang Kwa) treated with modified treated vapor heat treatment at 46 ° C for 0:30 minutes in large scale disinfestation test.

| Rep. | Infestation method | No. test fruit | | No. alive individual in control (larvae) | Estimated treated population (larvae) | No. survivors |
|------------------------------------|--------------------|----------------|-------------------------|--|---------------------------------------|---------------|
| | | Control | Treatment ^{2/} | | | |
| Full load: 123.50 - 129.50 kg/cum. | | | | | | |
| 1 | Larval inoculation | 4 | 12 | 460 | 1,380 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 746 | 2,238 | 0 |
| 2 | Larval inoculation | 4 | 12 | 535 | 1,605 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 635 | 1,905 | 0 |
| 3 | Larval inoculation | 4 | 12 | 613 | 1,839 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 650 | 1,950 | 0 |
| 4 | Larval inoculation | 4 | 12 | 487 | 1,461 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 600 | 1,800 | 0 |
| 5 | Larval inoculation | 4 | 12 | 570 | 1,710 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 599 | 1,797 | 0 |
| 6 | Larval inoculation | 4 | 12 | 556 | 1,668 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 651 | 1,953 | 0 |
| Total | | 36 | 108 | 7,102 | 21,306 | 0 |

^{1/} Combined data of 6 replicates.

^{2/} Treatment: 72 fruits (Larval inoculation) infested with 200 individuals/fruit.

Control: 24 fruits (Larval inoculation) infested with 200 individuals/fruit.

Treatment: 36 fruits (Forced infestation).

Control: 12 fruits (Forced infestation).





Figure 1 Field Survey at Pomelos Farm



Figure 2 Calibration sensor of resistance thermometers



Figure 3 Injury test for Pomelos at Temperature 46 47 48 °C 0 min 1 hr. and 2 hr. of more than 90 % RH for various holding times



Figure 4 After treatment Keep at 10 °C for 7 day. Storage duration should simulate commercial transportation and shelf life



Figure 5 Commercial export simulation test for Pomelos at Temperature 46 °C 30 min





Figure 6 pomelo fruits after subjecting to modified vapor heat treatment (MVHT) of more than 90 % RH during dry pre-heating period at 48 °C center temperature for various holdingtimes and 7 days storage at 10 °C and 95 % RH



Control



MVHT 48°C for 2 hr.

Figure 7 Symptom of damaged oil gland (black spot) found on peel of MVHT treated fruits at 48 °C for 2 h after 7 days in chamber at 10 °C



Figure 8 Field survey at guava orchard for collection fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel)



Figure 9 Fruit fly *B. dorsalis* (Hendel) screening



Figure 10 Increase volume on Artificial Food of Fruit Fly *B. dorsalis* (Hendel)



Figure 11 The first hole was made on top at the area where the stalk attached with fruit. The second hole was made on upper half of test fruits

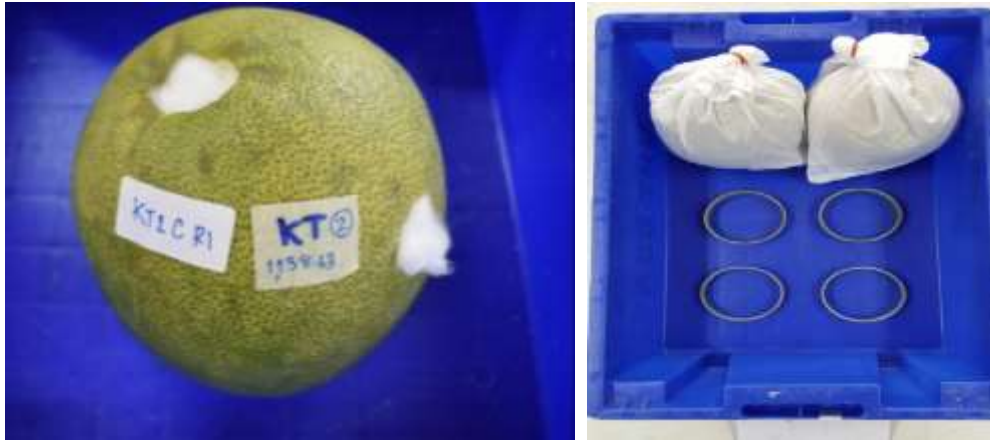


Figure 12 Test fruits were held in a plastic container. Each fruit was placed on top of a plastic ring to prevent larvae from drowning



Figure 13 Mortality test of first instar of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in pummelo (Thong Dee vs Khao Tang Kwa) treated with modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test



Figure 14 After 5 days of mortality test, check the larva 3rd survived

วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ในผลมะนาวแป้นพิจิตร 1 เพื่อการส่งออก
 Research and Development on Disinfestation with Heated Air Quarantine Treatment to Controlling the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) on Lime for Export

สลักจิต พานคำ รัชฎา อินทรกำแหง ชัยณรัตน์ สนศิริ มลนิภา ศรีมาตรภิมย์
 ปวีณา บุษาทิยาน พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์ พงษ์ศักดิ์ จิณฤทธิ์ ศิริพร คงทวี
 กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The experiment was carried out to investigate heat tolerance of the eggs (24 h) of Oriental Fruit Fly (OFF), *Bactrocera dorsalis* (Hendel) to vapor heat treatment (VHT) on lime between Phichit1 (PH) and Pean (PN) cultivar. The experiment infested fruit of both lime cultivars placed in the same treatment chamber and were exposed to VHT at 45 °C and 46 °C, 46 °C+10, 46 °C+ 20, 46 °C+ 30 and 46 °C+ 40 min. VHT was done by heating infested fruits and the fruits were then gradually warmed until fruit center temperature reached target temperatures and holding time with high temperature air saturated with water vapor 93 %RH.

These research results obviously demonstrated that the OFF of the eggs (24 h) in PH lime were not more tolerance to VHT than those in PN lime. We proposed these of treatment schedule, relative humidity 93 %RH and fruit center temperatures 46 °C for 40 min., The result indicated the effect of In laboratory infesting comparative tolerance of eggs of oriental fruit fly infested in lime (PH and PN) to vapor heat treatment. None of the treated 3600 eggs survived.

Complete mortality of 24 hour-old eggs of the oriental fruit fly (*B. dorsalis*) on lime (*C. aurantifolia*) was achieved, when the infested lime were exposed to vapor heat treatment (VHT). The treatment stepped of heating lime with vapor heat treatment 93 % RH after ambient temperature to 30 minute and the fruit pulps were

รหัสการทดลอง 03-04-59-03-01-00-06-62



then gradually warmed to 46°C and maintained at 46°C for 40 minute with high temperature air saturated with water vapor. In large-scale confirmatory test of this treatment schedule, none of the treated 162,454 eggs survive. Under commercial export simulation tests, the treatment had no effect on fruit quality. Based on these results and those from previous studies, we proposed the above treatment as a post-harvest disinfestation treatment to disinfest lime of the OFF before export to countries which prohibit the importation of lime from Thailand

Keywords : Plant Quarantine, Modified vapour heat treatment, Fruit fly, lime

บทคัดย่อ

การวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ในผลมะนาวพันธุ์แป้น กับ พิจิตร1 *Citrus aurantifolia* Swing. จำเป็นต้องเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนและกำจัดแมลงวันผลไม้ oriental fruit fly ระยะไข่อยู่ในผลมะนาวระหว่างมะนาว 2 พันธุ์ เพื่อกำหนดอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด ในการทดลองอบมะนาวกำจัดแมลงระยะไข่ ในเครื่องตู้อบความร้อนตู้เดียวกัน โดยให้ความร้อนเหมือนกัน การทดลองเปรียบเทียบอัตราการตายของแมลงที่อุณหภูมิ 45 และ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10, 20, 30 และ 40 นาที จากการทดลองอบมะนาวเปรียบเทียบระหว่างมะนาวพันธุ์แป้น กับพิจิตร1 พบว่าที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ใช้เวลานาน 40 นาที สามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ระยะไข่ตายทั้งหมด และผลการทดลองที่อุณหภูมิ 45 และ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10, 20, 30 และ 40 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับมะนาวพันธุ์แป้น กับพิจิตร1 พบว่าอัตราการตายของไข่ เท่ากับ 4.45, 16.82, 46.18, 86.98, 96.12, 100% กับ 7.46, 24.76, 49.23, 90.40, 99.05, 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแมลงวันผลไม้ระยะไข่ในมะนาวแป้น มีความทนทานต่อความร้อนมากกว่ามะนาวพิจิตร1 จากผลการทดลองอบมะนาว 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที สามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ระยะไข่ (24 ชั่วโมง) ไม่น้อยกว่า 3600 ฟอง สรุปล้มพบไข่ฟักออกเป็นตัวหนอนทั้ง 2 พันธุ์ ดังนั้นในการวิจัยพัฒนาวิธีการอบไอน้ำ เพื่อทดสอบประเมินเปรียบเทียบกับมะนาวพันธุ์แป้น กับพิจิตร 1 ที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุดในระยะไข่ เพื่อใช้กำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะนาวในเรื่องการยืนยันประสิทธิภาพระดับการใช้แมลงจำนวนมากต่อไป

แมลงวันผลไม้ (*B. dorsalis*) ระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง ในผลมะนาว (*C. aurantifolia*) พันธุ์พิจิตร1 ตายทั้งหมดเมื่อผ่านการกำจัดแมลงด้วยความร้อนกรรมวิธีอบไอน้ำ ซึ่งประกอบด้วยการหมุนเวียนอากาศร้อน อากาศร้อนที่อิมตัวด้วยไอน้ำความชื้นสัมพัทธ์ 93 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มความร้อนให้อุณหภูมิผลมะนาวสูงขึ้นไปอย่างช้าจนกระทั่งบริเวณกึ่งกลางผลมะนาวอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 46°ซ. และคงอุณหภูมิผลไว้ที่ 46° ซ. เป็นเวลานาน 40 นาที จะลดอุณหภูมิทันทีหลังจากสิ้นสุดกระบวนการให้ความร้อน แบ่งเป็น 2 กรรมวิธี คือ 1. เป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง 2. พ่นด้วยน้ำ 10 นาที ผลการ



ประเมินประสิทธิภาพกระบวนการกำจัดแมลงวันผลไม้ดังกล่าวข้างต้นพบว่า สามารถกำจัดแมลงวันทองระยะไข่จำนวนประมาณ 162,454 ฟอง ในผลมะนาวตายทั้งหมด โดยคุณภาพผลมะนาวเปลี่ยนแปลงไปจากปกติเล็กน้อยในด้านกลิ่นน้ำมันหอมมีแนวโน้มลดลง ภายใต้สภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบิน แต่ภายใต้สภาพจำลองการส่งออกทางเรือคุณภาพผลมะนาวเปลี่ยนแปลงไปจากปกติมากกว่าผลมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนในด้านรสชาติมีความขมปนบ้างเล็กน้อยในบางผลจนไม่สามารถแยกออกได้ชัดเจน สีผิวเปลือกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแตกต่างกันเล็กน้อย ส่วนกลิ่นน้ำมันหอมมีแนวโน้มลดลงมากกว่ามะนาวไม่ผ่านความร้อนชัดเจน สภาพโดยรวมทั้งหมดผู้บริโภคมอบรับได้ข้อมูลจากงานวิจัยนี้และงานวิจัยที่ผ่านมา จึงขอเสนอกระบวนการกำจัดแมลงวันทองดังกล่าวข้างต้นเป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชสำหรับใช้กำจัดแมลงวันทองในผลมะนาวของไทยก่อนส่งออกจำหน่ายยังประเทศที่ห้ามนำเข้าผลมะนาวจากประเทศไทย

คำหลัก : วิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช วิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ แมลงวันผลไม้ มะนาว

คำนำ

อุปสรรคสำคัญต่อการขยายการส่งออกผลไม้สดของไทยไปต่างประเทศ เนื่องจากผลไม้ส่วนใหญ่เป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ ซึ่งเป็นศัตรูพืชสำคัญด้านกักกันพืช หลายประเทศจึงออกมาตรการสุขอนามัยพืชห้ามนำเข้าผลไม้สดจากประเทศไทย ปัจจุบันกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นวิธีการที่ต่างประเทศยอมรับ และมีศักยภาพสูงที่จะนำมาใช้กับผลไม้ของไทย ให้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (plant quarantine treatment) สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลไม้สดก่อนการส่งออก ซึ่งหากประสบความสำเร็จแล้ว จะส่งผลให้ต่างประเทศผ่อนปรน หรือยกเลิกข้อกำหนดห้ามนำเข้าผลไม้สดจากประเทศไทย

หลังจากที่มีการกำจัดแมลงโดยวิธีรมด้วยสารเคมีเอธิลีนไดโบรไมด์ (ethylene dibromide, EDB) ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลายว่า มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแมลงวันผลไม้ ในผักและผลไม้ก่อนส่งออกถูกห้ามใช้ เนื่องจากพบว่าเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง วิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนจึงได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง หลายประเทศประสบผลสำเร็จในการวิจัยพัฒนาการใช้ความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลไม้ก่อนส่งออก สำหรับประเทศไทย ในปีพ.ศ. 2529 ประสบความสำเร็จในการวิจัยพัฒนาวิธีอบไอน้ำ (vapor heat treatment, VHT) เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ 2 ชนิด คือ oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) และ melon fly, *B. cucurbitae* (Coquillett) ในมะม่วง (*Mangifera indica* Linn.) พันธุ์หนึ่งกลางวัน (Unahawutti *et al.*, 1986) ต่อมาได้มีการวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน กระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (modified vapor heat treatment, MVHT) มีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ในมะม่วงครอบคลุมถึง 4 พันธุ์ ได้แก่ หนึ่งกลางวัน น้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง (Unahawutti *et al.*, 1991) นอกจากนี้ ยังประสบความสำเร็จในการวิจัยพัฒนากระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*



ในมังกุด (Unahawutti *et al.*, 1999) และผลไม้ที่ประเทศญี่ปุ่นได้ประกาศอนุญาตให้นำเข้าผลไม้สดจากประเทศไทยด้วยกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอพันธุ์ทองดี (Unahawutti *et al.*, 2006)

มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swing.) เป็นผลไม้สำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง ที่มีศักยภาพสูงในการส่งออกแต่มีปัญหาด้านสุขอนามัยพืช เนื่องจากบางประเทศกล่าวว่าผลไม้ส่วนใหญ่เป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ ถึงแม้ว่ามะนาวในธรรมชาติไม่มีปัญหาจากการเข้าทำลายจากแมลงวันผลไม้ แต่จากการสำรวจการทำลายมะนาวจากแมลงวันทองในธรรมชาติ ในท้องที่จังหวัด สมุทรสาคร สมุทรสงคราม นครปฐม เพชรบุรี ชัยนาท และจังหวัดพิจิตร พบว่ามะนาวที่เก็บมาจากต้นไม่พบการเข้าทำลายของแมลงวันทอง ยกเว้นผลมะนาวแก่จัดสีเหลืองซึ่งหล่นลงอยู่บนพื้นดินในท้องที่จังหวัด ชัยนาทเท่านั้นที่ตรวจพบแมลงวันทองเข้าทำลายในผลมะนาว และเจริญเป็นตัวเต็มวัยของแมลงวันทองตัวเต็มวัย มีจำนวน 8 ตัว ตัวผู้ 2 ตัว ตัวเมีย 6 ตัว สลักจิต และคณะ (2554) โดยเฉพาะผลมะนาวอยู่ในสภาพที่ใกล้จะเน่าซึ่งพบน้อยมากและแมลงวันผลไม้สามารถเข้าทำลายและเจริญเติบโตได้ในมะนาว อัตราการรอดชีวิตค่อนข้างต่ำมาก เนื่องจากเป็นพืชอาศัยที่ไม่ดีของแมลงวันผลไม้ แต่อย่างไรก็ดี ประเทศที่เข้มงวดด้านกักกันพืช ยังพิจารณาว่ามะนาวเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ การขอยกเลิกข้อห้ามนำเข้าต้องกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะนาวด้วยวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชที่ได้มาตรฐาน การวิจัยพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อน เพื่อใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชสำหรับมะนาวก่อนส่งออก มีโอกาสประสบความสำเร็จสูง เนื่องจากตามรายงานผลการศึกษารวบรวมในหลายประเทศพบว่า วิธีการนี้สามารถใช้ได้ผลกับพืชตระกูลส้ม (*Citrus* spp.) หลายชนิด เช่น ส้มเกรฟฟรุท (*Citrus paradisi* Macf.) ได้โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพ (Miller and McDonald, 1991; Miller *et al.*, 1991; Mangan and Ingle, 1994; Mangan *et al.*, 1998) ส้มนาวเลนเซีย และส้มเกลี้ยง [*Citrus sinnensis* (Linn.)] (Sharp and McGuire, 1996; Mangan *et al.*, 1998) และพืชอื่นอีกหลายชนิด เช่น มะม่วง (Merino *et al.*, 1985; Sunagawa *et al.*, 1987; Mangan and Ingle, 1992; Sharp, 1992; Heather *et al.*, 1997) มะละกอ (*Carica papaya* Linn.) (Armstrong, *et al.*, 1989; Sugimoto and Tanabe, 1989) แตงชู กิ นี (zucchini) (*Cucurbita pepo* Linn.) (Corcoran, *et al.*, 1993) มะเขือ (*Solanum melongena* Linn.) (Furusawa *et al.*, 1984) มะเฟือง (*Averrhoa carambola* Linn.) (Hallman, 1990; Sharp and Hallman, 1992) แตง (*Cucumis melo* Linn. var. *reticulatus*) (Iwata *et al.*, 1990) พริกยักษ์ (*Capsicum annuum*) (Sugimoto *et al.*, 1983) และมะระ (*Momordica charantia* Linn.) (Sunagawa *et al.*, 1988) เป็นต้น

ประเทศญี่ปุ่นเป็นหนึ่งในหลายประเทศเป้าหมายสำหรับการส่งออกมะนาว แต่อย่างไรก็ดีมะนาวและผลไม้สดอื่นอีกหลายชนิดของไทย เป็นสิ่งต้องห้ามนำเข้าประเทศญี่ปุ่น เนื่องจากเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ ตามประกาศเดิมของกระทรวงเกษตรป่าไม้และประมงญี่ปุ่น ได้ระบุ *B. dorsalis* และ *B. cucurbitae* เป็นศัตรูด้านกักกันพืช แต่ต่อมาได้มีการแก้ไขประกาศใหม่จาก



แมลงวันผลไม้ดังกล่าว เปลี่ยนเป็นแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* species complex มี 4 ชนิด ได้แก่ carambola fruit fly, *B. carambolae* Drew and Hancock; oriental fruit fly, *B. dorsalis* (Hendel); papaya fruit fly, *B. papayae* Drew and Hancock และ guava fruit fly, *B. pyrifoliae* Drew and Hancock ดังนั้นการพัฒนาวีธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชสำหรับมะนาว หรือผลไม้ชนิดอื่นของไทยที่ถูกระบุว่าเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ ในกลุ่ม *B. dorsalis* species complex ต้องศึกษาประสิทธิภาพของวีธีกำจัดแมลงนั้นกับแมลงวันผลไม้ ทั้ง 4 ชนิด ดังกล่าว

อุตร และคณะ (2549) ศึกษาเปรียบเทียบความทนทานระหว่างระยะไข่และหนอนวัยต่างๆ ของแมลงวันผลไม้ 4 ชนิด ได้แก่ carambola fruit fly, *Bactrocera carambolae* Drew and Hancock; oriental fruit fly, *B. dorsalis* (Hendel); papaya fruit fly, *B. papayae* Drew and Hancock และ guava fruit fly, *B. pyrifoliae* Drew and Hancock, โดยวิธีจุ่มแมลงในน้ำร้อนเป็นระยะเวลาจาก 43 - 2 นาที พบว่า ในแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด หนอนวัยที่ 1 ทนทานต่อความร้อนสูงมากกว่า ระยะไข่ หนอนวัยที่ 2 และ 3 เมื่อทำการทดลองศึกษาความทนทานต่อความร้อนของระยะไข่และหนอนวัยที่ 1 เปรียบเทียบกันระหว่างแมลงวันผลไม้ 4 ชนิด พบว่า ระยะไข่ของแมลงวันผลไม้ทั้ง 4 ชนิด มีความทนทานต่อความร้อนไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ในทำนองเดียวกัน ความทนทานต่อความร้อนของหนอนวัยที่ 1 ระหว่างแมลงวันผลไม้ 4 ชนิด จะอยู่ในระดับใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันอย่างเด่นชัด จากผลการวิจัยนี้ อุตร และคณะ (2549) ได้คัดเลือกแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เป็นตัวแทนของแมลงวันผลไม้ทั้ง 4 ชนิด ในการศึกษาวิจัย เพื่อหากระบวนการกำจัดแมลงด้วยความร้อนที่มีประสิทธิภาพ สำหรับผลไม้ที่เป็นพืชอาศัยของ แมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* species complex

Jang (1986) เปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระยะตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ 3 ชนิด ได้แก่ *C. capitata*, *B. dorsalis* และ *B. cucurbitae* โดยวิธีจุ่มในน้ำร้อนปรากฏว่า หนอนวัยที่ 1 ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด ขณะที่ Armstrong และคณะ (1989) ศึกษาการกำจัดแมลงวันผลไม้ 3 ชนิด ดังกล่าวข้างต้นในมะละกอโดยใช้วิธี High-temperature, forced-air treatment กลับปรากฏว่า ระยะไข่ ของแมลงวันผลไม้ทั้ง 3 ชนิด ทนทานต่อความร้อนมากกว่า หนอนวัยที่ 1 และหนอนวัยที่ 3 Unahawutti และคณะ (1986) ศึกษาเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระหว่างระยะไข่และหนอนวัยต่าง ๆ ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* โดยวิธีจุ่มในน้ำร้อนพบว่าหนอนวัยที่ 1 ทนทานต่อความร้อนมากกว่าไข่ เมื่อทำการศึกษาในมะม่วง โดยให้ความร้อนด้วยกรรมวิธีอบไอน้ำ จะปรากฏผลในทำนองเดียวกัน หนอนวัยที่ 1 ทนทานต่อความร้อนมากกว่าระยะไข่ (Unahawutti *et al.*, 1986) แต่อย่างไรก็ดี การวิจัยพัฒนาวีธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมังคุด กลับพบว่า ระหว่างไข่ และหนอนวัยต่าง ๆ ในผลมังคุด ระยะการเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนด้วยกรรมวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ มากที่สุดคือ ระยะไข่ (อายุ 24 ชั่วโมง) (Unahawutti *et al.*, 1999)



สลักจิต และคณะ, 2558 การวิจัยพัฒนาวิธีการอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมะนาวแป้น พบว่าระหว่างระยะไข่ และหนอนวัยต่าง ๆ ในผลมะนาว ระยะการเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนด้วยกรรมวิธีอบไอน้ำมากที่สุดคือ ระยะไข่ (อายุ 24 ชั่วโมง) อุดร และสลักจิต 2544 ได้ทดลองกำจัดแมลงวันทองระยะไข่ 24 ชั่วโมง และหนอนวัยที่ 1 ในผลมังคุดสามารถยืนยันได้ว่าไข่ทนทานต่อความร้อนมากกว่าหนอนวัยที่ 1 การอบมังคุดด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์โดยคงอุณหภูมิไว้ที่ 45° ซ. นาน 1:30 ชั่วโมง สามารถกำจัดไข่ในผลมังคุดให้ตายทั้งหมด สลักจิต และ คณะ (2560) ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิผล 46 ° ซ. นาน 30, 35 และ 40 นาที พบว่าที่ระยะเวลา 40 นาที สามารถกำจัดแมลงวันทองระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง จำนวนไข่ไม่น้อยกว่าประมาณ 3,000 ฟอง ในผลมะนาวตายทั้งหมด ประสิทธิภาพของกระบวนการกำจัดแมลงวันทองดังกล่าวข้างต้นจึงมีแนวโน้มสูงที่จะใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช โดยทั่วไปกระบวนการกำจัดแมลงที่ได้มาตรฐานยอมรับเป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช ต้องมีประสิทธิภาพการกำจัดแมลงสูงมาก ให้ความมั่นใจได้ว่าจะไม่มีแมลงรอดชีวิตติดไปกับผลไม้ ไปเจริญแพร่พันธุ์อย่างถาวรในประเทศปลายทาง หน่วยงานกักกันพืชของประเทศสหรัฐอเมริกาได้กำหนดหลักเกณฑ์สำหรับวิธีการกำจัดแมลงที่จะใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช

เนื่องจากขั้นตอนของงานวิจัยพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อน เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในมะนาวพันธุ์พิจิตร1 จำเป็นต้องศึกษาความทนทานระหว่างระยะไข่ 24 ชั่วโมงของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เปรียบเทียบในผลมะนาวพันธุ์แป้น ต้องอบมะนาวกำจัดไข่ในสภาพที่ไข่อยู่ภายในผล ดังนั้นจึงควรที่จะได้มีการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำในการกำจัดแมลงวันผลไม้ โดยขั้นตอนแรกจำเป็นต้องศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ระยะไข่ (อายุ 24 ชั่วโมง) ในผลมะนาวเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์แป้น กับพิจิตร1 เพื่อใช้เป็นตัวแทนของแมลงวันผลไม้สำหรับการศึกษาวิจัยในขั้นตอนต่อไป รายงานผลการวิจัยต่อไปนี้จะมียัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความทนทานของแมลงวันผลไม้ในระยะไข่เปรียบเทียบในมะนาวพันธุ์แป้น กับพิจิตร1 ต่อวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนกรรมวิธีอบไอน้ำ สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลไม้ก่อนส่งออก ต้องมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ต่ำสุดที่ระดับ 99.9968 เปอร์เซ็นต์ (probit 9) (Baker, 1933) นั่นคือให้มีแมลงรอดชีวิตได้ไม่เกินจำนวน 3 ตัว จากจำนวนแมลงที่ผ่านวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชทั้งหมดจำนวน 100,000 ตัว ขณะที่หน่วยงานกักกันพืชญี่ปุ่นกำหนดให้มีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้จำนวนไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว ได้ทั้งหมด รายงานผลการวิจัยต่อไปนี้มีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ คือ

1) เพื่อประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการอบไอน้ำที่อุณหภูมิผล 46°ซ. นาน 40 นาที ในการกำจัดไข่แมลงวันทองอายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 100,000 ตัว/ฟอง เพื่อการยอมรับเป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช

2) เพื่อศึกษาความเสียหายของมะนาวหลังจากผ่านกระบวนการอบไอน้ำที่อุณหภูมิผล 46° ซ. นาน 0:40 ชั่วโมง และเก็บไว้ภายใต้สภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ



วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. มะนาวพันธุ์พิจิตร1 จากสวนที่ปลูกเป็นการค้าได้มาตรฐานมีใบรับรองสวน (GAP) จากกรมวิชาการเกษตร ขนาดเล็กที่ใช้ทดลองน้ำหนัก 35-50 กรัม และขนาดกลาง 51-80กรัม
2. ตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็ก “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) รุ่นEHK-1000B และEHK-1000D
3. เครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” shower Cooling System (Differential Pressure Type (model : SHS-12 Sanshu Sangyo co.,Ltd.,Kagoshima, Japan)
4. เครื่องวัดสีผลไม้ Komica Minol TA รุ่น CR-10 Plusert
5. เครื่องวัดปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ Titrator mettler toledo DL53 Titrator
6. ห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้ 2 ห้อง
7. เครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์แบบต่อเนื่อง
8. แท่งวัดอุณหภูมิขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง
9. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งสำหรับงานทดลอง
10. เครื่องอ่างน้ำร้อน1 เครื่อง
11. ห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก
12. ห้องเย็นสำหรับเก็บผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง
13. เครื่องหม้อนึ่งความดันเพื่อฆ่าเชื้อโรคข้าวโพดอบ
14. อุปกรณ์สำหรับการเตรียมและการตรวจผลการทดลอง ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ พู่กัน ปากคีบ เคาะเตอร์ งานทดลองขนาดเล็ก (plate) ถาดใส่ผลไม้ ถุงมือ ถุงขยะดำ เลนส์ขยาย มีดผ่าตัด หลอดดูดสารละลาย ถุงมือยาง ผ้าปิดปาก ถาดผลไม้ และอื่น ๆ

วิธีการ

1. สำรวจและคัดเลือกมะนาวพันธุ์พิจิตร1 ที่ได้มาตรฐานเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

คัดเลือกผลมะนาวจากสวนที่ได้รับคำแนะนำจากกรมส่งเสริมการเกษตรเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง และเลือกสวนเกษตรกรที่มีการจัดการที่ได้มาตรฐานส่งออก จากจังหวัดพิจิตร และกำแพงเพชร เพื่อนำมาใช้ในการทดลองสำหรับขั้นตอนศึกษาด้านความเสียหายของมะนาวพิจิตร 1 จากความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำจะคัดเลือกมะนาวพิจิตร1 จากสวนที่ปลูกเป็นการค้าที่ได้มาตรฐาน

2. สืบค้นฐานข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์ ชีววิทยาของมะนาวพันธุ์พิจิตร1

เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในงานทดลองโดยการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยการใช้วิธีกำจัดแมลงวันทอง ด้วยความร้อนในผลมะนาวจากเว็บไซต์ และแหล่งข้อมูลงานวิจัยอื่น ๆ ทั้งใน และต่างประเทศ

3. การทดสอบความเที่ยงตรงของแท่งวัดความร้อนและความชื้น (sensor calibration)

ซึ่งเป็นอุปกรณ์สำคัญที่ใช้ในงานทดลองอบไอน้ำ โดยแท่งวัดความร้อนจะคลาดเคลื่อนเมื่อถูกใช้งานไปในระยะเวลาหนึ่งดังนั้นขั้นตอนการทดสอบความเที่ยงตรงของแท่งวัดความร้อนจึงจำเป็นต้อง



ตรวจสอบอย่างสม่ำเสมออย่างน้อย 1 เดือน เพื่อปรับค่าความคลาดเคลื่อนอุณหภูมิที่วัดได้ของแท่งวัด ความร้อนและความชื้นแต่ละแท่ง ดำเนินการโดยการจุ่มแท่งวัดความร้อน และแท่งวัดความชื้นที่ ต้องการทดสอบ และเทอร์โมมิเตอร์มาตรฐาน (standard thermometer) ลงในเครื่องอ่างน้ำร้อน (water bath) ตั้งค่าอุณหภูมิน้ำที่ 46 °ซ. กับเครื่องอ่างน้ำร้อน และตั้งค่าอุณหภูมิของตู้อบไอน้ำกำจัด แผลงวันผลไม้ขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง ที่อุณหภูมิ 46 °ซ. และความชื้นสัมพัทธ์ ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการอ่านค่าอุณหภูมิ และความชื้น สามารถตรวจสอบได้จากหน้าจอเครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้น (hybrid recorder) ของตู้อบไอน้ำ เมื่อแท่งวัดความร้อนและความชื้น มีอุณหภูมิและความชื้น เป็นไปตามที่กำหนดไว้แล้ว จึงเริ่มบันทึกอุณหภูมิและความชื้นของแท่งวัดความร้อนและความชื้น โดยทำการป้อนคำสั่งการพิมพ์กระดาษบันทึกอุณหภูมิและความชื้นของตู้อบไอน้ำ เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 4 ครั้ง ใช้เวลารวมนาน 20 นาที

4. ศึกษาอิทธิพลของปริมาณมะนาวพันธุ์พิจิตร1 ในห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องอบไอน้ำต่อคุณภาพของมะนาว

ดำเนินการทดลองโดยใช้เครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแผลงวันผลไม้ Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) รุ่น EHK-1000B จำนวน 2 เครื่อง และเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” shower Cooling System (Differential Pressure Type (model : SHS-12 Sanshu Sangyo co.,Ltd., Kagoshima, Japan) ผลมะนาวพิจิตร1 ที่นำมาผ่านความร้อน ต้องเป็นผลมะนาวพิจิตร1 ที่แก่จัด ผลสีเขียว ขนาดกลางน้ำหนัก 35-50 และ 51-75 กรัม/ผล ทำการทดลองกับมะนาวจากแหล่งปลูกจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม นครปฐม ชัยนาท พิจิตร ศรีสะเกษ กำแพงเพชร

อบมะนาวภายใต้สภาพที่ห้องบรรจุผลไม้มีปริมาณมะนาวน้ำหนักประมาณ 36, 72, 108 และ 144 กก.-ลบม. นำมะนาว ใส่ในภาชนะบรรจุผลไม้แบบกระเบพลาสติกแข็งทนความร้อน 40 ผล/กระเบ ซึ่งมะนาวทั้งหมด 40 ผลนี้ใช้สำหรับตรวจสอบความเสียหายที่เกิดจากความร้อน จากนั้น นำมะนาวอื่นๆ (filler fruit) ซึ่งมีน้ำหนักผลหรือความแก่ สีส้มเปลือกไม่ได้ตามกำหนดใส่เพิ่มเติม กระเบเพื่อให้มีน้ำหนัก 11-12 กก. ภายในห้องบรรจุผลไม้ของตู้อบความร้อน สามารถวางกระเบบรรจุมะนาวได้ทั้งหมดรวม 12 กระเบ โดยวางเป็น 3 แถว แต่ละแถววางซ้อนกัน 4 ชั้น ดังนั้นในการทดลองมะนาวสภาพที่มีปริมาณมะนาวน้ำหนักประมาณ 36, 72, 108 และ 144 กก. ตามลำดับ สำหรับมะนาวใช้เปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน มีจำนวน 40 ผล

ทำการอบมะนาวในสภาพต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นด้วยวิธีอบไอน้ำ โดยกรรมวิธีการเพิ่มอุณหภูมิผลมะนาวถึง 30 °ซ. มีความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศร้อนจะอยู่ที่ระดับมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ อบมะนาวให้อุณหภูมิตรงบริเวณกึ่งกลางผลเพิ่มขึ้นถึง 46 °ซ. และคงอุณหภูมิไว้ที่ 46 °ซ. เป็นระยะเวลา 0:40 ชั่วโมง

วิธีวัดอุณหภูมิผลมะนาว จะวัดอุณหภูมิจากมะนาวกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) จำนวน 3 ผลน้ำหนัก 42±2 หรือ 62±2 กรัม/ผล วางอยู่ในกระเบชั้นล่างสุด มะนาวกำหนดอุณหภูมิทั้ง 3 ผล



นี้ใช้เป็นตัวแทนแสดงอุณหภูมิผลมะนาวทั้งหมดภายในเครื่องตู้อบความร้อน ทำการวัดอุณหภูมิผลมะนาวตามรายละเอียดในสลักจิต และคณะ (2559) เมื่อมะนาวกำหนดอุณหภูมิ 3 ผล อุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึงอุณหภูมิกำหนด แสดงว่าขณะนั้นมะนาวทดลองทั้งหมดในเครื่องตู้อบความร้อนมีอุณหภูมิอยู่ในระดับเดียวกับมะนาวกำหนดอุณหภูมิ เมื่อมะนาวทดลองมีอุณหภูมิคงที่อยู่ที่ระยะเวลาตามกำหนดแล้ว ลดอุณหภูมิผลทันทีโดยวิธีเป่าลม ตามรายละเอียดในสลักจิต และคณะ (2559) จากนั้นนำมะนาวทดลอง 40 ผลออกจากแต่ละกระบะ ใส่ในกล่องกระดาษเขียนรายละเอียดต่างๆ ดังนี้ ได้แก่ ตำแหน่งของกระบะ (ซ้าย กลาง ขวา) ชั้นของกระบะ (ชั้นที่ 1, 2, 3 และ 4) จากนั้นนำมะนาวทดลองทั้งหมดเก็บห้องเย็นอุณหภูมิ $12 \pm 2^{\circ}\text{C}$. ความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\%$ ตรวจสอบความเสียหายของมะนาวหลังจากเก็บไว้นาน 1 สัปดาห์ โดยบันทึกจำนวน มะนาวที่เสียหายจากความร้อนได้แก่ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ความเป็นกรด การเปลี่ยนแปลงของสีเปลือก กลิ่นหอมต่อมน้ำมันที่เปลือก รสชาติ และอาการอื่นๆ ตามวิธีการดังรายละเอียดในสลักจิต และคณะ (2556) ดำเนินการทดลองอบมะนาวในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม่มีปริมาณมะนาวตามที่กำหนดจำนวน 2 ครั้ง

5. แมลงที่ใช้ในการทดลอง

5.1 แหล่งที่มาของแมลงวันผลไม้

เลี้ยงแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เป็นจำนวนมากไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ ต้นกำเนิดสายพันธุ์ของแมลงได้มาจากผลน้อยหน่าและผลมะม่วง เก็บรวบรวมในห้องที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และกาญจนบุรี แมลงตัวเต็มวัยจะถูกจำแนกชนิดอย่างละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คัดแยกเอาเฉพาะแมลงวันทอง *B. dorsalis* เพียงชนิดเดียว จากนั้นจึงนำแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัย ไปเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการและเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นโดยอาศัยวิธีการเลี้ยงแมลงด้วยอาหารเทียม (artificial diet)

5.2 การเลี้ยงแมลงวันผลไม้ที่ใช้สำหรับการทดลอง

5.2.1 สภาพของห้องเลี้ยงแมลง: ห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้เป็นห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง ห้องเลี้ยงแมลงมีขนาด $3.5 \times 4.6 \times 2.3$ เมตร อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65 ± 5 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่างภายในห้องได้จากหลอดชีวภาพ (bioluck) จำนวน 20 หลอดติดตั้งบนเพดานห้อง และอีกจำนวน 40 หลอดติดตั้งไว้บนผนังรอบห้อง ไฟจะสว่างในระหว่างช่วงเวลา 6.00 น - 18.00 น. นอกจากนี้ ภายในห้องเลี้ยงแมลงยังมีหลอดฟลูออเรสเซนต์ขนาด 40 วัตต์ อีก 1 หลอด เพื่อให้แสงสลัวเลียนแบบสภาพของแสงแดดในช่วงรุ่งเช้า และพลบค่ำซึ่งจะช่วยกระตุ้นการผสมพันธุ์ของแมลง โดยไฟจะเปิดและปิดในช่วงเวลา 5.30-6.00 น. และ 18.00-18.30 น. (Figure 1)

5.2.2 วิธีปฏิบัติสำหรับตัวเต็มวัย: เลี้ยงแมลงตัวเต็มวัยจำนวนมากประมาณ 20,000 ตัว/กรง ไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด $65.5 \times 69 \times 77$ ซม. กรงแมลงทำด้วยมุ้งลวดตาข่ายอลูมิเนียมขนาด 16 เมช ภายในกรงมีจานพลาสติกบรรจุอาหารสำหรับตัวเต็มวัย ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมโดย



น้ำหนัสดังนี้ น้ำตาล 10 ส่วน enzymatic protein hydrolysate (Amber series 100) 1 ส่วน และ yeast extract 1 ส่วน การให้น้ำใช้ขวดพลาสติกทรงกระบอกขนาด 9 x 9.30 ซม. ฝาขวดเจาะรูตรงกลางขนาด 1 ซม. จำนวน 1 รู เอาสำลีมาป้อนเป็นแท่งกลมยาวประมาณ 13.5 ซม. วิธีให้น้ำโดยเอาแท่งใส่เข้าไปที่ฝาขวดเจาะรู จากนั้นเทน้ำใส่เข้าไปในกระบอกให้เต็ม ปิดฝากระบอกตั้งสำลีบนฝาแผ่นกระจายตามแนวรัศมีของฝากระบอก วางกระดาษกรองรูปทรงกลมลงไปทับด้านบนสำลี จากนั้นนำกระบอกน้ำเข้าไปวางอยู่บนตะแกรงภายในกรงเลี้ยงแมลง หลังจากเลี้ยงแมลงตัวเต็มวัยครบ 7 สัปดาห์ เอากระบอกน้ำและอาหารออกจากกรง ปล่อยให้แมลงที่ยังเหลืออยู่ในกรงตายทั้งหมด หลังจากนั้นทำความสะอาดกรงเลี้ยงแมลงเพื่อเตรียมไว้สำหรับใส่แมลงในรุ่นใหม่ต่อไป ระหว่างการทดลองเตรียมแมลงตัวเต็มวัยอายุต่าง ๆ กันไว้ไม่น้อยกว่า 5 กรง มีแมลงมากกว่า 100,000 ตัว

5.2.3 วิธีการเก็บไข่: เริ่มเก็บไข่จากแมลงตัวเต็มวัยเมื่อมีอายุประมาณ 15 วัน โดยใช้กระบอกพลาสติกมีฝาปิด ด้านข้างเจาะรูเป็นอุปกรณ์รวบรวมไข่ กระบอกพลาสติกมีขนาด 7 x 17 ซม. ด้านข้างเจาะรูขนาด 0.4 มม. แมลงตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ผ่านรูจากด้านข้างเข้าไปวางไข่ภายในกระบอกพลาสติก ในการเก็บไข่แต่ละครั้งใส่น้ำส้มไว้ในกระบอกเก็บไข่ เพื่อกระตุ้นให้แมลงมาวางไข่และในขณะเดียวกัน ยังให้ความชื้นภายในกระบอกพลาสติก ป้องกันไม่ให้ไข่ของแมลงแห้งและแตก รวบรวมไข่แมลงด้วยวิธีเติมน้ำสะอาดในกระบอกพลาสติก เก็บไข่เขย่าเบาๆ เพื่อให้ไข่ที่ติดอยู่ด้านข้างภายในกระบอกหลุด ใช้ผ้ามีสลิขนาด 150 เมช แยกไข่ออกจากน้ำส้ม รวบรวมไข่ทั้งหมดเก็บไว้ในน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเทียม พร้อมทั้งตรวจหาอัตราการฟักของไข่โดยวิธีสุ่มไข่จำนวน 100 ฟอง วางไว้บนผ้ามีสลิสีดำวางทับบนกระดาษกรองชุบน้ำเก็บไว้ในจานแก้ว ตรวจนับจำนวนไข่ที่ฟักเป็นตัวหนอนหลังจากนั้น 2 วัน

5.2.4 วิธีปฏิบัติสำหรับตัวหนอน: เลี้ยงหนอนบนอาหารเทียมสูตรข้าวโพดป่น (Watanabe *et al.*, 1973) ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้ ข้าวโพดป่น (ขนาด 20 เมช) 50 กรัม กระดาษชำระ 3 กรัม น้ำตาล 5 กรัม น้ำกลั่น 85 มล. HCl (Conc.) 0.2 มิลลิลิตร Brewer's yeast 5 กรัม และ butyl p-hydroxybenzoate 0.15 กรัม นำอาหารเทียมประมาณ 900 กรัม ใส่ถาดพลาสติกขนาด 23 x 32 x 5 ซม. ตัดกระดาษชำระขนาด 5.5 x 11 ซม. จำนวน 2 ชิ้น วางไว้บนอาหารเทียม ใช้หลอดดูดสารละลายขนาด 1 มิลลิลิตร ตวงไข่จำนวน 0.4 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางบนกระดาษชำระ กลิ้งไข่ด้วยฟูกันให้กระจาย ทั่วๆ กันบนกระดาษชำระด้วยวิธีการนี้จะช่วยให้หนอนไม่แย่งอาหารกันเมื่อฟักออกจากไข่ ปิดถาดอาหารเทียมด้วยถาดเปล่าอีกใบหนึ่ง เพื่อให้ภายในมีความชื้นสูง ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นมากสำหรับไข่จะฟักออกเป็นตัวหนอน นำถาดอาหารเก็บไว้ในห้องเลี้ยงแมลงจนกระทั่งตัวหนอนเจริญเติบโตเต็มที่

5.2.5 วิธีปฏิบัติสำหรับดักแด้: หนอนแมลงวันผลไม้เจริญเติบโตเต็มที่พร้อมจะเข้าดักแด้ภายใน 6 วัน เปิดฝาครอบถาดอาหารเทียม และย้ายไปวางในภาชนะสำหรับให้แมลงเข้าดักแด้ ซึ่งเป็นกระบอกพลาสติกขนาด 43 x 74 x 23 ซม. ภายในกระบอกบรรจุขี้เลื่อยขนาด 20 เมช มีความชื้นพอประมาณ เป็นที่สำหรับให้หนอนเข้าดักแด้ หนอนตัวเต็มวัยที่พร้อมจะเข้าดักแด้จะคลานหรือติด



ตัวเองออกจากอาหารเทียมและเข้าดักด้วในซีลื้อย ก่อนที่ดักด้วจะออกเป็นตัวเต็มวัยประมาณ 2 วัน ใช้ตะแกรงขนาด 20 ซม. ร่อนแยกเอาดักด้วออกจากซีลื้อย คัดดักด้วที่ไม่สมบูรณ์หรือตายทิ้ง นำดักด้วที่สมบูรณ์จำนวนประมาณ 20,000 ดักด้ว ใส่ในภาชนะพลาสติกขนาด 23 x 32 x 5 ซม. วางไว้ในกรงเลี้ยงแมลง

5.2.6 ระยะเวลาสำหรับการเจริญเติบโต: ภายใต้สภาพห้องเลี้ยงแมลงที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง การเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้ในแต่ละวัยจะใช้ระยะเวลาดังต่อไปนี้คือ

| | | |
|-----------------|-------|---------|
| ระยะไข่ | 30-36 | ชั่วโมง |
| ระยะหนอนวัยที่1 | 1 | วัน |
| ระยะหนอนวัยที่2 | 2 | วัน |
| ระยะหนอนวัยที่3 | 3-4 | วัน |
| ระยะดักด้ว | 8-10 | วัน |

5.2.7 การควบคุมคุณภาพของแมลง: แมลงวันผลไม้ซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการจะต้องมีความแข็งแรง เพื่อที่ข้อมูลจากผลการศึกษาวิจัยจะได้ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของแมลงเป็นประจำ เพื่อที่จะสามารถพบสิ่งผิดปกติและแก้ไขได้ทันทีโดยในการเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่นจะตรวจสอบอัตราการฟักของไข่ (hatching rate) อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) น้ำหนักของดักด้ว และอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio) และอัตราความพิการของแมลง

6. ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

มะนาวใช้ในการทดลองเป็นมะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์พิจิตร1 การเตรียมมะนาวทดลอง ผลมะนาวต้องล้างทำความสะอาด เป่าให้แห้ง คัดเลือกมะนาวผลแก่สีผิวเปลือกสีเขียวมีน้ำมาก เป็นผลมะนาวที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของหนอน ผลขนาดกลางน้ำหนัก 38 – 48 กรัม / ผล เก็บมะนาวไว้ในที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งถึงเวลาที่นำไปใช้ในการทดลอง ตรวจสอบสภาพความผิดปกติของผลมะนาวทุกผลจะต้องไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลง วิธีการเตรียมมะนาวให้มีแมลงวันผลไม้ระยะไข่ อยู่ภายในผล จะใช้วิธีใส่ไข่สมบูรณ์ที่ผ่านการตรวจสอบและคัดเลือกภายใต้กล้องจุลทรรศน์) ลงบนเนื้อมะนาว (artificial infestation method) โดยใช้มีดผ่าตัดกรีดเป็นวงรอบขั้วประมาณ ¼ ส่วน ห่างจากขั้วประมาณ 1 ซม. เปิดเปลือกมะนาวด้านบนเผยขึ้น จากนั้นใช้มีดผ่าตัดกรีดตัดตรงแกนกลางมะนาวออกทำให้แต่ละกีบมะนาวเปิด เพื่อให้มีอากาศถ่ายเทภายในผล ช่วยให้หนอนสามารถซ่อนไข่เข้าไปทุกส่วนของผลมะนาวได้โดยง่าย และช่วยระบายน้ำออกจากผลโดยการคว่ำด้านขั้วผลเอียงแฉกผ่าเปิดให้น้ำมะนาวในผลไหลออกให้หมด ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำขังในผลซึ่งอาจจะทำให้หนอนจมน้ำตายได้ จากนั้นนำมะนาววางไว้ในกระดาษชำระในภาชนะเพื่อซับน้ำซึ่งพร้อมที่จะใส่ไข่ การเตรียมมะนาวทดลองให้มีไข่ของแมลงวันผลไม้ไม่ได้อยู่ภายในผลมะนาว ดำเนินการตามขั้นตอน และวิธีการดังนี้



การเตรียมมะนาวมีระยะไซ่อยู่ภายในผล: เก็บไซ่แมลงวันผลไม้ตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยวางกระบอกเก็บไซ่ไว้ในกรงเลี้ยงแมลงนาน 60 นาที รวบรวมไซ่ที่ได้ใส่ในน้ำกลั่นเก็บไว้ในถ้วยแก้ว (beaker) แยกไซ่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ซึ่งลอยอยู่บนน้ำทิ้งทั้งหมด ใช้หลอดดูดสารละลาย (dropper) ดูดไซ่ไปวางไว้บนผ้ามีสลิสนีดำซึ่งวางทับอยู่ด้านบนของกระดาษกรองสีดำชุ่มน้ำ จากนั้นใช้พู่กันเขี่ยกระจายไซ่ให้เป็นแถวยาวเพื่อสะดวกในการแยกไซ่ไม่สมบูรณ์ออกทิ้ง เลือกไว้เฉพาะไซ่ที่สมบูรณ์เท่านั้น นับจำนวนไซ่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้พู่กันเขี่ยไซ่อย่างระมัดระวังให้รวมกันเป็นกลุ่ม ๆ ละ 30 ฟอง/ผล จากนั้นใช้พู่กันย้ายไซ่ 1 กลุ่ม (จำนวน 30 ฟอง/ผล) ดังกล่าวลงบนเนื้อมะนาวทรงบริเวณที่ทำรอยแผล ปิดแผลโดยดึงเปลือกด้านข้างลงมาประกบชิดกับเปลือกอีกด้านปิดให้สนิท โดยการใช้กระดาษขาวปิดทับพันโดยรอบแผลเพื่อป้องกันไม่ให้เปลือกมะนาวแยกออกจากกัน (Figure 2 และ 3) เก็บมะนาวมีระยะไซ่อยู่ภายในผลใส่ในกระบะเก็บให้ครบ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมะนาวไปใช้ในการทดลองต่อไป

7. เปรียบเทียบความทนทานของแมลงวันผลไม้ระยะไซ่ 24 ชั่วโมงในผลมะนาวพันธุ์แป้น กับ พิจิตร1 ต่อความร้อนที่อุณหภูมิ และระยะเวลาต่างๆ ด้วยวิธีการอบไอน้ำ

ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ Sanshu Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) (model: EHK – 1000B, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) จำนวน 2 เครื่อง มะนาวใช้ในการทดลองเป็นมะนาวแก่ผิวเปลือกสีเขียว ผลขนาดกลางน้ำหนัก 38 – 48 กรัม/ผล การเตรียมมะนาวในสภาพที่มีแมลงระยะไซ่ อยู่ภายในผล อาศัยขั้นตอนและวิธีปฏิบัติของ สลักจิต (2554) การเตรียมมะนาวทดลองไซ่ของแมลงวันผลไม้ใช้ในการทดลองมีอายุ 24 ชั่วโมง ไซ่ไซ่จำนวน 30 ฟอง/ผล การศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ระยะไซ่เปรียบเทียบกับระหว่างมะนาวพันธุ์แป้น กับพิจิตร1 มีขั้นตอนและวิธีการดังรายละเอียดต่อไปนี้

เตรียมมะนาวพันธุ์แป้น และพิจิตร1 มีแมลงระยะไซ่ อยู่ภายในผล นำมะนาวทดลองซึ่งมีแมลงระยะไซ่ในผลมะนาวพันธุ์แป้น และพิจิตร1 อย่างละ 20 ผล วางไว้ในถาดบรรจุผลไม้เดียวกัน จากนั้นอบมะนาว กำจัดแมลงระยะไซ่ในผลมะนาวพันธุ์แป้น และพิจิตร1 พร้อมกันในตู้อบความร้อนเดียวกันด้วยวิธีอบไอน้ำ เปรียบเทียบอัตราการตายของไซ่ระยะไซ่ในผลมะนาวพันธุ์แป้น และพิจิตร1 เมื่ออบมะนาวให้อุณหภูมิภายในสุดผลของมะนาวเพิ่มขึ้นถึง 45 และ 46 องศาเซลเซียส และคงความร้อนภายในผลมะนาวที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 0, 10, 20, 30 และ 40 นาที เริ่มต้นด้วยอากาศร้อนที่อ้อมตัวด้วยไอน้ำนาน 30 นาที ความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองแต่ละครั้ง ใช้มะนาวกำหนดอุณหภูมิ จำนวน 3 ผล/พันธุ์ (แบ่งวัดอุณหภูมิซึ่งเป็นตัวกำหนดอุณหภูมิผลมะนาวต้องทำการสอบเทียบความเที่ยงตรงอย่างน้อยเดือนละ 1 ครั้ง) ในการทดลองแต่ละครั้งใช้มะนาวกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) ขนาดกลางน้ำหนัก 42 ± 1 กรัม/ผล จำนวน 3 ผล/พันธุ์ วางไว้ในกระบะชั้นล่างสุด เมื่อมะนาวกำหนดอุณหภูมิอย่างน้อยจำนวน 2 ผล/พันธุ์ (Figure 4) อุณหภูมิภายในสุดผลของมะนาวเพิ่มขึ้นถึง 45 และ 46 องศาเซลเซียส เป็น



ระยะเวลาตามกำหนด นำมะนาวทดลองมีแมลงระยะไข่ในผลมะนาวพันธุ์แป้น และพิจิตร1 ในผลอย่างละจำนวน 20 ผล ออกจากห้องบรรจุผลไม้ (Figure 5) และลดอุณหภูมิผลมะนาวทันทีโดยเป่าด้วยลมนาน 30 นาที ในเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” Shower Cooling System (Differential Pressure Type) (model: SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) (Figure 6) ส่วนมะนาวที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ของระยะไข่ในผลมะนาวพันธุ์แป้น และพิจิตร1 มีจำนวน 50 ผล ไม่ต้องผ่านความร้อน แยกเก็บมะนาวทดลองแต่ละชนิด และระยะเวลาในกระป๋องพลาสติกทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5 เซนติเมตร สูง 4.5 เซนติเมตร ปิดฝา (ฝาปิดทำช่องระบายอากาศเป็นรูสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดประมาณ 1 ซม. ปิดช่องระบายอากาศด้วยผ้ามีสลิขนาด 16 เมช) นำกระป๋องใส่มะนาวจัดเรียงลงในกระบะพลาสติกขนาด 36 x 54 x 15 ซม. โดยใส่มะนาวจำนวน 20 ผล/กระบะ เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงจากภายนอกเล็ดลอดเข้าไปวางไข่ในมะนาวทดลอง กลุ่มกระบะด้วยผ้ามีสลิ หลังจากนั้นนำมะนาวทดลองทั้งหมดเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60-80 เปอร์เซ็นต์ (Figure 7) ตรวจนับจำนวนแมลงรอดชีวิตในมะนาวแต่ละผลหลังจากอบมะนาวกำจัดแมลงระยะระยะไข่ (Figure 8) เป็นเวลานาน 6 วัน ดำเนินการทดลองอบมะนาวกำจัดแมลงระยะไข่ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิและเวลา กำหนดดังกล่าวข้างต้น จำนวน 6 ครั้ง นำข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์เปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนมากที่สุดของแมลงวันผลไม้ระยะไข่ 24 ชั่วโมงในผลมะนาวพันธุ์แป้น กับพิจิตร1 ต่อความร้อนที่อุณหภูมิ และระยะเวลาต่างๆ ด้วยวิธีการอบไอน้ำ วิเคราะห์ข้อมูลหาอัตราการตายคำนวณโดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925)

Abbott's formula :

$$\text{อัตราการตาย} = \frac{\text{อัตราการตายของกลุ่มทดลอง} - \text{อัตราการตายของกลุ่มไม่ผ่านความร้อน} \times 100}{100 - \text{อัตราการตายของกลุ่มไม่ผ่านความร้อน}}$$

$$\text{สถิติที่ใช้ในการศึกษา: อัตราการตาย (\% mortality)} = \frac{\text{จำนวนแมลงวันผลไม้ที่ตาย} \times 100}{\text{จำนวนแมลงวันผลไม้ที่ทดลอง}}$$

8. การประเมินประสิทธิภาพการกำจัดแมลง

8.1 วิธีการเตรียมมะนาวทดลอง : มะนาวใช้ในการทดลองมีผลขนาดกลาง น้ำหนัก 38-48 กรัม/ผล ผลมะนาวพันธุ์พิจิตร1 ที่นำมาผ่านความร้อนต้องเป็นผลมะนาวที่แก่จัดผลสีเขียว (สลักจิต และคณะ, 2559) เตรียมมะนาวให้มีไขอายุ 24 ชั่วโมง อยู่ภายในผล 2 วิธี คือวิธีใส่ไข่ในผลมะนาว (artificial infestation) และวิธีให้แมลงวันผลไม้วางไข่บนผลมะนาว (forced infestation) แต่ละวิธีการมีรายละเอียดดังนี้

(1) วิธีใส่ไข่ในผลมะนาว

จะใช้วิธีใส่ไข่ลงบนเนื้อมะนาวโดยตรง (artificial infestation method) มะนาวใช้ในการทดลองเป็นมะนาวพันธุ์พิจิตร1 ผลแก่สีผิวเปลือกสีเขียว เปลือกหนาค่อนข้างแข็ง ซึ่งเป็น



ลักษณะประจำพันธุ์ การเตรียมผลมะนาวที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของหนอนนั้น มะนาวทุกผลต้องล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า ผึ่งให้แห้ง คัดเลือกมะนาวสมบูรณ์ ตรวจสอบสภาพความผิดปกติของมะนาว ทุกผลจะต้องไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลง ซึ่งคัดขนาดตามกำหนด เก็บมะนาวไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งถึงเวลาที่นำไปใช้ในการทดลอง วิธีการเตรียมมะนาวสำหรับการทดลอง โดยใช้มีดผ่าตัดเจาะกรีดเป็นวง รอบหัวผลประมาณ $\frac{3}{4}$ ส่วน ห่างจากหัวประมาณ 1 ซม. เปิดเปลือกมะนาวด้านบนเผยออก จากนั้นใช้มีดผ่าตัด ตัดตรงแกนกลางมะนาวออกให้มีช่องว่าง สำหรับให้มีอากาศถ่ายเทภายในผล ทำให้แต่ละกีบมะนาวเปิด และเพื่อช่วยให้หนอนสามารถซอมน้ำเข้าไปทุกส่วนของผลมะนาวได้โดยง่าย ช่วยระบายน้ำออกจากผลโดยการคว่ำแง้มผาด้านหัวผลเอียงเพื่อช่วยระบายน้ำมะนาวที่อยู่ภายในผลไหลออกให้หมด และเพื่อป้องกันน้ำซังในผลซึ่งอาจจะส่งผลทำให้หนอนจมน้ำตายได้ จากนั้นนำมะนาววางไว้บนกระดาษชำระวางบนในถาดเพื่อซับให้ผิวเปลือกแห้ง ซึ่งเตรียมพร้อมที่จะใส่ไข่ การเตรียมมะนาวทดลองให้มีระยะไข่ของแมลงวันผลไม้ไม่ได้อยู่ภายในผลมะนาว ดำเนินการตามขั้นตอน และวิธีการดังนี้

การเตรียมมะนาวมีระยะไข่อยู่ในผล: เก็บไข่แมลงวันผลไม้ตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยวางกระบอกเก็บไข่ไว้ในกรงเลี้ยงแมลงนาน 30 นาที รวบรวมไข่ที่ได้ใส่ในน้ำกลั่นเก็บไว้ในถ้วยแก้ว (beaker) แยกไข่ที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ซึ่งลอยอยู่บนน้ำทิ้งทั้งหมด ใช้หลอดดูดสารละลาย (dropper) ดูดไข่ไปวางไว้ผ้ามีสลิสนีดำซึ่งถูกวางบนกระดาษกรองสีดำชุ่มน้ำอีกชั้น โดยการกระจายไข่ให้เป็นแถวยาวเพื่อสะดวกในการแยกไข่ไม่สมบูรณ์ออก เลือกว่าไข่ที่สมบูรณ์เท่านั้น นับจำนวนไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ฟู่กันเขี่ยไข่อย่างระมัดระวังให้รวมกันเป็นกลุ่มๆ ละ 30 ฟอง/ผล จากนั้นใช้ฟู่กันย้ายไข่ 1 กลุ่ม (จำนวน 30 ฟอง/ผล) ดังกล่าววางลงบนเนื้อมะนาวตรงบริเวณที่ทำรอยแผล จากนั้นปิดแผลโดยดึงเปลือกประกบชิดกับเปลือกอีกด้านปิดให้สนิท และปิดรอยแผลโดยการรัดด้วยกระดาษขาวเพื่อป้องกันไม่ให้เปลือกมะนาวแยกออกจากกัน ในระหว่างที่นำมะนาวผ่านความร้อนในเครื่องตู้อบความร้อนกำลังแมลงวันผลไม้ นำมะนาวทั้งหมดเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น อุณหภูมิ $27 \pm 1^{\circ}$ ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 75 ± 5 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งนำมะนาวไปใช้ในการทดลอง

(2) วิธีให้แมลงวางไข่บนผลมะนาว

โดยใช้เข็มหมุดปักบอร์ดเจาะรูบนผลมะนาวจนสุดเข็มจำนวน 5 รู เพื่อบังคับให้แมลงตัวเต็มวัยเพศเมียแทงอวัยวะวางไข่เข้าไปวางไข่ในผลมะนาวผ่านรูที่เจาะไว้เท่านั้น กรงแมลงสำหรับวางไข่มีขนาด $50.5 \times 35.6 \times 35.2$ ซม. ทำด้วยมุ้งลวดตาข่ายอลูมิเนียมขนาด 16 เมช มีแมลงตัวเต็มวัยอายุไม่น้อยกว่า 2 สัปดาห์ จำนวนประมาณ 2,000 ตัว การเตรียมมะนาวทดลองแต่ละครั้ง จะนำมะนาวจำนวน 10 ผล ใส่ในกรงให้แมลงวันวางไข่เป็นเวลานาน 30 นาที หลังจากนั้นเก็บมะนาวไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นอุณหภูมิ $27 \pm 1^{\circ}$ ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 75 ± 5 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งนำมะนาวไปใช้ในการทดลอง



8.2 การประเมินประสิทธิภาพการกำจัดแมลง: ออบมะนาวทดลองในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้อบความร้อนมีปริมาณมะนาวน้ำหนักแตกต่างกัน คือ น้ำหนักประมาณ 66-72 กก/ลบ.ม. (Haft load) และ 132-144 กก/ลบ.ม. (full load) ดำเนินการทดลองโดยเตรียมมะนาวให้มีไข่แมลงวันทองอยู่ในผล 2 วิธีตามที่ได้กล่าวมาแล้ว วิธีใส่ไข่ในผลมะนาวจำนวน 200 ผล และวิธีให้แมลงวันทองวางไข่บนผลมะนาวจำนวน 40 ผล สุ่มแบ่งมะนาวของทั้งสองกลุ่มออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน เลือกมะนาวที่ได้จากวิธีการใส่ไข่ในผลมะนาว และวิธีการให้แมลงวางไข่บนผลมะนาว 1 ส่วน จำนวน 50 และ 10 ผล ตามลำดับ เก็บไว้สำหรับเป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ต้องนำไปผ่านความร้อน มะนาวส่วนนี้จะใช้สำหรับการประมาณจำนวนแมลงที่มีชีวิตในมะนาวที่ผ่านความร้อน (treatment) เนื่องจากว่าจำนวนแมลงที่มีชีวิตในมะนาวที่ผ่านความร้อนนั้นไม่สามารถที่จะทำการตรวจสอบได้โดยตรง สำหรับมะนาวที่เหลืออีก 3 ส่วนแบ่งจำนวนเท่า ๆ กันใส่ในภาชนะบรรจุผลไม้แบบกระบะพลาสติกแข็งทนความร้อนขนาด 36 x 70 x 15 ซม. จำนวน 3 กระบะ นำมะนาวแต่ละกระบะไปซั่ง และใส่มะนาวส่วนอื่นที่ไม่ใช้ในการทดลอง (filler fruit) เพิ่มลงไปในกระบะเพื่อให้มีน้ำหนักประมาณ 11-12 กก./กระบะ นำกระบะบรรจุมะนาวทั้ง 3 กระบะวางไว้ในห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้อบความร้อน เพื่อให้มะนาวมีน้ำหนักประมาณ 66-72 กก/ลบ.ม. อยู่ในห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้อบความร้อน นำมะนาวส่วนอื่นที่ไม่ใช้ในการทดลอง (filler fruit) เฉลี่ยจำนวนเท่า ๆ กันใส่ในกระบะบรรจุผลไม้อีก 3 กระบะ และนำไปวางซ้อนลงบนกระบะซึ่งบรรจุมะนาวทดลอง

กรณีของการอบมะนาวในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม้มีปริมาณมะนาวน้ำหนักประมาณ 132-144 กก/ลบ.ม. (full load) ดำเนินการทดลองโดยเตรียมมะนาวด้วยวิธีใส่ไข่ในผล และวิธีให้แมลงวางไข่บนผลจำนวน 380 ผล 40 ผลตามลำดับ สุ่มเลือกมะนาวทดลองวิธีใส่ไข่ในผลและวิธีให้แมลงวางไข่บนผลจำนวน 50 ผล และ 10 ผล ตามลำดับ เก็บไว้สำหรับเป็นตัวเปรียบเทียบไม่ต้องผ่านความร้อนสำหรับมะนาวที่เหลือแบ่งออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน นำมะนาวแต่ละส่วนใส่ในกระบะบรรจุผลไม้จำนวน 3 กระบะ และใส่มะนาวส่วนอื่นที่ไม่ใช้ในการทดลอง (filler fruit) เพิ่มลงไปในกระบะเพื่อให้มีน้ำหนักประมาณ 10.5 กก./กระบะ นำกระบะบรรจุมะนาวทั้ง 3 กระบะวางไว้ในห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้อบความร้อน จากนั้นนำกระบะบรรจุผลไม้อีก 9 กระบะซึ่งมีมะนาวไม่ใช้ในการทดลองจำนวนประมาณ 11-12 กก/กระบะ ใส่เพิ่มเข้าไปในห้องบรรจุผลไม้เพื่อให้มีมะนาวทั้งหมดน้ำหนักประมาณ 132-144 กก/ลบ.ม. ตามที่กำหนดไว้

ยืนยันประสิทธิภาพของกระบวนการอบไอน้ำโดยการทำอบมะนาวกำจัดไข่แมลงวันทองตามข้อกำหนด ดังต่อไปนี้

- (1). อุณหภูมิสูงสุดของอากาศภายในห้องบรรจุผลไม้ = 47.4 ° ซ.
- (2). อุณหภูมิภายในสุดของผลมะนาว = 46 ° ซ.
- (3). คงระดับอุณหภูมิภายในผลมะนาวหลังเพิ่มขึ้น = 0:40 ชั่วโมง
ถึง 46 ° ซ. นาน 40 นาที



- (4). ระดับความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศร้อน = 93 % RH
- (5). วิธีการควบคุมการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิอากาศภายในห้องบรรจุผลไม้ = อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นแต่ละระดับในช่วงเวลาที่กำหนด (Stepped temp. VHT)
- (7). วิธีการลดอุณหภูมิผลมะนาว = 1. เป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง
2. ฉีดพ่นน้ำนาน 10 นาที
- (8). ปริมาณมะนาวในห้องบรรจุผลไม้ = ประมาณ 66 กก/ลบ.ม. และ 132 กก/ลบ.ม.
- (9). การตรวจสอบการตายของแมลงวันผลไม้ = 7 วันหลังผ่านความร้อน

การวัดอุณหภูมิผลมะนาวทดลองอาศัยการวัดจากมะนาวกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) จำนวน 3 ผล น้ำหนัก 42 ± 1 กรัม/ผล ซึ่งวางอยู่ในกระบะบรรจุผลไม้ชั้นล่างสุด เมื่อมะนาวกำหนดอุณหภูมิจำนวน 2 ผล อุณหภูมิคงที่อยู่ที่ 46°C . เป็นระยะเวลาตามกำหนด เปิดประตูห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้ควบคุมความร้อน ลดอุณหภูมิผลมะนาวทันทีโดยแบ่งเป็น 2 กรรมวิธี คือ 1.เป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง และ 2. ใช้วิธีพ่นด้วยน้ำนาน 10 นาทีต่อจากนั้นเป่าด้วยลมนาน 50 นาที หลังจากนั้นเก็บมะนาวทดลองตามรายละเอียดใน สลักจิตและคณะ (2559) ในกระบะพลาสติกขนาด $36 \times 54 \times 15$ ซม. ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น อุณหภูมิ $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$. ความชื้นสัมพัทธ์ 75 ± 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองอบมะนาวตามรายละเอียดที่กล่าวมาแล้ว จนกระทั่งมีแมลงในผลมะนาวทดลองที่ผ่านความร้อนจำนวนไม่น้อยกว่า 100,000 ตัว เก็บมะนาวทดลองตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้ว ตรวจนับจำนวนแมลงรอดชีวิตในผลมะนาวแต่ละผลหลังจากอบมะนาวแล้ว 6 วัน ดำเนินการทดลองอบมะนาวกำจัดแมลงระยะไข่ ที่อุณหภูมิและเวลาที่กำหนดดังกล่าวข้างต้น จำนวน 30 ครั้ง นำข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์ข้อมูลหาอัตราการตายคำนวณโดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925)

9. การประเมินความเสียหายต่อคุณภาพผลมะนาว: จำลองการส่งออกมะนาวพันธุ์พิจิตร1 ทางเครื่องบินและทางเรือ

การเตรียมมะนาวเข้าตู้อบ : มะนาวพันธุ์พิจิตร1 จากสวนใส่ลงกระบะ เเทน้ำให้ท่วมผลมะนาว แยกผลมะนาวลอยน้ำออก ล้างทำความสะอาดมะนาวที่เหลือทั้งหมด ใช้พัดลมเป่าให้แห้ง จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคัดขนาด

ผลมะนาวที่ใช้ทดลอง: ต้องเป็นผลมะนาวพันธุ์พิจิตร1 ที่แก่จัด ผลสีเขียว ผิวสวยไม่มีตำหนิผลขนาดเล็กน้ำหนัก 40-50 กรัม/ผล หรือขนาดกลางน้ำหนัก 51-60 กรัม/ผล



นำมะนาวใช้เติม (filler fruit) : มะนาวตากเกรด รวมถึงมะนาวลอยน้ำ ไม่กำหนดขนาด น้ำหนักผลหรือความแก่-อ่อน สีผิวเปลือก นำมาใช้เติมให้เต็มกระบะบนที่ก้นน้ำหนักต่อกระบะ

การอบมะนาวพันธุ์พิจิตร1 ในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม้ไม่มีปริมาณมะนาวน้ำหนักประมาณ 132-144กก./ลบ.ม. ภายในห้องบรรจุผลไม้ของตู้อบความร้อน สามารถวางกระบะบรรจุมะนาวได้ทั้งหมดรวม 12 กระบะ โดยวางเป็น 3 แถว แต่ละแถววางซ้อนกันได้สูงสุด 4 ชั้น โดยเริ่มจากการเตรียมกระบะบรรจุผลไม้ 9 กระบะซึ่งมีมะนาว filler fruit ให้เต็ม 3 ชั้น ซึ่งน้ำหนักประมาณ 11-12 กก/กระบะ วางด้านล่างของตู้ก่อน

ดำเนินการทดลองโดยเตรียมมะนาวคัดพิเศษจำนวน 160 ผล สุ่มเลือกมะนาวทดลองจำนวน 40 ผล เก็บไว้สำหรับเป็นตัวเปรียบเทียบไม่ต้องผ่านความร้อน สำหรับมะนาวที่เหลือแบ่งออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กันนำมะนาวแต่ละส่วนใส่ในกระบะบรรจุผลไม้จำนวน 3 กระบะ และเติมมะนาวส่วนอื่นที่ไม่ใช้ในการทดลอง (filler fruit) ใส่เพิ่มลงไปในกระบะเพื่อให้มีน้ำหนักประมาณ 11-12 กก/กระบะ นำกระบะบรรจุมะนาวทั้ง 3 กระบะ วางไว้ชั้นบนสุดในห้องบรรจุผลไม้ของตู้อบความร้อนซึ่งใกล้ทางออกลมร้อนมากที่สุด

ทำการอบมะนาวดังกล่าวข้างต้นด้วยวิธีอบไอน้ำ โดยกรรมวิธีซึ่งอากาศร้อนอุณหภูมิเพิ่มขึ้นแต่ละระดับภายในช่วงเวลาที่กำหนด (stepped temperature vapor heat treatment VHT) ดังรายละเอียดในสไลด์จิต และคณะ (2556) โดยการอบมะนาวสภาพอากาศร้อนที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 93 เปอร์เซ็นต์ อบมะนาวให้อุณหภูมิบริเวณตรงกึ่งกลางผลเพิ่มขึ้น 46 °ซ. และคงอุณหภูมิไว้ที่ 46 °ซ. เป็นระยะเวลา 40 นาที

วิธีการวัดอุณหภูมิผลมะนาว โดยจะวัดอุณหภูมิจาก ผลมะนาวกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) จำนวน 3 ผล ผลมะนาวที่ใช้ทดลองมี 2 ขนาด คือ ขนาดเล็ก และขนาดกลาง น้ำหนักผล 45 ± 1 และ 62.5 ± 1 กรัม/ผลตามลำดับ ตำแหน่งการวางผลมะนาวกำหนดอุณหภูมิ ให้ผลวางอยู่ตรงกลางกระบะชั้นล่างสุด มะนาวกำหนดอุณหภูมิทั้ง 3 ผลนี้ใช้เป็นตัวแทนแสดงอุณหภูมิผลมะนาวทั้งหมดภายในตู้ความร้อน ทำการวัดอุณหภูมิผลมะนาวจากมะนาวกำหนดอุณหภูมิทั้ง 3 ผล เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึงอุณหภูมิกำหนด แสดงว่าขณะนั้นมะนาวทดลองทั้งหมดในตู้อบความร้อนมีอุณหภูมิอยู่ในระดับเดียวกับมะนาวกำหนดอุณหภูมิ เมื่อมะนาวทดลองมีอุณหภูมิกึ่งที่อยู่เป็นระยะเวลาตามกำหนดแล้ว ลดอุณหภูมิผลมะนาวทันทีโดยวิธีการเป่าด้วยลม (air cooling) นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมะนาวทดลอง 40 ผลออกจากแต่ละกระบะจัดเก็บมะนาวทดลองบรรจุถุงตัดแปรสภาพบรรยากาศ (Modified Atmosphere Packaging, MAP) วางลงในกล่องกระดาษจากนั้นนำมะนาวไปเก็บไว้ตู้ควบคุมอุณหภูมิ $12 \pm 2^{\circ}\text{ซ}$. และเขียนรายละเอียดต่างๆ ดังนี้

มะนาวทดลอง 120 ผลผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อน 40 ผล เก็บไว้ 7 วัน

มะนาวทดลอง 120 ผลผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อน 40 ผล เก็บไว้ 14 วัน



ประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อมะนาวในสภาพจำลองการส่งออกมะนาวทางเครื่องบินและทางเรือ โดยบันทึกจำนวนมะนาวเสียหายจากความร้อน 3 อากาศ ได้แก่ เปลี่ยนเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ต่อมาน้ำมันเปลี่ยนเป็นจุดสีน้ำตาล น้ำมะนาวมีรสชาดขม ดำเนินการทดลองอบมะนาวในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม่มีปริมาณมะนาวตามที่กำหนดจำนวน 2 ครั้ง

ดำเนินการทดลองโดยใช้เครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) รุ่น EHK-1000B จำนวน 2 เครื่อง และเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” shower Cooling System (Differential Pressure Type (model : SHS-12 Sanshu Sangyo co.,Ltd.,Kagoshima, Japan) ผลมะนาวที่นำมาผ่านความร้อน ต้องเป็นผลมะนาวพันธุ์พิจิตร1

อบมะนาวภายใต้สภาพที่ห้องบรรจุผลไม่มีปริมาณมะนาวน้ำหนักประมาณ 132-144 กก./ลบม. นำมะนาววางใส่ภายในภาชนะบรรจุผลไม้แบบกระบะพลาสติกแข็งทนความร้อน 40 ผล/กระบะ จำนวน 3 กระบะ ซึ่งมะนาวทั้งหมด 120 ผลนี้จะใช้สำหรับตรวจสอบความเสียหายที่เกิดจากความร้อน จากนั้นนำมะนาวอื่นๆ (filler fruit) ซึ่งมีน้ำหนักผลหรือความแก่ สีผิวเปลือกไม่ได้ตามกำหนดใส่เพิ่มเติมให้เต็มกระบะเพื่อให้มีน้ำหนัก 11-12 กก./กระบะ ภายในห้องบรรจุผลไม้ของตู้อบความร้อน สามารถวางกระบะบรรจุมะนาวได้ทั้งหมดรวม 12 กระบะ โดยวางเป็น 3 แถว แต่ละแถววางซ้อนกันได้สูงสุด 4 ชั้น ดังนั้นในการทดลองอบมะนาวสภาพที่มีปริมาณมะนาวน้ำหนักประมาณ 132-144 กก. หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของความจุตู้เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับมะนาวใช้เปรียบเทียบ (control) มีจำนวน 40 ผล ไม่ต้องผ่านความร้อน

ทำการอบมะนาวดังกล่าวข้างต้นด้วยวิธีอบไอน้ำ โดยกรรมวิธีซึ่งอากาศร้อนอุณหภูมิเพิ่มขึ้นแต่ละระดับภายในช่วงเวลาดำหนด (stepped temperature vapor heat treatment VHT) ดังรายละเอียดในสลักจิต และคณะ (2556) โดยการอบมะนาวสภาพอากาศร้อนที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 93 เปอร์เซ็นต์ อบมะนาวให้อุณหภูมิตรงบริเวณกึ่งกลางผลเพิ่มขึ้น 46 °ซ. และคงอุณหภูมิไว้ที่ 46 °ซ. เป็นระยะเวลา 40 นาที

วิธีวัดอุณหภูมิผลมะนาว จะวัดอุณหภูมิจากมะนาวกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) จำนวน 3 ผลน้ำหนัก 45±1 หรือ 55±1 กรัม/ผล วางอยู่ในกระบะชั้นล่างสุด มะนาวกำหนดอุณหภูมิทั้ง 3 ผลนี้ใช้เป็นตัวแทนแสดงอุณหภูมิผลมะนาวทั้งหมดภายในเครื่องตู้อบความร้อน ทำการวัดอุณหภูมิผลมะนาวเมื่อมะนาวกำหนดอุณหภูมิ 3 ผล อุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึงอุณหภูมิที่กำหนดคืออุณหภูมิตรงบริเวณกึ่งกลางผลเพิ่มขึ้น 46 °ซ. และคงอุณหภูมิไว้ที่ 46 °ซ. เป็นระยะเวลา 40 นาที แสดงว่าขณะนั้นมะนาวทดลองทั้งหมดในเครื่องตู้อบความร้อนมีอุณหภูมิอยู่ในระดับเดียวกับมะนาวกำหนดอุณหภูมิ เมื่อมะนาวทดลองมีอุณหภูมิคงที่อยู่เป็นระยะเวลาตามกำหนดแล้ว ลดอุณหภูมิผลทันทีโดยวิธีเป่าลม ตามรายละเอียดในสลักจิต และคณะ (2559) จากนั้นนำมะนาวทดลอง 40 ผลออกจากแต่ละกระบะ ใส่ในกล่องกระดาษเขียนรายละเอียดต่างๆ ดังนี้ ได้แก่ ตำแหน่งของกระบะแต่ละชั้นมี 3 กระบะ (ซ้าย กลาง ขวา) ชั้นของกระบะ (ชั้นที่ 4) จากนั้นนำมะนาวทดลองทั้งหมดเก็บห้องเย็น



อุณหภูมิ $12 \pm 2^{\circ}\text{C}$. ความชื้นสัมพัทธ์ $75 \pm 5\%$ ตรวจสอบความเสียหายของมะนาวหลังจากเก็บไว้นาน 7 และ 14 วัน โดยบันทึกจำนวน มะนาวที่เสียหายจากความร้อนได้แก่ เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก ความเป็นกรด การเปลี่ยนแปลงของสีเปลือก กลิ่นหอมต่อมน้ำมันที่เปลือก รสชาติ และอาการอื่นๆ ตามวิธีการตั้งรายละเอียดในสลักจิต และคณะ (2556) ดำเนินการทดลองอบมะนาวในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม้ไม่มีปริมาณมะนาวตามที่กำหนดแต่ละกรรมวิธีจำนวน 2 ครั้ง

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น กันยายน 2562 สิ้นสุด ตุลาคม 2564

จังหวัดพิจิตร กำแพงเพชร สมุทรสาคร นครปฐม เพชรบุรี และ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ภายในห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้อบความร้อนสามารถวางกระบะบรรจุผลไม้แบบพลาสติก แข็งทนความร้อนได้สูงสุด 12 กระบะ ซึ่งมะนาวมีน้ำหนักรวมสูงสุดประมาณ 144 กก./ลบม. ถือได้ว่าเป็นการอบมะนาวในสภาพที่มีมะนาวอยู่ภายในตู้ 100 เปอร์เซ็นต์ของความจุตู้ ขณะที่การอบมะนาวประมาณ 36, 72, และ 108 กก./ลบม. เป็นการอบมะนาว 25, 50 และ 75 เปอร์เซ็นต์ของความจุตู้ Figure 9

Table 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิอากาศ และอุณหภูมิผลมะนาว ในขณะที่อบมะนาวน้ำหนักประมาณ 36, 72, 108 และ 144 กก.-ลบม. และ Figure 10-13 แสดงการเปลี่ยนแปลงความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิอากาศ และอุณหภูมิผลมะนาว แสดงระยะเวลาที่ใช้ในการอบมะนาว ให้อุณหภูมิผลเพิ่มขึ้นถึง 46°C . นาน 40 นาที ในสภาพห้องบรรจุผลไม้ไม่มีปริมาณมะนาวต่างกัน เมื่อมีมะนาวประมาณ 36, 72, 108 และ 144 กก./ลบม. ต้องใช้เวลาในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 นานเฉลี่ยเท่ากับ 2:2, 2:2, 2:32, 2:23, 3:10, 2:56, 2:51, และ 2:54 ชั่วโมง ตามลำดับเวลาที่ใช้สำหรับอบมะนาวที่ความจุ 75 เปอร์เซ็นต์ ครั้งที่ 1 ใช้เวลามากที่สุด

การสอบเทียบแท่งวัดอุณหภูมิผลไม้ในเครื่องอ่างน้ำร้อน ทดสอบประสิทธิภาพของตู้อบไอน้ำ อุณหภูมิแท่งวัดต้องแม่นยำ และเป็นไปตามอุณหภูมิกำหนด 46°C นาน 20 นาที ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 100% สำหรับการศึกษาคุณภาพของมะนาวหลังจากอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46°C . นาน 40 นาที ที่ความจุ 25 50 75 และ 100% พบว่า เมื่อทำการอบมะนาวที่ความจุ 25% ใช้ระยะเวลาที่ 2:20 ชั่วโมงเท่ากันทั้ง 2 ครั้ง ในขณะที่การอบมะนาวที่ความจุ 50% ทั้ง 2 ครั้งใช้เวลาแตกต่างกัน 9 นาที ทั้งนี้เนื่องจากผลมะนาวที่เข้าตู้อบมีขนาดแตกต่างกัน ผลขนาดใหญ่จะใช้เวลามากกว่าผลขนาดเล็ก สำหรับการอบมะนาวที่ความจุ 75% จากการอบมะนาว 2 ครั้ง พบว่าใช้เวลานานที่สุดจากการทดลองครั้งที่ 1 ระยะเวลาที่ใช้ในการอบครั้งที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันถึง 14 นาที ซึ่งอาจเกิดจากลักษณะของการวางผลมะนาวกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) หรือผลมะนาวที่เสียบแท่งวัดอุณหภูมิในตู้ที่ใส่มะนาวอัดแน่นเกินไปทำให้ความร้อนเข้าถึงช้า แต่การอบมะนาวที่ความจุ 100% ผลการทดลองพบว่า



ระยะเวลาห่างกันแค่ 3 นาทีเท่านั้น จากการทดลองดังกล่าวทั้งหมดสังเกตพบว่า ขนาดผล ปริมาณความหนาแน่นในการวาง ปริมาณความจุของผลมะนาวในตู้ มีผลกระทบต่อระยะเวลาในการให้ความร้อนของมะนาวพิจิตร 1 การอบมะนาวที่ความจุ 25 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาน้อยที่สุด ถ้าใช้ผลมะนาวขนาดใหญ่ขึ้นถึงแม้จะใช้ความจุ 75% แต่เวลาที่ใช้ในการอบยาวนานกว่าการอบผลมะนาวขนาดเล็กที่ความจุ 100%

การสูญเสียน้ำหนักของมะนาวพิจิตร 1 หลังจากผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 46°C เป็นเวลา 40 นาที เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ $12 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 7 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์ของการสูญเสียน้ำหนักของมะนาวผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำที่ความจุ 25 และ 100% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน การสูญเสียน้ำหนักโดยรวมน้อยมากเฉลี่ยไม่ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมะนาวหลังเก็บเกี่ยวจากสวนมาทดลองทันที พบว่าปริมาณการสูญเสียน้ำหนักจะน้อยมากสังเกตเห็นได้ชัดเจน แต่ในส่วนของมะนาวผ่านความร้อนที่ความจุ 50% กระบะมะนาวที่วางตำแหน่งตรงกลางมีการสูญเสียน้ำหนักมากกว่า และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน ซึ่งคาดว่าอาจจะเกิดจากการวางมะนาวบรรจุในกระบะอัดแน่นเกินไปทำให้มะนาวมีโอกาสในการสะสมความร้อนมากกว่าจุดอื่น สิ่งที่ตามมาคือทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหนักมากกว่า สำหรับที่ความจุมะนาว 75% พบว่ามะนาวผ่านความร้อนที่ความจุ 75% มีการสูญเสียน้ำหนักมากกว่าและมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน (Table 2) โดยปกติมะนาวก่อนผ่านความร้อนจะมีขี้ติติดมากับผล แต่เมื่อมะนาวผ่านความร้อนมาแล้วจะทำให้ขี้ติติดมีโอกาสหลุดออกง่ายขึ้น มะนาวบางผลนั้นขี้ติจะหลุดหายไป แต่บางผลยังมีขี้ติติดอยู่ ซึ่งมีผลทำให้น้ำหนักแตกต่างกันไป โดยทั่วไปมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนจะยังมีขี้ติติดที่ผลอยู่เป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะความแก่ และความสดของมะนาวแต่ละผล และระยะเวลาหลังการเก็บเกี่ยว

เปอร์เซ็นต์ปริมาณกรดของมะนาวที่ผ่านความร้อนทุกกรรมวิธี พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับมะนาวไม่ผ่านความร้อน (Control) อบมะนาวพิจิตร 1 ซึ่งอยู่ภายใต้สภาพห้องบรรจุผลไม้ที่มีปริมาณมะนาวน้ำหนักประมาณ 36, 72, 108 และ 144 กก./ลบ.ม.ตามลำดับ อบมะนาวพิจิตร 1 จำนวน 2 ซ้ำ เก็บไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 12°C . นาน 7 วัน พบว่ามะนาวที่ผ่านความร้อนส่วนใหญ่มีแนวโน้มความเป็นกรดลดลงมากกว่ามะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน ยกเว้นมะนาวผ่านความร้อนที่ความจุ 25% พื้นที่วางด้านซ้าย และมะนาวที่ความจุ 75% พื้นที่กระบะที่วางตรงกลาง เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดสูงกว่าไม่ผ่านความร้อน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ผลของความเป็นกรดแสดงให้เห็นดังนี้

1. ที่ปริมาณมะนาวที่ความจุตู้ 25% มีค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้เฉลี่ย = 2.30 2.08 2.04 และ control = 2.14 % ตามลำดับ
2. ที่ปริมาณมะนาวที่ความจุตู้ 50% มีค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้เฉลี่ย = 2.26 2.22 2.30 และ control = 2.44 % ตามลำดับ
3. ที่ปริมาณมะนาวที่ความจุตู้ 75% มีค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้เฉลี่ย = 1.55 1.86 1.54 และ control = 1.65 % ตามลำดับ



4. ที่ปริมาณมะนาวที่ความจุ 100% มีค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้เฉลี่ย = 1.66 1.08 1.52 และ control = 2.22 % ตามลำดับ

จากการการอบที่ความจุ 75% และ 100 % พบว่า เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดลดลงมากกว่าการอบมะนาวที่ความจุ 25 และ 50% ทั้งนี้อาจจะมาจากสาเหตุของการเก็บมะนาวก่อนนำมาผ่านความร้อนไว้นานเกิน 4 วัน ทำให้ปริมาณความเป็นกรดลดลงตามไปด้วย มะนาวผ่านความร้อนแต่เมื่อเปรียบเทียบกับแล้วไม่แตกต่างจากมะนาวทุกระบวนวิธี (Table 3) ซึ่งหมายความว่ามะนาวที่ผ่านการอบไอน้ำในระดับความจุเพิ่มขึ้นถึง 75 % ไม่ทำให้ปริมาณความเป็นกรดแตกต่างจากมะนาวไม่ผ่านความร้อน การเก็บมะนาวเป็นระยะเวลาหลายวันจนกระทั่งนำมาใช้สำหรับอบทดลอง 4. ที่ปริมาณมะนาวที่ความจุ 100% มีค่าปริมาณกรดที่ไทเทรตได้เฉลี่ย = 1.66 1.08 1.52 และ control = 2.22 % ตามลำดับ จากการการอบที่ความจุ 100% พบว่า เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดลดลงมากกว่าการอบมะนาวที่ความจุ 25 และ 50% สาเหตุเช่นเดียวกันกับที่ความจุ 75 % เมื่อเปรียบเทียบระหว่างมะนาวผ่านความร้อนที่ความจุ 25% 50% 75% และ 100% กับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน พบว่ามะนาวผ่านความร้อนมีแนวโน้มของค่าความเป็นกรดลดลงทั้งหมดแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นที่ความจุ 100% กระบะที่วางในตู้อบชั้นบนสุดตรงกลางซึ่งเป็นบริเวณที่ใกล้กับช่องทางปล่อยความร้อน มีค่าความเป็นกรดลดลงต่ำสุดและแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน

คุณภาพมะนาวหลังผ่านความร้อน เมื่อเก็บไว้ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 12°C นาน 7 วัน พบว่า มะนาวผ่านการอบไอน้ำที่ความจุ 25% มีแนวโน้มของการเปลี่ยนสีเปลือกเป็นสีเหลืองมากกว่ามะนาวไม่ผ่านความร้อน รสชาติ กลิ่น ไม่แตกต่างกัน (Figure 14 and 15) ส่วนที่ความจุ 50% พบว่า มะนาวผ่านการอบไอน้ำมีแนวโน้มของการเปลี่ยนสีเปลือกเป็นสีเหลืองมากกว่าเล็กน้อยกับมะนาวไม่ผ่านความร้อน รสชาติ กลิ่น ไม่แตกต่าง แต่พบความเสียหายที่เกิดจากผิวเปลือกเป็นสีน้ำตาล จำนวน 2 ผล ซึ่งอาจเกิดจากการผลกระแทกกับของแข็ง เมื่อเจอกับความร้อนทำให้ปรากฏความเสียหายชัดเจนขึ้น ที่ความจุมะนาว 75% พบว่า มะนาวผ่านการอบไอน้ำมีแนวโน้มของการเปลี่ยนสีเปลือกเป็นสีเหลืองมากกว่ามะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน รสชาติมีขมปนบ้าง กลิ่นหอมของผิวเปลือกลดลง พบความเสียหายที่เกิดจากผิวเปลือกเป็นสีน้ำตาลหลายจุดในบางผล ซึ่งอาจเกิดจากความร้อนทำให้ปรากฏความเสียหายชัดเจนขึ้น (Figure 16 and 17) และที่ความจุมะนาว 100% พบว่า มะนาวผ่านการอบไอน้ำมีแนวโน้มของการเปลี่ยนสีเปลือกเป็นสีเหลืองมากกว่ามะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน รสชาติมีขมปนบ้าง กลิ่นหอมของผิวเปลือกลดลง พบความเสียหายที่เกิดจากผิวเปลือกเป็นสีน้ำตาลหลายจุดในบางผล ซึ่งอาจเกิดจากความร้อนทำให้ปรากฏความเสียหายชัดเจนขึ้น (Figure 18 และ 19) ภาพทั้งหมดจากการทดลองดังกล่าว การบรรจุมะนาวที่ความจุ 50% จะมองเห็นได้ชัดเจนว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสีเปลือกน้อยที่สุด สีเปลือกยังคงเขียวปกติ ผิวเปลือกยังมีความสด ไม่มีรอยเหี่ยว สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะว่า มะนาวพันธุ์พิจิตร 1 ที่นำมาทดลองครั้งนี้ผ่านการเก็บรักษาก่อนการอบประมาณ 1 วัน



ซึ่งมีความแตกต่างกับมะนาวที่ความจุ 25% ซึ่งได้ผ่านการเก็บรักษาในห้องเย็นก่อนการอบประมาณ 3 วัน จึงทำให้สีเปลือกมีโอกาสเปลี่ยนเป็นสีเหลืองได้มากกว่า

การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่างของสี L* เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสว่างของผลไม้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสีเปลือกมะนาวหลังจากผ่านการอบไอน้ำที่ระดับปริมาณมะนาวที่ความจุต่างๆ มะนาวที่ถูกจัดวางในตู้ตำแหน่งด้านซ้าย และตรงกลาง พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าความสว่างของสี L ไม่แตกต่างไปจากมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน แต่มะนาวที่ผ่านการอบไอน้ำมีการพัฒนาของสีเปลือกค่อนข้างมาก ระดับปริมาณมะนาวที่ความจุ 50 และ 75% เมื่อเปรียบเทียบกับมะนาวที่ผ่านการอบไอน้ำกับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน พบว่า ค่าความสว่างโดยเฉพาะด้านขวาของตู้มีแนวโน้มสูงกว่าชัดเจนและต่างต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน แต่เมื่ออบไอน้ำมะนาวที่ความจุ 25 และ 100 % ทุกตำแหน่ง ตรงซ้าย กลาง และขวาของตู้ตามลำดับ พบว่าไม่แตกต่างทางสถิติกับมะนาวไม่ผ่านความร้อน

ในขณะที่อบไอน้ำที่ความจุเพิ่มมากขึ้นมะนาวมีแนวโน้มมีการพัฒนาความสว่างของสีเปลือกเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าความสว่างของสีเปลือก แต่ในครั้งนี้นักพบว่า สาเหตุอาจเกิดจากระยะการเก็บเกี่ยวมะนาว ถ้าเก็บผลแก่เกินไปจะทำให้การพัฒนาของสีเปลือกเร็วขึ้นตามไปด้วย และอาจเกี่ยวข้องกับคุณภาพของมะนาวด้วย และเมื่อเก็บรักษานานขึ้นค่าความสว่างของสีเปลือกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4)

การเปลี่ยนแปลงค่า a* เป็นค่าที่บ่งบอกถึงสีเขียวของผลไม้ หากค่า a* มีค่าน้อย หมายถึงสีเปลือกของมะนาวเป็นสีเขียวมาก แต่หากค่า a* มีค่ามากขึ้น หมายถึง สีเปลือกของมะนาวมีสีไปทางแดงสีแดง จากผลการทดลองพบว่า มะนาวมีการเปลี่ยนแปลงของค่า a* ไม่แน่นอน ทั้งนี้เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่า a* มีค่าแตกต่างกันโดยระดับความจุมะนาว 25, 50, 75 และ 100% มีค่าเฉลี่ย a* เท่ากับซ้าย ตรงกลาง ด้านขวา 1.81/ 2.52 /1.84, -4.11/ -4.19/ -3.76, 2.25/ 3.65 /3.11, 10.91/ -0.01/-2.4 และมะนาวไม่ผ่านความร้อน 2.41 -5.60 -2.05 และ -1.77 ตามลำดับ หมายความว่า มะนาวหลังอบไอน้ำเมื่อเก็บรักษานานขึ้นสีผิวเปลือกไม่ชัดเจน (Table 4) มะนาวหลังอบไอน้ำที่ระดับต่างๆ เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่า a* ไม่มีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่ความจุนาน 50 และ 100 % กับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน

แต่ a* จะเพิ่มขึ้นโดยมะนาวหลังจากการอบไอน้ำที่ความจุเพิ่มขึ้นนาน 75 % ในช่องความจุมะนาวด้านซ้าย และตรงกลางมีค่า a* สูงขึ้นหมายความว่า มะนาวหลังอบไอน้ำเมื่อเก็บรักษานานขึ้นสีผิวมีสีไปทางแดงสีแดงมากขึ้น และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับมะนาวไม่ผ่านความร้อน

ที่ปริมาณความจุ 25 และ 75% พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่า a* ค่อนข้างสูงสาเหตุอาจเกิดจากระยะการเก็บเกี่ยวมะนาว ถ้าเก็บผลแก่เกินไปจะทำให้การพัฒนาของสีเปลือกเร็วขึ้นตามไปด้วย และอาจเกี่ยวข้องกับคุณภาพของมะนาวด้วย และเมื่อเก็บรักษานานขึ้นค่าสีเปลือกของมะนาวมีสีไปทางแดงสีแดงของสีเปลือกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อีกปัจจัยที่มีผลเช่นนี้เพราะระยะเวลาการเก็บผลมะนาวนาน



เกิน 3 วันก่อนนำไปอบไอน้ำทำให้มะนาวมีความอ่อนแอต่อความร้อนมากขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีเปลือกเร็วขึ้นกว่า

การเปลี่ยนแปลงค่า b^* เป็นค่าที่บ่งบอกถึงสี จากสีน้ำเงินไปเป็นสีเหลือง มีค่าเพิ่มสูงขึ้น การเปลี่ยนสีของเปลือกผลมะนาวที่ได้รับความร้อนจะเป็นสีที่ค่อนข้างเหลืองมากกว่ามะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน และตำแหน่งการวางผลมะนาวที่ได้รับความร้อนมากที่สุด คือด้านบน จะมีสีเปลือกเป็นสีเหลืองมากกว่าด้านล่างจึงใช้ตำแหน่งนี้เป็นจุดทดสอบ จากผลการทดลองพบว่า มะนาวมีการเปลี่ยนแปลงของค่า b^* เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเพิ่มระดับปริมาณความจุมะนาวที่สูงขึ้นและอายุการเก็บรักษาลดลง โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่า b^* มีค่าแตกต่างกันโดยระดับความจุมะนาว 25, 50, 75 และ 100% มีค่าเฉลี่ย b^* เท่ากับ ด้านซ้าย/ ตรงกลาง/ ด้านขวา 45.39/ 48.20 /46.40, 38.31/ 39.26/ 40.56, 44.95/ 42.25 /47.53, 42.27/ 41.70/ 40.71 และมะนาวไม่ผ่านความร้อน 48.82/ 34.72/ 43.01 และ 39.37 ตามลำดับ เมื่ออบไอน้ำ (VHT) มะนาวพิจิตร1 ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที เก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 12 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน โดยปกติแล้วมะนาวหลังอบไอน้ำที่ความจุมะนาวที่สุด 100% จะมีปัญหาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงค่า b^* ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงสี จากสีน้ำเงินไปเป็นสีเหลือง จะเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุด แต่การอบครั้งนี้พบว่าไม่กระทบต่อค่า b^* และไม่แตกต่างทางสถิติกับมะนาวพิจิตร1 ที่ไม่ผ่านความร้อน การอบทั้ง 2 ครั้งมีผลไปแนวทิศทางเดียวกัน ปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อค่า b^* คือระยะเวลา หลังจากเก็บเกี่ยวมะนาวจะต้องนำมาดำเนินการตามขั้นตอนการอบให้เร็วที่สุด สีผลมะนาว มีความสด ค่า b^* ยังปกติ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความจุมะนาวที่ความจุมะนาว 100% กับ 50% ไม่แตกต่างกัน เพราะดำเนินการในระยะเวลาหลังการเก็บเกี่ยวใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่า b^* แล้ว เมื่ออบมะนาวพิจิตร 1 ที่ความจุมะนาว 50 และ 100 % ไม่มีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่กับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน ถึงแม้ว่าความจุมะนาวจะเต็มตู้ หรือครึ่งตู้

แต่เมื่อเก็บรักษามะนาวนานขึ้นประมาณ 2 ถึง 3 วันสีผิวเปลือกมีไปทางเฉดสีเหลืองมากขึ้น มะนาวหลังอบไอน้ำที่ระดับต่างๆ แต่จะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเก็บรักษานานขึ้น ค่า b^* จะเพิ่มขึ้นโดยมะนาวหลังจากการอบไอน้ำที่ความจุมะนาวเพิ่มขึ้นนาน 75 % ในช่องความจุมะนาวด้านขวา มีค่า b^* สูงขึ้นหมายความว่า มะนาวหลังอบไอน้ำเมื่อเก็บรักษานานขึ้นสีผิวเปลือกมีแนวโน้มสีไปทางเฉดสีเหลืองมากขึ้น และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับมะนาวไม่ผ่านความร้อน ยกเว้นที่ความจุมะนาว 25% ในช่องความจุมะนาวด้านซ้ายและขวา มีค่า b^* ลดลง มีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน นั้นหมายความว่านอกจากระยะเวลาการเก็บก่อนอบแล้ว ความแข็งแรงของมะนาวในบางผลไม่เท่ากัน ในขณะที่อยู่ในสภาพที่บรรจุกระเบบเหมือนกัน ความแข็งแรงของมะนาวแตกต่างกัน สาเหตุอาจเกิดจากระยะการเก็บเกี่ยวมะนาว ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว หรือถ้าเก็บผลแก่เกินไปจะทำให้การพัฒนาของสีเปลือกเร็วขึ้น ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับคุณภาพของมะนาวด้วย และเมื่อเก็บรักษานานขึ้นค่าสีเปลือกของมะนาวมีสีไปทางเฉดสีเหลืองของสีเปลือกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อีกปัจจัยที่มีผลเช่นนี้ เพราะระยะเวลาการเก็บผลมะนาวนานเกิน 2 ถึง 3 วันก่อนนำไปอบไอน้ำ ทำให้มะนาวมีความอ่อนแอต่อความร้อนมากขึ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีเปลือกเร็วขึ้นกว่า ทั้งนี้อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับ



คุณภาพความแข็งแรงของมะนาวด้วย และเชื่อมโยงไปถึงการดูแล เอาใจใส่การให้น้ำ ปุ๋ย และธาตุอาหารที่จำเป็นในระยะการเจริญเติบโตของผลมะนาว

ความเสียหายจากความร้อนที่ผิวเปลือก มีลักษณะเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้มขึ้น ถ้าอาการรุนแรงมากจนกระทั่งจุดสีน้ำตาลกลายเป็นสีดำ อาจพบบ้างแต่ไม่มากประมาณไม่เกิน 2 ผลที่อาการค่อนข้างรุนแรงเฉพาะที่พบดังปรากฏใน Figure 20 ที่ความจุ 50% และ Figure 21 ที่ ความจุ 75% เท่านั้นจากข้อสังเกตอาการนี้จะเกิดขึ้นได้เพราะว่า มะนาวได้รับความกระทบกระเทือนอย่างรุนแรง เช่น ตกจากที่สูงทำให้มะนาวบอบช้ำเมื่อโดนความร้อนจึงทำเกิดอาการของความเสียหายนี้ชัดเจนยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังพบความเสียหายจากอาการเป็นจุดเล็กๆ สีน้ำตาลสีไม่ชัดเจน ซึ่งอาการนี้อาจมีผลกระทบที่เกิดจากมะนาวได้รับความร้อนสูงทำให้เกิดการขยายตัวของต่อมน้ำมัน พบบนผิวเปลือกบางส่วนเพียงเล็กน้อย อาการไม่รุนแรงผู้บริโภคยอมรับได้ ไม่เป็นอุปสรรคต่อการรับประทานผลสด เพราะยังคงคุณภาพของความสดปกติของเปลือก รสชาติความเปรี้ยวปกติ ยกเว้นกลิ่นหอมของเปลือกลดลงมาก แต่เมื่อนำผลมะนาวอบไอน้ำไปปรุงอาหารไม่พบความผิดปกติ เปรียบเทียบความทนทานของแมลงวันผลไม้ระยะไข่ 24 ชั่วโมงในผลมะนาวพันธุ์แป้น กับพิจิตร1 ต่อความร้อนที่อุณหภูมิ และระยะเวลาต่างๆ ด้วยวิธีการอบไอน้ำ ผลการทดลองอบมะนาวกำจัดแมลงวันผลไม้ในแต่ละงานทดลองปรากฏผลดังนี้

Table 5 แสดงข้อมูลระยะเวลาที่ใช้ในการอบมะนาวให้อุณหภูมิผลคงอยู่ที่ 45 และ 46 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานานต่าง ๆ ตามกำหนดซึ่งมะนาวอยู่ภายใต้สภาพอากาศร้อนความชื้นสัมพัทธ์ 93 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออบมะนาวพันธุ์แป้น และพิจิตร1 กำจัดระยะไข่ 24 ชั่วโมง จากผลการทดลอง 6 ครั้ง ปรากฏว่า ใช้เวลานาน 1:27, 1:27, 1:30, 1:29, 1:29, 1:27, และ 1:39, 1:47, 1:47, 1:57, 1:55, 1:50 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงการให้ความร้อนเมื่ออบมะนาวในช่วงอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 45 ทั้ง 6 การทดลอง ใช้ระยะเวลาแตกต่าง 3 นาที (การทดลองที่ 1 2 6 กับ การทดลองที่ 3) จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการอบมะนาวกำจัดแมลงแต่ละครั้งด้วยวิธีการอบไอน้ำมีสภาพที่แตกต่างกันค่อนข้างน้อย แต่เมื่อความร้อนเพิ่มขึ้นถึง 46 องศาเซลเซียส ทั้ง 6 การทดลอง พบว่าใช้ระยะเวลาแตกต่าง 18 นาที จากข้อมูลดังกล่าวกันมากส่งผลให้ความร้อนข้างต้น แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 45 ถึง 46 องศาเซลเซียส ของการอบมะนาวกำจัดแมลงแต่ละครั้งด้วยวิธีการอบไอน้ำมีสภาพที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก (การทดลองที่ 1 กับ 4) ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าได้มีการกำหนดอุณหภูมิอยู่ที่ 47 องศาเซลเซียส ซึ่งความร้อนที่กำหนดในผลคืออุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นช่วงความร้อนที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นความร้อนค่อยๆ เพิ่มขึ้นภายในผลจะเริ่มช้าลงแตกต่างกันไป การสะสมความร้อนภายในผลมะนาวก็มีค่อนข้างน้อยเนื่องจากผลมะนาวมีขนาดเล็ก ลักษณะตำแหน่งการวางผลมะนาวบนกระบะภายในตู้อบก็มีผลกระทบต่อการเพิ่มขึ้นของความร้อนเช่นกัน

Table 6 แสดงระยะเวลาอบมะนาวให้อุณหภูมิผลคงอยู่ที่ 46 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานานตามกำหนด รวมทั้งรายละเอียดอื่น ๆ ในการอบมะนาวแต่ละครั้ง เมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาการให้ความร้อนเมื่ออบมะนาวในช่วงอุณหภูมิผล 45 ถึง 46 องศาเซลเซียสทั้ง 6 การทดลอง ใช้ระยะเวลา



แตกต่างกัน 12, 20, 17, 28, 26 และ 23 นาที ตามลำดับ จากผลการทดลอง พบว่า แผลงวันผลไม้ ระยะไขในผลมะนาวพันธุ์แป้น ดูจะมีความทนทานต่อความร้อนมากกว่า ในผลมะนาวพันธุ์พิจิตร1 จึงทำการอบมะนาวกำจัดแมลงระยะไข 24 ชั่วโมงอยู่ในผลมะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์พิจิตร1 พร้อมกัน ในเครื่องตู้อบความร้อนเดียวกัน ซึ่งทำให้ทั้งระยะไขในผลมะนาวพันธุ์แป้น และมะนาวพันธุ์พิจิตร1 อยู่ภายใต้สภาพความร้อนที่เหมือนกัน

ผลการตรวจนับแมลงในมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนพบว่า แผลงระยะไข 24 ชั่วโมง ในผลมะนาวพันธุ์แป้นที่ไม่ผ่านความร้อน มีอัตราการตาย 69.91 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการทดลองอบมะนาวพันธุ์แป้นที่อุณหภูมิ 45 และ 46 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 0:10, 0:20, 0:30 และ 0:40 ชั่วโมง พบว่าไขมีอัตราการตายเฉลี่ย 71.21, 74.97, 83.81, 96.08, 98.83 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่พันธุ์พิจิตร 1 แผลงในมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนมีอัตราการตาย 53.11 เปอร์เซ็นต์ และมะนาวผ่านความร้อน มีอัตราการตาย 56.61, 64.72, 76.19, 95.50, 99.56 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อัตราการตายของแมลงที่ไม่ผ่านความร้อนทั้ง 2 พันธุ์ พบว่ามะนาวพันธุ์แป้น มีอัตราการตายสูงกว่า พันธุ์พิจิตร 1 ในช่วงอุณหภูมิ 45 และ 46 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 10, 20 นาที ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากมะนาวแป้นมีสภาพเปลือกบางและให้ปริมาณน้ำมากกว่า จึงทำให้แมลงมีโอกาสจมน้ำตายมากกว่า ในส่วนของมะนาวพันธุ์พิจิตร 1 เปลือกมีสภาพหนากว่า และให้ปริมาณน้ำน้อยกว่า ขณะที่ใส่แมลงเข้าไปในเนื้อมะนาวตรงกลางผลจะมีลักษณะค่อนข้างแห้งกว่าจึงทำให้อัตราการรอดชีวิตในมะนาวพันธุ์พิจิตร 1 สูงกว่าพันธุ์แป้น แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที พบว่า แผลงระยะไข 24 ชั่วโมงในผลพันธุ์พิจิตร1 มีอัตราการตายสูงกว่ามะนาวแป้น ความร้อนมีผลกระทบต่ออัตราการตายของแมลงในมะนาวพันธุ์พิจิตร 1 อย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตายเฉลี่ยของแมลงระยะไข 24 ชั่วโมง ทั้งมะนาวพันธุ์แป้น และ พันธุ์พิจิตร 1 พบว่าแมลงตายทั้งหมดเมื่ออุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที

อัตราการตายที่แท้จริงของแมลงระยะไขในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน Table 7 จากผลการทดลองพบว่าแมลงระยะไข 24 ชั่วโมง ในผลมะนาวพันธุ์แป้นไม่ผ่านความร้อน มีอัตราการตายที่แท้จริง 0 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำการทดลองอบมะนาวพันธุ์แป้นที่อุณหภูมิ 45 และ 46 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 0:10, 0:20, 0:30 และ 0:40 พบว่าไขมีอัตราการตายที่แท้จริง 4.45, 16.82, 46.18, 86.98, 96.12 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่พันธุ์พิจิตร 1 แผลงในมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนมีอัตราการตายที่แท้จริง 0 เปอร์เซ็นต์ และผ่านความร้อน มีอัตราการตายที่แท้จริง 7.46, 24.76, 49.23, 90.40, 99.05 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการทดลองดังกล่าวแมลงระยะไข 24 ชั่วโมง ในผลมะนาวพันธุ์แป้น มีอัตราการตายที่แท้จริงน้อยกว่าในผลมะนาวพันธุ์พิจิตร1 ของทุกความร้อนและระยะเวลาต่างๆ แสดงให้เห็นชัดเจนว่าแมลงระยะไข 24 ชั่วโมง ในผลมะนาวพันธุ์พิจิตร1 มีความทนทานต่อความร้อนน้อยกว่า โดยเฉพาะเมื่อใช้ความร้อนที่อุณหภูมิคงที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียสนาน 0:30 ชั่วโมง แผลงในผลมะนาวพันธุ์พิจิตร1 มีอัตราการตายที่แท้จริง 99.06 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มอัตราการตายที่แท้จริงสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแมลงใน



ผลมะนาวพันธุ์แป้นซึ่งมีอัตราการตายที่แท้จริง 96.12 เปอร์เซ็นต์แมลงในผลมะนาวพันธุ์พิจิตร1 เป็นพันธุ์มะนาวที่มีความอ่อนแอต่อความร้อนมากกว่า แมลงในผลมะนาวพันธุ์แป้น 2.94 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความร้อนที่อุณหภูมิคงที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียสได้รับความร้อนเป็นระยะเวลา 0:40 ชั่วโมง แมลงในผลมะนาวพันธุ์พิจิตร1 และพันธุ์แป้นมีอัตราการตายที่แท้จริง ทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองพบว่าระยะไข่ของแมลงวันผลไม้ในผลมะนาวพันธุ์แป้นมีความทนทานต่อความร้อนมากกว่า พันธุ์พิจิตร1 ในช่วงที่ผ่านความร้อนก่อนระยะเวลา 0:40 ชั่วโมง

Merino *et al* (1985) รายงานว่า หนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันทองทนทานต่อความร้อนมากกว่าระยะไข่ และหนอนวัยที่อื่น ๆ ของแมลงวันทองและแมลงวันแดงในผลมะม่วงพันธุ์ Carabao อุดร และคณะ (2529) ศึกษาการใช้วิธีอบน้ำร้อนเพื่อกำจัดแมลงวันทองและแมลงวันแดง ในผลมะม่วงพันธุ์หนึ่งกลางวัน และรายงานผลในการทำงานเดียวกันว่า ระหว่างระยะไข่และหนอนวัยต่าง ๆ ของแมลงวันทองและแมลงวันแดงในผลมะม่วง หนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันทองมีความทนทานต่อความร้อนมากที่สุด แต่อย่างไรก็ดี ความทนทานต่อความร้อนของหนอนวัยที่ 1 เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้เมื่ออยู่ในมะม่วงต่างพันธุ์ โดยหนอนวัยที่ 1 เมื่ออยู่ในมะม่วงพันธุ์พิมพ์เสนแดง จะทนทานต่อความร้อนได้ดีกว่าเมื่ออยู่ในมะม่วงพันธุ์หนึ่งกลางวัน น้ำดอกไม้ และแรด (อุดร และคณะ, 2536)

ในการเตรียมมะนาวโดยวิธีใส่ไข่เข้าไปในผล ถึงแม้ว่าจะใส่ไข่เข้าไปลึกในเนื้อมะนาว เนื่องจากมะนาวไม่ใช่พืชอาศัยที่ดีของแมลงวันผลไม้ เพราะมีสภาพเป็นกรดสูง การซึบน้ำภายในผลอาจจะกระทำที่ไม่พอดีพอเหมาะอาจมีน้ำมะนาวท่วมขังในบางผล หรือเนื้อมะนาวบริเวณดังกล่าวอาจจะมีสภาพไม่เหมาะสม เนื่องจากตรงแกนกลางผลจะมีชอกที่ติดกับเมล็ดบังความร้อน หรืออาจมีพื้นที่บางจุดในผลทำให้อาจถูกวางหรือเชี่ยให้หลบซ่อนตัวระหว่างแกนกลางกับเมล็ด ถึงแม้ว่าจะผ่าเอาแกนกลางบางส่วนออกแล้ว เมื่อไข่ฟักเป็นตัวหนอนสามารถคลานเข้าไปกินเนื้อมะนาวได้ทุกด้าน ซึ่งโดยปกติหนอนจะคลานลึกเข้าไปในผล แต่บางตัวอาจจะคลานมากินในส่วนเปลือกสีขาวที่ติดกับเนื้อมะนาวด้านใน ดังนั้นอัตราการรอดชีวิตของแมลงจึงไม่สม่ำเสมอ

แมลงทนทานต่อความร้อนได้มากหรือน้อยมีปัจจัยสำคัญคือ ชนิดพันธุ์ของผลไม้ ลักษณะทางกายภาพภายในและภายนอก ความหนาบางของเปลือก ความสุกแก่ รสชาติ กลิ่น เนื้อของผลไม้ แต่ละผลไม้เท่ากัน และตำแหน่งที่แมลงทำลาย หรือหลบซ่อนอยู่ภายในผลไม้ ในการเตรียมมะนาวมีแมลงอยู่ภายในผล ได้ใช้วิธีนำแมลงระยะไข่ ใส่ลงบนเนื้อมะนาวโดยตรงเนื่องจากเนื้อมะนาวบริเวณที่ยังลึกเข้าไปในผลยิ่งจะได้รับความร้อนน้อยกว่า ดังนั้นในการย้ายแมลงใส่ในผลมะนาวจึงพยายามใส่แมลงให้ลึกเข้าไปในเนื้อมะนาวซึ่งจะทำให้แมลงได้รับความร้อนในระดับที่ใกล้เคียงกันมากที่สุดเท่าที่จะทำได้

Jang (1986) เปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระยะตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ 3 ชนิด ได้แก่ *C. capitata*, *B. dorsalis* และ *B. cucurbitae* โดยวิธีจุ่มในน้ำร้อนปรากฏว่า หนอนวัยที่ 1 ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด ขณะที่ Armstrong และคณะ (1989) ศึกษาการกำจัดแมลงวันผลไม้ 3



ชนิด ดังกล่าวข้างต้นในมะละกอโดยใช้วิธี High-temperature, forced-air treatment กลับปรากฏว่า ระยะไข่ ของแมลงวันผลไม้ทั้ง 3 ชนิด ทนทานต่อความร้อนมากกว่า หนอนวัยที่ 1 และหนอนวัยที่ 3 Unahawutti และคณะ (1986) ศึกษาเปรียบเทียบความทนทานต่อความระหว่างระยะไข่และหนอนวัยต่าง ๆ ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* โดยวิธีจุ่มในน้ำร้อนพบว่าหนอนวัยที่ 1 ทนทานต่อความร้อนมากกว่าไข่ เมื่อทำการศึกษาในมะม่วง โดยให้ความร้อนด้วยกรรมวิธีอบไอน้ำ จะปรากฏผลในทำนองเดียวกัน หนอนวัยที่ 1 ทนทานต่อความร้อนมากกว่าระยะไข่ (Unahawutti *et al.*, 1986) สลักจิต และคณะ (2549) การศึกษาความทนทานของแมลงวันผลไม้ ระยะไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ในผลเงาะต่อความร้อนด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ โดยเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแมลงเมื่อคงอุณหภูมิผลไว้ที่ 45^oซ. และ 46^oซ. เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กัน ผลการทดลองพบว่าหนอนวัยที่ 1 ในผลเงาะมีความทนทานต่อความร้อนได้มากกว่า ระยะไข่ หนอนวัยที่ 2 และ 3

การวิจัยพัฒนาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมังคุด กลับพบว่าระหว่างไข่ และหนอนวัยต่าง ๆ ในผลมังคุด ระยะการเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนกรรมวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์มากที่สุดคือ ระยะไข่ (อายุ 24 ชั่วโมง) (Unahawutti *et al.*, 1999) และในการศึกษาโดยวิธีการอบมังคุดกำจัดแมลงแต่ละระยะการเจริญเติบโตให้ผลสอดคล้องเช่นเดียวกันกับผลการทดลองผลมะนาว พบว่าระยะไข่ (อายุ 24 ชั่วโมง) มีความทนทานต่อความร้อนมากกว่าหนอนวัยที่ 1 2 และ 3 สาเหตุที่ระยะไข่ หนอนวัยที่ 1 ในผลมะนาวมีความทนทานต่อความร้อนสูงกว่า หนอนวัยที่ 2 และ 3 (สลักจิต และคณะ 2558)

การประเมินประสิทธิภาพการกำจัดแมลง

Figure 22 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในผลมะนาว อุณหภูมิอากาศและความชื้นสัมพัทธ์ ระหว่างการอบมะนาวด้วยวิธีการอบไอน้ำ Table 8 แสดงเวลาในการอบมะนาวให้อุณหภูมิคงอยู่ที่ 46 ° ซ. รวมทั้งรายละเอียดอื่นๆ ได้แก่ปริมาณความจุ การตั้งค่ารูปแบบการเดินเครื่องเป็นแบบเป็นขั้น (STEPPED VHT) แสดงน้ำหนักมะนาวกำหนดอุณหภูมิ ในการทดลองอบมะนาวซึ่งมีแมลงวันทองระยะไข่อยู่ภายในผลแต่ละครั้งนั้น แบ่งการทดลอง 2 ระดับความจุ คือที่ระดับความจุครึ่งหนึ่ง 50 % (Haft load) และบรรจุเต็มตู้ 100 % (Full load) สำหรับการทดลองที่ระดับความจุครึ่งหนึ่งนั้นอยู่ในลำดับซ้ำที่ 1-10 มีการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ โดยใช้ระยะเวลาการอบสั้นที่สุด และนานที่สุดอยู่ในการทดลองซ้ำที่ 8 และ 6 ใช้เวลานาน 2:07 และ 2:11 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งใช้เวลาในการทดลองแตกต่างกันแค่ 5 นาที ถือว่าเล็กน้อยมาก

สำหรับการทดลองที่ระดับความจุสูงสุด 100 % นั้น หลังจากได้ผ่านขั้นตอนการอบไอน้ำแล้ว ได้แบ่งการทดลองขั้นตอนการลดความร้อนเป็น 2 กรรมวิธี คือ

1. การใช้ลมเป่าอย่างเดียว ระยะเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในการทดลองลำดับซ้ำที่ 1-10 มีการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ โดยใช้ระยะเวลาการอบสั้นที่สุด และนานที่สุดอยู่ในการทดลองซ้ำที่ 2 ใช้เวลานาน 2:08 และ 2:11 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งใช้เวลาในการทดลอง แตกต่างกันน้อยมาก โดยใช้เวลานานแค่ 3 นาที



2. การใช้น้ำในช่วงแรก 10 นาที จากนั้นใช้ลมเป่าต่อ 50 นาทีรวมระยะเวลาานาน 1 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในการทดลองลำดับซ้ำที่ 1-10 มีการทดลองทั้งหมด 10 ซ้ำ โดยใช้ระยะเวลาการอบสั้นที่สุดและนานที่สุดอยู่ในการทดลองซ้ำที่ 2 ใช้เวลานาน 2:06 และ 2:10 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งใช้เวลาในการทดลอง แตกต่างกันน้อยมาก โดยใช้เวลานานแค่ 4 นาที

สลักจิต และคณะ (2556) ที่อุณหภูมิผล 46 องศาเซลเซียส นาน 30, 35 และ 40 นาที แผลงวันทองระยะไข่ มีอัตราการตายที่แท้จริง 94.14, 99.87 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ หนอนวัยที่ 1 มีอัตราการตายที่แท้จริง 99.92, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทุกอุณหภูมิ กำหนดหนอนวัยที่ 1 มีอัตราการตายเฉลี่ยสูงกว่าระยะไข่ ดังนั้นระยะไข่จึงมีความทนทานต่อความร้อนมากกว่าหนอนวัยที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาของ จากผลการศึกษานี้ สามารถยืนยันได้ว่าระหว่างระยะไข่และหนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันทองที่อาจจะพบทำลายในผลมะนาว ระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง มีความทนทานต่อความร้อนกรรวิธีอบไอน้ำมากที่สุด

การทดลองการอบไอน้ำการยืนยันประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำเป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้าน กักกันพืชสำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลมะนาว เป็นการอบมะนาวซึ่งมีแมลงวันทองระยะไข่อยู่ ภายในผลแต่ละครั้งนั้น แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ระดับความจุ คือ ระดับความจุน้อยสุด 50 % (half load) และความจุมากที่สุด 100 % (Full load)

Table 9. การทดลองที่ระดับความจุครั้งหนึ่งนั้น การทดลองมีจำนวนทั้งหมด 10 ซ้ำ โดยใช้ มะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนจากวิธีใส่ไข่เข้าในผล และวิธีให้แมลงวางไข่บนผลมะนาว จำนวน 500 และ 100 ผลตามลำดับ ผลจากการตรวจนับจำนวนแมลง พบว่าจำนวนแมลงรอดชีวิตทั้งหมดของมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 12,658 ตัว แต่สำหรับมะนาวจากวิธีใส่ไข่ในผล และวิธีให้แมลงวางไข่บนผล มะนาว นำมะนาวดังกล่าวผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำ โดยใส่มะนาวเข้าอบไปภายในตู้จำนวน 1500 และ 300 ผลตามลำดับ ลดความร้อนโดยวิธีเป่าลม พบว่าจำนวนแมลงวันทองมีอัตราการตายที่แท้จริงทั้งหมดจำนวน 37,974 ตัว

Table 10. การลดความร้อนโดยวิธีเป่าลม เป็นการทดลองอบไอน้ำที่ระดับความจุเต็มตู้ 100 % นั้น การทดลองมีจำนวนทั้งหมด 10 ซ้ำ โดยใช้มะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนจากวิธีใส่ไข่เข้าในผล และวิธีให้แมลงวางไข่บนผลมะนาว จำนวน 500 และ 100 ผลตามลำดับ ผลจากการตรวจนับจำนวนแมลง พบว่าจำนวนแมลงรอดชีวิตทั้งหมดของมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 12,922 ตัว แต่สำหรับมะนาวจากวิธีใส่ไข่ในผล และวิธีให้แมลงวางไข่บนผลมะนาว นำมะนาวดังกล่าวผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำ โดยใส่มะนาวเข้าอบไปภายในตู้จำนวน 3,300 และ 300 ผลตามลำดับ ลดความร้อนโดยวิธีเป่าลม พบว่าจำนวนแมลงวันทองมีอัตราการตายที่แท้จริงทั้งหมดจำนวน 58,655 ตัว

Table 11. การลดความร้อนโดยวิธีพ่นน้ำ 10 นาที เป่าลมให้แห้งอีก 50 นาที เป็นการทดลองที่ระดับความจุเต็มตู้ 100 % นั้น การทดลองมีจำนวนทั้งหมด 10 ซ้ำ โดยใช้มะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนจากวิธีใส่ไข่เข้าในผล และวิธีให้แมลงวางไข่บนผลมะนาว จำนวน 500 และ 100 ผลตามลำดับ ผลจากการตรวจนับจำนวนแมลง พบว่าจำนวนแมลงรอดชีวิตทั้งหมดของมะนาวที่ไม่ผ่าน



ความร้อนจำนวน 12,103 ตัว แต่สำหรับมะนาวจากวิธีใส่ไข่ในผล และวิธีให้แมลงวางไข่บนผลมะนาว นำมะนาวดังกล่าวผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำ โดยใส่มะนาวเข้าอบไปภายในตู้จำนวน 3,300 และ 300 ผลตามลำดับ ลดความร้อนโดยวิธีพ่นน้ำ 10 นาที เป่าลมให้แห้งอีก 50 นาที พบว่าจำนวนแมลงวันทองมีอัตราการตายที่แท้จริงทั้งหมดจำนวน 65,825 ตัว

ผลการตรวจ นับจำนวนแมลงในมะนาวจากการทดลอง 30 ครั้งโดยใช้มะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนจากวิธีใส่ไข่ในผล และวิธีให้แมลงวางไข่บนผลมะนาว จำนวนรวม 1,800 ผล จากการตรวจนับจำนวนแมลง พบว่าจำนวนแมลงรอดชีวิตทั้งหมดของมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน โดยจะมีไข่ซึ่งสามารถฟักออกเป็นตัวหนอนได้จำนวนไม่น้อยกว่าประมาณ 37,683 ฟอง แต่สำหรับมะนาวจากวิธีใส่ไข่ในผล และวิธีให้แมลงวางไข่บนผลมะนาว นำมะนาวดังกล่าวผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำ โดยใส่มะนาวเข้าอบไปภายในตู้จำนวน 9,000 ผล การลดความร้อนผลมะนาวใช้ 2 วิธี คือ 1. โดยวิธีเป่าลม และ 2. โดยวิธีพ่นน้ำ 10 นาที เป่าลมให้แห้งอีก 50 นาที พบว่าแมลงวันทองมีอัตราการตายที่แท้จริงรวมทั้งหมดจำนวน 162,454 ตัว แสดงว่าที่ระยะเวลา 40 นาที น่าจะเป็นช่วงระยะเวลาสั้นที่สุดที่อุณหภูมิผล 46 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถกำจัดไข่แมลงวันทองได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ซึ่งมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงได้ตามมาตรฐานกำหนดและยอมรับเป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช จะขจัดปัญหาด้านกักกันพืชซึ่งเป็นอุปสรรคกีดขวาง การส่งออกผลไม้พืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ไปยังประเทศที่ไม่มีแมลงวันผลไม้แพร่ระบาด โดยทั่วไปวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชต้องมีประสิทธิภาพการกำจัดแมลงสูงมาก ให้ความมั่นใจได้ว่าจะไม่มีแมลงรอดชีวิตเล็ดลอดติดไปกับผลไม้ ไปเจริญแพร่พันธุ์อย่างถาวรในประเทศปลายทาง หน่วยงานกักกันพืชของประเทศญี่ปุ่นกำหนดหลักเกณฑ์สำหรับพิจารณาวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช คือ ต้องมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ ระยะเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุดจำนวนไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว ได้ทั้งหมด ขณะที่หน่วยงานกักกันพืชของประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดหลักเกณฑ์ต้องมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงต่ำสุดที่ระดับ 99.9968 เปอร์เซ็นต์ (probit 9) นั่นคือ ให้มีแมลงรอดชีวิตได้ไม่เกินจำนวน 3 ตัว จากจำนวนแมลงที่ผ่านวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชทั้งหมด จำนวน 100,000 ตัว (Baker, 1939) จากข้อมูลผลการวิจัยที่ผ่านมาและผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า กระบวนการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานตั้งแต่ 40 นาที มีประสิทธิภาพกำจัดแมลงได้ถึงระดับของวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช ตามกำหนดหลักเกณฑ์ประเทศญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกา

การประเมินความเสียหายต่อคุณภาพผลมะนาว

Table 23 แสดงเวลาในการอบมะนาว ให้อุณหภูมิคงอยู่ที่ 46 ° ซ. นาน 40 นาทีรวมทั้งรายละเอียดอื่นๆ ได้แก่ปริมาณความจุ การตั้งค่ารูปแบบการเดินเครื่องเป็นแบบเป็นขั้น (STEPPED VHT) แสดงน้ำหนักมะนาวกำหนดอุณหภูมิ ในการทดลองอบมะนาว ระดับความจุ คือที่ระดับความจุเต็มตู้ 100 % (Full load) มีการทดลองทั้งหมด 30 ครั้ง โดยใช้ระยะเวลาการอบสั้นที่สุด และนานที่สุดเวลา 2:06 และ 2:12 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งใช้เวลาในการทดลองใช้เวลาใกล้เคียงกันมาก ซึ่งแตกต่าง



กันนานแค่ 6 นาที การเปลี่ยนแปลงความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิอากาศ และอุณหภูมิผลมะนาว ในขณะที่อบมะนาวด้วยวิธีการอบไอน้ำให้อุณหภูมิผลเพิ่มขึ้นถึง 46°C . ในสภาพห้องบรรจุผลไม่มีปริมาณมะนาว ประมาณ 132 กก./ลบม. ใช้วิธีการลดอุณหภูมิด้วยลมเป่าอย่างเดียว แสดงระยะเวลาที่ใช้ในการอบมะนาว ให้อุณหภูมิผลเพิ่มขึ้นถึง 46°C . ต้องใช้เวลานานเฉลี่ย 2:12, 2:12, 2:14, และ 2:14 ชั่วโมงตามลำดับ เวลาที่ใช้สำหรับการอบไอน้ำมะนาวเพื่อประเมินความเสียหายต่อคุณภาพผลมะนาวพันธุ์พิจิตร1 ซึ่งเป็นการศึกษาความเสียหายของมะนาวในสภาพจำลองการส่งออกมะนาวทางเครื่องบิน 2 ซ้ำ และทางเรือ 2 ซ้ำ ตามลำดับ

จากการตรวจสอบความเสียหายของมะนาวพันธุ์พิจิตร1 พบว่ามะนาวที่ผ่านความร้อนจากมะนาวกำหนดอุณหภูมิอยู่ที่กึ่งกลางผล 46°C . คงที่เป็นเวลานาน 40 นาที และการเก็บรักษาที่ $12 \pm 2^{\circ}\text{C}$ นาน 7 และ 14 วัน นั้น ซึ่งเป็นการศึกษาความเสียหายของมะนาวในสภาพจำลองการส่งออกมะนาวทางเครื่องบิน ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ โดยทำการตรวจสอบลักษณะอาการที่ปรากฏ ได้แก่ ผิวเปลือกเป็นสีน้ำตาล fresh browning กลิ่นความหอมของต่อมน้ำมันที่ผิวเปลือก รสชาติ อาการปรากฏของโรคพืช ความเสียหายอื่นๆ การตรวจสอบความเป็นกรด เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนัก และลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสีผิวเปลือก

ผลจากการตรวจพบลักษณะอาการความเสียหายที่ผิวเปลือกของมะนาวเป็นจุดสีเขียวเข้มสีน้ำตาล และสีดำ พบอาการดังกล่าวเล็กน้อยในบางผล ซึ่งไม่สามารถระบุเป็นจำนวนได้ อาการนี้เกิดขึ้นได้ทั้งผลมะนาวไม่ผ่านความร้อน จำนวน และมะนาวที่ผ่านความร้อนที่เก็บไว้นาน 14 วันเท่านั้น จากการสังเกตอาการที่เกิดขึ้น สาเหตุของมะนาวเป็นจุดน่าจะมาจากการเก็บเกี่ยวมะนาว ลักษณะทั่วไปของกิ่งก้านมะนาวพันธุ์พิจิตร 1 คือกิ่งก้านจะแข็งมาก นอกจากนี้ยังมีหนามแหลมคมจำนวนมากตรงบริเวณตลอดทั้งกิ่งก้านและซั้วผล เมื่อเก็บเกี่ยวมะนาวแล้วเสร็จนำไปเก็บในตะกร้าหรือกล่องรวมกันทำให้เกิดบาดแผลได้ง่ายถ้าไม่แยกผลออกจากกันชัดเจน หรือขาดความระมัดระวัง ถ้ามะนาวผลไหนมีความสมบูรณ์พอที่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคหรือไม่เป็นอะไร แต่ถ้าผลที่ค่อนข้างอ่อนแอ เมื่อเจอความร้อนและเก็บไว้เป็นระยะเวลานานจะปรากฏอาการนี้ได้ชัดเจน ฉะนั้นการรักษาคุณภาพของมะนาวพันธุ์พิจิตร1 ต้องระมัดระวังเรื่องกิ่งก้านและหนามแหลมคม โดยใช้กรรไกรตัดให้ชัดซั้วผล นอกจากนี้ยังไม่พบอาการเกิดโรคของมะนาวที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน สำหรับการทดสอบรสชาติจากการชิม พบว่ามะนาวที่ผ่านความร้อนบางผลเท่านั้นมีรสชาติที่เปลี่ยนจากปกติคือรสเปรี้ยวปนขมเล็กน้อย ซึ่งไม่สามารถแยกรสชาตินี้ออกได้ชัดเจนเช่นกัน

กลิ่นความหอมของเปลือกมะนาวมีความแตกต่างกันมากในแต่ละผล พบว่ามะนาวที่ผ่านความร้อนส่วนใหญ่กลิ่นความหอมของเปลือกมีแนวโน้มลดลง ไม่สามารถบ่งบอกจำนวนผลได้ชัดเจนถึงระดับของกลิ่นหอม สาเหตุความหอมลดลงอาจจะเป็นเพราะว่าความร้อน และในขณะที่ทำการตรวจสอบเริ่มแรกของการผ่าผลมะนาวกลิ่นหอมยังมีบ้างอ่อนๆ แต่หลังจากผ่าผลเสร็จทั้งหมดแล้ว ทำการพิสูจน์ความหอมด้วยการดมกลิ่น ปรากฏว่ามีกลิ่นหอมเหลือเพียงเบาๆ จนกระทั่งไม่มีความหอมของกลิ่นมะนาวเหลืออยู่



สลักจิต และคณะ (2560) ได้ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยวิธีการลดอุณหภูมิมะนาวโดยวิธีฉีดพ่นด้วยน้ำ ต่อความเสียหายของมะนาวซึ่งผ่านวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนกรรมวิธีอบไอน้ำปรับสภาพผล การทดลองพบว่า การลดอุณหภูมิผลมะนาวโดยวิธีฉีดพ่นด้วยน้ำไม่แตกต่างจากวิธีเป่าด้วยลม วิธีฉีดพ่นด้วยน้ำถึงแม้ว่าทำให้อุณหภูมิผลมะนาวต่ำลงได้เร็วกว่าวิธีเป่าด้วยลม แต่อย่างไรก็ดี ไม่ว่าจะลดอุณหภูมิผลมะนาวด้วยวิธีการใดหลังสิ้นสุดกระบวนการให้ความร้อน จำนวนมะนาวเสียหายไม่มีความรุนแรง อาการโดยรวมทั้งหมดของมะนาวหลังจากผ่านการอบไอน้ำ จากผิวเปลือกเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (color change on lime rind from green color to yellow) การเปลี่ยนรสชาติเปรี้ยวปนขม (Flour change from sour to bitter) กลิ่นหอมที่ผิวเปลือกลดลง อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน

การสูญเสียน้ำหนักของมะนาว (%) หลังจากผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำ ระดับความร้อนที่อุณหภูมิ 46°C เป็นเวลานาน 0:40 ชั่วโมง และเก็บมะนาวในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 12 ± 2 °C นาน 7 วันนั้น พบว่าเปอร์เซ็นต์ของการสูญเสียน้ำหนักของมะนาวที่ผ่านความร้อนลดลงอย่างชัดเจน และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับมะนาวไม่ผ่านความร้อน เมื่อมะนาวผ่านความร้อนทำให้ข้อผิดพลาดออกง่ายยิ่งขึ้นจึงส่งผลทำให้ค่าการสูญเสียน้ำหนักของมะนาวไม่สม่ำเสมอและไม่แน่นอน ในส่วนของมะนาวผ่านความร้อนที่วางในตำแหน่งด้านซ้าย ของการทดลองที่ 2 พบว่ามะนาวที่วางในทุกตำแหน่งของตู้อบไอน้ำ ซ้าย กลาง ขวา การสูญเสียน้ำหนักค่อนข้างมีปริมาณสูงมากกว่าเมื่อเทียบกับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน สังเกตเห็นได้ชัดเจน บางตำแหน่งค่าการสูญเสียน้ำหนักอาจจะแตกต่างกันบ้าง ซึ่งคาดว่าอาจจะเกิดจากการวางมะนาวบรรจุในกระบะค่อนข้างหลวมเกินไปทำให้มะนาวจึงมีโอกาสกระจายความร้อนได้เร็วกว่า ตำแหน่งที่วางแน่นมากกว่าจุดอื่น สิ่งที่ตามมาคือทำให้เกิดการสูญเสียน้ำหนักมากกว่า รวมไปถึงขนาดผลของมะนาวที่ใช้เดิม เช่นผลขนาดเล็ก หรือผลขนาดใหญ่การสะสมความร้อนภายในผลก็มีโอกาสแตกต่างกัน แต่ในส่วนของการทดลองการจำลองขนส่งทางเรือเก็บมะนาวไว้นาน 14 วันนั้น เป็นการอบมะนาวมีแนวทางปฏิบัติเช่นเดียวกันกับมะนาวที่เก็บไว้ส่งออกทางเครื่องบิน ซึ่งพบว่าการสูญเสียน้ำหนักค่อนข้างสูงกว่าการส่งออกทางเครื่องบิน การสูญเสียน้ำหนักเป็นไปในทางเดียวกันทั้ง 2 การทดลอง และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับมะนาวไม่ผ่านความร้อน (Table 13) โดยปกติมะนาวจะมีข้อผลติดกับผลค่อนข้างแน่นก่อนอบ แต่หลังจากมะนาวผ่านการอบความร้อนและเก็บผลมะนาวไว้เป็นระยะเวลาขึ้น ข้อผลที่ติดมาจะเริ่มแยกห่างออกจากผลซึ่งอาจจะมีผลหลุดออกบ้าง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะความแก่ ความสด รวมถึงช่วงระยะเวลาหลังการเก็บเกี่ยวแต่ละครั้งถ้าเก็บไว้หลายวันก็ส่งผลกระทบต่อผลการสูญเสียน้ำหนักเช่นกัน

Table 14 แสดงเปอร์เซ็นต์ปริมาณกรดของมะนาวที่ผ่านความร้อนทุกกรรมวิธี พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับมะนาวไม่ผ่านความร้อน (Control) อบมะนาวพิจิตร1 ซึ่งอยู่ภายใต้สภาพห้องบรรจุผลไม้ที่มีปริมาณมะนาวน้ำหนักประมาณ 132- 144 กก./ลบ.ม. อบมะนาวพิจิตร 1 จำนวน 2 ซ้ำต่อกรรมวิธี เก็บไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 12°C. นาน 7 วัน และ 14 วัน พบว่ามะนาวที่ผ่านความร้อนทั้งหมดแนวโน้มความเป็นกรดลดลงมากกว่ามะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติทุกกรรมวิธี



คุณภาพของการเปลี่ยนสีเปลือกมะนาวพิจิตร1 หลังผ่านความร้อน ซึ่งอยู่ภายใต้สภาพห้องบรรจุผลไม้ที่มีปริมาณมะนาวน้ำหนักประมาณ 132- 144 กก./ลบ.ม. อบมะนาวพิจิตร 1 จำนวน 2 ซ้ำต่อกรรมวิธี เก็บไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 12°ซ. นาน 7 วัน และ 14 วัน พบว่ามะนาวพบว่า มะนาวผ่านการอบไอน้ำมีแนวโน้มของการเปลี่ยนสีเปลือกเป็นสีเหลืองมากกว่ามะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน จะมองเห็นได้ชัดเจนว่ามีการเปลี่ยนแปลงของสีเปลือกน้อยที่สุด สีเปลือกยังคงเขียวปกติ ผิวเปลือกยังมีความสด ไม่มีรอยเหี่ยว สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะว่า มะนาวพันธุ์พิจิตร 1 ที่นำมาทดลองครั้งนี้ผ่านการเก็บรักษาก่อนการอบประมาณ 2 วัน

Table 15 การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่างของสี L* เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสว่างของผลไม้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสีเปลือกมะนาวหลังจากผ่านการอบไอน้ำ พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าความสว่างของสี L พบว่าไม่แตกต่างทางสถิติกับมะนาวไม่ผ่านความร้อน

Table 16 การเปลี่ยนแปลงค่า a* เป็นค่าที่บ่งบอกถึงสีเขียวของผลไม้ หากค่า a* มีค่าน้อย หมายถึง สีเปลือกของมะนาวเป็นสีเขียวมาก แต่หากค่า a* มีค่ามากขึ้น หมายถึง สีเปลือกของมะนาวมีสีไปทางแดง จากผลการทดลองพบว่า มะนาวมีการเปลี่ยนแปลงของค่า a* ไม่แน่นอน ทั้งนี้เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่า a* มะนาวหลังอบไอน้ำจากการเก็บรักษาเพื่อจำลองส่งออกทางเครื่องบิน และทางเรือ เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่า a* ไม่มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ กับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน

Table 17 การเปลี่ยนแปลงค่า b* เป็นค่าที่บ่งบอกถึงสี จากสีน้ำเงินไปเป็นสีเหลือง มีค่าเพิ่มสูงขึ้น การเปลี่ยนสีของเปลือกผลมะนาวที่ได้รับความร้อนจะเป็นสีที่ค่อนข้างเหลืองมากกว่ามะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน เมื่ออบไอน้ำ (VHT) มะนาวพิจิตร1 ที่อุณหภูมิ 46, องศาเซลเซียส นาน 40 นาที เก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 12 องศาเซลเซียส นาน 7 และ 14 วัน โดยปกติแล้วมะนาวหลังอบไอน้ำที่ความจุเต็มตู้ 100% จะมีปัญหากับการเปลี่ยนแปลงค่า b* ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงสี จากสีน้ำเงินไปเป็นสีเหลือง จะเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุด แต่การอบครั้งนี้พบว่าไม่กระทบต่อค่า b* และไม่แตกต่างทางสถิติกับมะนาวพิจิตร1 ที่ไม่ผ่านความร้อน การอบทั้ง 2 ครั้งมีผลไปแนวทิศทางเดียวกัน ปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อค่า b* คือระยะเวลา หลังจากเก็บเกี่ยวมะนาวจะต้องนำมาดำเนินการตามขั้นตอนการอบให้เร็วที่สุด สีผลมะนาวตามภาพที่ Figure 23 และ 24 มีความสด ค่า b* ยังปกติ เพราะว่าดำเนินการในระยะเวลาหลังการเก็บเกี่ยวใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่า b* แล้ว ไม่มีค่าแตกต่างกันทางสถิติที่กับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน ถึงแม้ว่าความจุของมะนาวเต็มตู้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เมื่ออบไอน้ำ (VHT)มะนาวพิจิตร1 ที่อุณหภูมิ 46, องศาเซลเซียส นาน 40 นาที เก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 12 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่ามะนาวพันธุ์พิจิตร 1 ปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อความเสียหายจากความร้อนในการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทุกด้านของมะนาวพันธุ์พิจิตร 1 ซึ่งประกอบด้วย การสูญเสียน้ำหนัก และความเป็นกรดลดลง กลิ่นหอมของเปลือกลดลง การเปลี่ยนแปลงของเปลือกเป็นสีเหลืองมีแนวโน้มพัฒนาเร็วขึ้น นอกจากนั้นยังพบความเสียหายจาก



อาการเป็นจุดเล็กๆ สีน้ำตาลสีไม่ชัดเจน ปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้มีผลกระทบของมะนาวที่เกิดขึ้นจากความร้อน ได้แก่ ปริมาณความจุในตัวของมะนาวพิจิตร 1 ระยะการเก็บเกี่ยวมะนาว ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยว หรือถ้าเก็บผลแก่เกินไปจะทำให้การพัฒนาของสีเปลือกเร็วขึ้น แต่ถ้าเก็บผลอ่อนไปก็เป็นสภาพมะนาวไม่มีน้ำ

ถึงแม้จะอบมะนาวเต็มตู้ ที่อุณหภูมิและเวลาการอบดังกล่าว เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของมะนาวพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับมะนาวไม่ผ่านความร้อน การวัดสภาพความเป็นกรดของมะนาวที่ผ่านการอบไอน้ำ ถึงแม้ความร้อนทำให้มะนาวมีค่าความเป็นกรดลดลงแต่ไม่แตกต่างทางสถิติทุกความจุ ยกเว้นที่ระดับความจุมะนาว 100% เท่านั้น เฉพาะมะนาวระยะบะตรงกลางชั้นบนสุดอยู่ในตำแหน่งที่ร้อนที่สุดของตู้ ความเป็นกรดลดลงต่ำสุด และแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อน ในส่วนการเปลี่ยนสีของเปลือกมะนาวพิจิตร1 โดยวัดค่าสีในระบบ $L^* a^* b^*$ พบว่าวัดค่าสีโดยรวมไม่มีแตกต่างกันทางสถิติกับมะนาวที่ผ่านความร้อนถึงแม้จะบรรจุมะนาวเต็มตู้ สิ่งสำคัญที่ควรทำ การเก็บเกี่ยวมะนาวต้องระมัดระวังห้ามตกหล่นหรือกระแทก จะทำให้ต่อมน้ำมันขี้และเกิดความเสียหายเมื่อผ่านความร้อน และทำให้เกิดผลกระทบต่อการพัฒนาของสีผิวเปลือก หลังจากเก็บเกี่ยวผลมะนาวเสร็จแล้วจะต้องเร่งดำเนินการอบไอน้ำให้แล้วเสร็จเร็วที่สุด เพื่อช่วยลดความเสียหายที่เกิดขึ้นจากความร้อน

มะนาวที่ต้องผ่านวิธีการกำจัดศัตรูพืชก่อนการส่งออกเพื่อให้เป็นไปตามเงื่อนไขด่านกักกันพืช วิธีการกำจัดศัตรูพืช ด่านกักกันพืชนั้น จะต้องมีประสิทธิภาพในการกำจัดศัตรูพืชและไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของมะนาวความเสียหายของผลไม้จากวิธีการกำจัดศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยว นั้น แสดงออกโดยสูญเสียคุณสมบัติด้านการตลาดหลายรูปแบบ ได้แก่ สีผล อายุการเก็บรักษา รูปลักษณ์ ภายนอก การสุกรสชาติ กลิ่น และความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืชหลังการ เก็บเกี่ยว คุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นลดลงหรือผิดไปจากปกติจะมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค

การทดลอง เปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระยะไซ่อยู่ในผลมะนาวระหว่างมะนาวพันธุ์แป้นและพันธุ์พิจิตร1 เพื่อยืนยันระยะไซ่ในผลมะนาวชนิดพันธุ์ที่ทนทานต่อความร้อนได้มากกว่าระหว่างมะนาวพันธุ์แป้นและ พันธุ์พิจิตร1 จึงทำการอบมะนาวกำจัดแมลงระยะไซ่ 24 ชั่วโมงพร้อมกันในเครื่องตู้อบความร้อนเดียวกัน ซึ่งทำให้ระยะไซ่อยู่ในผลมะนาวระหว่างมะนาวพันธุ์แป้นและ พันธุ์พิจิตร1 อยู่ภายใต้สภาพความร้อน และความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมือนกัน ผลการตรวจนับแมลงในมะนาวที่ผ่านความร้อน พบว่าแมลงวันผลไม้ระยะไซ่ที่อยู่ภายในผลมะนาวพันธุ์พิจิตร1 มีอัตราการตายมากกว่าในผลมะนาวพันธุ์แป้น จากการทดลองอบมะนาวเปรียบเทียบระหว่างแมลงวันทองระยะไซ่ 24 ชั่วโมง ในมะนาวทั้ง 2 พันธุ์ ที่อุณหภูมิ 46 °ซ. ใช้เวลานาน 40 นาที พบว่า สามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ระยะไซ่ 24 ชั่วโมงในมะนาวทั้ง 2 พันธุ์ตายทั้งหมด การนำมะนาว 2 พันธุ์ มาใช้ทดลองเปรียบเทียบกันนั้น สิ่งจำเป็นจะต้องดำเนินการได้แก่ มะนาวทั้ง 2 พันธุ์ต้องมีขนาดน้ำหนัก ความสุกแก่ต้องใกล้เคียงกันมากที่สุด อายุเก็บเกี่ยวต้องเป็นวันเดียวกัน การปฏิบัติทุกอย่างจะต้องทำให้เหมือนกัน บรรจุในภาชนะเดียวกัน วิธีการผลวางมะนาวบนถาดตำแหน่งเดียวกัน แต่เนื่องจากมะนาวทั้ง 2 พันธุ์มีลักษณะที่



แตกต่างกันคือ มะนาวแป้นมีลักษณะรูปร่างผลส่วนใหญ่ค่อนข้างแป้น เปลือกบาง น้ำเยอะ ถ้ายังมีน้ำมะนาวซึ่งอยู่ภายในผลมากอาจจะทำให้น้ำท่วมไข่เน่าก่อนฟักเป็นตัวหนอน และจากนั้นหนอนอาจจมน้ำตายได้ ต้องตรวจสอบบ่อยๆ ในขณะที่มะนาวพันธุ์พิจิตร 1 มีลักษณะรูปร่างผลส่วนใหญ่ค่อนข้างกลม เปลือกหนา น้ำน้อย ไม่มีปัญหาในเรื่องน้ำท่วมแมลงที่อยู่ภายในผล จะสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์การตายของมะนาวพันธุ์พิจิตร 1 น้อยกว่ามะนาวแป้น ดังนั้นควรระมัดระวังเรื่องนี้เป็นพิเศษ

แมลงวันทอง oriental fruit fly, *B. dorsalis* ระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง ในผลมะนาว (*C. aurantifolia* Swing.) พันธุ์พิจิตร 1 ตายทั้งหมดเมื่อผ่านการกำจัดแมลงด้วยความร้อนกรรมวิธีอบไอน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์ 93 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่กลางผลมะนาวอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 46°C. และคงอุณหภูมิผลไว้ที่ 46°C. เป็นเวลานาน 40 นาที จะลดอุณหภูมิทันทีหลังจากสิ้นสุดกระบวนการให้ความร้อน แบ่งเป็น 2 กรรมวิธี คือ 1. เป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง 2. พ่นด้วยน้ำ 10 นาที ผลการประเมินประสิทธิภาพกระบวนการกำจัดแมลงวันผลไม้ดังกล่าวข้างต้นพบว่า สามารถกำจัดแมลงวันทองระยะไข่จำนวนประมาณ 162,454 ฟอง ในผลมะนาวตายทั้งหมด โดยคุณภาพผลมะนาวเปลี่ยนแปลงไปจากปกติเล็กน้อยในด้านกลิ่นน้ำมันหอมมีแนวโน้มลดลง ภายใต้สภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบิน แต่ภายใต้สภาพจำลองการส่งออกทางเรือคุณภาพผลมะนาวเปลี่ยนแปลงไปจากปกติมากกว่าผลมะนาวที่ไม่ผ่านความร้อนในด้านรสชาติมีความขมปนบ้างเล็กน้อยในบางผลจนไม่สามารถแยกออกได้ชัดเจน สีผิวเปลือกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแตกต่างกันเล็กน้อย ส่วนกลิ่นน้ำมันหอมมีแนวโน้มลดลงมากกว่ามะนาวไม่ผ่านความร้อนชัดเจน สภาพโดยรวมทั้งหมดผู้บริโภคยอมรับได้

จากการศึกษายืนยันประสิทธิภาพด้านการกำจัดแมลงด้วยความร้อนจากวิธีอบไอน้ำ VHT เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะไข่ ในผลมะนาว ออบมะนาวทดลองจนอุณหภูมิภายในสุดผลถึง 46 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิดังกล่าว นาน 40 นาที โดยตรวจนับจำนวนแมลงรอดชีวิตหลังอบมะนาว 6 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที ไม่พบแมลงรอดชีวิต ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที มีประสิทธิภาพกำจัดระยะไข่แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวนมากกว่า 162,454 ฟอง/ตัว ในผลมะนาวพันธุ์พิจิตร 1 ให้ตายทั้งหมด ซึ่งได้ตามมาตรฐานตามวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช จากผลงานวิจัยนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะเสนอให้เป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะนาวพันธุ์พิจิตร 1 ก่อนส่งออกและเสนอรายงานวิจัยต่อประเทศผู้นำเข้าที่ยอมรับวิธีการอบไอน้ำเป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้เชี่ยวชาญ คุณอุตร อุณหวุฒิ ที่มีส่วนช่วยให้คำแนะนำ ขอขอบคุณ คุณนวนลนินสา ตั้งสัจจะกุล คุณประชุม นัยจรรย์นัถ์ คุณสมิทธิ์ อยู่เอี่ยม คุณกัลยา วงศ์สุวรรณ คุณมีนา จริจจิตร และคณะนักศึกษาฝึกงานจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และมหาวิทยาลัยเกษตรแม่โจ้ ที่มีส่วนช่วยในการเตรียมการทดลอง รวมถึงตรวจผลการทดลอง



เอกสารอ้างอิง

- สลักจิต พานคำ ชัยณรัตน์ สนศิริ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ 2549. ระยะเวลาไข่และหนอนในผลเงาะต่อการกำจัดแมลงด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์รายงานผลงานวิจัยฉบับเต็ม. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- สลักจิต พานคำ, มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ และชัยณรัตน์ สนศิริ. 2551 ความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ ระยะเวลาไข่และหนอนในผลเงาะต่อวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ผลงานวิจัยฉบับเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- สลักจิต พานคำ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ และชัยณรัตน์ สนศิริ. 2551 ศึกษาวิธีการเตรียมเงาะทดลองในมีไข่และหนอนของแมลงวันผลไม้ *Oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae)* อยู่ในผลผลงานวิจัยฉบับเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- สลักจิต พานคำ และ จารุวรรณ จันทร์ธา. 2551 ความเสียหายของเงาะจากวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อน ผลงานวิจัยฉบับเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- สลักจิต พานคำ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ และชัยณรัตน์ สนศิริ. 2556 อิทธิพลของระยะเวลาให้ความร้อนต่อคุณภาพผลมะนาวผ่านความร้อนวิธีอบไอน้ำในรายงานความก้าวหน้า โครงการวิจัยพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลมะนาวเพื่อการส่งออก. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- สลักจิต พานคำ ชัยณรัตน์ สนศิริ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ 2558. ศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ ระยะเวลาไข่และหนอนในผลมะนาวต่อการกำจัดแมลงด้วยความร้อนวิธีอบไอน้ำ รายงานผลงานวิจัยฉบับเต็ม. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- สลักจิต พานคำ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ และชัยณรัตน์ สนศิริ. 2560 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเสียหายจากความร้อนของมะนาวซึ่งผ่านการอบไอน้ำ(การลดอุณหภูมิผลมะนาวโดยวิธีฉีดพ่นด้วยน้ำ) ในรายงานความก้าวหน้า โครงการวิจัยพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันในผลมะนาวเพื่อการส่งออก. สำนักงานวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรุงเทพฯ.
- อุดร อุณหภูมิต, มานะ พุ่มทอง, รัชฎา อินทรกำแหง, วลัยกร วรวิศิษฐ์ธำรง, นวลนินสา ตั้งสัจจะกุล, จำลอง เจตนะจิตร, ประเทือง ศรีสุข และ บุญชอบ ภัทรรุจิ. 2530. *ความสำเร็จของกรมวิชาการเกษตรในการส่งมะม่วงไปประเทศญี่ปุ่น*. ฝ่ายวิชาการกักกันพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 106 หน้า.
- อุดร อุณหภูมิต, มานะ พุ่มทอง, ประเทือง ศรีสุข และ บุญชอบ ภัทรรุจิ. 2531. *การส่งมะม่วงพันธุ์หนึ่งกลางวันอบไอน้ำไปประเทศญี่ปุ่นเป็นครั้งแรก*. ฝ่ายวิชาการกักกันพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 113 หน้า.



- อุดร อุณหภูมิต, มานะ พุ่มทอง, รัชฎา อินทรกำแหง, วลัยกร วรวิศิษฐ์ธำรงและประเทือง ศรีสุข. 2536. การศึกษาความต้านทานต่อความร้อนของหนอนแมลงวันผลไม้วัยที่ 1 ในมะม่วงหนึ่งกลางวัน น้ำดอกไม้ แรดและพิมเสนแดง. วารสาร วิชาการเกษตร. 11: 133-147.
- อุดร อุณหภูมิต, วลัยกร วรวิศิษฐ์ธำรง, รัชฎา อินทรกำแหง, มานะ พุ่มทองและประเทือง ศรีสุข. 2536. คุณภาพมะม่วงน้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง หลังจากผ่านกระบวนการอบไอน้ำ. วารสาร วิชาการเกษตร. 11: 31-44.
- อุดร อุณหภูมิต วลัยกร รัตนเดชากุลและพิทวัฒน์ อ่อนทองกลาง. 2537. ผลกระทบของกรรมวิธีกำจัดแมลงในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวด้วยความร้อนต่อคุณภาพของผลมังคุด. รายงานผลงานวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2537. กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.
- อุดร อุณหภูมิต และสลักจิต พานคำ. 2544. ประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันทองในผลมะนาว, น. E1-11. ในรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันในผลมะนาวเพื่อการส่งออก. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- อุดร อุณหภูมิต, สลักจิต พานคำ, ชัยณรัตน์ สนศิริ, มลนิภา ศรีมาตริภิมย์, ชูติมา อ้อมกิ่ง, จารุวรรณ จันทรา และรัชฎา อินทรกำแหง. 2549. การวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในส้มโอเพื่อส่งออก. ผลงานวิจัยเพื่อพัฒนาเป็นผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2549 กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 125-143.
- Armstrong, J.W., J.D. Hansen, B.K.S. Hu and S.A. Brown. 1989. High-temperature, forced-air quarantine treatment for papayas infested with Tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*. 82: 1667-1674.
- Corcoran, R.J., N.W. Heather and T.A. Heard. 1993. Vapor heat treatment for zucchini infested with *Bactrocera cucumis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*. 86: 66-69.
- Furusawa, K., T. Sugimoto and T. Gaja. 1984. *The effectiveness of vapor heat treatment against the melon fly, Dacus cucurbitae Coquillett, in eggplant and fruit tolerance to the treatment*. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 20: 17-24.
- Furusawa, K., T. Sugimoto and T. Gaja. 1984. The effectiveness of vapor heat treatment against the melon fly, *Dacus cucurbitae* (Coquillett) in eggplant and fruit tolerance to the treatment. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 20: 17-24.



- Hallman, G.L. 1990. Vapor-heat treatment of carambolas infested with Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*. 83: 2340-2342.
- Heather, N.W., R.J. Corcoran and R.A. Kopittke. 1997. Hot air disinfestation of Australian 'Kensington' mangoes against two fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Postharvest Biology and Technology*. 10: 99-105.
- Iwata, M., K. Sunagawa, K. Kume and A. Ishikawa. 1990. *Efficacy of vapor heat treatment on netted melon infested with melon fly, Dacus cucurbitae Coquillett (Diptera: Tephritidae)*. *Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan*. 26: 45-49.
- Jang, E.B. 1986. Kinetics of thermal death in eggs and first instars of three species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*. 79 (3): 700-705.
- Jones, W. 1939. *The influence of relative humidity on the respiration of papaya at high temperatures. Proceeding of the American Society for Horticultural Science*. 37: 700-705.
- MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries). 2010. *Summary of proposed Revisions to the Enforcement Ordinance of the Plant Protection Law and Concerned Public Notice Retrieved*. (Online). Available. http://www.members.wto.org/crnattachments/2010/sps/JPN/10_4194_00_e.pdf (February 1, 2012.)
- Mangan, R.L. and S.J. Ingle. 1992. Forced hot-air quarantine treatment for mangoes infested with West Indian fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*. 85: 1859-1864.
- Mangan, R.L. and S.J. Ingle. 1994. Forced hot-air quarantine treatment for grapefruit infested with Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*. 87: 1574-1579.
- Mangan, R.L., K.C. Shellie, S.J. Ingle and M.J. Firko. 1998. High temperature forced-air treatments with fixed time and temperature for 'Dancy' tangerines, 'Valencia' oranges, and 'Rio Star' grapefruit. *Journal of Economic Entomology*. 91: 933-939.
- Merino, S.R., M.M. Eugenio, A.U. Ramos and S.T. Hernandez. 1985. Fruit fly disinfestation of mangoes (*Mangifera indica* L. var. 'Manila Super') by vapor heat treatment. Ministry of Agriculture and Food, Bureau of Plant Industry. Manila, Philippines. 76 p.



- Miller, W.R. and R.E. McDonald. 1991. Quality of store 'Marsh' and 'Ruby Red' grapefruit after high-temperature, forced-air treatment, HortScience. 26: 1188-1991.
- Miller, W.R., R.E. McDonald, G. Hallman and J.L. Sharp. 1991. Condition of Florida grapefruit after exposure to vapor heat quarantine treatment. HortScience. 26: 42-44.
- Miyazaki, I. 2010. *How to prepare the technical report on vapor heat disinfestations test. In: Report of the thermal treatment for the disinfestations of fruit flies. Naha Plant Protection Station, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Okinawa International Centre. Japan International Cooperation Agency. Japan. 30 pp.*
- Sharp, J.L. 1992. Hot-air quarantine treatment for mango infested with Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Journal of Economic Entomology. 85: 2302-2304.
- Sharp, J.L. and G.J. Hallman. 1992. Hot-air quarantine treatment for carambolas infested with Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). Journal of Economic Entomology. 85: 168-171.
- Sharp, J.L. and R.G. McGuire. 1996. Control of Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in navel orange by forced hot air. Journal of Economic Entomology. 89: 1181-1185.
- Sugimoto, T. and K. Tanabe. 1989. Efficacy of vapor heat treatment for papaya fruit infested with melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 25: 23-30.
- Sugimoto, T., K. Furusawa and M. Mizobuchi. 1983. Effectiveness of vapor heat treatment against the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel, in green pepper and fruit tolerance to the treatment. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 19: 81-88.
- Sunagawa, K., K. Kume and R. Iwaizumi. 1987. *The effectiveness of vapor heat treatment against the melon fly, Dacus cucurbitae Coquillett, in mango and fruit tolerance to the treatment. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 23:13-20.*
- Sunagawa, K., K. Kume, A. Ishikawa, T. Sugimoto and K. Tanabe. 1988. *Efficacy of vapor heat treatment for bitter momordica fruit infested with melon fly, Dacus cucurbitae (Coquillett) (Diptera :Tephritidae).* Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 24:1-5.



- Unahawutti, U., C. Chettanachitara, M. Poomthong, P. Konson, E. Smitasiri, C. Lapasathukool, W. Worawisitthumrong and R. Intarakumheng. 1986. *Vapor heat treatment for 'Nang Klarngwun' mango, Mangifera indica Linn., infested with eggs and larvae of the oriental fruit fly, Dacus dorsalis Hendel and the melon fly, Dacuscucurbitae Coquillett (Diptera: Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division. Agricultural Regulatory Division. Department of Agriculture. Bangkok. 108 pp.*
- Unahawutti, U., M. Poomthong, R. Intarakumheng, W. Worawisitthumrong, C. Lapasathukool, E. Smitasiri, P. Srisook and C. Ratanawaraha. 1991. *Vapor heat as plant quarantine treatment of 'Nang klarnwan', 'Nam Dorkmai', 'Rad' and 'Pimsen Daeng' mangoes, Infested with fruit flies (Diptera: Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries for approved of quarantine treatment on Thai mangoes to be exported to Japan. Tech. Plant Quarant. Sub Div., Agr. Regulat. Div., Dept. of Agr., Bangkok. 342 p.*
- Unahawutti, U., S. Phankum, P. Ongthonglang and C. Chettanachitara. 1999. *Heated-air quarantine treatment for mangosteen infested with oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries for approval of quarantine treatment on Thai mangosteen to be exported to Japan. Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture, Bangkok. 630 p.*
- Unahawutti, U., S. Phankum, M. Srimartpirom, C. Ormking, C. Sonsiri, J. Chantra, and R. Intarakumheng. 2006. *Heated-air quarantine treatment for pummelo infested with oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries for approval of quarantine treatment on Thai pummelo to be exported to Japan. Technical*
- Watanabe, N., F. Ichinohe and M. Sonda. 1973. *Improvement of corn flour medium for larval culture of oriental fruit fly. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 11: 57-58.*



Table 1 Time for center of lime fruits after subjecting to vapor heat treatment (VHT) at 46°C for 0:40 hours at various capacities loading.

| Capacity loading (%) | Rep. | Loading (kg./cum.) | Sensor fruit weight (g) | | | Time for fruit center to reach 46°C + 0:40 hrs. ^{1/} |
|----------------------|------|--------------------|-------------------------|-------|-------|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | |
| 25 | 1 | 36 | 42.26 | 42.57 | 42.65 | 2:20 |
| | 2 | 36 | 42.60 | 42.66 | 42.67 | 2:20 |
| 50 | 1 | 72 | 62.14 | 62.15 | 62.25 | 2:32 |
| | 2 | 72 | 43.03 | 43.20 | 43.21 | 2:23 |
| 75 | 1 | 108 | 62.11 | 62.13 | 62.40 | 3:10 |
| | 2 | 108 | 62.35 | 62.72 | 62.74 | 2:56 |
| 100 | 1 | 144 | 42.40 | 42.44 | 42.66 | 2:51 |
| | 2 | 144 | 42.52 | 42.57 | 42.60 | 2:54 |

^{1/} Time for center of only 3 sensor fruits to attain target temperature.

Table 2 Weight loss (%) of lime fruits after subjecting to vapor heat treatment (VHT) of 93%RH maintain at temperature 46°C for 40 minute temperature for various loading capacity and 7 days storage at 12°C.

| Capacity loading (%) | Treatment | \bar{x} After Treatment | T-test ^{1/} |
|----------------------|-----------|---------------------------|----------------------|
| 25 | Control | 3.28 | |
| | left | 3.77 | ns |
| | middle | 3.88 | ns |
| | right | 4.03 | ns |
| 50 | Control | 2.37 | |
| | left | 2.58 | ns |
| | middle | 2.65 | ** |
| | right | 2.40 | ns |
| 75 | Control | 2.38 | |
| | left | 3.13 | ** |
| | middle | 3.27 | ** |
| | right | 3.25 | ** |
| 100 | Control | 1.72 | |
| | left | 1.76 | ns |
| | middle | 1.73 | ns |
| | right | 1.78 | ns |

^{1/} Each treatment compare with control

* p < 0.05 = significant, ns= nonsignificant



Table 3 Acidity (%) of lime fruits after subjecting to vapor heat treatment (VHT) of 93 % RH maintain at temperature 46°C for 40 minute temperature for various loading capacity and 7 days storage at 12 °C.

| Capacity loading (%) | Treatment | Mean After Treatment | T-test ^{1/} |
|----------------------|-----------|----------------------|----------------------|
| 25 | Control | 2.14 | |
| | left | 2.30 | ns |
| | middle | 2.08 | ns |
| | right | 2.04 | ns |
| 50 | Control | 2.44 | |
| | left | 2.26 | ns |
| | middle | 2.22 | ns |
| | right | 2.30 | ns |
| 75 | Control | 1.65 | |
| | left | 1.55 | ns |
| | middle | 1.86 | ns |
| | right | 1.54 | ns |
| 100 | Control | 2.22 | |
| | left | 1.66 | ns |
| | middle | 1.08 | ** |
| | right | 1.52 | ns |

^{1/} Each treatment compare with control

* p < 0.05 = significant, ns= nonsignificant



Table 4 Color rating (L*a*b*) of lime fruits after subjecting to vapor heat treatment (VHT) of 93% RH maintain at temperature 46°C for 40 minute temperature for various loading capacity and 7 days storage at 12 °C.

| Capacity loading (%) | Treatment Color rating | Mean After Treatment | | | T-test | | |
|----------------------|------------------------|----------------------|-------|-------|--------|----|----|
| | | L* | a* | b* | L* | a* | b* |
| 25 | Control | 61.01 | 2.41 | 48.82 | | | |
| | left | 57.05 | 1.81 | 45.39 | ns | ns | ** |
| | middle | 60.25 | 2.52 | 48.20 | ns | ns | ns |
| | right | 58.55 | 1.84 | 46.40 | ns | ns | ** |
| 50 | Control | 48.28 | -5.60 | 34.72 | | | |
| | left | 50.10 | -4.11 | 38.31 | ns | ns | ns |
| | middle | 51.31 | -4.19 | 39.26 | ns | ns | ns |
| | right | 52.60 | -3.76 | 40.56 | ** | ns | ns |
| 75 | Control | 55.37 | -2.05 | 43.01 | | | |
| | left | 59.63 | 2.25 | 44.95 | ns | ** | ns |
| | middle | 56.23 | 3.65 | 42.25 | ns | ** | ns |
| | right | 61.24 | 3.10 | 47.53 | ** | ns | ** |
| 100 | Control | 53.56 | -1.77 | 39.37 | | | |
| | left | 54.97 | -0.91 | 42.27 | ns | ns | ns |
| | middle | 56.81 | -0.01 | 41.70 | ns | ns | ns |
| | right | 54.36 | -0.24 | 40.71 | ns | ns | ns |

^{1/} Each treatment compare with control

* p < 0.05 = significant, ns= nonsignificant



Table 5 Time for center of lime fruit to attain 45°C and 46°C for various holding times during vapor heat treatment.

| Method/ variety | Rep. | Sensor fruit weight (g) | | | Temp.45°C. /time (h) ¹ | Temperature46°C/time (h) ¹ | | | | |
|--------------------|------|-------------------------|-------|-------|--------------------------------------|---------------------------------------|------|------|------|------|
| | | | | | | 0:00 | 0:10 | 0:20 | 0:30 | 0:40 |
| VHT/Pean | 1 | 42.6 | 42.6 | 42.67 | 1:27 | 1:39 | 1:49 | 1:59 | 2:09 | 2:19 |
| VHT/Phichit1 | | 42.48 | 42.50 | 42.77 | | | | | | |
| VHT/Pean | 2 | 42.50 | 42.57 | 42.59 | 1:27 | 1:47 | 1:57 | 2:07 | 2:17 | 2:27 |
| VHT/Phichit1 | | 42.54 | 42.59 | 42.65 | | | | | | |
| VHT/Pean | 3 | 42.50 | 42.50 | 42.51 | 1:30 | 1:47 | 1:57 | 2:07 | 2:17 | 2:27 |
| VHT/Phichit1 | | 42.56 | 42.64 | 42.65 | | | | | | |
| VHT/Pean | 4 | 42.52 | 42.52 | 42.52 | 1:29 | 1:57 | 2:07 | 2:17 | 2:27 | 2:37 |
| VHT/Phichit1 | | 42.45 | 42.46 | 42.65 | | | | | | |
| VHT/Pean | 5 | 42.50 | 42.53 | 42.55 | 1:29 | 1:55 | 2:05 | 2:15 | 2:25 | 2:35 |
| VHT/Phichit1 | | 42.49 | 42.59 | 42.61 | | | | | | |
| VHT/Pean | 6 | 42.54 | 42.56 | 42.56 | 1:27 | 1:50 | 2:0 | 2:10 | 2:20 | 2:30 |
| VHT/Phichit1 | | 42.52 | 42.53 | 42.53 | | | | | | |

¹ Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.

Table 6 Time for center of lime fruit to attain 45°C and 46°C during vapor heat treatment.

| Method/ variety | Rep. | Loading (kg/cum.) | Time for center to reach 45°C (h) ¹ | Time for center to reach 46°C (h) ¹ | Time from 45 to 46°C (h) ¹ |
|-----------------|------|----------------------|--|--|---|
| VHT/Pean | 1 | | | | |
| VHT/Phichit1 | | 9.6 | 1:27 | 1:39 | 0:12 |
| VHT/Pean | 2 | | | | |
| VHT/Phichit1 | | 9.5 | 1:27 | 1:47 | 0:20 |
| VHT/Pean | 3 | | | | |
| VHT/Phichit1 | | 9.8 | 1:30 | 1:47 | 0:17 |
| VHT/Pean | 4 | | | | |
| VHT/Phichit1 | | 9.6 | 1:29 | 1:57 | 0:28 |
| VHT/Pean | 5 | | | | |
| VHT/Phichit1 | | 9:8 | 1:29 | 1:55 | 0:26 |
| VHT/Pean | 6 | | | | |
| VHT/Phichit1 | | 9:8 | 1:27 | 1:50 | 0:23 |

¹ Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.



Table 7 Mortality¹ of OFF eggs in lime fruits (Pean & Phichit1) treated to Vapor Heat Treatment.

| Method/ variety | Treatment ² | Number treated | Number dead | mortality (%) ³ | Corrected mortality (%) ³ |
|--------------------|------------------------|-------------------|----------------|-------------------------------|--|
| VHT/Pean | Control | 9000 | 6,994 | 69.91 | 0 |
| | 45.0 °C +0 h | 3600 | 3,260 | 71.25 | 4.45 |
| | 46.0 °C +0 h | 3600 | 3,502 | 74.97 | 16.82 |
| | 46.0 °C +0:10 h | 3600 | 3,560 | 83.81 | 46.18 |
| | 46.0 °C +0:20 h | 3600 | 3,590 | 96.08 | 86.98 |
| | 46.0 °C +0:30 h | 3600 | 3,600 | 98.83 | 96.12 |
| | 46.0 °C +0:40 h | 3600 | 3,600 | 100 | 100 |
| VHT/Phichit 1 | Control | 9000 | 5,357 | 53.11 | 0 |
| | 45.0 °C +0 h | 3600 | 3,357 | 56.61 | 7.46 |
| | 46.0 °C +0 h | 3600 | 3,545 | 64.72 | 24.76 |
| | 46.0 °C +0:10 h | 3600 | 3,585 | 76.19 | 49.23 |
| | 46.0 °C +0:20 h | 3600 | 3,596 | 95.50 | 90.40 |
| | 46.0 °C +0:30 h | 3600 | 3,600 | 99.56 | 99.05 |
| | 46.0 °C +0:40 h | 3600 | 3,600 | 100 | 100 |

¹ Combined data of 6 Replication

² ผ่านความร้อน There are 20 treated fruits and 50 control fruits infested with 30 eggs/fruit In each replication.

³ Mortality is Corrected by using Abbott's formula (Abbott,1925)



Table 8 Times for center of lime to attain 46 ° C for 40 min.

| Load factor | Operation /VHT | Rep | Sensor fruit weight(g) | | | Time ¹ (h) |
|------------------------|-------------------|-----|------------------------|-------|-------|-----------------------|
| Low load (65 kg/cum.) | STEPPED | 1 | 42.57 | 42.57 | 42.62 | 2.08 |
| | Air cooling | 2 | 42.44 | 42.50 | 42.54 | 2.09 |
| | | 3 | 42.57 | 42.57 | 42.57 | 2.08 |
| | | 4 | 42.52 | 42.52 | 42.52 | 2.08 |
| | | 5 | 42.52 | 42.52 | 42.52 | 2.10 |
| | | 6 | 42.50 | 42.51 | 42.52 | 2.12 |
| | | 7 | 42.62 | 42.63 | 42.66 | 2.08 |
| | | 8 | 42.55 | 42.57 | 42.63 | 2.07 |
| | | 9 | 42.52 | 42.52 | 42.64 | 2.09 |
| | | 10 | 42.67 | 42.68 | 42.69 | 2.09 |
| Full load (132 kg/cum) | STEPPED | 1 | 42.73 | 42.75 | 42.76 | 2.09 |
| | Air cooling | 2 | 42.51 | 42.62 | 42.62 | 2.08 |
| | | 3 | 42.71 | 42.72 | 42.76 | 2.09 |
| | | 4 | 42.90 | 42.90 | 42.90 | 2.10 |
| | | 5 | 42.61 | 42.58 | 42.56 | 2.10 |
| | | 6 | 42.54 | 42.57 | 42.62 | 2.10 |
| | | 7 | 42.60 | 42.63 | 42.63 | 2.10 |
| | | 8 | 42.54 | 42.54 | 42.54 | 2.11 |
| | | 9 | 42.55 | 42.59 | 42.59 | 2.09 |
| | | 10 | 42.57 | 42.58 | 42.60 | 2.08 |
| Full load (132 kg/cum) | STEPPED | 1 | 42.52 | 42.58 | 42.61 | 2.06 |
| | Hydro cooling | 2 | 42.57 | 42.58 | 42.59 | 2.06 |
| | | 3 | 42.54 | 42.54 | 42.55 | 2.06 |
| | | 4 | 42.52 | 42.58 | 42.61 | 2.06 |
| | | 5 | 42.55 | 42.70 | 42.72 | 2.10 |
| | | 6 | 42.55 | 42.59 | 42.61 | 2.08 |
| | | 7 | 42.63 | 42.63 | 42.63 | 2.08 |
| | | 8 | 42.50 | 42.58 | 42.58 | 2.07 |
| | | 9 | 42.62 | 42.63 | 42.63 | 2.08 |
| | | 10 | 42.52 | 42.53 | 42.60 | 2.07 |

¹ Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.



Table 9 Survival of eggs of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in lime treated with proposed quarantine treatment.

| Load Factor | Operation Mode | Rep | Infestation Method | No. test fruit | | No. alive individual in control | Estimated treated population | No. survivors | |
|-------------|----------------|-----|--------------------|----------------|-----------|---------------------------------|------------------------------|---------------|---|
| | | | | Control | Treatment | | | | |
| Low load | STEPPED | 1 | Egg inoculation | 50 | 150 | 929 | 2787 | 0 | |
| | | | Forced infestation | 10 | 30 | 629 | 1887 | 0 | |
| | Air cooling | 2 | Egg inoculation | 50 | 150 | 819 | 2457 | 0 | |
| | | | Forced infestation | 10 | 30 | 629 | 1887 | 0 | |
| | | 4 | Egg inoculation | 50 | 150 | 771 | 2313 | 0 | |
| | | | Forced infestation | 10 | 30 | 531 | 1593 | 0 | |
| | | 5 | Egg inoculation | 50 | 150 | 828 | 2484 | 0 | |
| | | | Forced infestation | 10 | 30 | 590 | 1770 | 0 | |
| | | 6 | Egg inoculation | 50 | 150 | 780 | 2340 | 0 | |
| | | | Forced infestation | 10 | 30 | 391 | 1173 | 0 | |
| | | 7 | Egg inoculation | 50 | 150 | 801 | 2403 | 0 | |
| | | | Forced infestation | 10 | 30 | 512 | 1536 | 0 | |
| | | 8 | Egg inoculation | 50 | 150 | 585 | 1755 | 0 | |
| | | | Forced infestation | 10 | 30 | 320 | 960 | 0 | |
| | | 9 | Egg inoculation | 50 | 150 | 605 | 1815 | 0 | |
| | | | Forced infestation | 10 | 30 | 337 | 1011 | 0 | |
| | | 10 | Egg inoculation | 50 | 150 | 689 | 2067 | 0 | |
| | | | Forced infestation | 10 | 30 | 368 | 1104 | 0 | |
| | | | | Sub-total | 600 | 1800 | 12658 | 37974 | 0 |



Table 10 Survival of eggs of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in lime treated with proposed quarantine treatment.

| Load Factor | Operation Mode | Rep | Infestation Method | No. test fruit | | No. alive individual in control | Estimated treated population | No. survivors | |
|---------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|----------------|-----------|------------------------------------|---------------------------------|------------------|---|
| | | | | Control | Treatment | | | | |
| Full load (126 kg/cum) | STEPPED VHT | 1 | Egg inoculation | 50 | 330 | 601 | 3967 | 0 | |
| | | | Forced infestation | 10 | 30 | 376 | 1128 | 0 | |
| | Forced infestation | | 10 | 30 | 657 | 1971 | 0 | | |
| | Forced infestation | | 10 | 30 | 861 | 1292 | 0 | | |
| | 4 | Egg inoculation | 50 | 330 | 729 | 4811 | 0 | | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 744 | 2232 | 0 | | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 740 | 2220 | 0 | | |
| | 6 | Egg inoculation | 50 | 330 | 491 | 3241 | 0 | | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 622 | 1866 | 0 | | |
| | 7 | Egg inoculation | 50 | 330 | 794 | 5240 | 0 | | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 792 | 2376 | 0 | | |
| | 8 | Egg inoculation | 50 | 330 | 546 | 3604 | 0 | | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 683 | 2049 | 0 | | |
| | 9 | Egg inoculation | 50 | 330 | 632 | 4171 | 0 | | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 482 | 1440 | 0 | | |
| | 10 | Egg inoculation | 50 | 330 | 630 | 4158 | 0 | | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 503 | 1509 | 0 | | |
| | Sub-total | | | | 600 | 3,600 | 12,345 | 58,655 | 0 |



Table 11 Survival of eggs of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*, in lime treated with proposed quarantine treatment.

| Load Factor | Operation Mode | Rep | Infestation Method | No. test fruit | | No. alive individual in control | Estimated treated population | No. survivors |
|---------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|----------------|-----------|------------------------------------|---------------------------------|------------------|
| | | | | Control | Treatment | | | |
| Full load (126 kg/cum) | STEPPED | 1 | Egg inoculation | 50 | 330 | 619 | 4085 | 0 |
| | VHT | | Forced infestation | 10 | 30 | 800 | 2400 | 0 |
| Hydro cooling | 2 | Egg inoculation | 50 | 330 | 775 | 5115 | 0 | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 606 | 1818 | 0 | |
| | 3 | Egg inoculation | 50 | 330 | 838 | 5531 | 0 | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 712 | 2136 | 0 | |
| | 4 | Egg inoculation | 50 | 330 | 687 | 4547 | 0 | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 358 | 1076 | 0 | |
| | 5 | Egg inoculation | 50 | 330 | 687 | 4534 | 0 | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 517 | 1551 | 0 | |
| | 6 | Egg inoculation | 50 | 330 | 881 | 5815 | 0 | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 369 | 1107 | 0 | |
| | 7 | Egg inoculation | 50 | 330 | 823 | 5432 | 0 | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 239 | 717 | 0 | |
| | 8 | Egg inoculation | 50 | 330 | 866 | 5716 | 0 | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 238 | 714 | 0 | |
| | 9 | Egg inoculation | 50 | 330 | 884 | 5834 | 0 | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 597 | 1791 | 0 | |
| | 10 | Egg inoculation | 50 | 330 | 764 | 5042 | 0 | |
| | | Forced infestation | 10 | 30 | 288 | 864 | 0 | |
| Sub-total | | | | 600 | 3,600 | 12,548 | 65,825 | 0 |
| total | | | | 1,800 | 9,000 | 37,551 | 162,454 | 0 |



Table 12 Time for center of Lime to attain 46 ° C during modified vapor heat treatment.

| Method of transportation | Rep | Loading (kg/cum.) | Sensor fruit weight (g) | Time for fruit center to reach 46 ° C (h) ¹ |
|--------------------------|-----|-------------------|-------------------------|--|
| Air shipment | 1 | 140 | 42.04 | 2.12 |
| | | | 42.05 | |
| | | | 42.08 | |
| | 2 | 140 | 42.03 | 2.12 |
| | | | 42.06 | |
| 42.18 | | | | |
| Sea shipment | 1 | 140 | 45.57 | 2.14 |
| | | | 45.63 | |
| | | | 45.77 | |
| | 2 | 140 | 45.78 | 2.14 |
| | | | 45.78 | |
| 45.85 | | | | |

¹ Time for 3 sensor fruits to attain target temperatures.

Table 13 Weight loss (%) of lime fruits after subjecting to vapor heat treatment (VHT) of 93% RH maintain at temperature 46°C for 40 minute for 7 days and 14 days storage at 12 °C

| Replication | loading capacity | Treatment | Average After Treatment | T-test | T |
|--------------|------------------|-----------|-------------------------|-----------------|--------------------|
| Rep.1/7days | 100% | Control | 1.44 | | |
| | | left | 1.94 | Control+ left | 5.38** |
| | | middle | 1.70 | Control+ middle | 2.58 ^{ns} |
| | | right | 1.62 | Control+ right | 2.03 ^{ns} |
| Rep.2/7days | 100% | Control | 1.13 | | |
| | | left | 2.04 | Control+ left | 9.77** |
| | | middle | 1.85 | Control+ | 8.22** |
| | | right | 1.52 | Control+ right | 3.67** |
| Rep.1/14days | 100% | Control | 1.42 | | |
| | | left | 2.13 | Control+ left | 6.10** |
| | | middle | 2.17 | Control+ | 6.60** |
| | | right | 2.10 | Control+ right | 5.33** |
| Rep.2/14days | 100% | Control | 1.42 | | |
| | | left | 2.38 | Control+ left | 7.77** |
| | | middle | 2.37 | Control+ | 6.73** |
| | | right | 2.40 | Control+ right | 7.18** |

** p ≤ 0.01 = significant, ns= nonsignificant



Table 14 Acidity of lime fruits after subjecting to vapor heat treatment (VHT) of 93% RH maintain at temperature 46°C for 40 minute for 7 days and 14 days storage at 12 °C

| Replication | loading | Treatment | Average | T-test | T |
|--------------|---------|-----------|---------|------------------------|--------------------|
| Rep.1/7days | 100% | Control | 1.94 | | |
| | | left | 1.72 | Control+ left | 1.58 ^{ns} |
| | | middle | 1.85 | Control+ middle | 0.99 ^{ns} |
| | | right | 1.92 | Control+ right | 0.27 ^{ns} |
| Rep.2/7days | 100% | Control | 0.96 | | |
| | | left | 0.90 | Control+ left | 0.40 ^{ns} |
| | | middle | 0.63 | Control+ middle | 2.02 ^{ns} |
| | | right | 0.56 | Control+ right | 3.11 ^{**} |
| Rep.1/14days | 100% | Control | 2.91 | | |
| | | left | 2.39 | Control+ left | 2.70 ^{ns} |
| | | middle | 2.31 | Control+ middle | 3.48 ^{ns} |
| | | right | 3.26 | Control+ right | 1.82 ^{ns} |
| Rep.2/14days | 100% | Control | 2.91 | | |
| | | left | 4.56 | Control+ left | 1.69 ^{ns} |
| | | middle | 2.69 | Control+ middle middle | 1.0 ^{ns} |
| | | right | 2.80 | Control+ right | 0.56 ^{ns} |

** p ≤ 0.01 = significant, ns= nonsignificant

Table 15 Color rating L (L*a*b*) of lime fruits after subjecting to vapor heat treatment (VHT) of 93% RH maintain at temperature 46°C for 40 minute for 7 days and 14 days storage at 12 °C

| Replication | loading | Treatment | Average | T-test | T |
|--------------|---------|-----------|---------|-----------------|--------------------|
| Rep.1/7days | 100% | Control | 35.65 | | |
| | | left | 37.25 | Control+ left | 2.23 ^{ns} |
| | | middle | 36.54 | Control+ middle | 1.33 ^{ns} |
| | | right | 36.85 | Control+ right | 2.34 ^{ns} |
| Rep.2/7days | 100% | Control | 39.75 | | |
| | | left | 41.25 | Control+ left | 1.65 ^{ns} |
| | | middle | 42.52 | Control+ middle | 2.73 ^{**} |
| | | right | 37.42 | Control+ right | 2.52 ^{ns} |
| Rep.1/14days | 100% | Control | 53.69 | | |
| | | left | 51.15 | Control+ left | 2.24 ^{ns} |
| | | middle | 53.66 | Control+ middle | 0.02 ^{ns} |
| | | right | 54.56 | Control+ right | 0.84 ^{ns} |
| Rep.2/14days | 100% | Control | 53.69 | | |
| | | left | 52.43 | Control+ left | 1.24 ^{ns} |
| | | middle | 52.14 | Control+ middle | 1.47 ^{ns} |
| | | right | 56.66 | Control+ right | 2.88 ^{**} |

** p ≤ 0.01 = significant, ns= nonsignificant



Table 16 Color rating a (L*a*b*) of lime fruits after subjecting to vapor heat treatment (VHT) of 93% RH maintain at temperature 46°C for 40 minute for 7 days and 14 days storage at 12 °C

| Replication | loading | Treatment | Average | T-test | T |
|--------------|---------|-----------|---------|-----------------|--------------------|
| Rep.1/7days | 100% | Control | 6.14 | | |
| | | left | 5.87 | Control+ left | 1.92 ^{ns} |
| | | middle | 5.89 | Control+ middle | 2.21 ^{ns} |
| | | right | 5.80 | Control+ right | 2.71 ^{ns} |
| Rep.2/7days | 100% | Control | 5.40 | | |
| | | left | 5.34 | Control+ left | 0.32 ^{ns} |
| | | middle | 5.35 | Control+ middle | 0.29 ^{ns} |
| | | right | 5.19 | Control+ right | 1.54 ^{ns} |
| Rep.1/14days | 100% | Control | 1.22 | | |
| | | left | 2.00 | Control+ left | 1.58 ^{ns} |
| | | middle | 0.25 | Control+ middle | 1.91 ^{ns} |
| | | right | 0.13 | Control+ right | 1.92 ^{ns} |
| Rep.2/14days | 100% | Control | 1.22 | | |
| | | left | 1.36 | Control+ left | 0.30 ^{ns} |
| | | middle | 1.09 | Control+ middle | 0.22 ^{ns} |
| | | right | 1.91 | Control+ right | 5.23 ^{**} |

** p ≤ 0.01 = significant, ns= nonsignificant

Table 17 Color rating b (L*a*b*) of lime fruits after subjecting to vapor heat treatment (VHT) of 93% RH maintain at temperature 46°C for 40 minute for 7 days and 14 days storage at 12 °C

| Replication | loading | Treatment | Average After | T-test | T |
|--------------|---------|-----------|---------------|-----------------|--------------------|
| Rep.1/7days | 100% | Control | 21.19 | | |
| | | left | 22.80 | Control+ left | 1.43 ^{ns} |
| | | middle | 22.55 | Control+ middle | 1.45 ^{ns} |
| | | right | 22.20 | Control+ right | 1.01 ^{ns} |
| Rep.2/7days | 100% | Control | 27.99 | | |
| | | left | 31.88 | Control+ left | 2.72 ^{**} |
| | | middle | 29.76 | Control+ middle | 1.18 ^{ns} |
| | | right | 27.72 | Control+ right | 0.18 ^{ns} |
| Rep.1/14days | 100% | Control | 46.08 | | |
| | | left | 42.29 | Control+ left | 2.73 ^{**} |
| | | middle | 45.61 | Control+ middle | 2.35 ^{ns} |
| | | right | 45.83 | Control+ right | 0.19 ^{ns} |
| Rep.2/14days | 100% | Control | 46.08 | | |
| | | left | 44.38 | Control+ left | 1.35 ^{ns} |
| | | middle | 44.86 | Control+ middle | 0.87 ^{ns} |
| | | right | 50.15 | Control+ right | 3.11 ^{**} |

*p ≥ 0.01 = significant, ** p ≤ 0.01 = significant, ns= nonsignificant





Figure 1 General technique and procedure in fruit fly rearing: Fruit fly mass rearing room



Figure 2 General technique and procedure in disinfestation test: Preparation of fruit for artificial infestation



Figure 3 General technique and procedure in disinfestation test: Artificial infestation of test fruit with OFF eggs



Figure 4 General technique for performing vapor heat treatment: Monitoring of fruit center temperature



Figure 5 Cover the wound was secured before Lime were subjected to treatment and Separate varieties of lime



Figure 6 Cooling unit: 'Sanshu' Shower Cooling System (Differential Pressure Type), Model: SHS-12



Figure 7 Storage of control and treated fruits after treatment



Figure 8 Check results Lime testing to determine the mortality rate of egg stage insects. In the lime fruit Between Pean and Phichit 1 Varieties

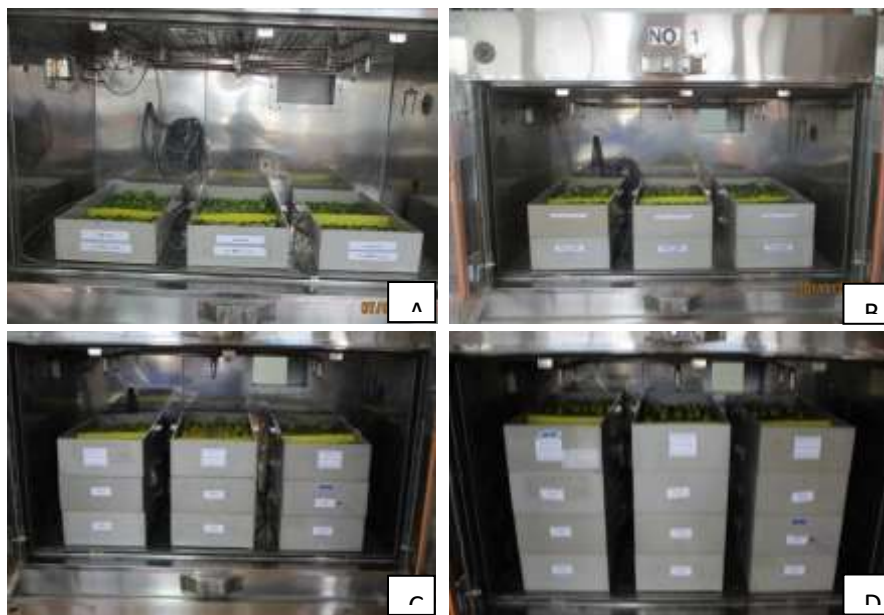


Figure 9 Capacity on 25% (A) 50% (B) 75% (C) and (D) at temperature 46°C for 40 minute

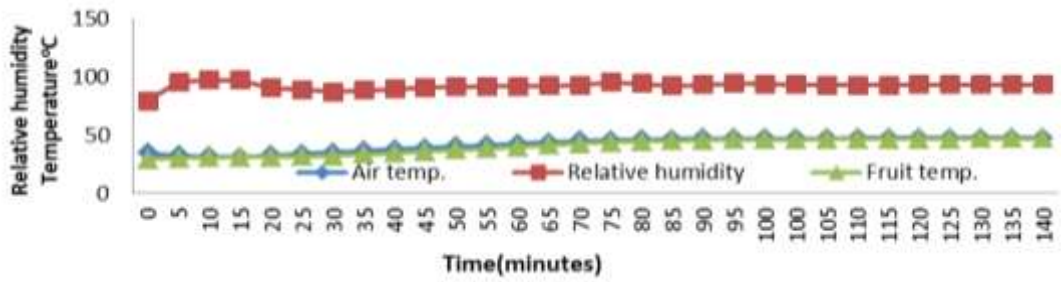


Figure 10 Vapor Heat Treatment of 25% loading capacity of lime

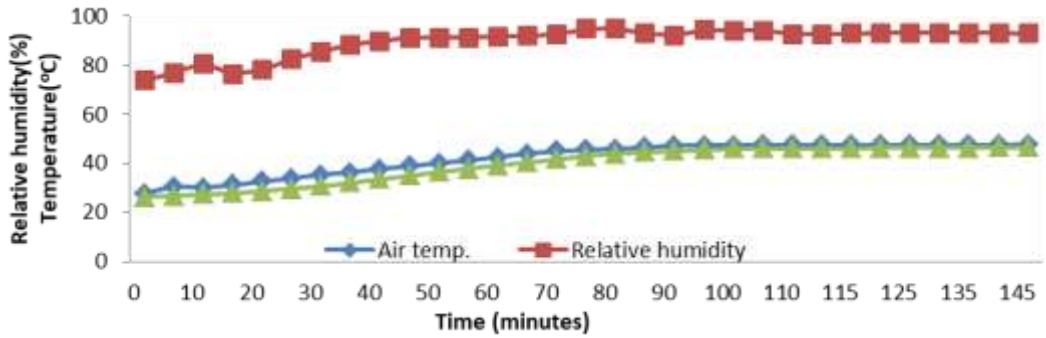


Figure 11 Vapor Heat Treatment of 50% loading capacity of lime

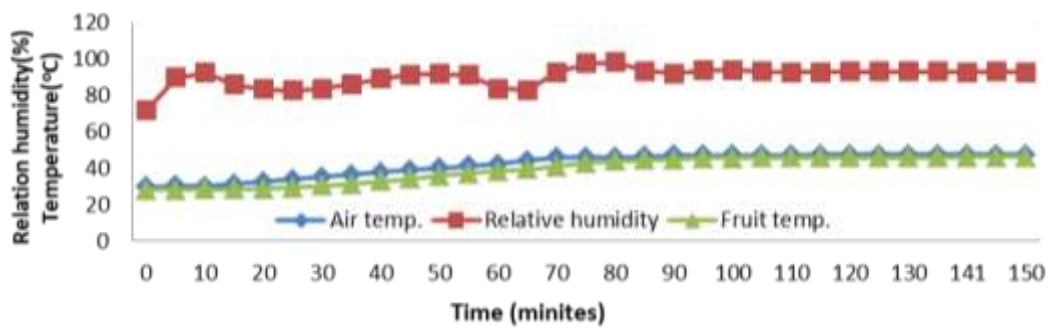


Figure 12 Vapor Heat Treatment of 75% loading capacity of lime

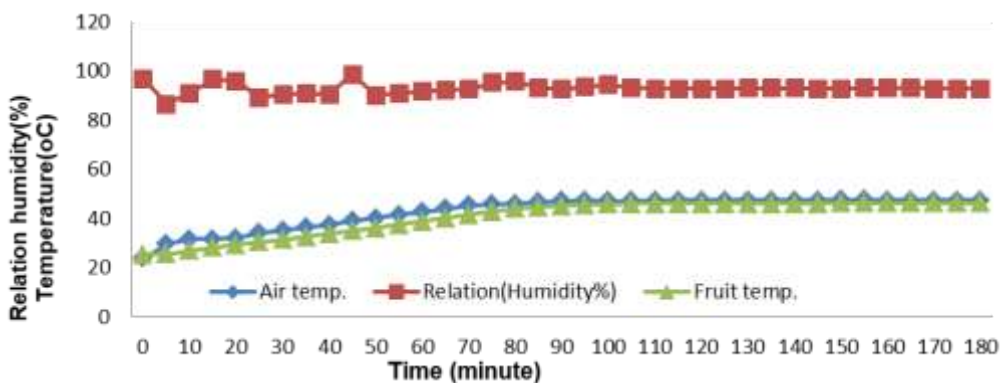


Figure 13 Vapor Heat Treatment of 100% loading capacity of lime



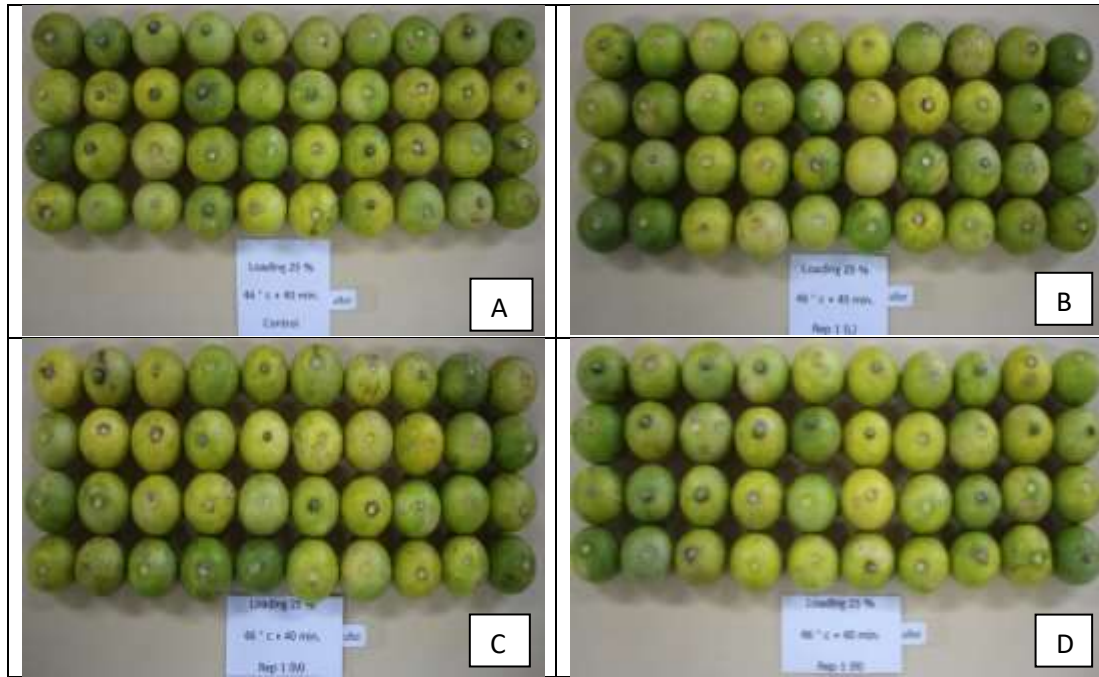


Figure 14 Quality of external lime 25% loading capacity after Vapor Heat Treatment maintain at temperature 46°C for 40 minute and kept in storage room at 12°C for 7 days, A =Control B=Left C=Middle D= Right

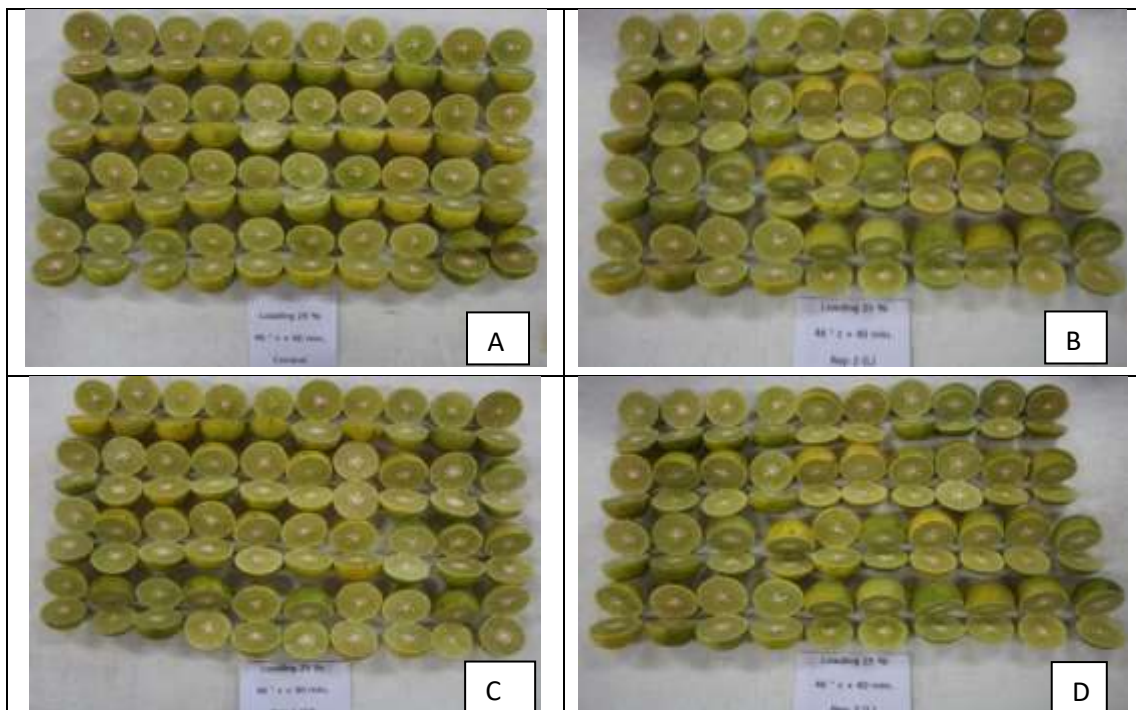


Figure 15 Quality of internal lime 25% loading capacity after Vapor Heat Treatment maintain at temperature 46°C for 40 minute and kept in storage room at 12°C for 7 days, A =Control B=Left C=Middle D= Right

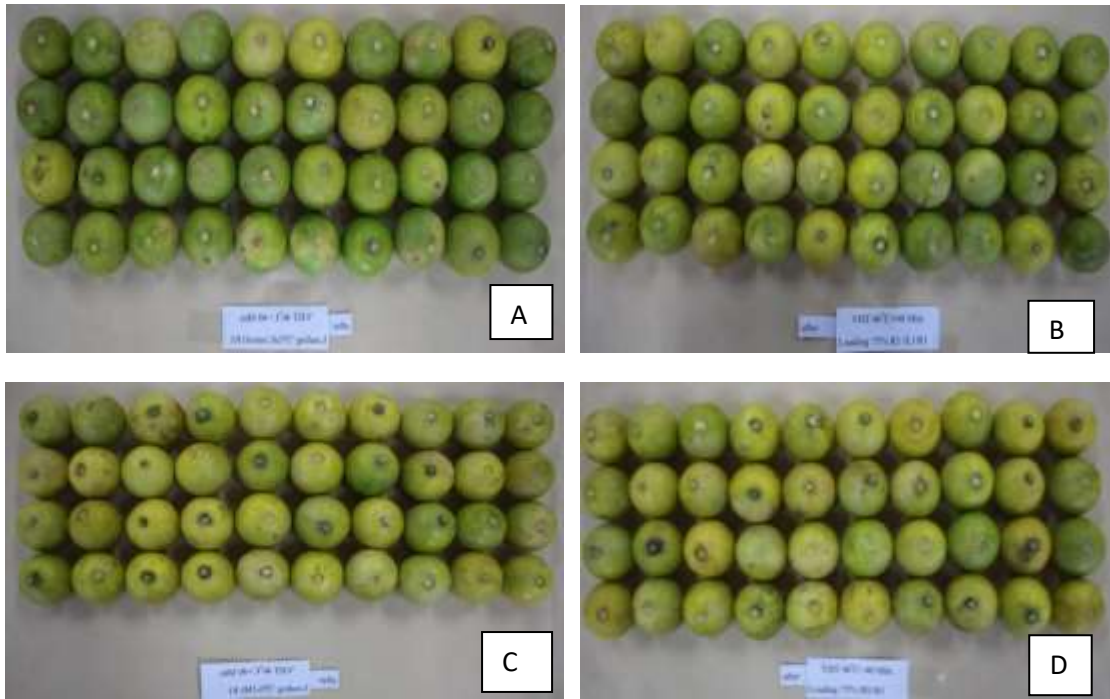


Figure 16 Quality of external lime 75% loading capacity after Vapor Heat Treatment maintain at temperature 46°C for 40 minute and kept in storage room at 12°C for 7 days, A =Control B=Left C=Middle D= Right

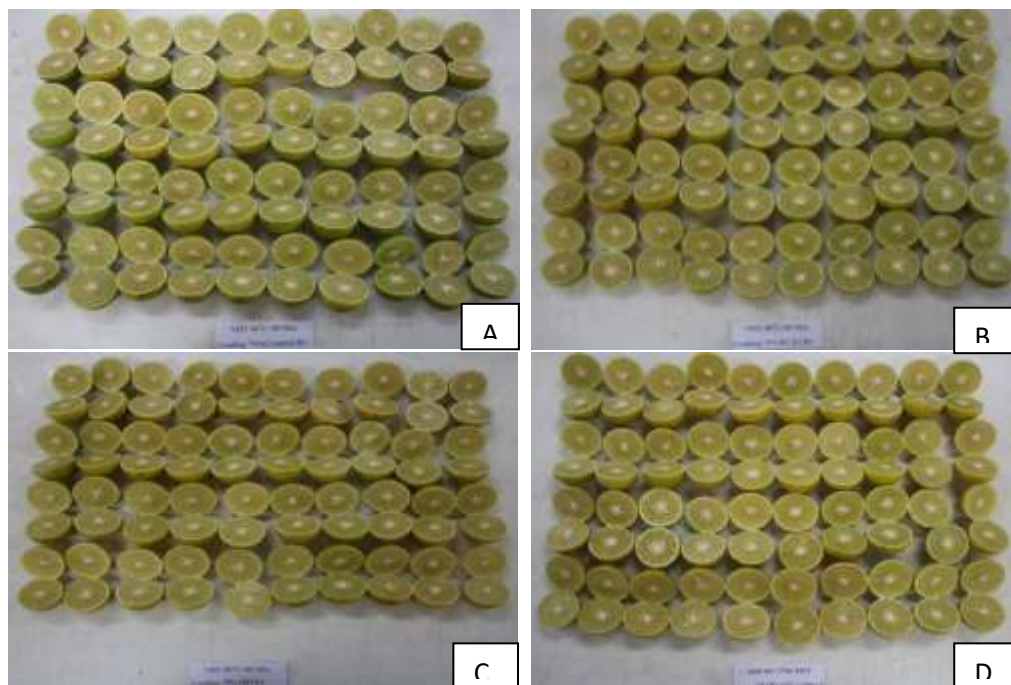


Figure 17 Quality of internal lime 75% loading capacity after Vapor Heat Treatment maintains at temperature 46°C for 40 minute and kept in storage room at 12°C for 7 days, A =Control B=Left C=Middle D= Right



Figure 18 Quality of external lime 100% loading capacity after Vapor Heat Treatment maintain at temperature 46°C for 40 minute and kept in storage room at 12°C for 7 days, A =Control B=Left C=Middle D= Right

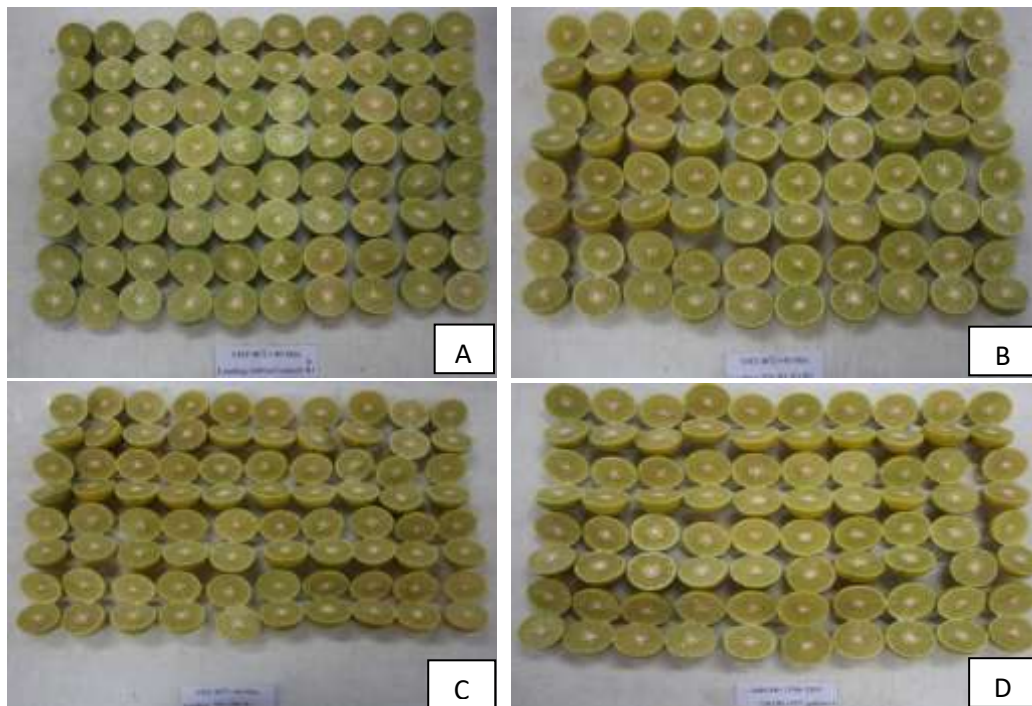


Figure 19 Quality of external lime 100% loading capacity after Vapor Heat Treatment maintain at temperature 46°C for 40 minute and kept in storage room at 12°C for 7 days, A =Control B=Left C=Middle D= Right



Figure 20 Injuries of lime after 50% loading capacity after Vapor Heat Treatment maintain at temperature 46°C for 40 minute and kept in storage room at 12°C for 7 days



Figure 21 Injuries of lime after 75% loading capacity after Vapor Heat Treatment maintain at temperature 46°C for 40 minute and kept in storage room at 12°C for 7 days

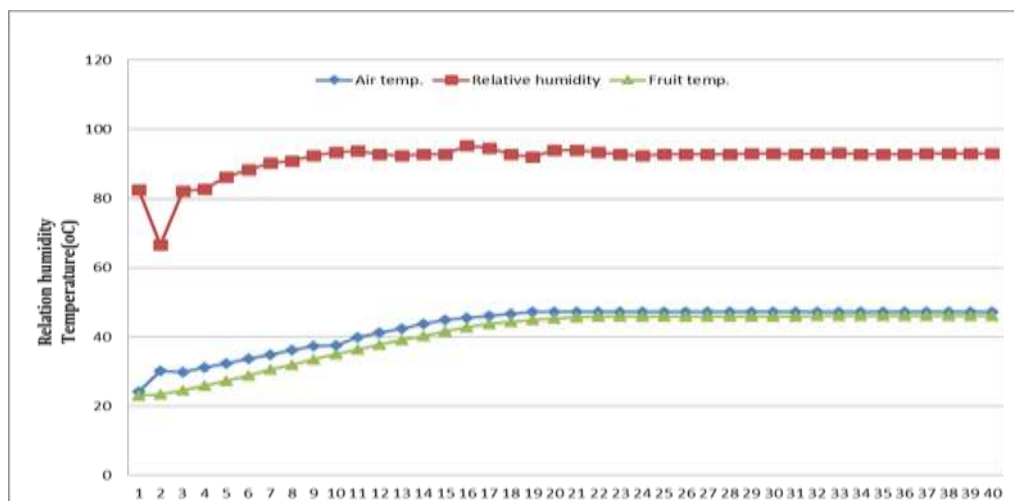


Figure 22 Temperature and relative humidity profile during vapor heat treatment (VHT)



Figure 23 Quality of lime fruits after subjecting to vapor heat treatment (VHT) of 93 % RH maintain at temperature 46°C for 40 minute for 7 days storage at 12 °C



Figure 24 Quality of lime fruits after subjecting to vapor heat treatment (VHT) of 93 % RH maintain at temperature 46°C for 40 minute for 14 days storage at 12 °C

วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้
Bactrocera dorsalis (Hendel) ในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามเพื่อการส่งออก
 Research and Development of Heated Air Quarantine Treatment for
 Pummelo (Tabtim Siam) Variety Control Fruit Flies for Export

ชัยรัตน์ สนศิริ มลนิภา ศรีมาตกริรมย์ สลักจิต พานคำ พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์
 พงษ์ศักดิ์ จิณฤทธิ์ ปวีณา บุษาทิเยน
 กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Currently, the vapor heat treatment schedule at 46 °C for 0:30 minutes was accepted as a quarantine treatment to disinfest all stages of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* species complex in pummelo cultivar Thong Dee form Thailand to Japan. To extend more variety of pummelo for Japan, the experiment was carried out to determine the heat tolerance of the first instar larvae of *B. dorsalis* (Hendel), the most tolerance stage to Modified Vapor Heat Treatment (MVHT) between Tubtim Siam and Thong Dee pummelo. The preliminary disinfestation test was to treat infested both pummelo cultivars with MVHT at 46 °C for 0:00, 0:10, 0:20 and 0:30 minutes respectively. The intermediate disinfestation test, infested with Tubtim Siam was subjected to MVHT at 46 °C for 0:00, 0:10 and 0:20 minutes respectively. MVHT was done by heating infested fruits with hot air from ambient temperature to 43 °C with 50-80 % RH (dry pre-heating period) then the fruits were gradually warmed up to 46 °C with saturated water vapor, and subsequently maintained the fruit target temperature for the desired duration holding time.

The results showed that oriental fruit fly first instar larvae infested in Tubtim Siam pummelo was less tolerance to MVHT than infested in Thong Dee pummelo. MVHT of fruit temperature 46 °C for 0:00 and 0:20 minutes was sufficient to completely kill all the oriental fruit fly first instar larvae in pummelo fruits. Intermediate disinfestation test, completely kill the oriental fruit fly first instar larvae

รหัสการทดลอง 03-04-59-03-01-00-07-62



in pummelo fruits at temperature 46 °C for 0:10 minutes. Large scale disinfestation test, complete mortality of the first instar larvae of the oriental fruit fly on fruits was achieved, when the infested fruits were heated with hot air at 50-80 % RH from ambient. In large scale efficacy test of this treatment schedule, none of the treated 39,384 first instar larvae survived.

The thermal injury was determined in Tubtim Siam pummelo. Fruits were treated with MVHT until fruit center temperature 46, 47 and 48 °C then fruits were maintained at these temperatures or greater for 0, 1 and 2 h. The thermal injury found black spot and damaged oil gland after treat at 48 °C for 2 h. The commercial export simulation test was determined in Tubtim Siam pummelo to assess the effect of proposed quarantine treatment schedule on fruit quality of pummelo under simulated condition of air and sea shipments. Fruits were treated with MVHT until fruit center temperature 46 °C for 30 minutes. The commercial export simulation test kept under air and sea shipment simulation tests showed no difference in fruit quality from untreated fruits.

Based on the experiment results, we proposed the MVHT at 46 °C for 0:30 minutes access as a quarantine treatment for Tubtim Siam pummelo before export to Japan.

Keywords : Fruit fly (*Bactrocera dorsalis*), Pummelo (Tubtim Siam variety), Modified vapour heat treatment

บทคัดย่อ

ส้มโอมีปัญหาในการส่งออกเนื่องจากเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางด้านกักกันพืชหลายประเทศออกมาตรการด้านสุขอนามัยพืชห้ามนำเข้าผลไม้จากประเทศไทย ดังนั้นหากมีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้แล้วจะทำให้ประเทศไทยสามารถขยายตลาดของส้มโอให้กว้างขวางมากยิ่งขึ้น การศึกษาวิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามเพื่อการส่งออก จากการสืบค้นข้อมูล พบว่า ใบเป็นรูปรีค่อนข้างกว้าง ใบมีขนาดใหญ่ ผลกลมรี มีขนาดใหญ่ น้ำหนักผล 900-2,500 กรัม เส้นรอบผล 16-22 นิ้ว หัวเป็นจีบ เปลือกผลบางสีเขียวเข้มและนิ่ม ผิวผลมีขนอ่อนนุ่มคล้ายกำมะหยี่ปกคลุม เนื้อกึ่งมีสีแดงเข้มหรือสีชมพูเข้ม รสชาติหวาน ไม่มีรสขมเจือปน มีเมล็ดน้อย การเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้สามารถเพาะเลี้ยงแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้มากกว่า 50,000 ตัว การปรับค่าความเที่ยงตรงของแท่งวัดอุณหภูมิ พบว่า แท่งวัดอุณหภูมิทั้งหมดสามารถคงอุณหภูมิที่ 46 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 99.9-100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงเวลานาน 20 นาที การศึกษา



ประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอ อบส้มโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10 และ 20 นาที พบว่า แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 มีอัตราการตายเฉลี่ย 99.85, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีขึ้นไป สามารถกำจัดหนอนวัย 1 ในผลส้มโอได้จำนวนประมาณ 6,078 ตัว ตายทั้งหมด การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลส้มโอ เพื่อประเมินความเสียหายต่อคุณภาพผลส้มโอ อบส้มโอที่อุณหภูมิ 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน พบว่า การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล ค่าความเป็นกรด และการเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน การเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส จะเปลี่ยนสีจากเดิมที่มีสีเขียว เปลี่ยนเป็นสีที่ค่อนข้างเหลืองมากกว่าส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน และส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 และ 47 องศาเซลเซียส โดยส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ยังพบจุดดำ ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากต่อมน้ำมันที่เปลือกของผลส้มโอแตก เมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิสูงและคงความร้อนไว้เป็นเวลานาน

การศึกษายืนยันประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอ เพื่อประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการอบไอน้ำในผลส้มโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยวิธีการใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอ และวิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอ พบว่า ส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 60 และ 20 ผล มีแมลงรอดชีวิต จำนวน 9,559 และ 3,542 ตัว ส้มโอที่ผ่านความร้อน จำนวน 180 และ 60 ผล ไม่พบแมลงรอดชีวิต ผลการประเมินประสิทธิภาพกระบวนการกำจัดแมลงวันผลไม้มุ่งกล่าวสามารถกำจัดหนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้จำนวนประมาณ 39,384 ตัว ในผลส้มโอตายทั้งหมด การศึกษาความเสียหายต่อคุณภาพผลส้มโอ เพื่อประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำในสภาพจำลองการส่งออกส้มโอทางเครื่องบินและทางเรือ โดยทำการอบส้มโอในรูปแบบเดียวกัน จากนั้นเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 และ 14 วัน พบว่า การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล ปริมาณกรด และการเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยคุณภาพความหวานของส้มโอไม่เปลี่ยนแปลง

คำหลัก : แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*, ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม, วิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

คำนำ

ปัญหาการกักกันพืชระหว่างประเทศนับวันจะยุ่งยากและสลับซับซ้อนเพิ่มขึ้น เนื่องจากการขยายตัวทางการค้าระหว่างประเทศอย่างรวดเร็ว การนำเข้าและส่งออกผักและผลไม้มีความเสี่ยงสูงที่แมลงศัตรูพืชร้ายแรงด้านกักกันพืชจะแพร่ระบาดจากประเทศหนึ่งไปยังอีกประเทศหนึ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งแมลงวันผลไม้ การวิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (plant quarantine



treatment) เพื่อใช้สำหรับกำจัดแมลงในผักและผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อ งานกักกันพืชระหว่างประเทศ เพราะช่วยให้สามารถส่งผักและผลไม้ออกจากแหล่งแพร่ระบาดของ แมลงวันผลไม้ได้ โดยปราศจากความเสียหายที่ศัตรูพืชร้ายแรงจะเล็ดลอดติดไปกับสินค้า (อุดร, 2541) การขยายตลาดของส้มโอจะทำให้เกษตรกรสามารถมีช่องทางในการจำหน่ายได้กว้างขวางมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับนโยบายของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในการช่วยเหลือเกษตรกรที่ได้รับผลกระทบ โดยส่งเสริมและผลักดันให้มีการส่งออกส้มโอเพิ่มมากขึ้น

สินค้าเกษตรที่สำคัญของประเทศไทยหลายชนิดไม่สามารถส่งออกไปจำหน่ายยังประเทศที่ เข้มงวดทางด้านกักกันพืช เนื่องจากประเทศไทยเป็นแหล่งแพร่ระบาดของโรคและศัตรูพืชที่สำคัญ ทางด้านกักกันพืช ประเทศไทยมีแมลงวันผลไม้หลายชนิดแพร่ระบาด แต่ที่มีความสำคัญทางด้าน กักกันพืชมี 2 ชนิด ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และแมลงวันแตง *B. cucurbitae* ซึ่งมีความสำคัญทางด้านกักกันพืชระหว่างประเทศ (White and Elson-Harris, 1992; Iwaizumi, 2004) ส้มโอเป็นสินค้าเกษตรที่สำคัญชนิดหนึ่ง ส้มโอ *Citrus maxima* Merr. วงศ์ Rutaceae เป็นหนึ่งใน ผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยปลูกมากในพื้นที่จังหวัดนครปฐม สมุทรสงคราม สมุทรสาคร กาญจนบุรี ราชบุรี นครนายก ปราจีนบุรี พิจิตร สุโขทัย ชัยนาท ชัยภูมิ เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง และสุราษฎร์ธานี โดยเฉพาะส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามปลูกมากในพื้นที่ อำเภอบางแพ จังหวัด นครศรีธรรมราช และมีแนวโน้มที่เกษตรกรจะขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้น ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมี รสชาติหวานหอม เนื้อสีแดงนุ่ม นำรับประทาน ราคาสูง และตลาดต่างประเทศมีความต้องการเป็น อย่างมาก ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น สาธารณรัฐประชาชนจีน ไต้หวัน ฮองกง เวียดนาม และกัมพูชา (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2559) ส้มโอเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางด้านกักกัน พืชระหว่างประเทศ ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ด้วยเหตุนี้ส้มโอจากประเทศไทยจึงถูกห้าม นำเข้าประเทศญี่ปุ่นภายใต้เงื่อนไขข้อกำหนดของกฎหมายทางด้านกักกันพืช ซึ่งจะถูกยกเลิกไปหาก ประเทศไทยสามารถพัฒนาวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานของวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช เพื่อ ใช้สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอก่อนการส่งออก แต่อย่างไรก็ดีการส่งออกส้มโอไปจำหน่ายยัง ตลาดต่างประเทศ ประเทศไทยจำเป็นต้องยึดหลักการตามข้อตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการ สุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures: SPS agreement) เนื่องมาจากประเทศไทยได้จัดทำข้อตกลงเขตการค้าเสรี (free trade area, FTA) กับหลายประเทศ โดยเฉพาะประเทศที่มีความเข้มงวดทางด้านกักกันพืช อาทิเช่น ประเทศญี่ปุ่น สาธารณรัฐเกาหลี นิวซีแลนด์ และไต้หวัน เป็นต้น ส้มโอเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* species complex ซึ่งแมลงวันผลไม้ชนิดนี้จัดเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางด้านกักกัน พืช (White and Elson-Harris, 1992; CABI, 2014) แมลงวันผลไม้เป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของผลไม้ หลายชนิด พบระบาดอยู่ทั่วโลก ทั้งในเขตนานู เขตอบอุ่น และเขตร้อน (Shimizu *et al.*, 2007; Jennifer and Gillett-Kaufman, 2012) รวมทั้งประเทศไทย (มนตรี, 2544; CABI, 2014) ในพื้นที่ ภาคกลางและภาคเหนือ แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีพืชอาหารจำนวนมากถึง 123 ชนิด โดยเฉพาะ



ผลไม้เปลือกบางหรืออ่อนนุ่มจะถูกทำลายได้ง่าย การเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้เกิดจากตัวเต็มวัยเพศเมียจะใช้อวัยวะวางไข่ (ovipositor) แทงลงใต้ผิวของผลไม้เพื่อวางไข่ เมื่อไข่ฟักเป็นตัวหนอนจะขอนไช กัดกินเนื้อภายในผลไม้ทำให้เน่าเสีย ซึ่งการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้สามารถเข้าทำลายได้ตั้งแต่อยู่ในแปลงปลูก (กรมวิชาการเกษตร, 2556; Thomas, 2004; Jennifer and Gillett-Kaufman, 2012) การทำลายอาจรุนแรงมากถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หากไม่มีการป้องกันกำจัด ตามข้อตกลงของการอนุญาตการนำเข้าพืชผักและผลไม้ของประเทศญี่ปุ่น ประเทศไทยจำเป็นต้องดำเนินการตามมาตรฐานขั้นตอนการยกเลิกห้ามการนำเข้าสิ่งต้องห้ามที่เป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ (standard procedure for lifting import ban of prohibited host plants of fruit flies) ของกระทรวงเกษตรป่าไม้และประมงญี่ปุ่น (ministry of agriculture, forestry and fisheries, MAFF) โดยมีขั้นตอนที่สำคัญคือกำหนดให้การขออนุญาตการนำเข้าสิ่งต้องห้ามที่เป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ต้องยื่นเสนอแผนการศึกษาวิจัยการกำจัดแมลงวันผลไม้ก่อนการส่งออกให้กับ MAFF พิจารณาตรวจสอบและให้ความเห็นชอบก่อน การวิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ต้องเป็นไปตามขั้นตอนที่กำหนดและมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งได้มาตรฐานตามวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (MAFF, 2010; Miyazaki, 2010)

ในปี พ.ศ. 2529 กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ประสบความสำเร็จในการวิจัยพัฒนาวิธีการอบไอน้ำ (vapor heat treatment, VHT) ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ จำนวน 2 ชนิด คือ oriental fruit fly, *B. dorsalis* และ melon fly, *B. cucurbitae* ในผลมะม่วงพันธุ์หนังกกลางวัน (Unahawutti *et al.*, 1986) ต่อมาได้มีการวิจัยพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (modified vapor heat treatment, MVHT) ที่อุณหภูมิตั้งที่ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที มีประสิทธิภาพสูงสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะม่วง (*Mangifera indica* Linn.) ครอบคลุมถึง 4 พันธุ์ คือ พันธุ์หนังกกลางวัน น้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลมะม่วง (Unahawutti *et al.*, 1991) หลังจากนั้นได้ทำการวิจัยพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนโดยใช้วิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะม่วงพันธุ์มหาชนก เขียวเสวย และโชคอนันต์ ซึ่งในปี พ.ศ. 2549 และ 2559 กระทรวงเกษตรป่าไม้และประมงญี่ปุ่นได้อนุญาตให้มีการนำเข้ามะม่วงเพิ่มเติมอีก 3 พันธุ์ ดังกล่าว (Intarakumheng *et al.*, 2006; Intarakumheng *et al.*, 2013) ในปี พ.ศ. 2545 ประสบความสำเร็จในการวิจัยพัฒนาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์มีประสิทธิภาพสูงสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) ที่อุณหภูมิตั้งที่ 46 องศาเซลเซียส นาน 58 นาที สามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* species complex จำนวน 4 ชนิด คือ *B. carambolae*, *B. dorsalis*, *B. papayae*, และ *B. pyrifoliae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Unahawutti *et al.*, 1999) ต่อมาได้ศึกษาวิจัยและพัฒนาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์มีประสิทธิภาพสูงสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *B. dorsalis* species complex จำนวน 4 ชนิด ในผลส้มโอ (*Citrus maxima* (Burman) Merr.) พันธุ์ทองดีได้เป็นผลสำเร็จ ที่อุณหภูมิตั้งที่ 46



องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (อุตร และคณะ 2549) และได้ส่งรายงานผลการศึกษาวิจัยวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ดังกล่าวให้กับกระทรวงเกษตรป่าไม้และประมงญี่ปุ่นพิจารณา ซึ่งในช่วงต้นปี พ.ศ. 2555 กระทรวงเกษตรป่าไม้และประมงญี่ปุ่นได้อนุญาตให้มีการนำเข้าส้มโอพันธุ์ทองดีจากประเทศไทยเข้าไปจำหน่ายในประเทศญี่ปุ่นได้อีกหนึ่งชนิด (Unahawutti *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการศึกษาวิจัยและพัฒนาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์มีประสิทธิภาพสูงสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมังคุด จำนวน 3 ชนิด คือ *B. dorsalis*, *B. carambolae* และ *B. papayae* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ชัยฉัตรน และคณะ 2562; 2563) และได้ส่งรายงานผลการศึกษาวิจัยให้กับทางสำนักงานกักกันและตรวจสอบสุขอนามัยพืชและสัตว์ไต้หวัน (bureau of animal and plant inspection and quarantine, BAPHIQ) พิจารณา โดยเมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม 2562 สำนักงานกักกันและตรวจสอบสุขอนามัยพืชและสัตว์ไต้หวัน อนุญาตให้มีการนำเข้าผลมังคุดสดจากประเทศไทยเข้าไปจำหน่ายในประเทศไต้หวัน ซึ่งทำให้ประเทศไทยประสบผลสำเร็จสามารถส่งออกมังคุดไปประเทศไต้หวันได้เป็นครั้งแรกในรอบ 16 ปี (Sonsiri *et al.*, 2015) ในปัจจุบันประเทศไทยได้มีการสร้างโรงงานอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนขนาดใหญ่ระดับการค้ากันอย่างแพร่หลาย โดยใช้กรรมวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ในการอบมะม่วง มังคุด และส้มโอ เพื่อการส่งออกไปประเทศญี่ปุ่น สาธารณรัฐเกาหลี นิวซีแลนด์ และไต้หวัน โดยยึดหลักการตามเงื่อนไขและข้อกำหนดของแต่ละประเทศ (มลณีภา, 2550; 2552; 2554; 2555; Srimartpirom, 2010)

การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้วิธีการอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ได้มีการศึกษาวิจัยกันอย่างแพร่หลายในต่างประเทศ เพราะสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้หลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังปลอดภัยจากสารพิษตกค้างภายในผลจึงผ่านการยอมรับได้โดยง่ายจากประเทศผู้นำเข้า ส้มโอเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีศักยภาพสูงในการส่งออกแต่ส้มโอเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องดำเนินการวิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนกรรมวิธีอบไอน้ำ ตามขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพและได้มาตรฐานตามวิธีการกำจัดศัตรูพืชทางด้านกักกันพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แมลงที่ใช้ในการทดลองคือแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis*
2. พืชที่ใช้ในการทดลอง ผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม *C. maxima*
3. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง
4. ตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็ก: “Sanshu” vapor heat treatment system (differential pressure type) รุ่น EHK-1000B และ EHK-1000D, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan



5. เครื่องลดอุณหภูมิผลไม้: “Sanshu” shower cooling system (differential pressure type) รุ่น SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan
6. เครื่องอ่างน้ำร้อน (water bath; Yamato, model: DK-43)
7. พรอทวัดความร้อนมาตรฐาน (standard thermometer)
8. ที่เจาะรู (cock borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร
9. กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
10. เครื่องใช้ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ เช่น จานทดลอง (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร กระจับพลาสติก และอุปกรณ์อื่นๆ เช่น ปิเปต (pipettes) หลอดทดลอง (test tube) บีกเกอร์ (beaker) หลอดหยด (dropper) ปากคีบ (forceps) ผ้ามีสลิน กระดาษกรองสีดำ ฟู่กัน หนั่งยาง และผ้าขาวบาง

วิธีการ

1. สืบค้นฐานข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์ชีววิทยาของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามเพื่อใช้ในการทดลอง

โดยการสืบค้นข้อมูลทางเว็บไซต์ของกรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร และจากแหล่งข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ซึ่งได้จัดหาและคัดเลือกส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามเพื่อนำมาใช้ในการทดลองในขั้นตอนของการกำจัดแมลงด้วยความร้อนและขั้นตอนของการประเมินความเสียหายต่อความร้อน จากอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช ใช้ผลส้มโอน้ำหนัก 1,100-1,300 กรัม/ผล (ส้มโอขนาดกลาง) นำมาเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นของกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช เพื่อรักษาคุณภาพของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามและนำมาใช้ในขั้นตอนของการทดลองต่อไป

โดยน้ำหนักผลของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามที่ใช้ในการทดลอง แบ่งน้ำหนักได้ดังนี้

| | | |
|-------------|-----|---------------|
| Small size | (S) | 900-1,100 g |
| Medium size | (M) | 1,100-1,300 g |
| Large size | (L) | 1,300-1,500 g |

2. แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ใช้ในการทดลอง

2.1 แหล่งที่มาของแมลงวันผลไม้

แมลงวันผลไม้ที่ใช้ในการทดลองได้มาจากแมลงวันผลไม้ที่เข้าทำลายผลมะเฟือง ในพื้นที่อำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอหัวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช และอำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง โดยทำการรวบรวมและเลี้ยงจนเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัย จากนั้นจะคัดแยกชนิดอย่างละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คัดแยกเอาเฉพาะแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* แล้วจึงนำแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยไปเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการและเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นโดยใช้การเลี้ยงด้วยอาหารเทียม (artificial diet) ที่ห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้ ของกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร



2.2 เทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์แมลงวันผลไม้

แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดใช้เทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ตามวิธีการของ Watanabe *et al.*, (1973) และอุตร (2541)

สภาพห้องเลี้ยงแมลง: ห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้เป็นห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้นและแสงสว่าง (Figure 1) ห้องเลี้ยงแมลงมีขนาด 3.5x4.6x2.3 เมตร อุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65 ± 5 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่างภายในห้องได้จากหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent lights) จำนวน 20 หลอด ติดตั้งบนเพดานห้องเลี้ยงแมลง มีระยะรอบของความมืดและสว่าง (light-dark cycle) เป็น 12:12 ชั่วโมง ไฟจะสว่างในช่วงเวลา 6:00-18:00 นาฬิกา ภายในห้องเลี้ยงแมลงติดหลอดไฟขนาด 15 วัตต์ จำนวน 1 หลอด ให้แสงสลัว (dim light) เป็นเวลานาน 15 นาที ก่อนและหลังที่ไฟในห้องเลี้ยงแมลงจะสว่างเพื่อช่วยกระตุ้นให้แมลงวันผลไม้ผสมพันธุ์

ตัวเต็มวัย: เลี้ยงแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยกรงใหญ่ จำนวนประมาณ 20,000 ตัว/กรง และกรงเล็ก จำนวนประมาณ 2,000 ตัว/กรง กรงเลี้ยงแมลงมีขนาด 65.5x69.0x77.0 เซนติเมตร และ 35x50x35 เซนติเมตร ทำด้วยมุ้งลวดตาข่ายอลูมิเนียมขนาด 16 เมช ภายในกรงมีจานพลาสติกบรรจุอาหารสำหรับตัวเต็มวัย ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมโดยน้ำหนักดังนี้ น้ำตาล 10 ส่วน เอ็นไซม์โปรตีนไฮโดรไลเซส (enzymatic protein hydrolysate; Amber series 100) 1 ส่วน และยีสต์เอ็กแทรค (yeast extract) 1 ส่วน การให้น้ำจะใช้ขวดพลาสติกทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 เซนติเมตร สูง 7.5 เซนติเมตร ฝาขวดเจาะรูขนาด 1 มิลลิเมตร จำนวน 3 รู วิธีให้น้ำจะคว่ำขวดน้ำลงบนกระดาษกรองซึ่งวางอยู่บนหลังกรงเลี้ยงแมลง หลังจากเลี้ยงแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยครบ 6 สัปดาห์ แมลงที่เหลือในกรงทั้งหมดจะถูกนำไปทำลายและทำความสะอาดกรงเลี้ยงแมลง เพื่อเตรียมไว้สำหรับใส่แมลงในรุ่นต่อไป ในระหว่างการทดลองจะต้องมีแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยอายุต่างๆ กันเพื่อเตรียมไว้ใช้ในการทดลอง กรงใหญ่ไม่น้อยกว่า 5 กรง และกรงเล็กไม่น้อยกว่า 10 กรง

วิธีการเก็บไข่: เก็บไข่แมลงวันผลไม้เมื่อตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 15 วัน โดยใช้กระบอกพลาสติก ขนาด 7x17 เซนติเมตร ด้านข้างเจาะรูขนาด 0.4 มิลลิเมตร ประมาณ 80-100 รู (Figure 2) เพื่อให้แมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยเพศเมียแทงอวัยวะวางไข่ผ่านรูจากด้านข้างเข้าไปวางไข่ภายในกระบอกพลาสติกในการเก็บไข่แต่ละครั้งจะใส่น้ำส้มประมาณ 30 มิลลิลิตร ไว้ในกระบอกเก็บไข่เพื่อกระตุ้นให้แมลงมาวางไข่ในขณะเดียวกันยังจะให้ความชื้นภายในกระบอกพลาสติกป้องกันไม่ให้ไข่ของแมลงแห้งและแตก รวบรวมไข่แมลงด้วยวิธีเติมน้ำสะอาดในกระบอกพลาสติกเก็บไข่แล้วเขย่าเบาๆ เพื่อให้ไข่ที่ติดอยู่ด้านข้างภายในกระบอกหลุด ใช้ผ้ามีสลินขนาด 150 เมช แยกไข่ออกจากน้ำส้ม รวบรวมไข่ทั้งหมดที่ได้ใส่ในน้ำกลั่นเก็บไว้ในถ้วยแก้ว (beaker) ขนาด 200 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำไข่ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเทียมพร้อมทั้งตรวจหาอัตราการฟักไข่ด้วยวิธีสุ่มไข่จำนวน 100 ฟอง วางไข่ให้กระจายเป็นแถวราบบนกระดาษกรองสีดำที่ชุ่มน้ำเก็บไว้ในจานแก้ว (petri-dish) ตรวจนับจำนวนไข่ที่ฟักเป็นตัวหนอน 2 วัน

ระยะหนอน: เลี้ยงหนอนแมลงวันผลไม้ด้วยอาหารเทียมบนสูตรข้าวโพดป่น อาหารเทียมสำหรับระยะหนอนประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้ข้าวโพดบด 50 กรัม กระดาษชำระ 3 กรัม น้ำกลั่น 85 มิลลิเมตร น้ำตาล 5 กรัม brewer's yeast 5 กรัม butyl p-hydroxybenzoate 0.15 กรัม HCl (conc.) 0.2 มิลลิเมตร นำอาหารเทียมประมาณ 900 กรัม ใส่ในภาดพลาสติกขนาด 23x32x5 เซนติเมตร ตัดกระดาษชำระขนาด 5.5x11.0 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น วางไว้บนอาหารเทียม ใช้หลอดดูดขนาด 1 มิลลิเมตร ตวงไข่จำนวน 0.4 มิลลิเมตร แล้วนำไปวางบนกระดาษชำระ กลี๋ยไข่ด้วยฟุ้งกันให้กระจายทั่ว ๆ กันบนกระดาษชำระ ด้วยวิธีการนี้จะช่วยให้หนอนไม่แก่งแย่งอาหารกันเมื่อฟักออกจากไข่ ปิดภาดอาหารเทียมด้วยภาดเปล่าอีกหนึ่งใบ เพื่อให้ภายในมีความชื้น ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นมากสำหรับไข่จะฟักออกเป็นหนอน นำภาดอาหารเก็บไว้ในห้องเลี้ยงแมลงจนกระทั่งหนอนเจริญเติบโตเต็มที่

ระยะดักแด้: หนอนแมลงวันผลไม้เจริญเติบโตเต็มที่พร้อมที่จะเข้าดักแด้ภายใน 6 วัน เปิดฝาครอบภาดอาหารเทียม และย้ายไปวางไว้ในภาชนะสำหรับให้แมลงเข้าดักแด้ ซึ่งเป็นกระบะพลาสติกขนาด 43x74x23 เซนติเมตร ภายในบรรจุขี้เลื่อย ขนาด 20 เมช พรมน้ำให้ขึ้นพอประมาณสำหรับให้หนอนเข้าดักแด้ หนอนวัย 3 ที่เจริญเติบโตเต็มที่พร้อมจะเข้าดักแด้จะติดตัวออกจากอาหารเทียมและเข้าดักแด้ในขี้เลื่อย ก่อนที่ดักแด้จะออกเป็นตัวเต็มวัยประมาณ 2 วัน ใช้ตระแกรงขนาด 20 เมช ร่อนแยกเอาดักแด้ออกจากขี้เลื่อย คัดดักแด้ที่ไม่สมบูรณ์หรือตายทิ้งให้หมด นำดักแด้ที่สมบูรณ์จำนวนประมาณ 20,000 และ 2,000 ดักแด้ ใส่ในภาดพลาสติก ขนาด 23x32x5 เซนติเมตร แล้วนำไปวางไว้ในกรงเลี้ยงแมลงที่เตรียมไว้รอให้ออกเป็นตัวเต็มวัย

การควบคุมคุณภาพแมลง: แมลงวันผลไม้ซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการจะต้องมีความแข็งแรงเพื่อที่ข้อมูลจากผลการศึกษาวิจัยจะได้ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของแมลงเป็นประจำ โดยในการเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่นจะตรวจสอบอัตราการฟักไข่ (hatching rate) อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) น้ำหนักของดักแด้ และอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio)

3. วิธีเตรียมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 สำหรับใช้ในการทดลอง

ส้มโอที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ผลส้มโอมีขนาดกลางน้ำหนัก 1,100-1,300 กรัม/ผล โดยตรวจสอบสภาพความผิดปกติของผลส้มโอ ซึ่งส้มโอทุกผลต้องไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือรอยแตกบนผล

3.1 การเตรียมแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1

เก็บไข่จากแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการตามวิธีการข้างต้น รวบรวมไข่ที่ได้วางไว้บนผ้าที่ชุ่มน้ำ เก็บไว้ในกล่องพลาสติกขนาด 12x18x4.5 เซนติเมตร แล้วนำไปไว้ในห้องเลี้ยงแมลงเป็นเวลา 2 วัน เมื่อไข่ฟักออกเป็นหนอนวัย 1 ใช้ตะแกรงขนาด 80 เมช ร่อนแยกหนอนวัย 1 ออกจากเปลือกไข่ ย้ายหนอนวัย 1 ใส่ในน้ำกลั่น เก็บไว้ในถ้วยแก้ว (beaker) ขนาด 200 มิลลิลิตร ใช้



หลอดดูดสารละลาย (dropper) ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดหนอนวัย 1 นำไปใส่ไว้ในจานแก้ว (petri-dish) ขนาด 10x2 เซนติเมตร พร้อมทั้งนับหนอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2 การเตรียมส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามให้มีแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 อยู่ภายในผล

เก็บไข่จากแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ตัวเต็มวัยซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการตามวิธีการข้างต้น รวบรวมไข่ที่ได้วางไว้บนผ้าที่ชุ่มน้ำ เก็บไว้ในกล่องพลาสติกขนาด 12x18x4.5 เซนติเมตร แล้วนำไปไว้ในห้องเลี้ยงแมลงเป็นเวลา 2 วัน เมื่อไข่ฟักออกเป็นหนอนวัย 1 ใช้ตะแกรงขนาด 80 เมช ร่อนแยกหนอนวัย 1 ออกจากเปลือกไข่ ย้ายหนอนวัย 1 ใส่ในน้ำกลั่น เก็บไว้ในถ้วยแก้ว (beaker) ขนาด 200 มิลลิลิตร ใช้หลอดดูดสารละลาย (dropper) ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดหนอนวัย 1 นำไปใส่ไว้ในจานแก้ว (petri-dish) ขนาด 10x2 เซนติเมตร พร้อมทั้งนับหนอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Figure 3) ใช้ฟูกันเชื้อหนอนวัย 1 ให้รวมกันเป็นกลุ่มๆ ละ 200 ตัว ในการทดลองใช้ส้มโอขนาดกลาง น้ำหนัก 1,100-1,300 กรัม/ผล ใช้ที่เจาะรู (cock borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร เจาะรูบนผลส้มโอจำนวน 3 รู ให้ลึกจนถึงกึ่งกลางผล รูที่ 1 เจาะตรงตำแหน่งขั้วผลให้ทะลุแกนกลางผล (Figure 4) รูที่ 2 เจาะด้านตรงกันข้ามกับรูที่ 1 ส่วนรูที่ 3 เจาะบริเวณด้านข้างผลให้อยู่เลยจากส่วนครึ่งบนของผล (Figure 5) สำหรับเหตุผลในการเจาะรูที่ 2 ตรงบริเวณส่วนใต้ของผลนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ของเหลวที่เกิดขึ้นจากการกินของหนอนแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอสามารถไหลออกมาได้ ซึ่งจะทำให้ภายในผลส้มโอมีสภาพเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหนอนแมลงวันผลไม้ ดึงแกนกลางซึ่งติดกับปลายที่เจาะรูออกจากผล จากนั้นแคะเมล็ดภายในผลส้มโอออกให้หมด ซึ่งพร้อมที่จะใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอ จำนวน 200 ตัว/ผล โดยใส่หนอนวัย 1 ลงบนเนื้อส้มโอภายในผลตรงบริเวณที่เจาะรูไว้ทางด้านข้าง อุดรูทั้งหมดด้วยสำลีปิดด้วยเทปกาว เพื่อป้องกันไม่ให้หนอนวัย 1 เล็ดลอดออกจากผล

4. รูปแบบของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ในการทดลองทั้งหมดใช้เครื่องตู้อบความร้อนกำลังแมลงวันผลไม้ขนาดเล็กสำหรับทดลองจำนวน 2 เครื่อง (Figure 6) ใช้ส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) น้ำหนัก $1,200 \pm 25$ กรัม/ผล จำนวน 3 ผล วางไว้ในกระบะชั้นล่างสุด ซึ่งใช้เป็นตัวแทนแสดงอุณหภูมิของส้มโอทั้งหมดภายในเครื่องตู้อบความร้อน เมื่อส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ จำนวน 3 ผล มีอุณหภูมิคงอยู่ที่ 46 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาตามที่กำหนด แสดงว่าขณะนั้นส้มโอทดลองทั้งหมดในเครื่องตู้อบความร้อนมีอุณหภูมิอยู่ในระดับเดียวกันกับส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ

การอบส้มโอด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (modified vapor heat treatment, MVHT) เป็นกรรมวิธีที่ให้ความร้อนกับส้มโอโดยอาศัยวิธีอบไอน้ำ (vapor heat treatment, VHT) ร่วมกับวิธีอบอากาศร้อน (hot air treatment, HAT) โดยช่วงแรกจะให้ความร้อนกับส้มโอด้วยวิธีอบอากาศร้อน (HAT) อากาศร้อนที่หมุนเวียนภายในตู้อบความร้อนผ่านส้มโอจะมีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 50-80 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิในผลส้มโอเพิ่มขึ้นถึง 43 องศาเซลเซียส แล้วจึงปรับเปลี่ยนเป็นวิธีอบไอน้ำ (VHT) ซึ่งอากาศร้อนจะอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ



(saturated condition) ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิผลส้มโอถึง 46 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง (เซ็นเซอร์กำหนดอุณหภูมิผลส้มโอ (sensor fruit) จะต้องอ่านค่าได้ 46 องศาเซลเซียส ทั้ง 3 เส้น) ขณะอบส้มโอทำการบันทึกอุณหภูมิ ความชื้น และระยะเวลาในการอบส้มโอ จากเครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้น (hybrid recorder) ของเครื่องตู้อบความร้อน ตามค่าที่กำหนดไว้ (อุตร, 2541; อุตร และคณะ, 2549; Unahawutti *et al.*, 2006)

ซึ่งแบบแผนของการเพิ่มอุณหภูมิภายในเครื่องตู้อบความร้อน (pattern MVHT test for pummelo) ที่ใช้ในการทดลองในผลส้มโอนี้ทั้งหมดใช้แผนวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ดังนี้

| Pattern MVHT test for pummelo | | | | | |
|-------------------------------|------|------|------|-------|-------|
| Temperature (°C) | 30.0 | 30.0 | 43.0 | 47.0 | 47.0 |
| Time (h) | 0:00 | 0:10 | 0:10 | 0:10 | 10:00 |
| Humidity RH (%) | 51.0 | 51.0 | 95.0 | 95.0 | |
| Time (h) | 0:00 | 5:00 | 0:10 | 10:00 | |

5. เครื่องตู้อบความร้อนและการปรับค่าความเที่ยงตรงของแท่งวัดอุณหภูมิ

ดำเนินการด้วยเครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็กสำหรับทดลอง จำนวน 2 เครื่อง ก่อนที่จะเริ่มทำการทดลอง แท่งวัดอุณหภูมิที่ติดตั้งภายในเครื่องตู้อบความร้อนทั้งหมดจะต้องนำมาตรวจสอบความเที่ยงตรง และปรับค่าความคลาดเคลื่อนอุณหภูมิที่วัดได้ของแท่งวัดอุณหภูมิแต่ละแท่ง (calibration sensor) โดยตรวจสอบเปรียบเทียบกับปรอทวัดความร้อนมาตรฐาน (standard thermometer) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ จุ่มแท่งวัดอุณหภูมิทั้งหมดรวมทั้งปรอทวัดความร้อนมาตรฐานลงในเครื่องอ่างน้ำร้อน (water bath; Yamato, model: DK-43) (Figure 7) ตั้งค่าเครื่องอ่างน้ำร้อนให้มีอุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เมื่อน้ำร้อน และมีอุณหภูมิคงที่จึงเริ่มการบันทึกอุณหภูมิเป็นระยะเวลา 20 นาที

ปรอทวัดความร้อนมาตรฐานจะแสดงค่าอุณหภูมิจริงของน้ำในเครื่องอ่างน้ำร้อน อ่านค่าอุณหภูมิของแท่งวัดอุณหภูมิแต่ละแท่งจากเครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้น (hybrid recorder; Chino, model: LE series และ FTH, model: FLE-073504E) ที่อ่านค่าได้ทุก 5 นาที (Figure 8) เครื่องตู้อบความร้อนจะติดตั้งอุปกรณ์พิเศษ คือ ชุดปรับค่าความต้านทานกระแสไฟฟ้า (correction resistance unit) ซึ่งเป็นอุปกรณ์สำหรับปรับค่าอุณหภูมิที่แท่งวัดความชื้นอ่านค่าได้ให้เท่ากับค่าอุณหภูมิที่อ่านได้จากปรอทวัดความร้อนมาตรฐาน การทดสอบความเที่ยงตรงของแท่งวัดอุณหภูมิจะเสร็จสิ้นเมื่อแท่งวัดอุณหภูมิทั้งหมดแสดงค่าอุณหภูมิที่ 46 องศาเซลเซียส โดยมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงเป็นระยะเวลานานติดต่อกันในช่วงเวลา 20 นาที



6. แบบแผนการเพิ่มอุณหภูมิในเครื่องตู้อบความร้อน

แบบแผนของการเพิ่มอุณหภูมิในเครื่องตู้อบความร้อนที่ใช้ในการทดลองการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอนี้ทั้งหมดใช้แผนการอบไอน้ำดังนี้ เริ่มต้นการเพิ่มอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้อง โดยช่วงแรกจะให้ความร้อนด้วยวิธีอบอากาศร้อน อากาศร้อนที่หมุนเวียนภายในตู้อบความร้อนจะมีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 50-80 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิภายในตู้เพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งและอุณหภูมิภายในผลส้มโอมีอุณหภูมิที่ 43 องศาเซลเซียส จึงปรับเปลี่ยนการให้ความร้อนเป็นวิธีอบไอน้ำ อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำโดยความชื้นสัมพัทธ์ภายในเครื่องตู้อบความร้อนต้องมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ จนถึงอุณหภูมิภายในผลส้มโอได้ 46 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาที่กำหนดตลอดเวลาทำการอบไอน้ำ

6.1 ขั้นตอนการกำจัดแมลงด้วยความร้อน

1. อุณหภูมิสูงสุดของอากาศภายในห้องบรรจุผลไม้ = 47 องศาเซลเซียส
2. อุณหภูมิภายในสุดผลส้มโอ = 46 องศาเซลเซียส
3. ระดับความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ

| | | |
|--------------------------------|---|-----------------------------|
| ก่อนอุณหภูมิผล 43 องศาเซลเซียส | = | 51 เปอร์เซ็นต์ RH % |
| หลังอุณหภูมิผล 43 องศาเซลเซียส | = | มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ RH % |
4. วิธีการควบคุมการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิอากาศ

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| = | อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นแต่ละระดับ |
| ภายในห้องบรรจุผลไม้ | ในช่วงเวลาที่กำหนด |
| | (stepped temp. MVHT) |
5. วิธีการลดอุณหภูมิผลส้มโอ = เป่าด้วยลม นาน 1 ชั่วโมง
6. การตรวจสอบการตายของแมลงวันผลไม้ = 5 วัน หลังผ่านความร้อน

ในการทดลองใช้ส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) น้ำหนัก $1,200 \pm 25$ กรัม/ผล จำนวน 3 ผล วางไว้ในกระบะชั้นล่างสุด (Figure 9) ซึ่งใช้เป็นตัวแทนแสดงอุณหภูมิของส้มโอทั้งหมดภายในเครื่องตู้อบความร้อน เมื่อส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ จำนวน 2 ผล มีอุณหภูมิคงอยู่ที่ 46 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาตามที่กำหนด แสดงว่าขณะนั้นส้มโอทดลองทั้งหมดในเครื่องตู้อบความร้อนมีอุณหภูมิอยู่ในระดับเดียวกันกับส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ

6.2 ขั้นตอนการประเมินความเสียหายต่อความร้อน

1. อุณหภูมิสูงสุดของอากาศภายในห้องบรรจุผลไม้ = 47, 48 และ 49 องศาเซลเซียส
2. อุณหภูมิภายในสุดผลส้มโอ = 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส
3. ระดับความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ

| | | |
|--------------------------------|---|-----------------------------|
| ก่อนอุณหภูมิผล 43 องศาเซลเซียส | = | 65 เปอร์เซ็นต์ RH % |
| หลังอุณหภูมิผล 43 องศาเซลเซียส | = | มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ RH % |
4. วิธีการควบคุมการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิอากาศ

| | |
|---------------------|--------------------------------|
| = | อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นแต่ละระดับ |
| ภายในห้องบรรจุผลไม้ | ในช่วงเวลาที่กำหนด |



(stepped temp. MVHT)

5. วิธีการลดอุณหภูมิผลส้มโอ = เป่าด้วยลม นาน 1 ชั่วโมง
 6. การประเมินความเสียหายต่อความร้อน = 7 วัน หลังผ่านความร้อน

ในการทดลองใช้ส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) น้ำหนัก $1,200 \pm 25$ กรัม/ผล จำนวน 3 ผล วางไว้ในกระเบาะชั้นล่างสุด ซึ่งใช้เป็นตัวแทนแสดงอุณหภูมิของส้มโอทั้งหมดภายในเครื่องตู้อบความร้อน เมื่อส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ จำนวน 3 ผล มีอุณหภูมิคงอยู่ที่ 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาตามที่กำหนด แสดงว่าขณะนั้นส้มโอดทดลองทั้งหมดในเครื่องตู้อบความร้อนมีอุณหภูมิอยู่ในระดับเดียวกันกับส้มโอที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิ

7. การจัดการกับส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามหลังจากการอบไอน้ำ

ในขั้นตอนการกำจัดแมลงด้วยความร้อน แยกเก็บส้มโอดทดลองที่ผ่านความร้อน (treatment) และไม่ผ่านความร้อน (control) แต่ละระยะเวลาใส่ในถุงผ้าปิดปากถุง วางลงบนแป้นรองส้มโอเพื่อให้ของเหลวภายในผลส้มโอซึ่งเกิดจากเนื้อส้มโอถูกหนอนกัดกินไหลออกจากผลซึมผ่านรูที่เจาะไว้และวางไว้ในกระเบาะพลาสติกขนาด $36 \times 54 \times 15$ เซนติเมตร คลุมด้วยผ้าปิดกระเบาะ หลังจากนั้นนำส้มโอเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (Figure 10) ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ตรวจนับจำนวนหนอนแมลงวันผลไม้ที่รอดชีวิตในส้มโอแต่ละผล หลังจากผ่านความร้อนเป็นเวลานาน 5 วัน (Figure 11) โดยบันทึกจำนวนหนอนที่รอดชีวิตทั้งหมดในส้มโอดทดลองที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่กำหนดนำข้อมูลไปคำนวณหาอัตราการตายที่แท้จริง (corrected mortality) โดยอาศัยสูตรของ Abbott (Abbott, 1925)

8. การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอ ศึกษา 2 การทดลอง แต่ละการทดลองมีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการดังต่อไปนี้ ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็ก จำนวน 2 เครื่องใช้ส้มโอพันธุ์ทองดีเป็นตัวเปรียบเทียบพันธุ์กับส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (การทดลองที่ 1) โดยใช้หนอนวัย 1 เพื่อเป็นตัวแทนของแมลงในการเตรียมส้มโอให้มีแมลงวันผลไม้ภายในผล (artificial infestation method) จากรายงานของอุดร และคณะ (2549) และ Unahawutti *et al.* (2006) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอพันธุ์ทองดีเพื่อกำหนดระยะเวลาการเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด โดยอบส้มโอด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์กำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ หนอนวัย 1, 2 และ 3 เพื่อเปรียบเทียบอัตราการตายของแมลงแต่ละระยะการเจริญเติบโต อบส้มโอให้อุณหภูมิภายในผลส้มโอเพิ่มขึ้นถึง 45 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิผลไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที จากผลการทดลอง พบว่า ระยะไข่ หนอนวัย 2 และ 3 ตายทั้งหมดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 50, 20 และ 30 นาที ส่วนหนอนวัย 1 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที



ยังคงรอดชีวิต จากผลการทดลองแสดงว่า หนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอมีความทนทานต่อความร้อนมากที่สุดด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

อุตร และคณะ (2549) และ Unahawutti *et al.* (2006) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการกำจัดแมลงกับแมลงจำนวนน้อยในผลส้มโอพันธุ์ทองดี โดยใช้หนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ซึ่งมีความทนทานต่อความร้อนมากที่สุดด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ โดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิผลจากเดิมที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิผลที่ 46 องศาเซลเซียส อบส้มโอด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เมื่ออุณหภูมิของผลส้มโอเพิ่มขึ้นถึง 46 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิผลไว้ที่ 46 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที จากผลการทดลอง พบว่า หนอนวัย 1 ตายทั้งหมด ที่อุณหภูมิผล 46 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

มลนิภา และคณะ (2554) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 ในผลส้มโอพันธุ์ทองดีเปรียบเทียบกับส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง โดยอบส้มโอทั้ง 2 สายพันธุ์ภายในเครื่องตู้อบความร้อนเดียวกันด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เมื่ออุณหภูมิของผลส้มโอเพิ่มขึ้นถึง 45 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิผลไว้ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที จากผลการทดลอง พบว่า หนอนวัย 1 ในผลส้มโอพันธุ์ทองดีและส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งตายทั้งหมดที่อุณหภูมิผล 45 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที

ส้มโอที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนัก 1,100-1,300 กรัม/ผล (ส้มโอขนาดกลาง) ใช้ส้มโอทั้งหมดจำนวน 108 ผล นำส้มโอทดลองเข้าเครื่องตู้อบความร้อน (Figure 12) วางเรียงส้มโอที่ทำการใส่หนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอ ผลละ 200 ตัว จำนวน 4 ผล/ถาด อบส้มโอโดยการเพิ่มอุณหภูมิผลส้มโอให้เป็นไปตามข้อ 6 และ 6.1 โดยมีการอบเป็นเวลานานที่แตกต่างกัน ดังนี้

การทดลองที่ 1: ใช้ระยะเวลาอบนาน 0, 10, 20 และ 30 นาที แต่ละระยะเวลาที่กำหนดมีส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) จำนวน 48 ผล และมีส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 12 ผล ทำการทดลอง 3 ครั้ง

การทดลองที่ 2: ใช้ระยะเวลาอบนาน 0, 10 และ 20 นาที แต่ละระยะเวลาที่กำหนดมีส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) จำนวน 36 ผล และมีส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 12 ผล ทำการทดลอง 3 ครั้ง

9. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ในขั้นตอนการประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อส้มโอ ตรวจสอบสภาพความผิดปกติของผลส้มโอ ซึ่งส้มโอทุกผลจะต้องไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือรอยแตกแยกเป็นส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) และส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน นำส้มโอทดลองเข้าเครื่องตู้อบความร้อน อบส้มโอโดยการเพิ่มอุณหภูมิผลส้มโอให้เป็นไปตามข้อ 6 และ 6.2 อบส้มโอภายในเครื่องตู้อบความร้อนให้อุณหภูมิภายในสุดผลของส้มโอเพิ่มขึ้นจนถึง 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส และคงความร้อนภายในผลไว้ที่อุณหภูมิ 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการให้ความร้อนลดอุณหภูมิส้มโอทันทีโดยวิธีเป่าด้วยลม นาน 1 ชั่วโมง



ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ (Figure 13) เปรียบเทียบกับส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน นำส้มโอทดลองทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนบรรจุใส่ในกล่องกระดาษขนาด 34x47x18 เซนติเมตร (Figure 14) ด้านยาวทั้งสองข้างเจาะรู พร้อมทั้งปิดด้วยผ้าตาข่ายขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1.6 มิลลิเมตร จำนวน 4 รู เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน (Figure 15) เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำส้มโอทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนมาประเมินความเสียหายจากความร้อน โดยใช้หลักเกณฑ์พิจารณาต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss) ศึกษาการสูญเสียน้ำหนักของส้มโอโดยคำนวณเป็นร้อยละของน้ำหนักที่สูญเสียไปด้วยวิธีการบันทึกน้ำหนักส้มโอก่อนการทดลอง และในวันที่ตรวจผลการทดลองชั่งน้ำหนักผลส้มโออีกครั้งหนึ่ง

2. ปริมาณน้ำตาล (brix value) ในการทดลองแต่ละครั้งคั้นน้ำจากเนื้อส้มโอที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ซึ่งปริมาณน้ำตาลในรูปปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) มีหน่วยเป็นค่าองศาบริกซ์ การวัดปริมาณน้ำตาลจากเนื้อส้มโอใช้เครื่อง digital refractometer (รุ่น DBX-30, atago Co., Ltd., Tokyo, Japan) (Figure 16)

3. ปริมาณกรด (acidity value) ในการทดลองแต่ละครั้ง คั้นน้ำจากเนื้อส้มโอที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรด ซึ่งปริมาณกรดในรูปปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ การวัดปริมาณกรดจากเนื้อส้มโอใช้เครื่อง digital acilyzer (รุ่น 5 006P) (Figure 17)

4. การเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอ (peel color) ใช้เกณฑ์การประเมิน ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| 0 | = | 100 เปอร์เซ็นต์ สีเปลือกส้มโอมีสีเขียว (ไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง) |
| 1 | = | 0-25 เปอร์เซ็นต์ สีเปลือกส้มโอมีสีเหลือง |
| 2 | = | 25-50 เปอร์เซ็นต์ สีเปลือกส้มโอมีสีเหลือง |
| 3 | = | 50-75 เปอร์เซ็นต์ สีเปลือกส้มโอมีสีเหลือง |
| 4 | = | 75-100 เปอร์เซ็นต์ สีเปลือกส้มโอมีสีเหลือง |

นำข้อมูลการสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล ปริมาณกรด และการเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอ วิเคราะห์ผลทางสถิติ และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีการตรวจสอบแบบ t-test

10. การศึกษายืนยันประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

การศึกษายืนยันประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอ โดยการประเมินประสิทธิภาพการกำจัดแมลงมีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการดังต่อไปนี้ การทดลองนี้ใช้รูปแบบการทำลายของแมลงวันผลไม้ 2 รูปแบบ คือ ใช้วิธีการใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอ (artificial infestation method) และใช้วิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอ (forced infestation method) แต่ละวิธีมีรายละเอียดดังนี้



1. รูปแบบการทำลายโดยวิธีการใส่หนอนวัย 1 แผลงวันผลไม้ในผลส้มโอ (artificial infestation method) ทำเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 8 ใช้ส้มโอดทดลอง จำนวน 240 ผล แยกเป็นส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) จำนวน 180 ผล และส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 60 ผล นำส้มโอทั้งหมดเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิโดยมีอุณหภูมิประมาณ 25-27 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำส้มโอไปใช้ในการทดลอง

2. รูปแบบการทำลายโดยวิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอ (forced infestation method) เจาะรูด้วยเข็มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร บนผลส้มโอ จำนวน 10 รู/ผล ให้ทะลุเปลือกไปถึงเนื้อ (Figure 18) เพื่อบังคับให้แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ตัวเต็มวัยเพศเมียทางอวัยวะวางไข่เข้าไปวางไข่ในผลส้มโอผ่านรูที่เจาะไว้ ใช้ส้มโอดทดลอง จำนวน 80 ผล แยกเป็นส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) จำนวน 60 ผล และส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 20 ผล นำไปวางไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาดเล็กที่มีแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัย จำนวนประมาณ 2,000 ตัว (Figure 19) ใช้ระยะเวลาในการให้แมลงวางไข่นาน 1 ชั่วโมง นำส้มโอทั้งหมดเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ โดยมีอุณหภูมิประมาณ 25-27 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำส้มโอไปใช้ในการทดลอง

ทำการอบส้มโอในสภาพของตู้อบความร้อนมีปริมาณส้มโอน้ำหนัก 60-120 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร (low load and full load) แบ่งส้มโอที่มีแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 ที่อยู่ภายในผลทั้ง 2 วิธี ออกเป็น 4 ส่วน เลือกส้มโอดทดลองที่ได้จากวิธีการใส่หนอนวัย 1 ในผลส้มโอ และวิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอ 1 ส่วน จำนวน 6 และ 2 ผล เก็บไว้สำหรับใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน ส้มโอส่วนนี้จะใช้สำหรับการประมาณจำนวนแมลงทั้งหมดในส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) เนื่องจากว่าจำนวนแมลงที่มีชีวิตในส้มโอที่ผ่านความร้อนนั้นไม่สามารถที่จะทำการตรวจสอบได้โดยตรง สำหรับส้มโออีก 3 ส่วน แบ่งจำนวนเท่าๆ กัน ใส่ในภาชนะบรรจุผลไม้แบบกระเบพลาสติกแข็งทนความร้อนขนาด 36x70x15 เซนติเมตร กระเบเดียวกัน จำนวน 3 กระเบ ในแต่ละกระเบมีส้มโอดทดลองโดยวิธีการใส่หนอนวัย 1 แผลงวันผลไม้ในผลส้มโอ จำนวน 6 ผล/กระเบ และวิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอ จำนวน 2 ผล/กระเบ (Figure 20) และใส่ส้มโอที่ไม่ใช้ในการทดลอง (filler fruit) (Figure 21) เฉลี่ยจำนวนเท่าๆ กัน ในกระเบบรรจุผลไม้อีก 9 กระเบ และนำไปวางซ้อนลงบนกระเบซึ่งบรรจุส้มโอดทดลองในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้อบความร้อนมีปริมาณส้มโอ 50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (low load and full load) ของความจุตู้ (Figure 22) นำส้มโอเข้าเครื่องตู้อบความร้อนเพื่อประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 โดยให้มีแมลงทดลองจำนวนไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว ตายทั้งหมด



11. การศึกษาความเสียหายต่อคุณภาพผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ต่อส้มโอในสภาพจำลองการส่งออกส้มโอทางเครื่องบินและทางเรือ โดยตรวจสอบสภาพความผิดปกติของผลส้มโอซึ่งส้มโอทุกผลจะต้องไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลงหรือรอยแตก แยกเป็นส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) จำนวน 12 ผล และส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 4 ผล นำส้มโอทดลองเข้าเครื่องตู้อบความร้อนวางส้มโอที่ผ่านความร้อนไว้ในกระบะชั้นล่างสุดใส่ในภาชนะบรรจุผลไม้แบบกระบะพลาสติกแข็งทนความร้อนขนาด 36x70x15 เซนติเมตร จำนวน 3 กระบะ ในแต่ละกระบะมีส้มโอทดลอง จำนวน 8 ผล/กระบะ (Figure 23) แยกเป็นส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) ทางเครื่องบิน จำนวน 4 ผล และทางเรือ จำนวน 4 ผล และใส่ส้มโอที่ไม่ใช้ในการทดลอง (filler fruit) เฉลี่ยจำนวนเท่าๆ กัน ให้เต็มความจุของกระบะ ในกระบะบรรจุผลไม้อีก 9 กระบะ และนำไปวางซ้อนลงบนกระบะซึ่งบรรจุส้มโอทดลองในสภาพที่ห้องบรรจุผลไม้ของเครื่องตู้อบความร้อนมีปริมาณส้มโอ 100 เปอร์เซ็นต์ ของความจุ (Figure 24) เพื่อประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที อบส้มโอโดยการเพิ่มอุณหภูมิผลส้มโอให้เป็นไปตามข้อ 6 และ 6.2 โดยช่วงแรกจะให้ความร้อนด้วยวิธีอบอากาศร้อน อากาศร้อนที่หมุนเวียนภายในตู้อบความร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 50-80 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิภายในตู้เพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งและอุณหภูมิภายในผลส้มโอมีอุณหภูมิที่ 43 องศาเซลเซียส จึงปรับเปลี่ยนการให้ความร้อนเป็นวิธีอบไอน้ำ อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการให้ความร้อนลดอุณหภูมิผลส้มโอภายในตู้อบความร้อน โดยวิธีเป่าด้วยลม นาน 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน นำส้มโอทดลองทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน บรรจุใส่ในกล่องกระดาษ ขนาด 34x47x18 เซนติเมตร ด้านยาวทั้งสองข้างเจาะรูพร้อมทั้งปิดด้วยผ้าตาข่าย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1.6 มิลลิเมตร จำนวน 4 รู เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 7 และ 14 วัน เพื่อจำลองสภาพการส่งออกส้มโอทางเครื่องบินและทางเรือ เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำส้มโอทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนมาประเมินความเสียหายจากความชื้น โดยใช้หลักเกณฑ์การพิจารณาและดำเนินการให้เป็นไปตามข้อ 9

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินงาน 3 ปี (ตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2564) ที่ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงาน กำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีชื่อวิทยาศาสตร์ และลักษณะทางพฤกษศาสตร์เหมือนกับส้มโอทั่วไป เป็นไม้ยืนต้น สูง 5-10 เมตร แตกกิ่งก้านเป็นพุ่มกว้าง ใบเป็นรูปรีค่อนข้างกว้าง ปลายใบแหลมโคน



เกือบมน ใบมีขนาดใหญ่ ใต้ใบมีขนอ่อนนุ่ม ผลกลมรี มีขนาดใหญ่ น้ำหนักผลประมาณ 900-2,500 กรัม เส้นรอบผลวัดได้ประมาณ 16-22 นิ้ว หัวเป็นจิบชัดเจน เปลือกผลบางสีเขียวเข้มและนิ่ม ผิวผลมีขนอ่อนนุ่มคล้ายกำมะหยี่ปกคลุมทั่วทั้งผล เมื่อจับผลเบาๆ จะรู้สึกผิวเปลือกนุ่ม เนื้อกึ่ง (juice sac) มีสีแดงเข้มหรือสีชมพูเข้ม รสชาติหวานไม่มีรสขมเจือปน มีเมล็ดน้อย ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามเป็นผลไม้ที่ตลาดทั้งในและต่างประเทศมีความต้องการสูง เนื่องจากเนื้อมีสีแดงเข้มแบบสีทับทิม มีรสชาติดหวาน และมีกลิ่นหอม แหล่งปลูกส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามที่สำคัญอยู่ในพื้นที่ อำเภอปากพะนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช

การเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลองภายในห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 65-70 เปอร์เซ็นต์ โดยในการเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่นจะตรวจสอบอัตราการฟักไข่ (hatching rate) อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) น้ำหนักของดักแด้ (pupa weight) และอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio) จากการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ พบว่า แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีความแข็งแรงตามมาตรฐานงานทดลองและสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้มากกว่า 50,000 ตัว ซึ่งเพียงพอเพื่อใช้สำหรับงานทดลองการกำจัดแมลงด้วยความร้อนในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

จากการปรับค่าความเที่ยงตรงของแท่งวัดอุณหภูมิตรวจสอบเปรียบเทียบกับปรอทวัดความร้อนมาตรฐาน โดยจุ่มแท่งวัดอุณหภูมิทั้งหมดรวมทั้งปรอทวัดความร้อนมาตรฐานลงในเครื่องอ่างน้ำร้อน ตั้งค่าเครื่องอ่างน้ำร้อนให้มีอุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เมื่อน้ำร้อนและมีอุณหภูมิคงที่จึงเริ่มการบันทึกอุณหภูมิ จากการปรับค่าความเที่ยงตรงของแท่งวัดอุณหภูมิ พบว่า แท่งวัดอุณหภูมิทั้งหมดสามารถคงอุณหภูมิที่ 46 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 99.9-100 เปอร์เซ็นต์ จากเครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้น (hybrid recorder) ที่อ่านค่าได้ทุก 5 นาที ซึ่งระยะเวลา อุณหภูมิ และความชื้นในการปรับค่าความเที่ยงตรงของแท่งวัดอุณหภูมิที่ 46 องศาเซลเซียส ได้แสดงไว้ใน (Table 1) โดยมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงเป็นระยะเวลาติดต่อกันในช่วงเวลานาน 20 นาที

การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอ ศึกษา 2 การทดลอง แต่ละการทดลองมีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการดังต่อไปนี้ ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็ก จำนวน 2 เครื่อง ใช้ส้มโอพันธุ์ทองดีเป็นตัวเปรียบเทียบกับส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (การทดลองที่ 1) และใช้หนอนวัย 1 เพื่อเป็นตัวแทนของแมลงในการเตรียมส้มโอให้มีแมลงวันผลไม้ภายในผล (artificial infestation method) ออบส้มโอกำจัดแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 เพื่อกำหนดกระบวนการอบไอน้ำที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้จำนวนไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว ในผลส้มโอให้ตายทั้งหมด ในการทดลองนี้ใช้ส้มโอทั้งหมดจำนวน 108 ผล นำส้มโอทดลองเข้าเครื่องตู้อบความร้อน วางเรียงส้มโอที่ทำการใส่หนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอผลละ 200 ตัว จำนวน 4 ผล/ถาด ออบส้มโอโดยการเพิ่มอุณหภูมิผลส้มโอให้เป็นไปตามข้อ 6 และ 6.1 ออบส้มโอภายในเครื่องตู้อบความร้อนให้อุณหภูมิภายใน



สุดผลส้มโอเพิ่มขึ้นจนถึง 46 องศาเซลเซียส และคงความร้อนภายในผลไว้ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานที่แตกต่างกันดังนี้

การทดลองที่ 1 ระยะเวลาที่ใช้ในการอบส้มโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10, 20 และ 30 นาที รวมทั้งน้ำหนักส้มโอกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน (Table 2 and 3) จากการทดลอง 3 ครั้ง พบว่า ส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 12 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 2,017 ตัว แสดงว่าในส้มโอจำนวน 48 ผล ซึ่งผ่านความร้อนแต่ละระยะเวลาที่กำหนดหนอนวัย 1 รอดชีวิต จำนวน 2 ตัว ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10, 20 และ 30 นาที โดยมีอัตราการตายของหนอนวัย 1 เฉลี่ย 100, 99.70, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 4 and 5)

การทดลองที่ 2 ระยะเวลาที่ใช้ในการอบส้มโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10 และ 20 นาที รวมทั้งน้ำหนักส้มโอกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน (Table 6 and 7) จากการทดลอง 3 ครั้ง พบว่า ส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 12 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 2,026 ตัว ซึ่งในส้มโอที่ผ่านความร้อนแต่ละระยะเวลาที่กำหนดจำนวน 36 ผล แมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 รอดชีวิต จำนวน 2 ตัว ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10 และ 20 นาที โดยมีอัตราการตายของหนอนวัย 1 เฉลี่ย 99.85, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 8)

จากการทดลองจึงประมาณการได้ว่าส้มโอซึ่งผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส แต่ละระยะเวลาที่กำหนดจะมีหนอนที่รอดชีวิตได้จำนวนไม่น้อยกว่าประมาณ 6,078 ตัว ผลการตรวจนับจำนวนแมลงในผลส้มโอ จากการทดลองปรากฏว่า หนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอตายทั้งหมดเมื่อคงความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานตั้งแต่ 10 นาทีขึ้นไป กระบวนการกำจัดแมลงดังกล่าวนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้ตามข้อกำหนดของวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช ดังนั้นควรจะได้มีการทดสอบการศึกษายืนยันกระบวนการกำจัดแมลงดังกล่าวข้างต้น เพื่อใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชสำหรับกำจัดระยะไข่ และหนอนวัยต่างๆ ของแมลงวันผลไม้ในส้มโอก่อนการส่งออก

การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อส้มโอ ตรวจสอบสภาพความผิดปกติของผลส้มโอ ซึ่งส้มโอทุกผลจะต้องไม่มีร่องรอยการทำลายของแมลงศัตรูพืชหรือรอยแตก แยกเป็นส้มโอที่ผ่านความร้อน (treatment) และส้มโอที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับ (control) ไม่ผ่านความร้อน นำส้มโอทดลองเข้าเครื่องตู้อบความร้อน อบส้มโอด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) โดยการเพิ่มอุณหภูมิผลส้มโอภายในเครื่องตู้อบความร้อนให้อุณหภูมิภายในผลส้มโอเพิ่มขึ้นจนถึง 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส และคงความร้อนภายในผลไว้ที่อุณหภูมิ 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ระยะเวลาที่ใช้ในการอบส้มโอรวมทั้งน้ำหนักส้มโอกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน (Table 9 and 10) เมื่อสิ้นสุดการให้ความร้อนลดอุณหภูมิผลส้มโอโดยวิธีเป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน นำส้มโอทดลองทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน บรรจุใส่ในกล่องกระดาษขนาด 34x47x18 เซนติเมตร ด้านยาวทั้งสองข้างเจาะรูพร้อมทั้งปิดด้วยผ้าตาข่าย จำนวน 4 รู เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน



เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำส้มโอทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนมาประเมินความเสียหายจากความร้อน จากการทดลองพบว่า การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล ค่าความเป็นกรด และการเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง หลังจากเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน โดยคุณภาพความหวานของส้มโอไม่เปลี่ยนแปลง (Table 11, 12, 13 and 14) นอกจากนี้การเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง จะเปลี่ยนสีจากเดิมที่มีสีเขียว เปลี่ยนเป็นสีที่ค่อนข้างเหลืองมากกว่าส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อนและส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 และ 47 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง โดยที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ยังพบจุดดำ (black spot) ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากต่อมน้ำมันที่เปลือกของผลส้มโอแตก (damaged oil gland) (Figure 23) เมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิสูงและคงความร้อนไว้เป็นระยะเวลานาน

เตรียมส้มโอทดลองให้มีแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 อยู่ภายในผล ศึกษา 2 วิธีการคือ 1. วิธีการใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอ (artificial infestation method) และ 2. วิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอ (forced infestation method) นำส้มโอเข้าเครื่องตู้อบความร้อนเพื่อประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในการกำจัดแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 จำนวนไม่น้อยกว่า 30,000 ตัวให้ตายทั้งหมด เพื่อการยอมรับเป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการอบส้มโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที รวมทั้งน้ำหนักส้มโอกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน (Table 15 and 16) จากการทดลองพบว่า ส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อนจำนวน 60 และ 20 ผล มีแมลงรอดชีวิตจำนวน 9,559 และ 3,542 ตัว ซึ่งส้มโอที่ผ่านความร้อน จำนวน 180 และ 60 ผล ไม่พบแมลงรอดชีวิต โดยสามารถกำจัดหนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้ประมาณ 39,384 ตัว ในผลส้มโอตายทั้งหมด (Table 17)

ซึ่งวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ โดยช่วงแรกจะให้ความร้อนด้วยวิธีอบอากาศร้อน อากาศร้อนที่หมุนเวียนภายในตู้อบความร้อนมีจะความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 50-80 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิภายในตู้เพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งและอุณหภูมิภายในผลส้มโอมีอุณหภูมิที่ 43 องศาเซลเซียส จึงปรับเปลี่ยนการให้ความร้อนเป็นวิธีอบไอน้ำ อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ (saturated condition) ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ กระบวนการอบส้มโอดังกล่าวนี้นี้มีประสิทธิภาพสูงได้ระดับมาตรฐานที่ยอมรับเป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช เพื่อใช้กำจัดแมลงวันผลไม้ระยะไข่และหนอนวัยต่างๆ ในส้มโอก่อนการส่งออก เพราะสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 ได้ตามมาตรฐานข้อกำหนดของประเทศญี่ปุ่นที่ระบุไว้ว่าวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชจะต้องกำจัดแมลงจำนวนไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว ตายทั้งหมด

การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ต่อส้มโอในสภาพจำลองการส่งออกส้มโอทางเครื่องบินและทางเรือ อบส้มโอโดยช่วงแรกจะให้ความร้อนด้วยวิธี



อบอากาศร้อน อากาศร้อนที่หมุนเวียนภายในตู้อบความร้อนจะมีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 50-80 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิภายในตู้เพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งและอุณหภูมิภายในผลส้มโอมีอุณหภูมิที่ 43 องศาเซลเซียส จึงปรับเปลี่ยนการให้ความร้อนเป็นวิธีอบไอน้ำ อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เพื่อประเมินการสูญเสีย น้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล ปริมาณกรด และการเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อน เมื่อเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการอบส้มโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที รวมทั้งน้ำหนักส้มโอ กำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน (Table 18) จากการทดลองพบว่า การสูญเสีย น้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล ค่าความเป็นกรด และการเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 19 and 20) เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยคุณภาพความหวานของส้มโอไม่เปลี่ยนแปลง

ผลไม้เกิดความเสียหายได้ทุกๆ ขั้นตอนทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับผลไม้ที่ต้องผ่านวิธีการกำจัดศัตรูพืชก่อนการส่งออก เพื่อให้เป็นไปตามเงื่อนไขด้านกักกันพืชวิธีการกำจัดศัตรูพืชมักกันพืชนั้นจะต้องมีประสิทธิภาพในการกำจัดศัตรูพืชและไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลไม้ ถ้าหากทำให้คุณภาพของผลไม้เสียไปแล้วถือว่าวิธีการนั้นไม่มีประสิทธิภาพอย่างแท้จริง ดังนั้นวิธีการใดก็ตามที่ใช้สำหรับกำจัดแมลงศัตรูพืชในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวควรมีผลทำให้ผลไม้เกิดความเสียหายน้อยที่สุด ความเสียหายของผลไม้จากวิธีการกำจัดศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยวนั้น แสดงออกโดยสูญเสียคุณสมบัติด้านการตลาดหลายรูปแบบ ได้แก่ สีผล อายุการเก็บรักษา รูปลักษณ์ภายนอก การสุก รสชาติ กลิ่น และความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุของโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว (Goodwin and Jamikorn, 1952; McDonald and William, 1994) การที่คุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นลดลงหรือผิดไปจากปกติจะมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม เป็นไม้ยืนต้น สูง 5-10 เมตร แตกกิ่งก้านเป็นพุ่มกว้าง ใบเป็นรูปรีค่อนข้างกว้าง ปลายใบแหลมโคนเกือบมน ใบมีขนาดใหญ่ ได้ใบมีขนอ่อนนุ่ม ผลกลมรี มีขนาดใหญ่ น้ำหนักผลประมาณ 900-2,500 กรัม เส้นรอบผลวัดได้ประมาณ 16-22 นิ้ว หัวเป็นจีบชัดเจน เปลือกผลบางสีเขียวเข้มและนํมึน ผิวผลมีขนอ่อนนุ่มคล้ายกำมะหยี่ปกคลุมทั่วทั้งผล เมื่อจับผลเบาๆ จะรู้สึกผิวเปลือกนํมึน เนื้อกุ่ม (juice sac) มีสีแดงเข้มหรือสีชมพูเข้ม รสชาติหวานไม่มีรสขมเจือปน มีเมล็ดน้อยและมีกลิ่นหอม แหล่งปลูกส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามที่สำคัญอยู่ในพื้นที่ อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช

การเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ในห้องปฏิบัติการ ภายในห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้ที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ในการเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่นจะตรวจสอบอัตราการฟักไข่ อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัย น้ำหนักของดักแด้ และอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย จากการ



เพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ พบว่า แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* มีความแข็งแรงตามมาตรฐานงานทดลองและสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้มากกว่า 50,000 ตัว ซึ่งเพียงพอสำหรับใช้ในการทดลอง

จากการปรับค่าความเที่ยงตรงของแท่งวัดอุณหภูมิตรวจสอบเปรียบเทียบกับปรอทวัดความร้อนมาตรฐาน พบว่า แท่งวัดอุณหภูมิทั้งหมดสามารถคงอุณหภูมิที่ 46 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 99.9-100 เปอร์เซ็นต์ จากเครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้น (hybrid recorder) ที่อ่านค่าได้ทุก 5 นาที โดยมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงเป็นระยะเวลาานติดต่อกันในช่วงเวลาาน 20 นาที ซึ่งได้มาตรฐานงานทดลองของเครื่องตู้อบความร้อนในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลส้มโอ

อบส้มโอกำจัดแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 เพื่อกำหนดกระบวนการอบไอน้ำที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว ในผลส้มโอให้ตายทั้งหมด จากการศึกษาพบว่า การทดลองที่ 1 ส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 12 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 2,017 ตัว แสดงว่าในส้มโอ จำนวน 48 ผล ซึ่งผ่านความร้อนแต่ละระยะเวลาที่กำหนดมีแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 รอดชีวิต จำนวน 2 ตัว ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10, 20 และ 30 นาที มีอัตราการตายของหนอนวัย 1 เฉลี่ย 100, 99.70, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การทดลองที่ 2 ส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 12 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 2,026 ตัว ซึ่งในส้มโอที่ผ่านความร้อนแต่ละระยะเวลาที่กำหนด จำนวน 36 ผล พบว่า อัตราการตายของหนอนวัย 1 ในส้มโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 10 และ 20 นาที มีอัตราการตายของหนอนวัย 1 เฉลี่ย 99.85, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

วิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนซึ่งใช้เป็นวิธีการกำจัดแมลงศัตรูพืชด้านกักกันพืชสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลไม้ก่อนการส่งออกต่างประเทศ การกำจัดแมลงโดยให้ความร้อนกับผลไม้ทำให้อุณหภูมิผลไม้เพิ่มขึ้นถึงอุณหภูมิระหว่าง 40-50 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดระยะไข่ และระยะหนอนวัยต่างๆ ของแมลงวันผลไม้ในผลไม้ให้ตายทั้งหมด การทำให้ผลไม้ร้อนอุณหภูมิสูงขึ้นอาจจะเป็นการให้ความร้อนโดยตรงกับผลไม้ โดยอาศัยอากาศหรือน้ำเป็นสื่อนำความร้อน ความร้อนจากอากาศจะถ่ายเทไปที่เปลือกของผลไม้ และจากเปลือกจึงจะถ่ายเทเข้าไปยังเนื้อถึงบริเวณที่อยู่ภายในสุดผล จากการทดลองแสดงว่าการอบส้มโอกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สามารถกำจัดหนอนวัย 1 ในผลส้มโอจำนวนไม่น้อยกว่าประมาณ 6,078 ตัว ตายทั้งหมด กระบวนการกำจัดแมลงดังกล่าวนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้ตามข้อกำหนดของวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช

การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อส้มโอ อบส้มโอโดยการเพิ่มอุณหภูมิผลส้มโอภายในเครื่องตู้อบความร้อนให้อุณหภูมิภายในผลของส้มโอเพิ่มขึ้นถึง 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส และคงความร้อนไว้ที่อุณหภูมิ 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง จากการทดลอง พบว่า การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล ค่าความเป็นกรด และการเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 46, 47 และ 48 องศาเซลเซียส



นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน โดยคุณภาพความหวานของส้มโอไม่เปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง จะเปลี่ยนสีจากเดิมที่มีสีเขียว เปลี่ยนเป็นสีที่ค่อนข้างเหลืองมากกว่าส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน และส้มโอที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 และ 47 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง โดยที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ยังพบจุดดำ (black spot) ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากต่อมน้ำมันที่เปลือกของผลส้มโอแตก (damaged oil gland) เมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิสูงและคงความร้อนไว้เป็นระยะเวลานาน

การประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในผลส้มโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 จำนวนไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว ให้ตายทั้งหมด เพื่อการยอมรับเป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช โดยวิธีการใส่หนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอและวิธีการให้แมลงวันผลไม้วางไข่ในผลส้มโอจากการทดลอง พบว่า ส้มโอที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 60 และ 20 ผล มีแมลงรอดชีวิต จำนวน 9,559 และ 3,542 ตัว ส้มโอที่ผ่านความร้อน จำนวน 180 และ 60 ผล ไม่พบแมลงรอดชีวิต โดยสามารถกำจัดหนอนวัย 1 ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้จำนวนประมาณ 39,384 ตัว ในผลส้มโอตายทั้งหมด

ซึ่งวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ โดยช่วงแรกจะให้ความร้อนด้วยวิธีอบอากาศร้อน อากาศร้อนที่หมุนเวียนภายในตู้อบความร้อนจะมีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 50-80 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิภายในตู้เพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่งและอุณหภูมิภายในผลส้มโอมีอุณหภูมิที่ 43 องศาเซลเซียส จึงปรับเปลี่ยนการให้ความร้อนเป็นวิธีอบไอน้ำ อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ (saturated condition) ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ กระบวนการอบส้มโอดังกล่าวนี้นี้มีประสิทธิภาพสูงได้ระดับมาตรฐานที่ยอมรับเป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช เพื่อใช้กำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ และหนอนวัยต่างๆ ในส้มโอก่อนการส่งออก

การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ต่อส้มโอในสภาพจำลองการส่งออกส้มโอทางเครื่องบินและทางเรือ อบส้มโอที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ซึ่งการสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล ปริมาณกรด และการเปลี่ยนสีเปลือกของส้มโอที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่านความร้อนเมื่อเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส นาน 7 และ 14 วัน พบว่า การสูญเสียน้ำหนัก ปริมาณน้ำตาล ปริมาณกรด และการเปลี่ยนสีเปลือกของผลส้มโอไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยคุณภาพความหวานของส้มโอไม่เปลี่ยนแปลง

ผลไม้เกิดความเสียหายได้ทุกๆ ขั้นตอนทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับผลไม้ที่ต้องผ่านวิธีการกำจัดศัตรูพืชก่อนการส่งออกเพื่อให้เป็นไปตามเงื่อนไขด้านกักกันพืช วิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชนั้นจะต้องมีประสิทธิภาพในการกำจัดศัตรูพืชและไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลไม้ ถ้าหากทำให้คุณภาพของผลไม้เสียไปแล้วถือว่าวิธีการนั้นไม่มีประสิทธิภาพอย่างแท้จริง ดังนั้นวิธีการใดก็ตามที่ใช้สำหรับกำจัดแมลงศัตรูพืชในผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวควรมีผลทำให้

ผลไม่เกิดความเสียหายน้อยที่สุด ความเสียหายของผลไม่จากวิธีการกำจัดศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยวนั้น แสดงออกโดยสูญเสียคุณสมบัติด้านการตลาดหลายรูปแบบ ได้แก่ สีผล อายุการเก็บรักษา รูปลักษณ์ ภายนอก การสุก รสชาติ กลิ่น และความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุของโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว การที่คุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นลดลงหรือผิดไปจากปกติจะมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอก่อนการส่งออกประเทศญี่ปุ่น ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนสนับสนุนงานวิจัยด้านการเกษตร ขอขอบพระคุณท่านผู้เชี่ยวชาญด้านกักกันพืชและที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตร คุณอุตร อุณหุฒิ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกันทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการเตรียมการทดลองรวมถึงตรวจผลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2556. แมลงวันผลไม้และการป้องกันกำจัด. [ออนไลน์] [อ้างถึง 26 กรกฎาคม 2557] แหล่งข้อมูล: http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n12/v_10_nov/rai.html.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2559. ส้มโอ. [ออนไลน์] [อ้างถึง 24 พฤษภาคม 2560] แหล่งข้อมูล: <http://www.agritech.doae.go.th/fruit2/pomelo>.

ชัยณรงค์ สนศิริ สลักจิต พานคำ ชลธิชา รักใคร่ มลนิภา ศรีมาตริกรมย์ พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์ และพงษ์ศักดิ์ จินนุทธิ์. 2562. การศึกษายีนยับประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงด้วยความร้อนเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera carambolae* (Diptera: Tephritidae) ในมังคุดก่อนการส่งออกประเทศไทยได้ทุกวัน. การประชุมวิชาการของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ประจำปี 2562. 10-12 มิถุนายน 2562. ณ. รอยัลฮิลส์ กอล์ฟ รีสอร์ท แอนด์ สปา จ. นครนายก. เอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 29 หน้า.

ชัยณรงค์ สนศิริ สลักจิต พานคำ ชลธิชา รักใคร่ มลนิภา ศรีมาตริกรมย์ พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์ และพงษ์ศักดิ์ จินนุทธิ์. 2563. การกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera carambolae* (Drew & Hancock) (Diptera: Tephritidae) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เพื่อเปิดตลาดมังคุดไปได้ทุกวัน. การประชุมวิชาการของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ประจำปี 2563. 17-18 กันยายน 2563. ณ. อาคารเฉลิมพระเกียรติ สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร. เอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 15 หน้า.

มนตรี จิระสุรัตน์. 2544. แมลงวันผลไม้ที่สำคัญของประเทศไทยและการแพร่กระจาย. แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองกีฏวิทยาและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 6 หน้า.



- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2550. โรงงานอบไอน้ำเพื่อการส่งออก. คู่มืออารักขาพืช 13 (1): 2.
- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2552. การกำจัดแมลงในผลไม้เพื่อการส่งออกด้วยวิธีการอบไอน้ำ. หน้า. 43-46. ใน: เทคโนโลยีการผลิตและการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองนอกฤดูเพื่อการส่งออก. โดยภารกิจโครงการและประสานงานวิจัย, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2552. ขั้นตอนการอบไอน้ำมะม่วงและมังคุดสดจากประเทศไทยเพื่อการส่งออกไปญี่ปุ่น. ใน: การประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่องเทคโนโลยีการผลิตและการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเพื่อการส่งออก. 30 มิถุนายน - 1 กรกฎาคม 2552. ณ. โรงแรมท็อปแลนด์พลาซ่า จ. พิษณุโลก. (เอกสารแจกในที่ประชุม)
- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2554. วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนในส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งเพื่อการส่งออก. หน้า. 43-46. ใน: การประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช 28-30 มิถุนายน 2554. ณ. โรงแรมทวาราวดี จ. ปราจีนบุรี. เอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชกรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2555. วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงวันทองด้วยความร้อนในผลมะละกอเพื่อการส่งออก. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาศัตรูพืชหมดปัญหาเมื่ออารักขาถูกวิธี. 7-9 สิงหาคม 2555. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 100 หน้า.
- อุดร อุณหภูมิต. 2541. การกำจัดแมลงวันผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว. ฝ่ายกักกันพืช, กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 129 หน้า.
- อุดร อุณหภูมิต สลักจิต พานคำ ชัยณรงค์ สุนศิริ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชุตติมา อ้อมกิ่ง จารุวรรณ จันทรา และรัชฎา อินทรกำแหง. 2549. การวิจัยพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในส้มโอเพื่อส่งออก. ผลงานวิจัยเพื่อพัฒนาเป็นผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2549, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า. 125-143.
- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- CABI. 2014. Invasive Species Compendium. *Bactrocera dorsalis* <http://www.cabi.org/isc/datasheet/17685>. (26 July 2014).
- Goodwin, T.W. and M. Jamikorn. 1952. Biosynthesis of carotenes in ripening tomatoes Nature. 170: 104-105.
- Intarakumheng, R., U. Unahawutti, S. Phankum, C. Sonsiri, M. Srimartpirom, C. Ormking and J. Chantra. 2006. Thermal tolerance of the first instar larvae of oriental fruit fly to modified vapor heat treatment in Mahachanok and Nang Klarnghwan mangoes. A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF) for approval of a quarantine treatment on Mahachanok



- mango to be exported from Thailand to Japan. Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. Bangkok 38 p.
- Intarakumheng, R., S. Phankum, C. Sonsiri, M. Srimartpirom, C. Ormking and U. Unahawutti. 2013. Evaluation of modified vapor heat treatment as quarantine treatment for Khiaosawoey and Chokanan mangoes infested with oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF) for market access of Khiaosawoey and Chokanan mangoes from Thailand to Japan. Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. Bangkok. 139 p.
- Iwaizumi, R. 2004. Species and host record of the *Bactrocera dorsalis* complex (Diptera: Tephritidae) detected by the plant quarantine of Japan. Applied Entomology and Zoology 39 (2): 327-333.
- Jennifer, L. and G. Kaufman. 2012. Featured Creatures. University of Florida http://www.entnemdept.ufl.edu/creatures/fruit/tropical/oriental_fruit_fly.htm (26 July 2014).
- MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries). 2010. Summary of proposed Revisions to the Enforcement Ordinance of the Plant Protection Law and Concerned Public Notice Retrieved February1, 2012 from http://www.members.wto.org/crnattachments/2010/sps/JPN/10_4194_00_e.pdf
- McDonald, R.E. and W.R. Miller. 1994. Quality and condition maintenance. In: J.L. Sharp and G.Y. Hallman (eds.), Quarantine treatment for pests of food plant. Westview Press, Inc., Boulder, Colorado, USA. pp. 249-277.
- Miyazaki, I. 2010. How to prepare the technical report on vapor heat disinfestations test. In: Report of the thermal treatment for the disinfestations of fruit flies. Naha Plant Protection Station, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Okinawa International Centre. Japan International Cooperation Agency, Japan. 30 p.
- Shimizu, Y., T. Kohama, T. Uesato, T. Matsuyama and M. Yamagishi. 2007. Invasion of solanum fruit fly *Bactrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae) to Yonaguni Island, Okinawa Prefecture, Japan. Appl. Entomol. Zool. 42 (2): 269-275.



- Sonsiri, C., W. Rattanadechakul, S. Phankum, M. Srimartpirom and C. Ormking. 2015. Modified Vapor Heat Treatment for Mangosteen Infested with *Bactrocera dorsalis*, *B. carambolae* and *B. papayae* (Diptera: Tephritidae) for Export. A research submitted to Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine (BAPHIQ) Council of Agriculture, Executive Yuan Taipei City Taiwan, R.O.C. Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. Bangkok. 26 p.
- Srimartpirom, M. 2010. The final report of thermal treatment for the disinfestations of fruit flies from Thailand. p 95. *In*: Report of the thermal treatment for the disinfestations of fruit flies. Naha Plant Protection Station, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, Okinawa International Centre. Japan International Cooperation Agency, Japan. 100 p.
- Thomas, D. B. 2004. Hot peppers as a host for the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). Florida Entomologist 87 (4): 603-608.
- Unahawutti, U., C. Chettanachitara, M. Poomthong, P. Konson, E. Smitasiri, C. Lapasathukool, W. Worawisitthumrong and R. Intarakumheng. 1986. Vapor heat treatment for ‘Nang Klarngwun’ mango, *Mangifera indica* Linn., infested with eggs and larvae of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel and the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett (Diptera: Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture. Bangkok. 108 p.
- Unahawutti, U., M. Poomthong, R. Intarakumheng, W. Worawisitthumrong, C. Lapasathukool, E. Smitasiri, P. Srisoon and C. Ratanawaraha. 1991. Vapor heat as plant quarantine treatment of ‘Nang Klarngwan’, ‘Nam Dorkmai’, ‘Rad’ and ‘Pimsen Daeng’ mangoes infested with fruit flies (Diptera: Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture. Bangkok. 342 p.
- Unahawutti, U., S. Phankum, P. Ongthonglang and C. Chettanachitara. 1999. Heated-air quarantine treatment for mangosteen infested with oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries for approval of quarantine treatment on Thai mangosteen to be exported to Japan. Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture. Bangkok. 630 p.



Unahawutti, U., S. Phankum, M. Srimartpirom, C. Ormking, C. Sonsiri, J. Chantra, and R. Intarakumheng. 2006. Heated-air quarantine treatment for pummelo infested with oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries for approval of quarantine treatment on Thai pummelo to be exported to Japan. Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. Bangkok. 135 p.

Watanabe, N., F. Ichinohe and M. Sonda. 1973. Improvement of corn flour medium for larval culture of oriental fruit fly. Res. Bull. Plant Prot. Japan. 11: 57-58.

White, I. M. and M. M. Elson-Harris. 1992. Fruit flies of economic significance: Their identification and bionomics. CAB International, Wallingford, UK. 601 p.

Table 1 Calibration factor obtained from each sensor of the vapor heat treatment system.

| Date/Time | Number of sensor ^{1/} | | | | | | | |
|------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 4 | 5 | 6 | 8 | 9 | 10 |
| 12/10/2018 | | | | | | | | |
| 9:00 | 46.0 | 100 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 |
| 9:05 | 46.0 | 99.9 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 |
| 9:10 | 46.0 | 100 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 |
| 9:15 | 46.0 | 99.9 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 |
| 9:20 | 46.0 | 99.9 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 | 46.0 |

^{1/}The test was conducted by dipping all sensors into constant temperature water bath at 46.0 °C for 0:20 minutes.

Table 2 Time for center of pummelo to attain 46.0 °C for various holding times during modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test.

| Rep. | Load | | Time (min.) ^{1/} | | | | | | |
|------|---------------------|----------------------------|---------------------------|----------|------|------|------|------|--|
| | factor (kg/cum.) | Sensor fruit weight (g) | 0:00 | | | | 0:10 | | |
| | | | 0:20 | 0:30 | 0:40 | 0:50 | 1:00 | 1:10 | |
| 1 | 18.35 | 1,175.89 | 1,181.40 | 1,182.30 | 5:36 | 5:46 | 5:56 | 6:06 | |
| 2 | 18.92 | 1,180.08 | 1,183.92 | 1,185.93 | 6:00 | 6:10 | 6:20 | 6:30 | |
| 3 | 18.86 | 1,192.82 | 1,194.10 | 1,197.96 | 5:40 | 5:50 | 6:00 | 6:10 | |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.



Table 3 Time for center of pummelo to attain 43.0 and 46.0 °C during modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test.

| Rep. | Time for fruit center to reach 43.0 °C (h) ^{1/} | Time for fruit center to reach 46.0 °C (h) ^{1/} | Time form 43.0 to 46.0 °C (h) ^{1/} |
|----------------|--|--|---|
| 1 | 3:36 | 5:36 | 2:00 |
| 2 | 4:00 | 6:00 | 2:00 |
| 3 | 3:41 | 5:40 | 1:59 |
| Average | 3:59 | 5:59 | 2:00 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.

Table 4 Mortality^{1/} of first instar of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in pummelo (Tabtim Siam) treated with modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test.

| Treatment ^{2/} | Number of treated (larvae) | Number of alive (larvae) | Number of dead (larvae) | Corrected mortality (%) ^{3/} |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Control | 1,200 | 1,001 | 199 | 0 |
| 46.0 °C + 0 min. | 1,200 | 0 | 1,200 | 100 |
| 46.0 °C + 10 min. | 1,200 | 0 | 1,200 | 100 |
| 46.0 °C + 20 min. | 1,200 | 0 | 1,200 | 100 |
| 46.0 °C + 30 min. | 1,200 | 0 | 1,200 | 100 |

^{1/}Combined data of 3 replicates.

^{2/}Treatment: 2 fruits infested with 200 individuals/fruit.

Control: 2 fruits infested with 200 individuals/fruit.

^{3/}Mortality is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925).



Table 5 Mortality^{1/} of first instar of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in pummelo (Thong Dee) treated with modified vapor heat treatment in preliminary disinfestation test.

| Treatment ^{2/} | Number of treated (larvae) | Number of alive (larvae) | Number of dead (larvae) | Corrected mortality (%) ^{3/} |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Control | 1,200 | 1,016 | 184 | 0 |
| 46.0 ° C + 0 min. | 1,200 | 0 | 1,200 | 100 |
| 46.0 ° C + 10 min. | 1,200 | 2 | 1,198 | 99.70 |
| 46.0 ° C + 20 min. | 1,200 | 0 | 1,200 | 100 |
| 46.0 ° C + 30 min. | 1,200 | 0 | 1,200 | 100 |

^{1/}Combined data of 3 replicates.

^{2/}Treatment: 2 fruits infested with 200 individuals/fruit.

Control: 2 fruits infested with 200 individuals/fruit.

^{3/}Mortality is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925).

Table 6 Time for center of pummelo to attain 46.0 ° C for various holding times during modified vapor heat treatment in intermediate disinfestation test.

| Rep. | Load factor (kg/cum.) | Sensor fruit weight (g) | | | Time (min.) ^{1/} | | |
|------|-----------------------|-------------------------|----------|----------|---------------------------|------|------|
| | | | | | 0:00 | 0:10 | 0:20 |
| 1 | 14.86 | 1,200.59 | 1,206.57 | 1,206.96 | 5:22 | 5:32 | 5:42 |
| 2 | 14.91 | 1,207.21 | 1,211.16 | 1,219.42 | 5:20 | 5:30 | 5:40 |
| 3 | 14.97 | 1,223.77 | 1,225.93 | 1,226.81 | 5:40 | 5:50 | 6:00 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.

Table 7 Time for center of pummelo to attain 43.0 and 46.0 ° C during modified vapor heat treatment in intermediate disinfestation test.

| Rep. | Time for fruit center to reach 43.0 ° C (h) ^{1/} | Time for fruit center to reach 46.0 ° C (h) ^{1/} | Time form 43 to 46.0 ° C (h) ^{1/} |
|---------|---|---|--|
| 1 | 3:31 | 5:22 | 1:51 |
| 2 | 3:25 | 5:20 | 1:55 |
| 3 | 3:40 | 5:40 | 2:00 |
| Average | 3:32 | 5:27 | 1:55 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.



Table 8 Mortality^{1/} of first instar of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in Pummelo (Tabtim Siam) treated with modified vapor heat treatment in intermediate disinfestation test.

| Treatment ^{2/} | Number of treated (larvae) | Number of alive (larvae) | Number of dead (larvae) | Corrected mortality (%) ^{3/} |
|-------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Control | 2,400 | 2,026 | 374 | 0 |
| 46.0 ° C + 0 min. | 2,400 | 2 | 2,398 | 99.85 |
| 46.0 ° C + 10 min. | 2,400 | 0 | 2,400 | 100 |
| 46.0 ° C + 20 min. | 2,400 | 0 | 2,400 | 100 |

^{1/}Combined data of 3 replicates.

^{2/}Treatment: 4 fruits infested with 200 individuals/fruit.

Control: 4 fruits infested with 200 individuals/fruit.

^{3/}Mortality is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925).

Table 9 Time for center of pummelo to attain 46.0, 47.0 and 48.0 ° C for various holding times during modified vapor heat treatment in fruit injury test.

| Temp. | Load factor (kg/cum.) | Rep. | Sensor fruit weight (g) | | | Time (h) ^{1/} | | |
|----------|-----------------------|------|-------------------------|----------|----------|------------------------|------|------|
| | | | | | | 0:00 | 1:00 | 2:00 |
| 46.0 ° C | 14.06 | 1 | 1,178.74 | 1,187.45 | 1,190.47 | 6:45 | 7:45 | 8:45 |
| | 13.60 | 2 | 1,191.40 | 1,195.08 | 1,197.97 | 6:25 | 7:25 | 8:25 |
| 47.0 ° C | 15.06 | 1 | 1,198.72 | 1,200.41 | 1,206.12 | 6:30 | 7:30 | 8:30 |
| | 15.11 | 2 | 1,280.40 | 1,210.04 | 1,212.08 | 6:20 | 7:20 | 8:20 |
| 48.0 ° C | 13.70 | 1 | 1,223.05 | 1,223.36 | 1,224.47 | 6:30 | 7:30 | 8:30 |
| | 14.34 | 2 | 1,217.36 | 1,220.75 | 1,221.28 | 6:25 | 7:25 | 8:25 |

^{1/}Time for center of only 3 sensor fruits to attain target temperature.



Table 10 Time for center of pummelo to attain 43.0, 46.0, 47.0 and 48.0 °C during modified vapor heat treatment in fruit injury test.

| Temp. | Rep. | Time for fruit center to reach 43.0 °C (h) ^{1/} | Time for fruit center to reach 46.0, 47.0, 48.0 °C (h) ^{1/} | Time form 43 to 46.0, 47.0, 48.0 °C (h) ^{1/} |
|---------|------|--|--|---|
| 46.0 °C | 1 | 4:25 | 6:45 | 2:20 |
| | 2 | 4:15 | 6:25 | 2:10 |
| 47.0 °C | 1 | 3:50 | 6:30 | 2:40 |
| | 2 | 3:50 | 6:20 | 2:30 |
| 48.0 °C | 1 | 3:35 | 6:30 | 2:55 |
| | 2 | 3:35 | 6:25 | 2:50 |
| Average | | 4:08 | 6:29 | 2:34 |

^{1/}Time for center of only 3 sensor fruits to attain target temperature.

Table 11 Weight loss (%) of pummelo treated with modified vapor heat treatment center temperature 46.0, 47.0 and 48.0 °C for various holding times and 7 days chamber at 10 °C.

| Rep. | Treatment ^{1/} | Weight loss (%) ^{ns} | | |
|------|---------------------------|-------------------------------|--------|--------|
| | | 0:00 h | 1:00 h | 2:00 h |
| 1 | 46.0 °C | 4.70 | 4.39 | 4.34 |
| | Control | 4.01 | | |
| | t-test 46.0 °C vs Control | | | |
| | 47.0 °C | 3.86 | 3.88 | 4.47 |
| | Control | 3.38 | | |
| | t-test 47.0 °C vs Control | | | |
| 2 | 48.0 °C | 4.50 | 5.09 | 4.59 |
| | Control | 4.07 | | |
| | t-test 48.0 °C vs Control | | | |
| | 46.0 °C | 3.94 | 4.15 | 4.34 |
| | Control | 4.21 | | |
| | t-test 46.0 °C vs Control | | | |
| 2 | 47.0 °C | 4.31 | 4.28 | 4.31 |
| | Control | 3.53 | | |
| | t-test 47.0 °C vs Control | | | |
| | 48.0 °C | 5.17 | 4.63 | 4.79 |
| | Control | 4.81 | | |
| | t-test 48.0 °C vs Control | | | |

^{1/}Treatment: mean of 4 fruits, Control: mean of 4 fruits.

^{ns} Non difference was statistically significant by t-test.

* The difference was statistically significant by t-test.



Table 12 Total soluble solid (⁰ Brix) of pummelo treated with modified vapor heat treatment center temperature 46.0, 47.0 and 48.0 °C for various holding times and 7 days chamber at 10 °C.

| Rep. | Treatment ^{1/} | Brix value (Brix) ^{ns} | | |
|------|---------------------------|---------------------------------|--------|--------|
| | | 0:00 h | 1:00 h | 2:00 h |
| 1 | 46.0 °C | 8.98 | 8.95 | 8.90 |
| | Control | 9.18 | | |
| | t-test 46.0 °C vs Control | | | |
| | 47.0 °C | 8.78 | 9.28 | 9.20 |
| | Control | 8.98 | | |
| | t-test 47.0 °C vs Control | | | |
| | 48.0 °C | 9.13 | 9.18 | 9.15 |
| | Control | 9.20 | | |
| | t-test 48.0 °C vs Control | | | |
| 2 | 46.0 °C | 8.65 | 9.03 | 9.38 |
| | Control | 9.50 | | |
| | t-test 46.0 °C vs Control | | | |
| | 47.0 °C | 9.45 | 9.08 | 9.35 |
| | Control | 9.73 | | |
| | t-test 47.0 °C vs Control | | | |
| | 48.0 °C | 9.65 | 8.98 | 9.25 |
| | Control | 10.28 | | |
| | t-test 48.0 °C vs Control | | | |

^{1/} Treatment: mean of 4 fruits, Control: mean of 4 fruits.

^{ns} Non difference was statistically significant by t-test.

* The difference was statistically significant by t-test.



Table 13 Acidity (%) of pummelo treated with modified vapor heat treatment center temperature 46.0, 47.0 and 48.0 °C for various holding times and 7 days chamber at 10 °C.

| Rep. | Treatment ^{1/} | Acidity (%) ^{ns} | | |
|------|---------------------------|---------------------------|--------|--------|
| | | 0:00 h | 1:00 h | 2:00 h |
| 1 | 46.0 °C | 0.35 | 0.43 | 0.40 |
| | Control | 0.43 | | |
| | t-test 46.0 °C vs Control | | | |
| | 47.0 °C | 0.50 | 0.40 | 0.41 |
| | Control | 0.46 | | |
| | t-test 47.0 °C vs Control | | | |
| | 48.0 °C | 0.46 | 0.50 | 0.37 |
| | Control | 0.44 | | |
| | t-test 48.0 °C vs Control | | | |
| 2 | 46.0 °C | 0.39 | 0.38 | 0.35 |
| | Control | 0.37 | | |
| | t-test 46.0 °C vs Control | | | |
| | 47.0 °C | 0.54 | 0.41 | 0.38 |
| | Control | 0.53 | | |
| | t-test 47.0 °C vs Control | | | |
| | 48.0 °C | 0.37 | 0.42 | 0.39 |
| | Control | 0.43 | | |
| | t-test 48.0 °C vs Control | | | |

^{1/} Treatment: mean of 4 fruits, Control: mean of 4 fruits.

^{ns} Non difference was statistically significant by t-test.

* The difference was statistically significant by t-test.



Table14 Peel color rating (0-4) of pummelo treated with modified vapor heat treatment center temperature 46.0, 47.0 and 48.0 °C for various holding times and 7 days chamber at 10 °C.

| Rep. | Treatment ^{1/} | Peel color rating (0-4) ^{ns} | | |
|------|---------------------------|---------------------------------------|--------|--------|
| | | 0:00 h | 1:00 h | 2:00 h |
| 1 | 46.0 °C | 0.25 | 0.50 | 0.50 |
| | Control | 0.50 | | |
| | t-test 46.0 °C vs Control | | | |
| | 47.0 °C | 0.50 | 0.25 | 0.25 |
| | Control | 0.25 | | |
| | t-test 47.0 °C vs Control | | | |
| | 48.0 °C | 0.50 | 0.25 | 0.75 |
| | Control | 0.25 | | |
| | t-test 48.0 °C vs Control | | | |
| 2 | 46.0 °C | 0.50 | 0.25 | 0.75 |
| | Control | 0.25 | | |
| | t-test 46.0 °C vs Control | | | |
| | 47.0 °C | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| | Control | 0.25 | | |
| | t-test 47.0 °C vs Control | | | |
| | 48.0 °C | 0.75 | 0.25 | 1.00 |
| | Control | 0.25 | | |
| | t-test 48.0 °C vs Control | | | |

^{1/} Treatment: mean of 4 fruits, Control: mean of 4 fruits.

^{ns} Non difference was statistically significant by t-test.

* The difference was statistically significant by t-test.



Table 15 Time for center of pummelo to attain 46.0 °C for 0:30 minutes during modified vapor heat treatment in large scale disinfestation test.

| Rep. | Loading (kg/cum.) | Sensor fruit weight (g) | | | Time (h) ^{1/} | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------|----------|----------|------------------------|------|
| | | | | | 0:00 | 0:30 |
| Low load: 60.38 - 60.59 kg/cum. | | | | | | |
| 1 | 60.51 | 1,200.79 | 1,203.73 | 1,206.73 | 5:26 | 5:56 |
| 2 | 60.38 | 1,191.02 | 1,192.82 | 1,196.26 | 5:48 | 6:18 |
| 3 | 60.55 | 1,178.82 | 1,185.01 | 1,186.88 | 5:20 | 5:50 |
| 4 | 60.59 | 1,194.82 | 1,196.58 | 1,197.79 | 5:41 | 6:11 |
| 5 | 60.45 | 1,212.18 | 1,216.65 | 1,219.50 | 5:18 | 5:48 |
| Full load: 120.55 - 120.67 kg/cum. | | | | | | |
| 1 | 120.65 | 1,211.38 | 1,215.70 | 1,219.69 | 6:02 | 6:32 |
| 2 | 120.65 | 1,212.14 | 1,214.14 | 1,219.12 | 6:17 | 6:47 |
| 3 | 120.55 | 1,213.55 | 1,220.10 | 1,220.70 | 6:27 | 6:57 |
| 4 | 120.66 | 1,221.03 | 1,222.87 | 1,222.99 | 6:33 | 7:03 |
| 5 | 120.67 | 1,220.22 | 1,223.12 | 1,223.57 | 6:10 | 6:40 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.

Table 16 Time for center of pummelo to attain 43.0 and 46.0 °C during modified vapor heat treatment in large scale disinfestation test.

| Rep. | Time for fruit center to reach 43.0 °C (h) ^{1/} | Time for fruit center to reach 46.0 °C (h) ^{1/} | Time form 43 to 46.0 °C (h) ^{1/} |
|------------------------------------|---|--|---|
| | Low load: 60.38 - 60.59 kg/cum. | | |
| 1 | 3:38 | 5:26 | 1:48 |
| 2 | 3:52 | 5:48 | 1:56 |
| 3 | 3:37 | 5:20 | 1:43 |
| 4 | 3:46 | 5:41 | 1:55 |
| 5 | 3:34 | 5:18 | 1:44 |
| Average | 3:41 | 5:31 | 1:49 |
| Full load: 120.55 - 120.67 kg/cum. | | | |
| 1 | 4:05 | 6:02 | 1:57 |
| 2 | 4:13 | 6:17 | 2:04 |
| 3 | 4:23 | 6:27 | 2:04 |
| 4 | 4:25 | 6:33 | 2:08 |
| 5 | 4:06 | 6:10 | 2:04 |
| Average | 4:14 | 6:18 | 2:03 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.



Table 17 Survival^{1/} of first instar of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in pummelo (Tabtim Siam) treated with modified treated vapor heat treatment at 46 ° C for 0:30 minutes in large scale disinfestation test.

| Rep. | Infestation method | No. test fruit | | No. alive individual in control (larvae) | Estimated treated population (larvae) | No. survivors |
|--|--------------------|----------------|-------------------------|--|---------------------------------------|---------------|
| | | Control | Treatment ^{2/} | | | |
| Low load: 60.38 - 60.59 kg/cum. | | | | | | |
| 1 | Larval inoculation | 6 | 18 | 825 | 2,556 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 325 | 975 | 0 |
| 2 | Larval inoculation | 6 | 18 | 919 | 2,757 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 279 | 891 | 0 |
| 3 | Larval inoculation | 6 | 18 | 868 | 2,604 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 322 | 966 | 0 |
| 4 | Larval inoculation | 6 | 18 | 986 | 2,958 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 304 | 912 | 0 |
| 5 | Larval inoculation | 6 | 18 | 1,047 | 3,141 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 415 | 1,245 | 0 |
| Sub-total | | 40 | 120 | 6,335 | 19,005 | 0 |
| Full load: 120.55 - 120.67kg/cum. | | | | | | |
| 1 | Larval inoculation | 6 | 18 | 1,013 | 3,039 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 365 | 1,095 | 0 |
| 2 | Larval inoculation | 6 | 18 | 931 | 2,793 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 374 | 1,122 | 0 |
| 3 | Larval inoculation | 6 | 18 | 920 | 2,760 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 385 | 1,155 | 0 |
| 4 | Larval inoculation | 6 | 18 | 1,042 | 3,126 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 396 | 1,188 | 0 |
| 5 | Larval inoculation | 6 | 18 | 981 | 2,943 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 386 | 1,158 | 0 |
| Sub-total | | 40 | 120 | 6,766 | 20,379 | 0 |
| Total | | 80 | 240 | 13,101 | 39,384 | 0 |

^{1/}Combined data of 10 replicates.

^{2/}Treatment: 180 fruits (Larval inoculation) infested with 200 individuals/fruit.

Control: 60 fruits (Larval inoculation) infested with 200 individuals/fruit.

Treatment: 60 fruits (Forced infestation).

Control: 20 fruits (Forced infestation).



Table 18 Time for center of pummelo to attain 43.0 and 46.0 °C for 0:30 minutes during modified vapor heat treatment in commercial export simulation test.

| Method of transportation | Rep. | Loading (kg/cum.) | Sensor fruit weight (g) | Time for fruit center to reach 43.0 °C (h) ^{1/} | Time for fruit center to reach 46.0 °C (h) ^{1/} | Time for fruit center to reach 46.0 °C 0:30 (h) ^{1/} |
|--------------------------|------|-------------------|-------------------------|--|--|---|
| Air shipment | 1 | 132.22 | 1,202.79 | 4.15 | 6.15 | 6.45 |
| Sea shipment | | | 1,206.20 | | | |
| | | | 1,214.17 | | | |
| Air shipment | 2 | 132.63 | 1,206.35 | 4.25 | 6.46 | 7.16 |
| Sea shipment | | | 1,208.88 | | | |
| | | | 1,214.77 | | | |

^{1/}Time for center of only 3 sensor fruits to attain target temperature.

Table 19 Air transportation: Quality of pummelo fruits treated with proposed heat quarantine treatment at center temperature 46.0 °C for 0:30 minutes and 7 days chamber at 10 °C.

| Rep. | Item ^{ns} | | Control ^{1/} | Treatment ^{1/} |
|------|---------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | Weight loss | % | 3.05 | 3.96 |
| | TSS | ⁰ Brix | 9.95 | 9.82 |
| | Acidity | % | 0.90 | 0.68 |
| | Peel color | 0-4 scale | 0.25 | 0.50 |
| | Damaged oil gland ^{2/} | Present | 0/4 | 0/12 |
| | Smell ^{2/} | Unusual | 0/4 | 0/12 |
| | Taste ^{2/} | Unusual | 0/4 | 0/12 |
| 2 | Weight loss | % | 3.22 | 3.93 |
| | TSS | ⁰ Brix | 9.65 | 10.60 |
| | Acidity | % | 0.53 | 0.46 |
| | Peel color | 0-4 scale | 0.25 | 0.75 |
| | Damaged oil gland ^{2/} | Present | 0/4 | 0/12 |
| | Smell ^{2/} | Unusual | 0/4 | 0/12 |
| | Taste ^{2/} | Unusual | 0/4 | 0/12 |

^{1/}Control = mean of 4 fruits, Treatment = mean of 12 fruits.

^{2/}Fruits exhibited symptom/Total number of fruits observed.

^{ns} Non difference was statistically significant by t-test.



Table 20 Sea transportation: Quality of pummelo fruits treated with proposed heat quarantine treatment at center temperature 46.0 °C for 0:30 minutes and 14 days chamber at 10 °C.

| Rep. | Item ^{ns} | | Control ^{1/} | Treatment ^{1/} |
|------|---------------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------------|
| 1 | Weight loss | % | 5.75 | 6.88 |
| | TSS | ⁰ Brix | 11.43 | 10.61 |
| | Acidity | % | 0.54 | 0.62 |
| | Peel color | 0-4 scale | 0.25 | 0.42 |
| | Damaged oil gland ^{2/} | Present | 0/4 | 0/12 |
| | Smell ^{2/} | Unusual | 0/4 | 0/12 |
| | Taste ^{2/} | Unusual | 0/4 | 0/12 |
| 2 | Weight loss | % | 6.36 | 6.62 |
| | TSS | ⁰ Brix | 10.23 | 9.96 |
| | Acidity | % | 0.50 | 0.48 |
| | Peel color | 0-4 scale | 0.50 | 0.83 |
| | Damaged oil gland ^{2/} | Present | 0/4 | 0/12 |
| | Smell ^{2/} | Unusual | 0/4 | 0/12 |
| | Taste ^{2/} | Unusual | 0/4 | 0/12 |

^{1/}Control = mean of 4 fruits, Treatment = mean of 12 fruits.

^{2/}Fruits exhibited symptom/Total number of fruits observed.

^{ns} Non difference was statistically significant by t-test.



Figure 1 Fruit fly mass rearing room



Figure 2 Fruit fly eggs



Figure 3 Count fruit fly first instar under microscope



Figure 4 The first hole was made on top at the area where the stalk attached with fruit

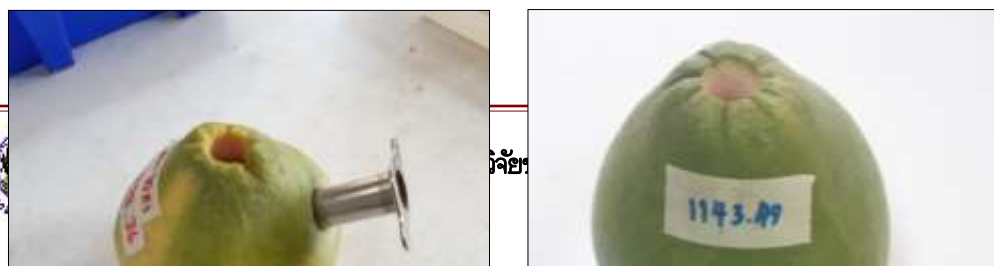


Figure 5 The second hole was made on upper half of test fruits



Figure 6 Sanshu vapor heat treatment system (differential pressure type) model: EHK-1000D



Figure 7 Calibration sensor of resistance thermometers



Figure 8 Recorder in the vapor heat treatment system



Figure 9 Place monitoring of fruit temperature (sensor fruit).



Figure 10 Control and test fruits infested with fruit fly first instar were held in room at 25-27 ° C after heat treatment



Figure 11 Test fruits infested with fruit fly first instar were observed at each given treatment temperature and holding time



Figure 12 Fruit holding containers (drawer-type boxes)



Figure 13 Showing cooling system (differential pressure type) model: SHS-12



Figure 14 Control and treated fruits keep in box



Figure 15 Control and treated fruits in chamber at 10 ° C after heat treatment



Figure 16 The measurement of total soluble solid (TSS) by using 'atago' digital refractometer (model: DBX-30)



Figure 17 The measurement of acidity by using acilizer (model: 5 006P)



Figure 18 Forced infestation method ten punctures were made on the fruit surface by inserting pin (0.5 mm. diameter)



Figure 19 Forced infestation method test fruits were individually exposed to gravid females for oviposition



Figure 20 Artificial and Forced infestation method



Figure 21 Filler fruits



Figure 22 Low load and Full load in chamber (capacity 50 and 100 %)



Figure 23 Commercial export simulation test



Figure 24 Filler fruits

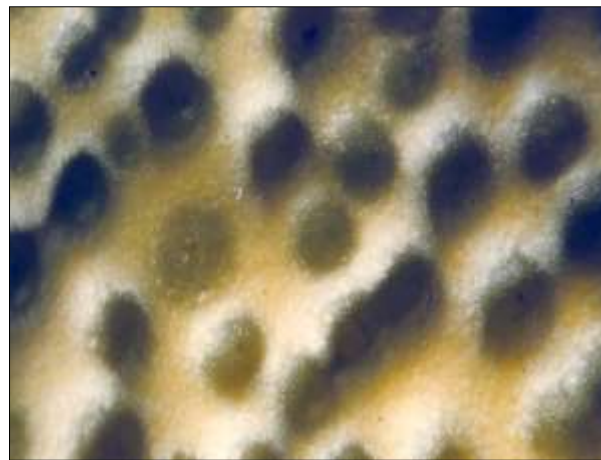


Figure 25 Symptom of damaged oil gland (black spot) found on peel of MVHT treated fruits at 48 °C for 2 h after 7 days in chamber at 10 °C

วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้
Bactrocera dorsalis (Hendel) ในผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์เพื่อการส่งออก
 Research and Development of Heated Air Quarantine Treatment to Control
 the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) on
 Papaya (Holland) cultivar for export

มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ สลักจิต พานคำ รัชฎา อินทรกำแหง ชัยณรัตน์ สนศิริ
 ปวีณา บุษาทิเยน พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์ พงษ์ศักดิ์ จิณฤทธิ ศิริพร คงทวี
 กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Thailand was successfully developed modified vapor heat treatment (MVHT) as a quarantine treatment to disinfest fruit flies in mango, mangosteen and pummelo fruit before export without affecting fruit quality. The objective of these experiment was to demonstrate the effectiveness of MVHT under simulated commercial conditions as large scale test for approval a quarantine treatment requires a minimum of 30,000 individuals of the most heat tolerant stage of the oriental fruit fly (OFF), *Bactrocera dorsalis* (Hendel), first instar larvae, infesting in the papaya would be completely killed by a specified treatment schedule. Completely mortality of the 1st instar larvae of *B. dorsalis* on “Holland” papaya fruit was achieved, when the infested fruits were heated with hot air at 50-80 % RH from ambient temperature to 43°C (dry preheating period) and the fruits were then gradually warmed to 47° C with high temperature air saturated with water vapor, and subsequently the fruit center temperature was kept at 47° C for 20 mins. The results indicated that none of the treated 32,888 of 1st instar larvae survived. Based on these results, the effectiveness of MVHT against the OFF, *B. dorsalis* on papaya without damaging fruit quality could be as standard quarantine treatment for papaya exported from Thailand.

Keywords : Plant Quarantine, Fruit fly, Papaya, Mortality, Export fruit

รหัสการทดลอง 03-04-59-03-01-00-08-62



บทคัดย่อ

หลังจากประเทศไทยได้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT) เป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (quarantine treatment) เพื่อใช้กำจัดแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* species complex ในผลมะม่วง, มังคุด และส้มโอ ก่อนส่งออกโดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลไม้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* (Hendel) ในผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ได้ตามมาตรฐานวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชระหว่างประเทศ โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของมะละกอหลังอบไอน้ำ สำหรับในปี 2562-2564 ได้มีการศึกษา 3 หัวข้อ ดังนี้ 1.) ศึกษาด้านความเสียหายของมะละกอจากความร้อนด้วยวิธีอบไอน้ำ MVHT ในตู้อบไอน้ำเชิงพาณิชย์ต่อคุณภาพของมะละกอ พบว่ามะละกอที่ผ่านความร้อน ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ไม่พบความเสียหายที่เด่นชัดภายในเนื้อมะละกอเมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน เมื่อพิจารณาจากการสูญเสียน้ำหนัก และปริมาณน้ำตาล พบว่ามะละกอที่ผ่านความร้อนที่ 8 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน 2.) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ ดำเนินการทดลองโดยอบมะละกอด้วยวิธีอบไอน้ำ MVHT ที่ อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และเก็บมะละกอที่ผ่านความร้อน ที่อุณหภูมิ 10-13 องศาเซลเซียส พบว่าการสูญเสียน้ำหนัก และปริมาณน้ำตาล ของมะละกอที่ผ่านความร้อน เก็บไว้ ที่ 7 และ 14 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน 3.) ศึกษายืนยันประสิทธิภาพด้านการกำจัดแมลงด้วยความร้อนจากวิธีอบไอน้ำ MVHT เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 ในผลมะละกอ อบมะละกอทดลองจนอุณหภูมิภายในสุดผลถึง 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยตรวจนับจำนวนแมลงรอดชีวิตหลังอบมะละกอ 5 วัน พบว่าที่อุณหภูมิดังกล่าว ไม่พบแมลงรอดชีวิต ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที มีประสิทธิภาพกำจัดหนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวนประมาณ 32,888 ตัว ในผลมะละกอฮอลแลนด์ให้ตายทั้งหมด ซึ่งได้ตามมาตรฐานของวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช จากผลงานวิจัยนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะเสนอให้เป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะละกอส่งออกและเสนอรายงานวิจัยต่อประเทศผู้นำเข้าที่ยอมรับวิธีการใช้ความร้อนเป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชต่อไป

คำหลัก : วิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช, แมลงวันผลไม้, มะละกอ, ทดสอบการตาย, ผลไม้ส่งออก



คำนำ

มะละกอ *Carica papaya* L. เป็นหนึ่งในผลไม้ที่มีศักยภาพในการส่งออก เนื่องจากประเทศไทยจัดอยู่ในลำดับที่ 9 ของผู้ผลิตมะละกอทั่วโลก (Songpol, 2011) พันธุ์ที่นิยมปลูกเป็นการค้าคือ พันธุ์แขกนวล แขกดำ แขกดำท่าพระ ฮอลแลนด์ เรดเลดี้ และปากช่อง โดยเฉพาะมะละกอฮอลแลนด์ผลสุก เป็นพันธุ์ที่ขายได้ราคาสูง เนื่องจากให้ผลดก ผลคล้ายลูกฟักอ่อน มีเนื้อสีแดงอมส้มรสชาติหวาน เปลือกหนา จึงทำให้ทนทานต่อโรค และการขนส่งได้ดี (จริงแท้, 2552; Thaipong *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามมะละกอเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ภายใต้เงื่อนไขการส่งออกมะละกอไปจำหน่ายยังประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช ประเทศไทยจำเป็นต้องหาวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ที่มีประสิทธิภาพ โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลไม้ และได้มาตรฐานตามวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช

แมลงวันผลไม้ Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ชนิดแมลงวันทองเป็นแมลงศัตรูที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของผลไม้หลายชนิดในประเทศไทย สามารถเข้าทำลายผลไม้ที่มีเปลือกบางหรืออ่อนนุ่ม เช่น มะม่วง ชมพู ฝรั่ง มะละกอ พุทรา กล้วย น้อยหน่า ฯลฯ (อินทวัฒน์, 2537) มลนิภาและคณะ (2555) รายงานว่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* สามารถเข้าทำลายมะละกอได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หากไม่มีการป้องกันกำจัด นอกจากนี้แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้จัดอยู่ในกลุ่มแมลงวันผลไม้สายพันธุ์ *B. dorsalis* species complex ซึ่งมีความสำคัญทางด้านกักกันพืช (CABI, 2015; Vargas *et al.*, 2015)

วิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชก่อนส่งออกมีหลายวิธี อาทิเช่น การใช้ความร้อน ความเย็น ร่มควัน และฉายรังสี ฯลฯ ประเทศไทยได้ประสบความสำเร็จในการวิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อน โดยใช้วิธีอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) และวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified, Vapor Heat Treatment, MVHT) เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* species complex และ *B. cucurbitae* ในมะม่วง 7 พันธุ์ (หนังกกลางวัน น้ำดอกไม้ แรด พิมเสนแดง มหาชนก เขียวเสวย และโชคอนันต์) มังคุด และส้มโอพันธุ์ทองดี ได้อย่างมีประสิทธิภาพตามมาตรฐานของวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลไม้ (รัชฎาและคณะ, 2553; Intarakumheng *et al.*, 2016; Lapasathukool *et al.*, 2002; Unahawutti *et al.*, 1991, 1999, 2006)

งานวิจัยในผลไม้ที่มีศักยภาพในการส่งออกชนิดอื่น ๆ มลนิภาและคณะ (2555) ได้ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนของมะละกอฮอลแลนด์ด้วยวิธีอบไอน้ำ (VHT) เปรียบเทียบกับวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) พบว่าวิธีอบไอน้ำ MVHT มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีอบไอน้ำ VHT นอกจากนี้ มลนิภาและคณะ (2555) ได้ศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในระยะไข่ และหนอน ในมะละกอฮอลแลนด์ ด้วยวิธีอบไอน้ำ MVHT เพื่อกำหนดระยะการเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด พบว่าหนอนวัยที่ 1 เป็นวัยที่ทนทานต่อความร้อน



มากที่สุด การศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำ MVHT ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลไม้เพื่อการส่งออก จำเป็นต้องศึกษาปัจจัยในด้านอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ได้ตามมาตรฐานด้านกักกันพืช

มลินิกา และคณะ (2558) ได้ศึกษาอิทธิพลของความชื้นสัมพัทธ์ต่ออัตราการตายของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมะละกอฮอลแลนด์ โดยอบมะละกอตกลงกำจัดหนอนแมลงวันผลไม้ วัยที่ 1 ด้วยวิธีอบไอน้ำ MVHT ในช่วงแรกของการให้ความร้อนกับมะละกออาศัยอากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ ที่ 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ เพิ่มอุณหภูมิภายในสุดผลมะละกอขึ้นถึง 43 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นปรับเปลี่ยนการให้ความร้อนกับมะละกอเป็นอากาศร้อนที่อ้อมตัวด้วยไอน้ำ (ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) จนกระทั่งอุณหภูมิผลมะละกอตรงบริเวณกึ่งกลางอยู่ที่ 46.5 และ 47 องศาเซลเซียส นาน 0, 10 และ 20 นาที โดยตรวจนับจำนวนแมลงรอดชีวิต พบว่าอุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ไม่พบแมลงรอดชีวิต นอกจากนี้ได้ศึกษาอัตราการตายของแมลงที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 0, 10 และ 20 นาที พบว่าอุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ไม่พบแมลงรอดชีวิต และอุณหภูมิและระยะเวลาดังกล่าวมีประสิทธิภาพกำจัดหนอนวัยที่ 1 จำนวนมากกว่า 3,000 ตัว ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

จากผลงานวิจัยนี้ มีความเป็นไปได้สูงที่จะเสนอให้มีการประเมินประสิทธิภาพวิธีการนี้กำจัดแมลงวันผลไม้ จำนวนมากกว่า 30,000 ตัว ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะละกอนำส่งออก สำหรับการเพิ่มอุณหภูมิผลขึ้นไปถึง 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อเป็นการป้องกันความผิดพลาด ในกรณีนำวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้กับตู้อบไอน้ำระดับการค้า เพื่อกำจัดแมลงในผลไม้อบไอน้ำก่อนส่งออกการวิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลไม้เพื่อการส่งออก จำเป็นต้องดำเนินการตามเงื่อนไขของหน่วยงานกักกันพืชต่างประเทศ อาทิเช่น ประเทศญี่ปุ่นได้กำหนดเกณฑ์พิจารณาวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช ต้องมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงในระยะการเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด จำนวนไม่ต่ำกว่า 30,000 ตัว ให้ตายทั้งหมด (Miyazaki, 2010) ประเทศสหรัฐอเมริกาได้กำหนดวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช ต้องมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงต่ำสุดที่ระดับ 99.9968 เปอร์เซ็นต์ (probit 9) แมลงสามารถรอดชีวิตได้ไม่เกิน 3 ตัว จากจำนวนแมลงทั้งหมด 100,000 ตัว

จากผลงานวิจัยของคณะผู้วิจัยฯ ในปี 2562 ได้ศึกษาด้านความเสียหายของมะละกอฮอลแลนด์จากความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำ MVHT ในตู้อบไอน้ำเชิงพาณิชย์ต่อคุณภาพของมะละกอ และในปี 2563 ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอฮอลแลนด์ในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ และล่าสุด ในปี 2564 ได้ศึกษายืนยันประสิทธิภาพด้านการกำจัดแมลงด้วยความร้อนจากวิธีการอบไอน้ำ MVHT เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 ในผลมะละกอฮอลแลนด์ พบว่าวิธีอบไอน้ำ MVHT มีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมะละกอ



ได้ตามมาตรฐานวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชระหว่างประเทศ โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของมะละกอหลังอบไอน้ำ

วิธีอบไอน้ำ MVHT นอกจากมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้แล้ว ยังไม่ก่อให้เกิดพิษตกค้างภายในผลไม้ ซึ่งมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค จึงผ่านการยอมรับอย่างกว้างขวางจากประเทศผู้นำเข้า ในปัจจุบันประเทศไทยมีการสร้างโรงงานกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนระดับการค้าอย่างแพร่หลาย โดยใช้วิธีอบไอน้ำ MVHT อบผลมะม่วง มังคุด และส้มโอ เพื่อการส่งออกไปประเทศญี่ปุ่น เกาหลี และนิวซีแลนด์ (มลนิภา, 2552, 2554, 2562) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีอบไอน้ำปรับปรุงสภาพความชื้นสัมพัทธ์สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ได้ตามมาตรฐานวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชระหว่างประเทศ โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของมะละกอหลังอบไอน้ำ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์จากสวนที่ปลูกเป็นการค้าเพื่อการส่งออกที่ได้มาตรฐาน
2. เครื่องชั่งตวงวัด 2 ตำแหน่งสำหรับงานทดลอง
3. เครื่องอ่างน้ำร้อน (water bath; Yamato, model: DK-43)
4. พรอทวัดความร้อนมาตรฐาน (standard thermometer)
5. แ่งวัดอุณหภูมิขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง
6. ตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) รุ่น EHK-1000B/EHK-1000D จำนวน 2 เครื่อง
7. เครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” shower cooling system (differential pressure type) รุ่น SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan
8. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ Refractometer Atago PAL-BX ACID 1
9. เครื่องวัดสี Konica Minolta รุ่น CR-10 Plusher
10. ห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก (อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์)
11. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ งานทดลอง (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร กระจกพลาสติก และอุปกรณ์อื่นๆ เช่น ปิเปต (pipettes) หลอดทดลอง (test tube) ปีกเกอร์ (beaker) หลอดหยด (dropper) ปากคีบ (forceps) ฆ้อนสลิค กระจาดขรองสีดำ พู่กัน หนั่งยาง และผ้าขาวบาง



วิธีการ

1. การเตรียมมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์และการทดสอบประสิทธิภาพของตูบไอน้ำ สำรวจสวนและคัดเลือกมะละกอเพื่อใช้ในการทดลอง

ดำเนินการสำรวจสวนมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ที่ได้คุณภาพตามมาตรฐานส่งออกจากแหล่งปลูกมะละกอที่สำคัญได้แก่ จังหวัดนครปฐม, สุพรรณบุรี, นครราชสีมา, นครนายก, กำแพงเพชร, กาญจนบุรี, ราชบุรี, จันทบุรี, แพร่ และเชียงใหม่ เพื่อใช้ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อน (มะละกอทดลอง ใช้ผลขนาดใหญ่ ขนาดกลาง และตกรวด) จากนั้นนำมะละกอล้อมมายังห้องปฏิบัติการกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เก็บมะละกอไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น เพื่อนำมาใช้ในงานทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของตูบไอน้ำเพื่อใช้ในการทดลอง

ขั้นตอนแรกเป็นการทดสอบความเที่ยงตรงของแท่งวัดความร้อนและความชื้น (sensor calibration) โดยแท่งวัดความร้อนจะคลาดเคลื่อนเมื่อถูกใช้งานไปในระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้นขั้นตอน sensor calibration จำเป็นต้องตรวจสอบอย่างสม่ำเสมออย่างน้อย 1 เดือน เพื่อปรับค่าความคลาดเคลื่อนอุณหภูมิที่วัดได้ของแท่งวัดความร้อนและความชื้น ดำเนินการโดยการจุ่มแท่งวัดความร้อน แท่งวัดความชื้นที่ต้องการทดสอบ และเทอร์โมมิเตอร์มาตรฐาน (standard thermometer) ลงในเครื่องอ่างน้ำร้อน (water bath) ตั้งค่าอุณหภูมิน้ำที่ 47 องศาเซลเซียส กับเครื่องอ่างน้ำร้อน และตั้งค่าอุณหภูมิของตูบไอน้ำกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง (จำนวน 2 ตู้) ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการอ่านค่าอุณหภูมิและความชื้น สามารถตรวจสอบได้จากหน้าจอเครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้น (hybrid recorder) ของตูบไอน้ำ เมื่อแท่งวัดความร้อนและความชื้น มีอุณหภูมิและความชื้น เป็นไปตามที่กำหนดไว้แล้ว จึงเริ่มบันทึกอุณหภูมิและความชื้น (แท่งวัดความร้อนทั้งหมดต้องอ่านค่าได้ 47 องศาเซลเซียส และแท่งวัดความชื้นต้องอ่านค่าได้ในช่วง 99.99 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์) โดยทำการป้อนคำสั่งการพิมพ์กระดาษบันทึกอุณหภูมิและความชื้นของตูบไอน้ำ (ทดลองจำนวน 2 ตู้)

ขั้นตอนที่สองเป็นการทดสอบรูปแบบของอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม ดำเนินการโดยตั้งค่าอุณหภูมิและความชื้นของตูบไอน้ำกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง ตรวจสอบอุณหภูมิและความชื้นที่กำหนดไว้โดยวัดอุณหภูมิจาก sensor fruit ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของอุณหภูมิผลมะละกอที่ต้องการทดสอบภายในตูบไอน้ำ โดยการเสียบแท่งวัดความร้อนบริเวณเหนือขั้วผลมะละกอเล็กน้อยเพื่อหลีกเลี่ยงช่องว่างภายในผลมะละกอ เสียบแท่งวัดความร้อนให้ลึกเข้าไปภายในผลมะละกอจนกระทั่งปลายแท่งวัดความร้อนอยู่บริเวณกึ่งกลางของผล หลังจากเสียบ sensor fruit เรียบร้อยแล้ว ดำเนินการวาง sensor fruit 1 ผล/กระบะ ลงในกระบะที่ใช้บรรจุมะละกอของตูบไอน้ำ สำหรับกระบะทำด้วยสแตนเลส ขนาด 30×50×7 เซนติเมตร พื้นด้านล่างเจาะรูกลมเพื่อการถ่ายเทความร้อนของผลไม้อบไอน้ำ ทดสอบตู้เปล่าของตูบไอน้ำ โดยใช้รูปแบบของอุณหภูมิและความชื้น ตามวิธีการของ มลนิภา และคณะ (2555) เมื่อ sensor fruit มีอุณหภูมิภายในสุดผลถึง



47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เรียบร้อยแล้วตรวจสอบค่าอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์จากกระดาษบันทึกอุณหภูมิและความชื้นของตู้อบไอน้ำจำนวน 2 ตู้ (ทดลองจำนวน 2 ซ้ำ)

2. ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อน

2.1 ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนของมะละกอด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในตู้อบไอน้ำเชิงพาณิชย์

คัดเลือกมะละกอฟันธุ์ฮอลแลนด์ที่ได้คุณภาพจากแหล่งปลูกมะละกที่สำคัญ คือ จังหวัดจันทบุรี มะละกอดทดลองใช้ระยะเก็บเกี่ยวเมื่อขึ้นแต่มสีเหลืองด้านปลายผล น้ำหนัก 600-900 กรัม/ผล จากนั้นนำมาล้างทำความสะอาดและแช่ในสารฆ่าเชื้อราเป็นเวลานาน 5 นาที เพื่อฆ่าเชื้อราที่อาจติดมากับผิวมะละกและผึ่งให้แห้ง ดำเนินการทดลองโดยใช้ตู้อบไอน้ำเชิงพาณิชย์ของโรงงานอบไอน้ำสหกรณ์การเกษตรท่าใหม่ อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เป็นตู้อบไอน้ำนำเข้าของบริษัท “Sanshu Sangyo” vapor heat treatment system รุ่น EHK 230 MC ซึ่งมีห้องบรรจุผลไม้ (treatment chamber) ขนาด (กว้าง×ยาว×สูง) (240×600×275) เซนติเมตร จำนวน 2 เครื่อง มะละกที่ใช้ทดลอง มีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ (ขนาดเหมาะสมสำหรับส่งออก) สำหรับมะละกofiller ใช้มะละกอดกเกรด การบรรจุมะละกอดทดลองในตู้อบไอน้ำ ดำเนินการโดยบรรจุลงในกระบะพลาสติก ขนาด 30×50×7 เซนติเมตร จำนวน 15 กระบะ กระบะที่เหลือบรรจุมะละกอดกเกรดอบมะละกอด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ในสภาพห้องบรรจุผลไม้ของตู้อบไอน้ำที่มีปริมาณมะละกอบรรจุ 100 เปอร์เซ็นต์ของความจุตู้ (full load) สำหรับการวัดอุณหภูมิผลมะละกอดทดลอง อาศัยการวัดจาก sensor fruit จำนวน 15 เส้น ซึ่งวางอยู่ในชั้นบน (top) กลาง (middle) และล่าง (bottom) ตามลำดับ โดยช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลก่อนถึง 43 องศาเซลเซียส (อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ที่ระดับ 50-80 เปอร์เซ็นต์) เมื่ออุณหภูมิผลถึง 43 องศาเซลเซียส (ความชื้นสัมพัทธ์จะถูกปรับให้ > 90 เปอร์เซ็นต์) อบมะละกอดทดลองจนอุณหภูมิภายในสุดผลถึง 47 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิดังกล่าว นาน 20 นาที ภายหลังจากอบมะละกอดทดลองครบตามอุณหภูมิและระยะเวลา ที่กำหนดไว้ ทำการลดอุณหภูมิผลมะละกอดทันที โดยการฉีดพ่นด้วยน้ำนาน 40 นาที หลังจากเสร็จสิ้นการให้ความร้อน นำมะละกอดที่ผ่านความร้อนห่อผลด้วยตาข่ายโพลีเอทิลีนและบรรจุลงในกล่องกระดาษลูกฟูกขนาด 28×58×14 เซนติเมตร จากนั้นเก็บมะละกอดทดลองตามรายละเอียดใน (มติ.น.ร. และคณะ 2555) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10-13 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอดหลังผ่านความร้อน ได้แก่ การสูญเสียน้ำหนัก การเปลี่ยนแปลงของสี ความแน่นเนื้อ และปริมาณน้ำตาลของมะละกอดหลังผ่านความร้อนแล้ว 8 วัน เปรียบเทียบกับมะละกอดที่ไม่ผ่านความร้อน (ทดลองจำนวน 2 ซ้ำ) วิเคราะห์ข้อมูลสถิติตามแผนการทดลอง และหาค่าความแตกต่างโดยใช้ DMRT โดยใช้หลักเกณฑ์พิจารณาและดำเนินการในหัวข้อต่าง ๆ ดังต่อไปนี้



การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)

คำนวณจากน้ำหนักผลมะละกอเริ่มต้นและหลังอบไอน้ำ

$$\text{สมการ : ร้อยละการสูญเสีย} = \frac{\text{น้ำหนักผลปกติก่อนอบไอน้ำ} - \text{น้ำหนักผลหลังอบไอน้ำ}}{\text{น้ำหนักผลปกติก่อนอบไอน้ำ}} \times 100$$

การเสียสภาพสีผิว (skin color loss)

ประเมินสีผิวผลมะละกอหลังอบไอน้ำ โดยทำการวัดด้วยเครื่อง Konica Minolta รุ่น CR-10 Plusher ทำการวัดรอบลูก 5 จุด โดยเกณฑ์การพิจารณาระบบสี ดังนี้

| ระบบสี CIE L*a*b* | เกณฑ์การพิจารณา |
|-----------------------------------|---|
| L* ใช้กำหนดค่าความสว่าง | L เป็น 0 สีที่ได้จะมีมืดเป็นสีดำ; L เป็น 100 สีที่ได้จะสว่างเป็นสีขาว |
| a* ใช้กำหนดสีแดง หรือสีเขียว | a เป็น + วัตถุมีสีออกแดง a เป็น -วัตถุมีสีออกเขียว |
| b* ใช้กำหนดสีเหลือง หรือสีน้ำเงิน | b เป็น + วัตถุมีสีออกเหลือง b เป็น -วัตถุมีสีออกน้ำเงิน |

ค่าความหวานหรือปริมาณค่าของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total solutions solid: TSS)

วิเคราะห์ค่าความหวาน หรือ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยชั่งตัวอย่างมะละกอ 50 กรัม นำเนื้อไปคั้นน้ำแล้วกรองด้วยผ้าขาวบางขนาด ขนาด 35-48 เมช จากนั้นนำน้ำคั้นที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Refractometer Atago PAL-BX 1 บันทึกค่าความหวาน มีหน่วยเป็น องศาบริกซ์ ($^{\circ}$ Brix)

2.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ

คัดเลือกมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ที่ได้คุณภาพจากจังหวัดกำแพงเพชร โดยมะละกอทดลองใช้ระยะเก็บเกี่ยวเมื่อขึ้นแต่มสีเหลืองด้านปลายผล ผลมีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นขนาดที่เหมาะสมสำหรับส่งออก (น้ำหนัก 700-1,000 กรัม/ผล) จากนั้นนำมาล้างทำความสะอาดและแช่ในสารฆ่าเชื้อราเป็นเวลา 5 นาที เพื่อฆ่าเชื้อราที่อาจติดมากับผิวมะละกอและฝังให้แห้งดำเนินการโดยใช้ตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) รุ่น EHK-1000B และ EHK-1000D จำนวน 2 เครื่อง ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ดำเนินการโดยบรรจุมะละกอทดลองลงในกระบะชั้นบนสุด สำหรับกระบะที่ใช้บรรจุมะละกอทดลองในชั้นตอนนี้ เป็นกระบะพลาสติกแข็งทนความร้อนสูง ขนาด 36×70×15 เซนติเมตร ส่วนบริเวณด้านล่างทำด้วยสแตนเลส เเจาะรูกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร เรียงเป็นแถวตลอดทั่วทั้งแผ่น เพื่อให้ความร้อนสามารถหมุนเวียนผ่านผลไม้ภายในกระบะไปยังกระบะใกล้เคียงได้ อบมะละกอในสภาพห้องบรรจุผลไม้ของตู้อบไอน้ำที่มีปริมาณมะละกอบรรจุ 100 เปอร์เซ็นต์ของความจุตู้ (full load) ด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ให้ความร้อนกับผลมะละกอ อาศัยวิธีการอบไอน้ำ ร่วมกับวิธีการอบอากาศร้อน โดยช่วงแรกจะให้ความร้อนกับผลมะละกอด้วยวิธีอบอากาศร้อน อากาศร้อนที่หมุนเวียนผ่านผลมะละกอจะมีความชื้น



สัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งเมื่ออุณหภูมิในผลมะละกอเพิ่มขึ้นถึง 43 องศาเซลเซียสแล้ว จึงปรับเปลี่ยนเป็นวิธีการอบไอน้ำ อากาศร้อนจะอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ โดยมีความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (ดัดแปลงจาก อุดร และคณะ, 2549; Unahawutti *et al.*, 2006) สำหรับการวัดอุณหภูมิผลมะละกอตลอดอาศัยการวัดจาก sensor fruit จำนวน 3 ผล น้ำหนัก 850 ± 25 กรัม ออบมะละกอโดยให้อุณหภูมิภายในสุดผลอยู่ที่ 47 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิ นาน 20 นาที หลังจากอบมะละกอครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่กำหนดไว้ นำมะละกอที่ผ่านความร้อนออกจากตู้อบไอน้ำ มาลดอุณหภูมิผลทันทีโดยการเป่าด้วยพัดลมนาน 1 ชั่วโมง จากเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ หลังจากเสร็จสิ้นการให้ความร้อนแล้วเก็บมะละกอตลอดตามรายละเอียดใน (มลินภา และคณะ 2555) บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอหลังผ่านความร้อนแล้ว 7 วัน (เก็บในสภาพเลียนแบบการส่งออกทางอากาศ) และ 14 วัน ตามลำดับ (เก็บในสภาพเลียนแบบการส่งออกทางเรือ) เปรียบเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน (ทดลองจำนวน 2 ซ้ำ) วิเคราะห์ข้อมูลสถิติตามแผนการทดลอง และหาค่าความแตกต่างโดยใช้ DMRT

3. ศึกษาด้านการกำจัดแมลงด้วยความร้อน

ศึกษายีนย่นประสิทธิภาพด้านการกำจัดแมลงด้วยความร้อนจากวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

ดำเนินการโดยเตรียมมะละกอตลอดให้มีหนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้อยู่ภายในผล (ดัดแปลงจาก อุดร และคณะ, 2550) มี 2 วิธี ดังนี้

1. วิธีใส่หนอนวัย 1 ในผลมะละกอโดยตรง (artificial infestation): ก่อนการทดลอง 2 วัน เก็บไข่จากแมลงวันผลไม้

B. dorsalis ตัวเต็มวัยซึ่งเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยใช้กระบอกเก็บไข่วางไว้ในกรงแมลงนาน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง นำไข่ที่ได้วางบนผ้ามีสลิ้นซุบน้ำใส่ไว้ในกล่องพลาสติก เก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (อุณหภูมิ 26 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65 ± 5 เปอร์เซ็นต์) เมื่อไข่ฟักออกเป็นหนอนวัย 1 ใช้ตะแกรงมีรูขนาด 80 เมช ร่อนแยกหนอนออกจากเปลือกไข่ และนำไปใส่ในน้ำกลั่นเก็บไว้ในบีกเกอร์แก้วขนาดเล็ก จากนั้นใช้หลอดดูดสารละลายดูหนอนวัย 1 จำนวน 100 ตัว ใส่ลงในผลมะละกอ จากนั้นปล่อยมะละกอทิ้งไว้ประมาณ 20-30 นาที เพื่อให้หนอนวัย 1 ได้ซ่อนไข่เข้าไปในเนื้อมะละกอ ตรงบริเวณกลางผล หลังจากนั้นจึงนำมะละกอไปใช้ทดลอง

2. วิธีการให้แมลงวางไข่บนผลมะละกอ (forced infestation): เลี้ยงแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ตัวเต็มวัยในกรงเลี้ยงแมลงขนาด $50.5 \times 35.6 \times 35.2$ ซม. ทำด้วยมุ้งลวดตาข่ายอลูมิเนียมขนาด 16 เมช แต่ละกรงมีแมลงตัวเต็มวัยจำนวนประมาณ 2,000 ตัว แมลงตัวเต็มวัยที่ใช้สำหรับวางไข่มีอายุมากกว่า 2 สัปดาห์ การเตรียมผลมะละกอก่อนการให้แมลงวางไข่บนผลมะละกอ โดยล้างมะละกอเพื่อทำความสะอาดและเช็ดให้แห้ง จากนั้นใช้เข็มเจาะรูจำนวน 5 รู บนผลมะละกอให้ทะลุถึงเนื้อเพื่อช่วยในการวางไข่ นำมะละกอเข้าไปในกรงเลี้ยงแมลงเพื่อให้แมลงวางไข่จำนวน 2 ผล/กรง



โดยให้แมลงวางไข่บนผลนาน 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง นำมะละกอเก็บไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นเช่นเดียวกับวิธีการแรก

การประเมินประสิทธิภาพกำจัดแมลง ดำเนินการในสภาพห้องบรรจุผลไม้ของตู้อบไอน้ำในปริมาณมะละกอที่มีน้ำหนักแตกต่างกัน คือ น้ำหนักประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของความจุตู้ (low load) และ 100 เปอร์เซ็นต์ของความจุตู้ (full load) โดยบรรจุมะละกอทดลอง (artificial infestation จำนวน 6 ผล + forced infestation จำนวน 2 ผล/กระบะ) ลงในกระบะพลาสติกแข็งทนความร้อนขนาด 36×70×15 ซม. จำนวน 3 กระบะ จากนั้นนำมะละกอในกระบะไปซัง และบรรจุมะละกอตกเกรด (filler fruit) ลงในกระบะเพิ่มเติมจนเต็ม (ดำเนินการบรรจุมะละกอทดลองในกระบะในสภาพ low load และ full load สำหรับกระบะที่เหลือบรรจุมะละกอตกเกรด) สำหรับการวัดอุณหภูมิภายในสุดผลมะละกอทดลองอาศัยการวัดจาก sensor fruit จำนวน 3 ผล น้ำหนัก 725 - 750 กรัม

อบมะละกอทดลองด้วยวิธีการอบไอน้ำ MVHT โดยช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลก่อนถึง 43 องศาเซลเซียส (อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ที่ระดับ 50-80 เปอร์เซ็นต์) เมื่ออุณหภูมิผลถึง 43 องศาเซลเซียส (ความชื้นสัมพัทธ์จะถูกปรับให้ > 90 เปอร์เซ็นต์) อบมะละกอทดลองจนอุณหภูมิภายในสุดผลถึง 47 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิดังกล่าว นาน 20 นาที (ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่มีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวนมากกว่า 3,000 ตัว ในผลมะละกอฮอลแลนด์ให้ตายทั้งหมด) (มลนิภา และคณะ, 2558) ภายหลังจากอบมะละกอทดลองครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลา ที่กำหนดไว้ ทำการลดอุณหภูมิผลมะละกอ โดยการเป่าด้วยลมนาน 1 ชั่วโมง ในตู้ลดอุณหภูมิผลไม้ (Sanshu shower cooling system: รุ่น SHS-12) จากนั้นเก็บมะละกอหลังผ่านความร้อนแล้ว ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น เช่นเดียวกับการศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนบันทึกจำนวนแมลงรอดชีวิต และตรวจนับจำนวนหนอนที่รอดชีวิตในผลมะละกอหลังผ่านความร้อนแล้ว 5 วัน เปรียบเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน โดยคำนวณอัตราการตายที่แท้จริง (corrected mortality) ตามสูตรของ Abbott (Abbott, 1925) การศึกษายืนยันประสิทธิภาพด้านการกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนตามมาตรฐานของวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช จะต้องสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะการเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด จำนวนมากกว่า 30,000 ตัว ให้ตายทั้งหมด บันทึกจำนวนแมลงรอดชีวิตใน แต่ละผล control ทำการทดลองซ้ำจนกว่าจะได้จำนวนแมลงวันผลไม้รอดชีวิตในผลมะละกออ้างอิง (control) มากกว่า 30,000 ตัว (probit 9)

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น กันยายน 2562 สิ้นสุด ตุลาคม 2564

จังหวัดนครปฐม, สุพรรณบุรี, นครราชสีมา, นครนายก, กำแพงเพชร, กาญจนบุรี, ราชบุรี, จันทบุรี, แพร่, เชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช



ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์และการทดสอบประสิทธิภาพของตูบไอน้ำ

สำรวจสวนและคัดเลือกมะละกอเพื่อใช้ในการทดลอง

ได้คัดเลือกผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ที่ได้คุณภาพจากแหล่งปลูกมะละกอที่สำคัญใน จ.จันทบุรี โดยทราบข้อมูลระยะที่เหมาะสมของมะละกอที่ใช้ทดลอง คือ ระยะเก็บเกี่ยวเมื่อขึ้นแต่มสีเหลืองด้านปลายผล น้ำหนัก 600-900 กรัม/ผล ซึ่งมีขนาดเหมาะสมสำหรับส่งออก เพื่อนำมาใช้ศึกษา ด้านความเสียหายจากความร้อนของมะละกอด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในตูบไอน้ำเชิงพาณิชย์ และได้คัดเลือกผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ที่ได้คุณภาพจากแหล่งปลูกมะละกอใน จ.กำแพงเพชร โดยทราบข้อมูลระยะที่เหมาะสมของมะละกอที่ใช้ทดลอง ที่มีขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ น้ำหนัก 700-1,000 กรัม/ผล (Figure 1) เพื่อใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอในสภาพ จำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ

การทดสอบประสิทธิภาพของตูบไอน้ำเพื่อใช้ในการทดลอง

ผลการทดสอบความเที่ยงตรงของแห่งวัดความร้อนและทดสอบรูปแบบของอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมของตูบไอน้ำเพื่อเตรียมความพร้อมของอุปกรณ์ก่อนการทดลอง พบว่าแห่งวัด ความร้อนสามารถอ่านค่าอุณหภูมิและความชื้นได้เที่ยงตรงเมื่อเทียบกับเทอร์โมมิเตอร์มาตรฐาน (Table 1) (Figure 2) และได้รูปแบบของอุณหภูมิ (Table 2) ความชื้นที่เหมาะสม (Table 3) เพื่อใช้ ศึกษาความเสียหายจากความร้อนของมะละกอด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

2. ศึกษาความเสียหายจากความร้อน

2.1 ศึกษาความเสียหายจากความร้อนของมะละกอด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ใน ตูบไอน้ำเชิงพาณิชย์

การอบมะละกอดทดลองน้ำหนัก 600-900 กรัม/ผล ในสภาพห้องบรรจุผลไม้ของตูบไอน้ำที่มี ปริมาณมะละกอบรรจุ 100 เพอร์เซ็นต์ของความจุ (full load) ของตูบไอน้ำเชิงพาณิชย์ด้วยวิธีอบ ไอน้ำ MVHT โดยให้อุณหภูมิตรงบริเวณกึ่งกลางผลอยู่ที่ 47 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิดังกล่าว นาน 20 นาที (ช่วงก่อนอุณหภูมิภายในผลมะละกอเพิ่มขึ้นถึง 43 องศาเซลเซียส อากาศร้อนมี ความชื้นสัมพัทธ์ 50-80 เพอร์เซ็นต์ และภายหลังก่อนอุณหภูมิภายในผลเพิ่มขึ้นถึง 43 องศาเซลเซียส อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ > 90 เพอร์เซ็นต์) โดยวัดอุณหภูมิผลมะละกอดทดลองอาศัยการวัดจาก sensor fruit จำนวน 15 เส้น พบว่าในการอบมะละกอมีระยะเวลาที่แตกต่างกัน ในชั้นบน กลาง และ ล่าง ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 4 และมะละกอที่ผ่านความร้อนที่วางในกระบะบริเวณชั้นบนสุด (Figure 3) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเป้าหมาย (47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที) ช้าที่สุด โดย ไม่พบความเสียหายที่เด่นชัดภายในเนื้อมะละกอเมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน ภายหลังจาก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10-13 องศาเซลเซียส แล้ว 8 วัน การสูญเสียน้ำหนัก และปริมาณน้ำตาลของ มะละกอที่ผ่านความร้อนที่ 8 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความ ร้อน Table 5 (Figure 4) แต่พบว่าค่าความแน่นเนื้อของมะละกอหลังผ่านความร้อนที่วางในกระบะ



บริเวณชั้นล่างสุดมีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน สำหรับการเปลี่ยนแปลงของสี ดังแสดงใน Figure 5-8 จากผลงานวิจัยนี้ทำให้ทราบข้อมูลระดับความเสียหายของมะละกอหลังผ่านความร้อน และผลกระทบของวิธีอบไอน้ำ MVHT ต่อคุณภาพของมะละกอในตู้อบไอน้ำเชิงพาณิชย์

2.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ

การอบมะละกอทดลองน้ำหนัก 700-1,000 กรัม/ผล ในสภาพห้องบรรจุผลไม้ของตู้อบไอน้ำที่มีปริมาณมะละกอบรรจุ 100 เปอร์เซ็นต์ของความจุตู้ (full load) ของตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงขนาดเล็กสำหรับงานทดลองด้วยวิธีอบไอน้ำ MVHT (Figure 9) โดยให้อุณหภูมิตรงบริเวณกึ่งกลางผลอยู่ที่ 47 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิดังกล่าว นาน 20 นาที (ช่วงก่อนอุณหภูมิภายในผลมะละกอเพิ่มขึ้นถึง 43 องศาเซลเซียส อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ และภายหลังอุณหภูมิภายในผลเพิ่มขึ้นถึง 43 องศาเซลเซียส อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ > 90 เปอร์เซ็นต์) พบว่าในการอบมะละกอมีระยะเวลา ดังแสดงใน Table 6 ผลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอฮอลแลนด์ในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ เมื่อพิจารณาจากการสูญเสียน้ำหนัก และปริมาณน้ำตาล พบว่ามะละกอหลังผ่านความร้อนที่ 7 และ 14 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน (Table 7) (Figure 10) และไม่พบความเสียหายที่เด่นชัดภายในเนื้อมะละกอที่ผ่านความร้อนที่เก็บในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ (Figure 11) จากผลงานวิจัยนี้ทำให้ทราบข้อมูลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอหลังการอบไอน้ำด้วยวิธีอบไอน้ำ MVHT ในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ

3. ศึกษาด้านการกำจัดแมลงด้วยความร้อน

ศึกษายืนยันประสิทธิภาพด้านการกำจัดแมลงด้วยความร้อนจากวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

จากการตรวจนับจำนวนแมลงรอดชีวิตหลังอบมะละกอ 5 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที มีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 ซึ่งมีความทนทานต่อความร้อนมากที่สุดจำนวนประมาณ 32,888 ตัว (การทดลองจำนวน 10 ซ้ำ) ระยะเวลาที่ใช้อบมะละกอ ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ดังแสดงใน Table 8 และระยะเวลาจากอุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส ดังแสดงใน Table 9 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที มีประสิทธิภาพกำจัดหนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวนมากกว่า 30,000 ตัว ในผลมะละกอฮอลแลนด์ให้ตายทั้งหมด Table 10 ซึ่งได้ตามมาตรฐานตามวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (Figure 12-14)



สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

งานวิจัยพัฒนาวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* (Hendel) ในผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์เพื่อการส่งออก ได้มีการศึกษา 3 หัวข้อ สรุปสาระสำคัญ ดังนี้

1.) ศึกษาด้านความเสียหายของมะละกอจากความร้อนด้วยวิธีอบไอน้ำ MVHT ในตู้อบไอน้ำเชิงพาณิชย์ต่อคุณภาพของมะละกอ พบว่ามะละกอที่ผ่านความร้อน ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ไม่พบความเสียหายที่เด่นชัดภายในเนื้อมะละกอเมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน เมื่อพิจารณาจากการสูญเสียน้ำหนัก และปริมาณน้ำตาล พบว่ามะละกอที่ผ่านความร้อนที่ 8 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน

2.) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของมะละกอในสภาพจำลองการส่งออกทางเครื่องบินและทางเรือ ดำเนินการทดลองโดยอบมะละกอด้วยวิธีอบไอน้ำ MVHT ที่ อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และเก็บมะละกอที่ผ่านความร้อน ที่อุณหภูมิ 10-13 องศาเซลเซียส พบว่าการสูญเสียน้ำหนัก และปริมาณน้ำตาล ของมะละกอที่ผ่านความร้อน เก็บไว้ ที่ 7 และ 14 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเทียบกับมะละกอที่ไม่ผ่านความร้อน

3.) ศึกษายืนยันประสิทธิภาพด้านการกำจัดแมลงด้วยความร้อนจากวิธีอบไอน้ำ MVHT เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 ในผลมะละกอ อบมะละกอตลอดจนอุณหภูมิภายในสุดผลถึง 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยตรวจนับจำนวนแมลงรอดชีวิตหลังอบมะละกอ 5 วัน พบว่าที่อุณหภูมิดังกล่าว ไม่พบแมลงรอดชีวิต ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที มีประสิทธิภาพกำจัดหนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวนประมาณ 32,888 ตัว ในผลมะละกอฮอลแลนด์ให้ตายทั้งหมด ซึ่งได้ตามมาตรฐานตามวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช

จากการศึกษายืนยันประสิทธิภาพด้านการกำจัดแมลงด้วยความร้อนจากวิธีอบไอน้ำ MVHT เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* หนอนวัย 1 ในผลมะละกอ อบมะละกอตลอดจนอุณหภูมิภายในสุดผลถึง 47 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิดังกล่าว นาน 20 นาที โดยตรวจนับจำนวนแมลงรอดชีวิตหลังอบมะละกอ 5 วัน พบว่าที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ไม่พบแมลงรอดชีวิต ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที มีประสิทธิภาพกำจัดหนอนวัย 1 แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* จำนวนมากกว่า 30,000 ตัว ในผลมะละกอฮอลแลนด์ให้ตายทั้งหมด ซึ่งได้ตามมาตรฐานตามวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช จากผลงานวิจัยนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะเสนอให้เป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะละกอส่งออกและเสนอรายงานวิจัยต่อประเทศผู้นำเข้าที่ยอมรับวิธีการอบไอน้ำเป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชต่อไป



คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงด้วยดีไม่ได้ หากขาดความช่วยเหลือจากนักวิชาการ และพนักงานของกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชด้วยกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช ในการเตรียมอุปกรณ์ รวมถึงการเช็คผลการทดลอง ผู้วิจัยขอขอบคุณบุคลากรทุกท่าน และขอขอบคุณสหกรณ์การเกษตรท่าใหม่ ที่เอื้อเพื่ออุปกรณ์ตู้อบไอน้ำในการศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนของมะละกอในตู้อบไอน้ำเชิงพาณิชย์

เอกสารอ้างอิง

- จริงแท้ ศิริพานิช. 2552. มะละกอไทย สถานภาพด้านสายพันธุ์ ระบบการผลิต และการตลาด. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กรุงเทพฯ. 136 หน้า.
- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2552. การกำจัดแมลงในผลไม้เพื่อการส่งออกด้วยวิธีอบไอน้ำ. ใน : รายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตและจัดการหลังการเก็บเกี่ยวมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองนอกฤดูเพื่อการส่งออก. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ กรุงเทพฯ.
- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ อุดร อุณหวุฒิ ชัยฉัตรรัตน์ สนศิริ จารุวรรณ จันทรา สลักจิต พานคำ และรัชฎา อินทรกำแหง. 2554. วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งเพื่อการส่งออก. ใน : สัมมนาสร้างสรรค์งานวิจัยอารักขาพืชก้าวไกล, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชัยฉัตรรัตน์ สนศิริ สลักจิต พานคำ รัชฎา อินทรกำแหง และอุดร อุณหวุฒิ. 2555. วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงสำหรับกำจัดแมลงวันทองด้วยความร้อนในผลมะละกอเพื่อการส่งออก (ฐานข้อมูลกรมวิชาการเกษตร). (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล <http://www.doa.go.th/research/showthread.php?tid=1272&pid=1290> (25 มีนาคม 2564).
- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2556. การป้องกันกำจัดแมลงในผลมะม่วงเพื่อการส่งออกด้วยวิธีอบไอน้ำและฉายรังสี. ใน : รายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการผลิตมะม่วง 52 สัปดาห์เพื่อการส่งออก. คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก.
- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ วลัยกร รัตนเดชากุล สลักจิต พานคำ ชัยฉัตรรัตน์ สนศิริ ชุตติมา อ้อมกิ่ง และอุดร อุณหวุฒิ. 2558. วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะละกอเพื่อการส่งออก. รายงานประจำปี 2558 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2559. การป้องกันกำจัดแมลงในผลมะม่วงเพื่อการส่งออกด้วยวิธีการอบไอน้ำและฉายรังสี. โครงการจัดการความรู้และถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเพื่อการส่งออก 7 - 11 พ.ย. 2559 ณ ห้องสัมมนา 1 คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัย



- นเรศวร พิษณุโลก. (Youtube). (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : <https://www.youtube.com/watch?v=4cwwn6kgEG0> (23 เมษายน 2563).
- มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2562. การป้องกันกำจัดแมลงในผลมะม่วงเพื่อการส่งออกด้วยวิธีการอบไอน้ำและฉายรังสี. โครงการจัดการถ่ายทอดความรู้การผลิตมะม่วงเพื่อการส่งออก 15 ก.พ. 2562 ณ สหกรณ์ชมรมชาวสวนมะม่วง อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา.
- รัชฎา อินทรกำแหง สลักจิต พานคำ ชัยณรัตน์ สนศิริ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชูติมา อ้อมกิ่ง จารุวรรณ จันทรา และอุตร อุณหุฒิ. 2553. วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลง ด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในมะม่วงพันธุ์มหาชนก โชคอนันต์ และเขียวเสวยเพื่อการส่งออก (ฐานข้อมูลกรมวิชาการเกษตร). (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : <http://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=781>(23 เมษายน 2563).
- อินทวัฒน์ บุรีคำ. 2537. บทปฏิบัติการกีฏวิทยาทางการเกษตร. โรงพิมพ์รุ่งวัฒนา กรุงเทพฯ. 243 หน้า.
- อุตร อุณหุฒิ สลักจิต พานคำ ชัยณรัตน์ สนศิริ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชูติมา อ้อมกิ่ง จารุวรรณ จันทรา และรัชฎา อินทรกำแหง. 2549. การวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในส้มโอเพื่อส่งออก. ใน : รายงานผลงานวิจัยดีเด่น ประเภทงานวิจัยประยุกต์ 2549 กรมวิชาการเกษตร.
- Abbott, W.S. 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Armstrong, J.W., J.D. Hansen, B.K.S. Hu and S.A. Brown. 1989. High-temperature,forced-air quarantine treatment for papayas infested with tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 82: 1667-1674.
- CAB International (CABI). 2015. *B. dorsalis*. (Online). Available. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/17685> (April 23, 2020).
- Dong, Y., C. Song, Y. Chuang, K. Chiang, W. Wu, L. Cheng and C. Chen. 2011. Degree of fruit ripeness affecting infestation of papaya by two species of fruit flies (Diptera : Tephritidae). J. Taiwan. Agric. Res. 60(4): 253-262.
- Hansen, J.D., J.W. Armstrong, B.K.S. Hu and S.A. Brown. 1990. Thermal death of oriental fruit fly (Diptera :Tephritidae) third instars in developing quarantine treatments for papayas. J. Econ. Entomol. 83: 160-167.
- Intarakumheng, R., S. Phankum, C. Sonsiri, M. Srimartpirom, C. Ormking and U. Unahawutti. 2016. Evaluation of Modified Vapor Heat Treatment as Quarantine Treatment for ‘Khiaosawoey’ and ‘Chokanan’ Mangoes Infested with Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF) for approval of a quarantine



- treatment on Thai mangoes to be exported to Japan, Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok. 139 p.
- Lapasathukool, S., S. Phankum, U. Unahawutti and S. Charnnarongkul. 2002. Heat Tolerance of Immature Stages of 4 Tephritid Fruit Fly Species in Thailand. An additional report submitted on Thai mangosteens to be exported to Japan. Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok.
- Miyazaki, I. 2010. How to Prepare the Technical Report on Vapor Heat Disinfestations Test. 30 Pages. *In* : Annual Report of the Thermal Treatment for the Disinfestations of Fruit Flies. Naha Plant Protection Station, Okinawa International Centre. Japan International Cooperation Agency, Japan.
- Songpol, S. 2011. Current Study of Papaya Production in Thailand. 70 Pages. *In* : The International Symposium on Papaya. Dec. 19-22, 2011. Chiangmai.
- Thaipong, K., S. Srimart, K. Iamjud, P. Sangwanankul and S. Wasee. 2011. Collection Evaluation and Selection of Papaya Varieties in Thailand. 70 Pages. *In* : The International Symposium on Papaya. Dec. 19-22, 2011. Chiangmai.
- Toshiyo, K. 1996. Textbook for vapor heat disinfestations test technicians (revised). Japan Fumigation Technology Association. Okinawa International Centre. Japan International Cooperation Agency, Japan.
- Unahawutti, U., M. Poomthong, R. Intatakumheng, W. Worawisitthumrong, C. Lapasathukool, E. Smitasiri, P. Srisook and C. Ratanawaraha. 1991. Vapor Heat as Plant Quarantine Treatment of 'Nang Klarnngwan', 'Nam Dorkmai', 'Rad' and 'Pimsen Daeng' Mangoes Infested with Fruit Flies (Diptera : Tephritidae). A report submitted on Thai mangoes to be exported to Japan. Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok. 342 p.
- Unahawutti, U. , S. Phankum, P. Ongthonglang and C. Chettanachitara. 1999. Heated-Air Quarantine Treatment for Mangosteen Infested with Oriental Fruit Fly (Diptera : Tephritidae). A report submitted on Thai mangosteen to be exported to Japan. Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok. 630 p.



- Unahawutti, U., S. Phankum, M. Srimartpirom, C. Ormking, C. Sonsiri, J. Chantra and R. Intarakumheng. 2006. Development of Heated-Air Quarantine Treatment for Pummelo Infested with Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). A report submitted on Thai pummel to be exported to Japan, Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok. 143 p.
- Vargas, R.I., Pinero and L. Leblanc. 2015. An Overview of Pest Species of *Bactrocera* Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) and the Integration of Biopesticides with Other Biological Approach for Their Management with a Focus on the Pacific Region. *Journal of Insects*. 6: 297-318. doi: 10.3390/insects6020297.
- Watanabe, N., F. Ichinohe and M. Sonda. 1973. Improvement of Corn Flour Medium for Larvae Culture of Oriental Fruit Fly. *Research Bullentine of Plant Protection Service Japan*. 11: 57-58.



Table 1 Calibration record obtained from each sensor of the VHT system no 1 and 2.

| VHT no.(Time) | (Number of sensor) | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| <u>VHT no. 1</u> | | | | | | | | | | | | |
| 09:00 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 09:05 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 09:10 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 09:15 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 09:20 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| <u>VHT no. 2</u> | | | | | | | | | | | | |
| 09:00 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 09:05 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 09:10 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 09:15 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 09:20 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |

* Combined data of 2 replications.



Table 2 Temperature pattern of modified vapor heat treatment (MVHT) for papaya.

| Temp. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------|------|------|------|------|------|------|
| Time | 30 | 30 | 35 | 43 | 48 | 48 |
| | 0.00 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.10 | 5.00 |

Table 3 Humidity pattern of MVHT for papaya.

| Humidity (% RH) | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|------|------|------|------|
| Time | 65 | 65 | 93 | 93 |
| | 0.00 | 5.00 | 0.10 | 5.00 |

Table 4 Time for center of papaya fruits after subjecting to MVHT at 47°C for 20 minutes at various position of sensor.

| Fruit temp (°C). | Rep | Loading (kg./cum.) | Sensor fruit | | Time for fruit center to reach 47°C for 20 min. ¹ | | |
|---------------------|-----|-----------------------|--------------|------------|---|----------|----------|
| | | | No. | Weight (g) | (Top) | (Middle) | (Bottom) |
| 47°C +20 min. | 1 | 288.00 | 1 | 767.50 | 3:25 | | |
| | | | 2 | 740.00 | 3:25 | | |
| | | | 3 | 739.00 | 3:20 | | |
| | | | 4 | 730.50 | 3:25 | | |
| | | | 5 | 768.50 | 3:45 | | |
| | | | 6 | 736.50 | 3:00 | | |
| | | | 7 | 747.00 | 2:40 | | |
| | | | 8 | 740.00 | 3:25 | | |
| | | | 9 | 761.00 | 2:35 | | |
| | | | 10 | 724.00 | 2:45 | | |
| | | | 11 | 733.00 | 2:20 | | |
| | | | 12 | 762.50 | 2:15 | | |
| | | | 13 | 733.00 | 2:20 | | |
| | | | 14 | 743.00 | 2:20 | | |
| | | | 15 | 762.00 | 2:20 | | |



Table 4 Time for center of papaya fruits after subjecting to MVHT at 47°C for 20 minutes at various position of sensor (continue).

| Fruit temp (°C). | Rep | Loading (kg./cum.) | Sensor fruit | | Time for fruit center to reach 47 °C for 20 min. ¹ | | |
|---------------------|-----|-----------------------|--------------|------------|--|----------|----------|
| | | | No. | Weight (g) | (Top) | (Middle) | (Bottom) |
| 47°C +20 min. | 2 | 288.00 | 1 | 738.00 | 3:55 | | |
| | | | 2 | 765.00 | 3:15 | | |
| | | | 3 | 748.50 | 4:05 | | |
| | | | 4 | 757.00 | 4:10 | | |
| | | | 5 | 744.00 | 4:05 | | |
| | | | 6 | 726.00 | | 3:35 | |
| | | | 7 | 748.00 | | 3:00 | |
| | | | 8 | 726.50 | | 3:20 | |
| | | | 9 | 764.50 | | 3:35 | |
| | | | 10 | 721.50 | | 3:05 | |
| | | | 11 | 734.00 | | | 2:35 |
| | | | 12 | 744.00 | | | 2:10 |
| | | | 13 | 740.00 | | | 2:25 |
| | | | 14 | 729.50 | | | 2:25 |
| | | | 15 | 725.00 | | | 2:45 |

¹ Time for selected 15 sensor fruits to attain target temperatures.

Table 5 Weight loss (%), total soluble solid (^oBrix), and pulp firmness (kgf) of papaya fruits after subjecting to MVHT at 47°C for 20 minutes, at full load capacity and storage 8 days at 10-13 °C.

| Treatment ¹ | Weight loss | Total soluble solid | Pulp firmness |
|------------------------|------------------|----------------------|--------------------|
| | (%) ² | (°Brix) ² | (kgf) ² |
| Control | 4.92 ± 0.32 a | 11.87 ± 0.21 a | 89.28 ± 0.23 b |
| 47°C+20 min. (top) | 7.44 ± 1.53 a | 11.65 ± 0.49 a | 387.03 ± 69.13 ab |
| 47°C+20 min. (middle) | 7.04 ± 1.23 a | 12.02 ± 0.23 a | 344.01 ± 180.75 ab |
| 47°C+20 min. (bottom) | 6.88 ± 1.24 a | 11.23 ± 0.35 a | 593.55 ± 102.60 a |

¹ Combined data of 2 replications.

² Values are average from 15 fruits for control; 15 fruits for treatment.

³ Means in column followed by different letters were statistically significant difference (*P*-value ≤ 0.05).



Table 6 Time for center of papaya to attain 43°C, 47°C, 47°C for 20 minutes during MVHT.

| Method of transportation | Rep. | Loading (kg./cum.) | Sensor fruit Weight (g) | Time for fruit center to attain target temperature | | |
|----------------------------|------|-----------------------|----------------------------|---|------|-----------------|
| | | | | 43°C | 47°C | 47°C+20 minutes |
| Air and sea transportation | 1 | 172.00 | 827.20 | 2:23 | 3:46 | 4:06 |
| | | | 830.14 | | | |
| | | | 835.20 | | | |
| Air and sea transportation | 2 | 172.00 | 825.00 | 2:16 | 3:40 | 4:00 |
| | | | 832.10 | | | |
| | | | 835.25 | | | |

¹Time for selected sensor fruits to attain target temperatures.

Table 7 Quality of papaya fruits treated with MVHT at 47°C for 20 minutes and 7 and 14 days storage at 10-13°C.

| Commercial export simulation test | Rep. | Item ¹ | Control ² | Treatment ² (Position) | | |
|--------------------------------------|------|------------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------|---------------|
| | | | | Left | Middle | Right |
| Air transportation | 1 | Weight loss (%) ² | 4.75 ± 0.31a | 7.44 ± 1.53a | 7.04 ± 1.23a | 6.88 ± 1.24a |
| | | Total soluble solid (°Brix) | 12.87 ± 0.28a | 13.10 ± 0.49a | 13.02 ± 0.23a | 12.45 ± 0.35a |
| Sea transportation | 2 | Weight loss (%) | 5.81 ± 0.43a | 7.75 ± 1.71a | 8.00 ± 1.12a | 7.59 ± 1.30a |
| | | Total soluble solid (°Brix) | 12.30 ± 0.25a | 13.25 ± 0.25a | 14.00 ± 0.23ab | 13.23 ± 0.35a |

¹Combined data of 2 replications.

²Values were averaged from 10 fruits for control; 6 fruits for each treatment.

³Means in column followed by different letters were statistically significant difference (P -value ≤ 0.05).



Table 8 Times for center of papaya fruits to attain to MVHT at 47°C for 20 minutes.

| Rep. | Sensor fruit weight | | | Time ¹ (h) |
|------|---------------------|--------|--------|--------------------------|
| | (g) | | | |
| 1 | 728.21 | 732.50 | 743.50 | 3:20 |
| 2 | 740.80 | 745.00 | 748.25 | 4:00 |
| 3 | 725.00 | 727.47 | 738.30 | 3:03 |
| 4 | 738.25 | 747.15 | 749.45 | 4:10 |
| 5 | 731.20 | 735.50 | 742.35 | 3:25 |
| 6 | 739.45 | 744.37 | 748.58 | 3:48 |
| 7 | 726.17 | 728.20 | 738.42 | 3:05 |
| 8 | 740.10 | 743.50 | 750.00 | 4:11 |
| 9 | 725.20 | 728.00 | 734.43 | 3:06 |
| 10 | 732.00 | 735.20 | 743.00 | 3:25 |

¹Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.

Table 9 Times for center of papaya fruits to attain 43°C and 47°C during MVHT in large scale disinfestation test.

| Rep | Time for fruit center to reach 43°C (h) ¹ | Time for fruit center to reach 47°C (h) ¹ | Time for 43°C to 47°C (h) ¹ |
|---------|--|--|--|
| 1 | 2:00 | 3:00 | 1:00 |
| 2 | 2:32 | 3:40 | 1:08 |
| 3 | 1:55 | 2:45 | 0:90 |
| 4 | 2:35 | 3:55 | 1:20 |
| 5 | 2:00 | 3:10 | 1:10 |
| 6 | 2:25 | 3:30 | 1:05 |
| 7 | 1:51 | 2:45 | 0:94 |
| 8 | 2:33 | 3:51 | 1:18 |
| 9 | 1:50 | 2:50 | 1:00 |
| 10 | 2:10 | 3:10 | 1:00 |
| Average | 1:99 | 3:04 | 1:05 |

¹Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.



Table 10 Survival of first instar larvae of the oriental fruit fly, *B. dorsalis* in papaya cv. “Holland” treated with proposed quarantine treatment schedule, MVHT at 47°C for 20 minutes.

| Rep | Infestation method | No. test fruits | | No. alive | Estimated | No. |
|-------|--------------------|-----------------|-----------|---------------------------|-----------------------|-----------|
| | | Control | Treatment | individuals in control | treated population | survivors |
| 1 | Larval inoculation | 6 | 18 | 501 | 1,503 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 450 | 1,350 | 0 |
| 2 | Larval inoculation | 6 | 18 | 544 | 1,632 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 480 | 1,440 | 0 |
| 3 | Larval inoculation | 6 | 18 | 551 | 1,653 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 520 | 1,560 | 0 |
| 4 | Larval inoculation | 6 | 18 | 560 | 1,680 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 545 | 1,635 | 0 |
| 5 | Larval inoculation | 6 | 18 | 561 | 1,683 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 545 | 1,635 | 0 |
| 6 | Larval inoculation | 6 | 18 | 554 | 1,662 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 555 | 1,665 | 0 |
| 7 | Larval inoculation | 6 | 18 | 556 | 1,668 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 557 | 1,671 | 0 |
| 8 | Larval inoculation | 6 | 18 | 554 | 1,662 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 577 | 1,731 | 0 |
| 9 | Larval inoculation | 6 | 18 | 555 | 1,665 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 625 | 1,875 | 0 |
| 10 | Larval inoculation | 6 | 18 | 552 | 1,656 | 0 |
| | Forced infestation | 2 | 6 | 604 | 1,862 | 0 |
| Total | | 72 | 240 | 10,946 | 32,888 | 0 |

¹This experiment was carried out by using VHT System: model EHK-1000 B; EHK-1000D





Figure 1 Field survey at papaya (*Carica papaya* L.) cv. “Holland” orchard at Chanthaburi province (left and middle) and at Kamphaeng phet province (right)



Figure 2 Field survey of papaya (*Carica papaya* L.) cv. “Holland” orchard at Suphanburi province



Figure 3 Calibration sensors were conducted by dipping all sensors into constant temperature water bath at 47°C for 20 minutes at laboratory of Plant Quarantine Treatment Section, Plant Quarantine Research Group



Figure 4 Commercial export simulation test of papaya cv. “Holland” fruit subject to MVHT at 47°C for 20 minutes with full load capacity at Thamai Ariculture Cooperative Ltd. VHT-facility

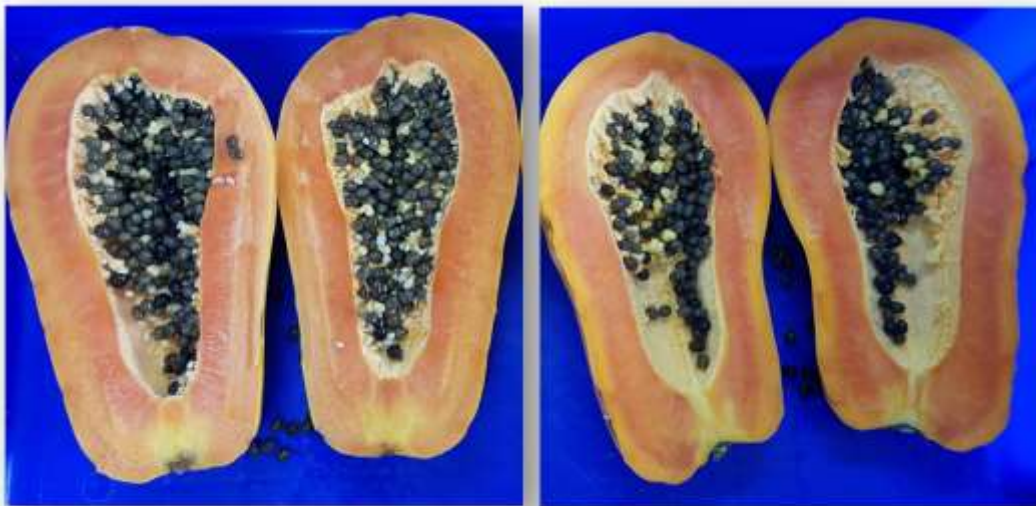


Figure 5 The internal appearance of papaya cv. “Holland” fruits were similar between untreated fruit (left) and MVHT treated at 47°C for 20 minutes (right) after kept at cold storage room at 10-13°C for 8 days

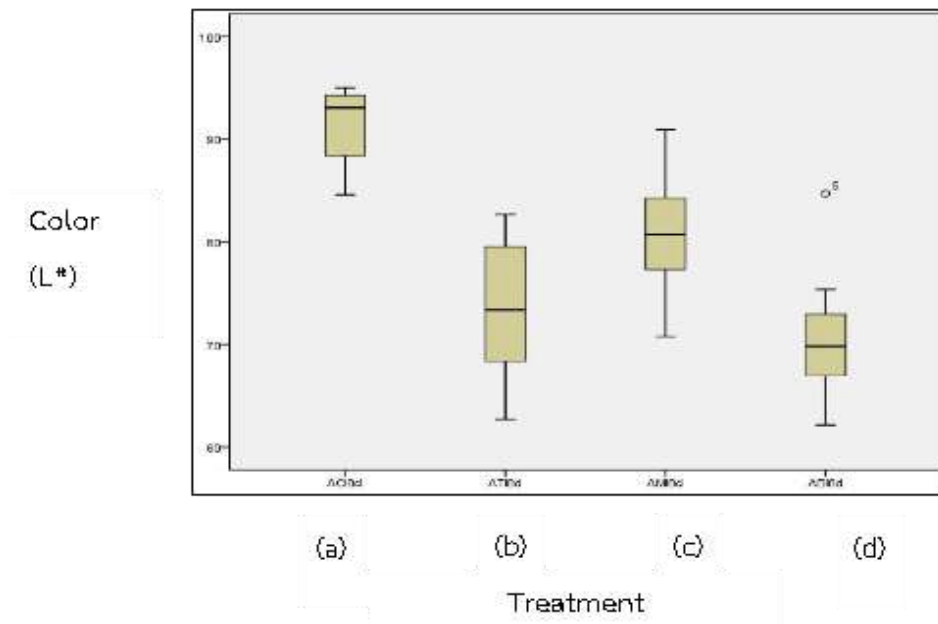


Figure 6 Changes in lightness color parameter, the L^* value in the pulp of papaya fruits; (a) control; (b) top; (c) middle and (d) bottom positions after subjecting with MVHT at 47°C for 20 minutes and storage 8 days at $10\text{-}13^{\circ}\text{C}$

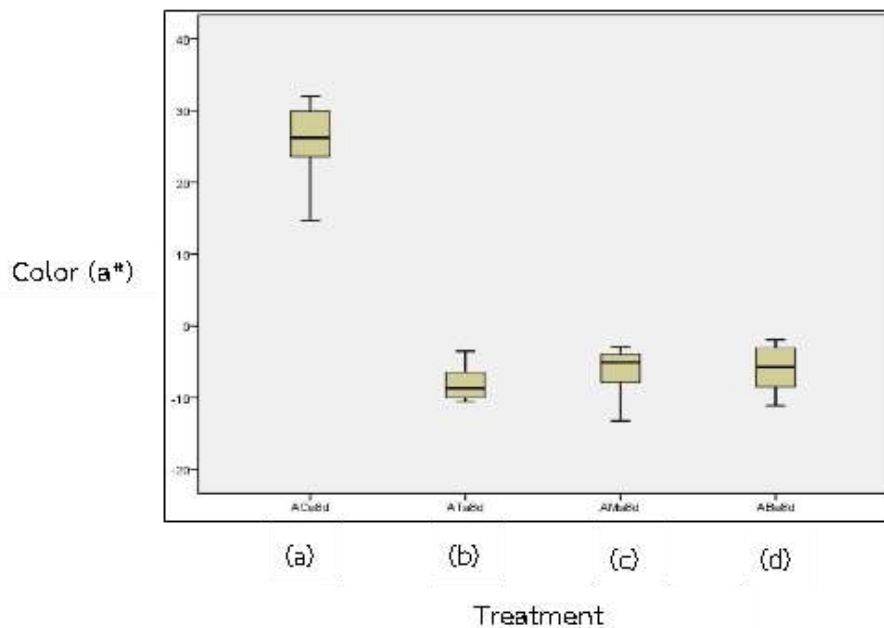


Figure 7 The a^* value in the pulp of papaya fruits; (a) control; (b) top; (c) middle and (d) bottom positions after subjecting with MVHT at 47°C for 20 minutes and storage 8 days at $10\text{-}13^{\circ}\text{C}$

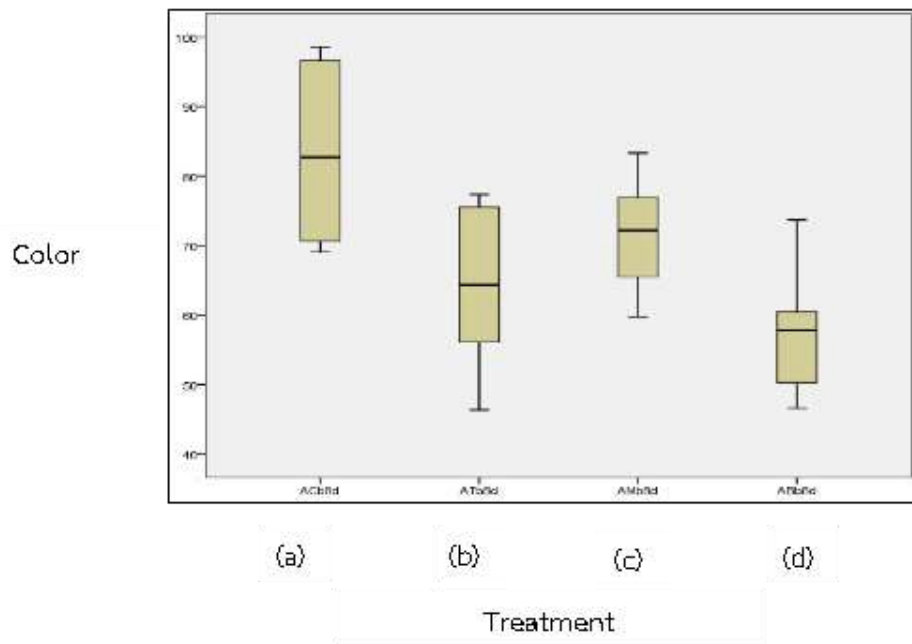


Figure 8 The Hue angle ($^{\circ}$ hue) value in the pulp of papaya fruits; (a) control; (b) top; (c) middle and (d) bottom positions after subjecting with MVHT at 47°C for 20 minutes and storage 8 days at $10\text{-}13^{\circ}\text{C}$



Figure 9 Commercial export simulation test of papaya cv. “Holland” subject to MVHT at 47°C for 20 minutes with full load capacity at laboratory of Plant Quarantine Treatment Section, Plant Quarantine Research Group

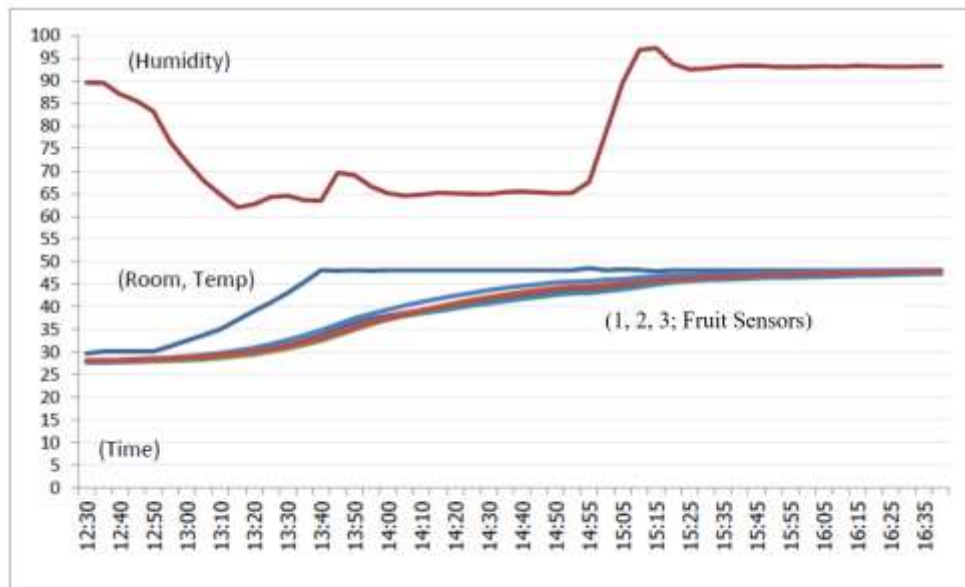


Figure 10 Temperature and humidity profile during MVHT at target temperature 47°C for 20 minutes

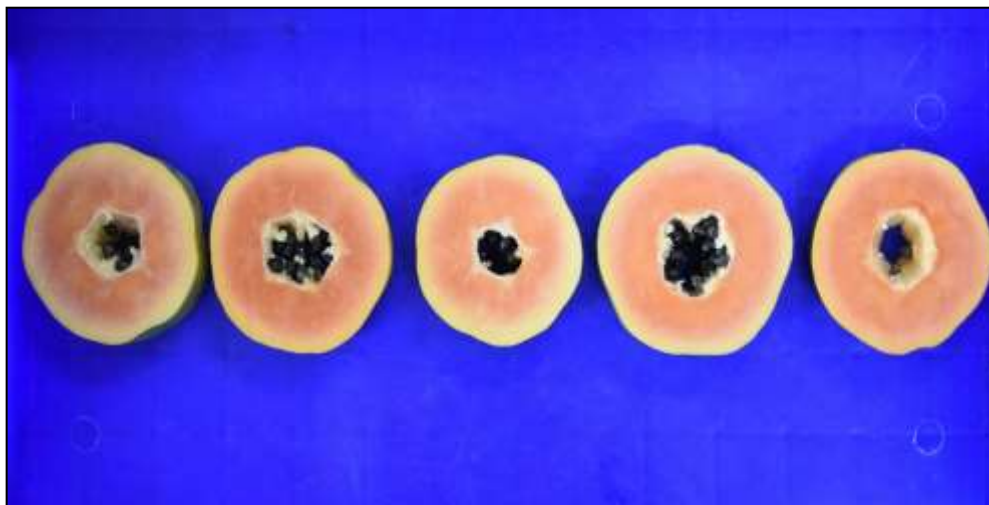


Figure 11 The papaya cv. "Holland" fruits cross section after treated to MVHT at 47°C for 20 minutes and kept at cold storage room at 10-13°C for 14 days



Figure 12 Preparation of papaya cv. “Holland” for large scale confirmatory test (left) and artificial infestation was used for test fruits (right)



Figure 13 Fruit fly rearing room at Plant Quarantine Treatment Section, Plant Quarantine Research Group (left), and forced infestation test fruits were exposed to gravid female of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in infestation cage container approximately 2,000 adults (right)



Figure 14 All infested fruits were placed in the containers located in the bottom of VHT chamber (left), large scale confirmatory test was conducted with MVHT at fruit temperature of 47°C for 20 minutes

วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้
Bactrocera dorsalis (Hendel) ในผลแก้วมังกรเนื้อแดงเพื่อการส่งออก
 Research and Development of Heated Air Quarantine Treatment to
 Control the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
 on Red Dragon Fruit for export.

ปวีณา บุษาทิยาน^{1/} สลักจิต พานคำ^{1/} รัชฎา อินทรกำแหง^{1/} ชัยณรัตน์ สนศิริ^{1/}
 มลนิภา ศรีมาตรภิมย์^{1/} พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์^{1/} พงษ์ศักดิ์ จิณฤทธิ์^{1/}
 ศิริพร คงทวี^{1/} วลัยกร รัตนเดชากุล^{2/}
^{1/} กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/}ผู้เชี่ยวชาญด้านระบบควบคุมการนำเข้าสินค้าพืชและปัจจัยการผลิต
 สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

Abstract

Research and development of heated air quarantine treatment to control the oriental fruit fly, *B. dorsalis* on red dragon fruit for export. The objective is to solve that barrier Thai fresh fruit to export. Test fruits were heated with air more than 90%RH from ambient temperature to 43 °C. After fruit center temperature was raised to 46 and 47 °C and kept at these temperatures for 0, 1 and 2 hours as after 7 days storage at 12±2 °C. These experiments were simulated commercial conditions. The result shown that the red dragon fruit was heat treatment had lost weight more than control was different statistic significantly. The brix value decreased in dragon fruit as MVHT took a long time and the hardness of fruit pulp were softness more than control and no sign of disease. Furthermore, the heat injured of red-dragon fruit after heat treatment, vapor heat treatment (VHT) and MVHT. Temperature attained 46.5 °C and kept at this temperature for 0, 1 and 2 after 7 days storage at 25±2 °C these experiments were did in laboratory condition. From the experiment, it was found that the quality of dragon fruit changed by VHT had not different statistic significantly

รหัสการทดลอง 03-04-59-03-01-00-09-62



($P>0.05$) at all intervals time, but the MVHT for 1 hour of rep. 1 and 2 hour of rep. 2, the brix value in red meat dragon fruit was different statistic significantly ($P<0.01$) compared to the control. In addition, it was found that the damage caused by heat was in the center of the flesh pitting, a hollow hole, and the surrounding flesh was injured. This symptom is not found in unheated dragon fruit

To determine the most heat tolerant stage of the oriental fruit fly with egg, 1st, 2nd and 3rd first instar in red dragon fruit to MVHT. The fruit temperatures were maintained at 45 and 46.5 °C for 0, 10, 20, 30 and 40 min. The results of three trials, it was found that the percentage of insect mortality on egg and first instar stage was 67.6 and 39 percent. Then choose egg and first instar stage of fruit flies were compared again by MVHT at temperature 45 and 46.5°C for 0, 10, 20, 30 and 40 min. The result shown that at 45 °C, the corrected mortality of egg stage less than first instar stage were 23.67 and 49.40 percent but temperature at 46.5°C of egg and first instar of oriental fruit fly were 100 percent death. Therefore, in this test the most heat tolerant stage is eggs stage. The efficiently disinfestation test with MVHT to control *B. dorsalis* on red dragon fruit in this experimental should be disinfest fruit fly more than 3,000 individuals at a temperature of 46.5 °C for 0, 10, 15, 20, 25 and 30 min. It was found that the insect mortality of 24h egg stage fruit flies were death 100 percent at 30 min. Fruit flies have an estimate for disinfestation according to Abbott equal to 4,356 individuals.

Keywords : Heat injury, Heated Air Quarantine Treatment, Fruit fly, Red dragon fruit

บทคัดย่อ

การวิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลแก้วมังกรเนื้อแดงเพื่อการส่งออก มีวัตถุประสงค์เพื่อแก้ปัญหาที่เป็นอุปสรรคต่อการส่งออกผลไม้ไทย จากการประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำปรับความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ต่อผลแก้วมังกรเนื้อแดง ที่อุณหภูมิ 46 และ 47 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชม. ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90% ทำการทดลองกับตู้อบความร้อนขนาดใหญ่ พบว่าแก้วมังกรที่ผ่านความร้อนมีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักมากกว่าผลที่ไม่ผ่านความร้อนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ความหวานลดลงเมื่อผ่านความร้อนในเวลาที่นานขึ้น เนื้อของแก้วมังกรมีความอ่อนนุ่มมากกว่าที่ไม่ผ่านความร้อน บริเวณกลางผลเนื้อมีขนาดเล็กไม่พบความเสียหาย และไม่มีการของโรคปรากฏ นอกจากนี้ ได้ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนของผลแก้วมังกร หลังจากผ่านความร้อน



วิธีการอบไอน้ำ (VHT) และ MVHT ที่อุณหภูมิ 46.5 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชม. ทำการทดสอบกับตู้ขนาดเล็ก จากการทดลองพบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของแก้วมังกรโดยวิธี VHT มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ทุกช่วงเวลา แต่วิธี MVHT นาน 1 ชม. ของ rep.1 และที่ 2 ชม. ของ rep.2 ปริมาณน้ำตาลซึ่งวัดจากปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยยะสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และพบว่าเนื้อบริเวณกลางผลยุบ เป็นรูกลวง เนื้อรอบๆที่เกิดช่องว่างลักษณะซำ ซึ่งไม่พบลักษณะอาการนี้ในแก้วมังกรที่ไม่ผ่านความร้อน

ทำการศึกษาคความทนทานของ *B.dorsalis* ระยะไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ในผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงต่อความร้อนด้วยวิธี MVHT ให้อุณหภูมิผลคงอยู่ที่ 45 และ 46.5 °ซ เป็นระยะเวลา 0, 10, 20, 30 และ 40 นาที จากผลการทดลอง 3 ครั้ง พบว่า เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงในระยะไข่สูงกว่าระยะหนอนวัย 1 คือ 67.6 และ 39 เปอร์เซ็นต์ จึงนำระยะไข่และหนอนวัย 1 ของแมลงมาศึกษาเปรียบเทียบกันอีกครั้ง โดยวิธีการวิธีอบไอน้ำ MVHT ที่อุณหภูมิ 45 และ 46.5 °ซ. ระยะเวลา 0, 10, 20, 30 และ 40 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 45 °ซ. มีอัตราการตายของแมลงระยะไข่ต่ำกว่าระยะหนอนวัย 1 ได้แก่ 23.67 และ 49.40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46.5 °ซ. พบว่าระยะไข่ และหนอนวัย 1 มีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ทุกช่วงเวลา จากผลการทดลองแสดงว่าระยะไข่ของแมลงวันผลไม้ในผลแก้วมังกรมีความทนทานต่อความร้อนมากกว่าหนอนวัยที่ 1 จึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของวิธี MVHT ในการกำจัด *B. dorsalis* ในผลแก้วมังกร ในระดับแมลงทดลองจำนวนไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว ที่อุณหภูมิ 46.5 °ซ. นาน 0, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที อัตราการตายของแมลงในระยะไข่เฉลี่ย 100% ที่ระยะเวลา 30 นาที และสามารถกำจัด *B. dorsalis* ระยะไข่ 24 ชม. ในผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงตายทั้งหมด มีค่าประมาณการในการกำจัดแมลงวันผลไม้ ตาม Abbott เท่ากับ 4,356 ตัว

คำหลัก : ความเสียหายจากความร้อน, วิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อน, แมลงวันผลไม้, แก้วมังกรเนื้อแดง

คำนำ

แก้วมังกร หรือ Dragon fruit เป็นพืชในวงศ์กระบองเพชร (Cactaceae) จัดอยู่ในสกุล *Hylocereus* เป็นพืชไม้เลื้อย มีถิ่นกำเนิดทางตอนใต้ของประเทศเม็กซิโกและประเทศใกล้เคียง สำหรับประเทศไทยมีการปลูกมาตั้งแต่ พ.ศ. 2540 โดยนำเข้าต้นพันธุ์จากเวียดนามมาปลูกเพื่อเป็นพืชเศรษฐกิจ พันธุ์ที่มีการนำเข้ามาในช่วงแรกเป็นพันธุ์เนื้อในสีขาว ต่อมามีการนำเข้ามาแก้วมังกรพันธุ์เนื้อในสีแดงที่มีชื่อว่า "แดงสยาม" จากไต้หวันเข้ามาปลูกในประเทศไทยที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ *H. costaricensis* (Web.) Britton & Rose ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแก้วมังกรเนื้อแดง คือมีลำต้นเป็นปล้องสามเหลี่ยมแยกเป็น 3 แฉก มีลักษณะอวบน้ำ สีเขียวเข้มปน



เทา ซึ่งเป็นส่วนของใบที่เปลี่ยนรูปร่างไป ส่วนลำต้นที่แท้จริงอยู่ในตำแหน่งที่เป็นศูนย์กลางของ แฉกทั้ง 3 ที่ลำต้นด้านบนนอกมีหนามเป็นกลุ่มๆ มีรากทั้งในดินและรากอากาศ ดอกของแก้วมังกร เป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ มีเกสรเพศผู้จำนวนมาก มีก้านเกสรเพศเมีย 1 อัน ส่วนของกลีบดอกอยู่ ด้านบนของรังไข่ เมื่อบานมีลักษณะคล้ายปากแตร โดยบานในช่วงหัวค่ำจนถึงเช้า มีกลิ่นหอม อ่อนๆ ผลแก้วมังกรเป็นทรงกลม มีเนื้อหลายเมล็ด (berry) ที่ผลมีกลีบ ภายในผลเมื่อผ่าออกมีเนื้อ สีแดงอมม่วง เมล็ดมีขนาดเล็กสีดำ ลักษณะคล้ายเมล็ดงา (ภขมน, 2556.; กฤติยา, 2559; Le Bellec *et al.*, 2006) แก้วมังกรเป็นพืชวันยาวที่ออกดอกให้ผลผลิตตามธรรมชาติในช่วงเดือน มีนาคม-ตุลาคม (ภาสันต์และคณะ, 2559) มีประโยชน์ต่อร่างกายเหมาะกับคนที่สนใจสุขภาพ เนื่องจากแก้วมังกรเป็นผลไม้ที่ให้พลังงานต่ำ (ประมาณ 50 - 60 กิโลแคลอรี/100 กรัม) น้ำตาลที่ พบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ในเนื้อผลพบวิตามินซี โยอาหาร และ โปแทสเซียมสูง นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่มโพลีฟีนอลซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก กระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรไบโอติกในลำไส้ ช่วยในเรื่องการขับถ่าย และในเมล็ดของแก้ว มังกรยังอุดมไปด้วยกรดไขมันจำเป็นซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาใน หลอดทดลองและสัตว์ทดลองพบว่าแก้วมังกรมีฤทธิ์ต้านจุลชีพก่อโรคหลายชนิด มีฤทธิ์ต้านอนุมูล อิศระ ต้านเซลล์มะเร็ง ต้านการอักเสบ ลดไขมันในเลือด ต้านภาวะเบาหวาน ลดภาวะดีต่อ อินซูลิน และช่วยปกป้องตับจากสารพิษ ซึ่งพบว่าการบริโภคแก้วมังกรจะทำให้ระดับน้ำตาลและ ไขมันในเลือดลดลง ในส่วนของการศึกษาความเป็นพิษพบว่าเนื้อผลของแก้วมังกร รวมทั้ง สารสำคัญอย่าง betalains มีความปลอดภัยสูง โดยพบทั้งในส่วนเปลือกและในเนื้อผลที่มีสีแดง หรือแดง-ม่วง ในทางอุตสาหกรรมนิยมนำสารกลุ่มดังกล่าวมาทำเป็นสีผสมอาหาร (กฤติยา, 2559; Ho Dinh Hai, 2014) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารสกัดจากเปลือกเพื่อย้อมเนื้อเยื่อเพื่อใช้ศึกษา ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ได้เป็นอย่างดี (Wagiyanti and Noor, 2017)

ปี 2560 มีเนื้อที่เพาะปลูกแก้วมังกรรวมทั้งประเทศ 24,067 ไร่ เพิ่มขึ้นจากปี 2559 จำนวน 2,379 ไร่ หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 9.88 มีการเพาะปลูกใน 59 จังหวัด ผลผลิตเฉลี่ย 1,987 กิโลกรัม/ไร่ แหล่งเพาะปลูกแก้วมังกร 5 อันดับแรกปี 2560 ได้แก่จังหวัดเลย มีพื้นที่เพาะปลูก 13,151 ไร่ รองลงมาคือจังหวัดนครราชสีมา จันทบุรี สมุทรสาคร และอุบลราชธานี (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมส่งเสริมการเกษตร, 2562) จากจำนวนพื้นที่การ เพาะปลูกและผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ในแต่ละปีของแก้วมังกรมีความเป็นไปได้ที่จะทำเป็นพืชส่งออก ในอนาคต

การให้ความร้อนกับผลไม้โดยอาศัยน้ำเป็นสื่อทำความร้อน ได้แก่ วิธีแช่ผลไม้ในน้ำร้อน (HWT) วิธีการนี้ทำให้ผลไม้หลายชนิดเกิดความเสียหายอย่างรุนแรง การใช้เพื่อวัตถุประสงค์ กำจัดแมลงจึงไม่แพร่หลายเหมือนกับการใช้เพื่อควบคุมโรคพืชของผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว ปัจจุบันงานวิจัยและพัฒนากระบวนการกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนจึงมุ่งเน้นให้ความ



สนใจอย่างมากกับวิธีการให้ความร้อนโดยอาศัยอากาศเป็นสื่อนำความร้อน โดยวิธีการนี้มีหลักการให้ความร้อนกับผลไม้ดังนี้ คือ หมุนเวียนอากาศร้อนผ่านผลไม้ ความร้อนจากอากาศจะถ่ายเทไปที่เปลือกของผลไม้ หลังจากนั้นความร้อนจึงจะถ่ายเทเข้าไปยังภายในเนื้อของผลไม้ จนกระทั่งอุณหภูมิภายในผลไม้เพิ่มขึ้นถึงระดับที่สามารถกำจัดแมลงได้ การกำจัดแมลงด้วยความร้อนโดยกรรมวิธีซึ่งอาศัยอากาศเป็นสื่อนำความร้อนแบ่งคร่าวๆ ออกได้เป็น 3 วิธีการ ซึ่งแต่ละวิธีการมีข้อแตกต่างกันในด้านของความชื้นสัมพัทธ์ดังนี้ คือ

1. วิธีอบไอน้ำ (Vapor heat treatment, VHT) : เป็นกรรมวิธีให้ความร้อนกับผลไม้โดยอาศัยการหมุนเวียนไอน้ำร้อนผ่านผลไม้ อากาศร้อนจะอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ (Saturated condition) ความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ตลอดเวลา วิธีการนี้เริ่มใช้เป็นที่แรกทีสหรัฐอเมริกาเมื่อปี พ.ศ. 2472 เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ 2 ชนิดในผลส้ม คือ แมลงวันผลไม้ *Ceratitis capitata* (Wiedemann), และแมลงวันผลไม้ *Anastrepha ludens* (Loew), (Baker, 1952) วิธีอบไอน้ำเป็นวิทยาการด้านการกำจัดศัตรูพืชที่ประสบความสำเร็จในระยะเริ่มแรก แต่อย่างไรก็ดี ความสนใจได้ลดน้อยลงเมื่อมีการคิดค้นวิธีรมผลไม้ด้วยสารเคมี เอธิลีนไดโบรไมด์ และ เมธิลโบรไมด์ จนกระทั่งหลังจากการห้ามใช้สารเคมีเอธิลีนไดโบรไมด์รมผลไม้กำจัดแมลงวันผลไม้เมื่อปี พ.ศ. 2527 วิธีอบไอน้ำจึงกลับมาได้รับความสนใจใหม่อีกครั้งหนึ่ง ประเทศญี่ปุ่นกลายเป็นผู้นำในด้านการพัฒนาอุปกรณ์เครื่องอบไอน้ำทั้งขนาดเล็กสำหรับงานวิจัยและขนาดใหญ่ระดับการค้าที่ทันสมัยควบคุมการทำงานด้วยระบบคอมพิวเตอร์ ปัจจุบัน เครื่องอบไอน้ำซึ่งใช้เทคโนโลยีของญี่ปุ่นมีอยู่ในหลายประเทศ ได้แก่ ญี่ปุ่น (เกาะโอกินาวา) ฟิลิปปินส์ ไทย สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย

2. วิธีอบอากาศร้อน (Hot air treatment, HAT) : เป็นกรรมวิธีซึ่งปรับปรุงมาจากวิธีอบไอน้ำ โดยวิธีการนี้นำมาใช้เป็นครั้งแรกสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะละกอที่ประเทศสหรัฐอเมริกา (Armstrong *et al.*, 1989; Hansen *et al.*, 1990) Hansen *et al.* (1990) พบว่า มะละกอเมื่อผ่านการกำจัดแมลงด้วยวิธีอบอากาศร้อนมีคุณภาพผลดีกว่ามะละกอที่ผ่านการกำจัดแมลงด้วยวิธีอบไอน้ำและวิธีจุ่มผลมะละกอในน้ำร้อน หน่วยงานกักกันพืชสหรัฐอเมริกา ยอมรับประสิทธิภาพของวิธีการดังกล่าวนี้ และอนุมัติให้ใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช วิธีการนี้มีข้อแตกต่างจากวิธีอบไอน้ำ คือ ขณะอบผลไม้ อากาศร้อนภายในห้องบรรจุผลไม้มีปริมาณไอน้ำน้อย (Unsaturated condition) และความชื้นสัมพัทธ์ต่ำประมาณ 50 ± 10 เปอร์เซ็นต์ การที่กำหนดความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศอยู่ในช่วงดังกล่าวนี้ เพื่อป้องกันการกลั่นตัวของอากาศร้อนเป็นหยดน้ำเกาะบนผิวผลไม้ การใช้วิธีอบอากาศร้อนกับผลไม้บางชนิดรักษาคุณภาพดีกว่าเมื่อใช้วิธีอบไอน้ำ (Armstrong *et al.*, 1989) Jones (1939) พบว่าอากาศร้อนที่ไม่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการรักษาคุณภาพของผลมะละกอ ในขณะที่มะละกอได้รับความร้อนอุณหภูมิผลเพิ่มขึ้นถึง 48.0°C . การที่อากาศร้อนเกิดการกลั่นตัวเป็นหยดน้ำคลุม



บนผิวผลไม้ นั้น จะขัดขวางการหายใจของผลไม้และเป็นสาเหตุสำหรับทำให้ผลไม้เกิดความเสียหาย เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการปรับปรุงกระบวนการอบอากาศร้อนขึ้นใหม่ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการกลั่นตัวเป็นหยดน้ำบนผิวผลไม้ โดยการควบคุม dew point (Sharp *et al.*, 1991) การควบคุมอากาศร้อนให้มี dew point ต่ำกว่าอุณหภูมิที่ผิวของผลไม้ จะสามารถป้องกันการกลั่นตัวเป็นหยดน้ำบนผิวผลไม้ แม้ว่าขณะนั้นอากาศมีความชื้นสัมพัทธ์สูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Gaffiney and Armstrong, 1990; Sharp *et al.*, 1991; Mangan and Ingle, 1992)

3. วิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้น (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT): Balock and Kosuma (1954) กล่าวถึงวิธีการนี้เป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2497 โดยเรียกว่าวิธี “quick run-up” vapor heat treatment ซึ่งกรรมวิธีการให้ความร้อนกับผลไม้จะอาศัยวิธีอบอากาศร้อนร่วมกับวิธีอบไอน้ำ โดยช่วงแรกจะให้ความร้อนกับผลไม้ด้วยวิธีอบอากาศร้อน อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 50-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออุณหภูมิในผลไม้เพิ่มขึ้นถึงระดับหนึ่ง จึงปรับเปลี่ยนการให้ความร้อนเป็นวิธีอบไอน้ำ อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ประเทศไทยมีอุปกรณ์เครื่องให้ความร้อนขนาดเล็กสำหรับงานวิจัย ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง สามารถให้ความร้อนกับผลไม้ได้ทุกกรรมวิธีที่กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้ยังมีการวิจัยพัฒนากระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่มีประสิทธิภาพกับมะม่วง มังคุด และส้มโอผ่านการยอมรับจากหน่วยงานกักกันพืชของประเทศญี่ปุ่น ให้ใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* และ *B. cucurbitae* ในผลมะม่วงสายพันธุ์ หนึ่งกลางวัน น้ำดอกไม้ แรด พิมเสนแดง มหาชนก โชคอนันต์ และเขียวเสวย ก่อนส่งออกไปจำหน่ายประเทศญี่ปุ่น (Unahawutti *et al.*, 1991) การวิจัยวิธีกำจัดศัตรูพืช มุ่งแก้ไขปัญหาที่เป็นอุปสรรคต่อการส่งออก โดยเฉพาะปัญหาไข่หรือหนอนแมลงวันทองติดไปกับผักผลไม้ส่งออก เพื่อจัดการความเสี่ยงตามมาตรฐานด้านกักกันพืชระหว่างประเทศ และแก้ไขปัญหาการกีดกันทางการค้า มีความสำคัญต่องานทางด้านกักกันพืช โดยประเทศที่เข้มงวดทางด้านกักกันพืช ใช้มาตรการสุขอนามัยพืช SPS เป็นเครื่องมือกีดกัน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงจากสวนที่ปลูกเป็นการค้าเพื่อการส่งออกที่ได้มาตรฐาน
2. เครื่องชั่งตวงวัด 2 ตำแหน่งสำหรับงานทดลอง
3. เครื่องอ่างน้ำร้อน (water bath; Yamato, model: DK-43)
4. พรอทวัดความร้อนมาตรฐาน (standard thermometer)
5. แท่งวัดอุณหภูมิขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง



6. ตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) รุ่น EHK-1000B/EHK-1000D จำนวน 2 เครื่อง
7. เครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” shower cooling system (differential pressure type) รุ่น SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan
8. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ Refractometer Atago PAL-BX ACID 1
9. เครื่องวัดสี Konica Minolta รุ่น CR-10 Plusher
10. ห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก
11. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ งานทดลอง (petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร กระจกพลาสติก และอุปกรณ์อื่นๆ เช่น ปิเปต (pipettes) หลอดทดลอง (test tube) ปีกเกอร์ (beaker) หลอดหยด (dropper) ปากคีบ (forceps) ผ้ามัสลิน กระจกชกรองสีดำ พู่กัน หนั่งยาง และผาขาวบาง
12. แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะไข่และหนอนวัย 1, 2 และ 3 ที่ใช้ในงานทดลอง ได้มาจากแมลงวันทองตัวเต็มวัยที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียม สูตรข้าวโพดป่น (Watanabe et al, 1975) วิธีการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ในห้องปฏิบัติการรวมทั้งวิธีเตรียมไข่และหนอนวัยต่างๆ มีขั้นตอนและรายละเอียดในอุดร (2537)

วิธีการ

1. ศึกษาข้อมูลเบื้องต้น

1.1 รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับชีววิทยา พื้นที่ปลูกแก้วมังกรเนื้อแดงเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในงานทดลอง

โดยการ สืบค้นข้อมูลงานวิจัยการใช้วิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนในแก้วมังกรจากเว็บไซต์ แหล่งข้อมูลงานวิจัยอื่น ๆ ทั้งใน และต่างประเทศ

1.2 สสำรวจและคัดเลือกผลแก้วมังกรจากสวนที่ได้คุณภาพเพื่อนำมาใช้ในการทดลอง คัดเลือกผลแก้วมังกรเนื้อแดงจากสวนเกษตรกรที่มีการจัดการแปลงที่ดี เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง อบไอน้ำภายในขั้นตอนต่อไป ในจังหวัดที่มีพื้นที่การปลูกแก้วมังกร เช่น จังหวัดเลย ขอนแก่น สมุทรสาคร

1.3 การเตรียมแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) เพื่อใช้ในการทดลอง

ดำเนินการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มจำนวนให้มีปริมาณมากเพื่อใช้ในการทดลอง โดยการเลี้ยงด้วยอาหารเทียม (artificial diet) ตามเทคนิคและวิธีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Watanabe et al., (1973) ดำเนินการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ที่ห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้ที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (อุณหภูมิ 26 ± 1 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 65 ± 5 เปอร์เซ็นต์) สำหรับการเตรียมแมลงวันผลไม้เพื่อใช้ในการทดลองดำเนินการโดยการเลี้ยง



ในกรงใหญ่ จำนวน 20,000 ตัว/กรง และใน กรงเล็ก จำนวน 2,000 ตัว/กรง เพื่อขยายประชากรแมลงให้เพียงพอต่องานทดลอง การเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่นจำเป็นต้องตรวจสอบคุณภาพของแมลงเป็นประจำ โดยการตรวจสอบอัตราการฟักไข่ (hatching rate) การออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) น้ำหนักดักแด้ (pupa weight) และอัตราส่วนเพศผู้ และเพศเมีย (sex ratio) เพื่อควบคุมคุณภาพของแมลงก่อนทดลอง นอกจากนี้ความแข็งแรงของแมลงวันผลไม้ยังเป็นปัจจัยสำคัญต่องานทดลองอบไอน้ำกำจัดแมลง ดังนั้นการสำรวจแมลงวันผลไม้ในสวนผลไม้ที่เป็นพืชอาศัยของผลไม้และสภาพธรรมชาติเพื่อนำมาผสมพันธุ์กับแมลงวันผลไม้ในสภาพห้องปฏิบัติการเพื่อให้ประชากรแมลงยังคงสภาพความแข็งแรงเพื่อใช้ใน งานทดลองจึงมีความจำเป็นต้องดำเนินการ

1.4 ศึกษาสภาพของแก้วมังกรในการเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ในสภาพธรรมชาติ

ศึกษาความเป็นไปได้ที่แมลงวันผลไม้เข้าทำลายแก้วมังกรในสภาพธรรมชาติ โดยสำรวจและเก็บรวบรวมผลแก้วมังกรจากสวนแก้วมังกรที่มีการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ ในจังหวัดที่มีพื้นที่การปลูกแก้วมังกร เช่นจังหวัดเลย ขอนแก่น สมุทรสาคร

1.5 ศึกษาความเป็นไปได้ที่แมลงวันผลไม้เข้าทำลายแก้วมังกรในสภาพห้องปฏิบัติการ

1.5.1 ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของแมลงวันผลไม้โดยใช้วิธีการบังคับให้แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่บนผลแก้วมังกรในกรงเลี้ยงแมลง (Forced infestation method) แบ่งเป็น 2 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่1 วางผลแก้วมังกรจำนวน 10 ลูก ในกรงที่มีตัวเต็มวัยของ *B. dorsalis* จำนวน 2,000 ตัว

กรรมวิธีที่2 วางผลแก้วมังกรจำนวน 10 ลูก บนกรงที่มีตัวเต็มวัยของ *B. dorsalis* จำนวน 2,000 ตัว

โดยเจาะรูที่ผิวเปลือกของผลแก้วมังกรด้วยเข็มหมุดจำนวน 10 รู เป็นเวลา 20 30 และ 40 นาที

1.5.2 ศึกษาเพื่อศึกษาจำนวนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ที่เหมาะสมในผลแก้วมังกร โดยใช้เทคนิคการใส่ไข่ และหนอนของแมลงวันผลไม้เข้าไปในชิ้นเนื้อแก้วมังกรโดยตรง (Eggs inoculation method) โดยเตรียมแก้วมังกรที่มีแมลงวันผลไม้โดยใช้กรอบพลาสติกสำหรับฟิล์มสไลด์วางทับบนผลแก้วมังกร ใช้มีดกรีดผลตามรอยกรอบสไลด์รูสี่เหลี่ยมผืนผ้าจำนวนเพียง 3 ด้าน จำนวน 1 รอยแผล สำหรับการใส่จำนวนแมลง 100 และ 150 ทำ 2 รอยแผลสำหรับใส่จำนวนแมลง 200ลงบนด้านใดด้านหนึ่งของผล กรีดเนื้อที่เปลือกออกเป็นตารางสี่เหลี่ยมเล็กๆเพื่อช่วยให้หนอนแมลงวันผลไม้ กินเนื้อแก้วมังกรได้ดีขึ้น ใส่แมลงวันผลไม้แต่ละระยะ คือ ไข่ หนอนวัย 1, 2 และ 3 ลงบนเนื้อแก้วมังกร จำนวน 100, 150 และ 200 ฟอง (ตัว) ต่อผล ใช้แก้วมังกร



จำนวน 10 ผล ในแต่ละวิธีการ เก็บแก้วมังกรใส่กล่องพลาสติกเก็บไว้ใน ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25-27 °ซ. ตรวจสอบจำนวนหนอนที่รอดชีวิตใน แก้วมังกรภายหลังจากการใส่ไข่ หนอนวัย 1, 2 และ 3 ในผล เป็นเวลา 7, 5, 3 และ 2 วัน ตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1.6 ศึกษาระยะเวลาเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้เมื่ออาศัยอยู่ในผลแก้วมังกร

เตรียมผลแก้วมังกรทั้งหมด 70 ผล ใส่ไข่หนอนแมลงวันผลไม้ในผลแก้วมังกรผลละ 100 ฟอง ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วในข้อ 1.5.2 เก็บแก้วมังกรใส่กล่องพลาสติก ใส่ไว้ในกระบะพลาสติกคลุม ด้วยผ้ามัสลินเก็บไว้ใน ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25-27 °ซ.เตรียมแมลงวันผลไม้ด้วยอาหารเทียม (artificial diet) และเก็บไว้ใน ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25-27 °ซ. เพื่อใช้เปรียบเทียบระยะเวลาเจริญเติบโตของแมลงระหว่างอาหารเทียม และแก้วมังกร

2. การทดสอบประสิทธิภาพของตู้อบไอน้ำเพื่อใช้ในการทดลอง

2.1 การทดสอบความเที่ยงตรงของแท่งวัดความร้อนและความชื้น (sensor calibration) โดยแท่งวัดความร้อนจะคลาดเคลื่อนเมื่อถูกใช้งานไปในระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้น ขั้นตอน sensor calibration จำเป็นต้องตรวจสอบอย่างสม่ำเสมออย่างน้อย 1 เดือน เพื่อปรับค่าความคลาดเคลื่อนอุณหภูมิที่วัดได้ของแท่งวัดความร้อนและความชื้น ดำเนินการโดยการจุ่มแท่งวัดความร้อน แท่งวัดความชื้นที่ต้องการทดสอบ และเทอร์โมมิเตอร์มาตรฐาน (standard thermometer) ลงในเครื่องอ่างน้ำร้อน (water bath) ตั้งค่าอุณหภูมิน้ำที่ 47 °ซ. กับเครื่องอ่างน้ำร้อน และตั้งค่าอุณหภูมิของตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง (จำนวน 2 ตู้) ที่อุณหภูมิ 47 °ซ. และความชื้นสัมพัทธ์ ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการอ่านค่าอุณหภูมิ และความชื้น สามารถตรวจสอบได้จากหน้าจอเครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้น (hybrid recorder) ของตู้อบไอน้ำ (Figure 1) เมื่อแท่งวัดความร้อนและความชื้น มีอุณหภูมิและความชื้น เป็นไปตามที่กำหนดไว้แล้ว จึงเริ่มบันทึกอุณหภูมิและความชื้น (แท่งวัดความร้อนทั้งหมดต้องอ่านค่าได้ 47 °ซ. และแท่งวัดความชื้นต้องอ่านค่าได้ในช่วง 99.99 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์) โดยทำการป้อนคำสั่งการพิมพ์กระดาษบันทึกอุณหภูมิและความชื้นของตู้อบไอน้ำ

2.2 การทดสอบรูปแบบของอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม ดำเนินการโดยตั้งค่าอุณหภูมิและความชื้นของตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง ตรวจสอบอุณหภูมิและความชื้นที่กำหนดไว้โดยอาศัยการวัดอุณหภูมิจาก sensor fruit ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของอุณหภูมิผลแก้วมังกรที่ต้องการทดสอบภายในตู้อบไอน้ำ โดยการเสียบแท่งวัดความร้อน บริเวณขั้วผลแก้วมังกรให้ปลายแท่งวัดอุณหภูมิอยู่ตรงกึ่งกลางผลแก้วมังกร หลังจากเสียบ sensor fruit เรียบร้อยแล้ว ดำเนินการวาง sensor fruit 1 ผล/กระบะ ลงในกระบะที่ใช้บรรจุแก้วมังกรของตู้อบไอน้ำ สำหรับกระบะทำด้วยสแตนเลส ขนาด 30×50×7 เซนติเมตร พื้นด้านล่างเจาะรูกลมเพื่อการถ่ายเทของความร้อนของผลไม้อบไอน้ำ ทดสอบตู้เปล่าของตู้อบไอน้ำ เมื่อ sensor fruit มีอุณหภูมิภายในสุดผลถึง 47 °ซ. นาน 20 นาที เรียบร้อยแล้วตรวจสอบค่าอุณหภูมิและ



ความชื้นสัมพัทธ์จากกระดาดบ้านที่กอุณหภูมิและความชื้นของตู้อบไอน้ำจำนวน 2 ตู้ (ทดลองจำนวน 2 ซ้ำ)

3. ศึกษาความเสียหายจากความร้อนของผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง

3.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของแก้วมังกรหลังจากผ่านความร้อนวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ กับตู้อบไอน้ำขนาดใหญ่

โดยลักษณะความเสียหายของแก้วมังกรหลังจากผ่านความร้อนด้วยวิธีการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT) ต่อคุณภาพของผลแก้วมังกรเนื้อแดง ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดใหญ่สำหรับการค้าส่งออกยี่ห้อ Sanshu รุ่น FHK-300MPC (เนื่องจากตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็ก “Sanshu” Vapor Heat Treatment System ชำรุดอยู่ระหว่างซ่อมบำรุง) แก้วมังกรที่ใช้ในการทดลองใช้แก้วมังกรที่มีขนาดกลาง แก้วมังกรที่ผ่านความร้อน treatment จำนวน 12 ผลต่อซ้ำ และแก้วมังกรที่ไม่ผ่านความร้อน control จำนวน 4 ผลต่อซ้ำ (ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ) สำหรับการวัดอุณหภูมิผลแก้วมังกรที่ทดลองอาศัยการวัดจากเซ็นเซอร์ที่เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิผลแก้วมังกร (sensor fruit) จำนวน 3 ผล โดยให้อุณหภูมิภายในสุดผลคงอยู่ที่ 46 และ 47 °ซ. (เซ็นเซอร์กำหนดอุณหภูมิแก้วมังกรต้องอ่านค่าได้ 46 และ 47 °ซ. ครบทั้ง 3 เส้น) และคงอุณหภูมิไว้ นาน 0, 1 และ 2 ชม. ตามลำดับ หลังจากท้อบแก้วมังกรครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่กำหนดไว้ แก้วมังกรที่ผ่านความร้อนออกจากตู้อบไอน้ำจะลดอุณหภูมิแก้วมังกรทันทีโดยวิธีการเป่าด้วยลมนาน 1 ชม. ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ จากนั้นเก็บแก้วมังกรที่ทดลองไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นที่อุณหภูมิ 12 °ซ.

3.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของแก้วมังกรหลังจากผ่านความร้อนวิธีการอบไอน้ำและวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ กับตู้อบไอน้ำขนาดเล็ก

อบแก้วมังกรเปรียบเทียบกันระหว่าง วิธีการอบไอน้ำ และวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เพื่อศึกษาลักษณะความเสียหายของแก้วมังกรเนื้อแดงจากความร้อน และเพื่อหากรรมวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนที่เหมาะสมกับแก้วมังกร วิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนแต่ละกรรมวิธีมีลักษณะของการให้ความร้อนกับผลไม้แตกต่างกันดังรายละเอียดต่อไปนี้ วิธีอบไอน้ำเป็นการอบผลไม้ในสภาพที่ผลไม้ไม่ได้อยู่ภายใต้สภาพอากาศร้อนที่อ้อมตัวด้วยไอน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศสูงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ คือในช่วงแรกความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ หลังจากผลไม้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 43 °ซ. จึงปรับเปลี่ยนเป็นวิธีการอบไอน้ำ

ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ขนาดเล็ก จำนวน 2 เครื่อง (Figure 1) ใช้แก้วมังกรเนื้อแดง ที่มีอายุหลังเก็บเกี่ยว 1-2 วัน น้ำหนัก 300-350 กรัม จาก



แหล่งปลูกในจังหวัดเลย เก็บแก้วมังกรทั้งหมดในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น 12 ± 1 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 65 ± 5 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองแต่ละครั้งจะอบแก้วมังกร 2 วิธีเปรียบเทียบกัน จำนวน 2 ครั้ง โดยใช้เครื่องตู้อบความร้อนคนละเครื่อง เปรียบเทียบผลกระทบของความร้อนแต่ละวิธีต่อคุณภาพมังคุดเมื่ออุณหภูมิผลคงอยู่ที่ 46.5 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชม. โดยแต่ละระยะเวลาใช้แก้วมังกรจำนวน 10 ผล สำหรับแก้วมังกรที่ใช้เปรียบเทียบมีจำนวน 10 ผล ไม่ต้องผ่านความร้อน ลดอุณหภูมิผลแก้วมังกรหลังจากสิ้นสุดการให้ความร้อนด้วยวิธีเป่าลมนาน 1 ชม. จากนั้นแยกแก้วมังกรแต่ละกรรมวิธีเก็บไว้ในกล่องกระดาษลูกฟูก เก็บทั้งหมดไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 27 ± 1 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 75 ± 5 เปอร์เซ็นต์ ประเมินคุณภาพภายหลังจากให้ความร้อนแล้ว 6 วัน โดยใช้หลักเกณฑ์พิจารณาและดำเนินการในหัวข้อต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.3 ความเสียหายของแก้วมังกรเนื้อแดงจากความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ

อบแก้วมังกรด้วยความร้อนจากวิธีที่ได้จากการทดลองที่ 1 ที่อุณหภูมิต่างๆกัน เพื่อคัดเลือกวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแก้วมังกร ดำเนินการทดลองโดยใช้แก้วมังกรสีแดง มีอายุหลังเก็บเกี่ยว 1-2 วัน น้ำหนัก 300-350 กรัม จากแหล่งปลูกในจังหวัดเลย เก็บแก้วมังกรทั้งหมดในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น 12 ± 1 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 65 ± 5 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งนำมังคุดเข้าอบในเครื่องตู้อบความร้อน ทำการอบไอน้ำโดยใช้ตู้อบความร้อนจำนวน 2 เครื่อง เปรียบเทียบคุณภาพผลแก้วมังกรเมื่ออุณหภูมิภายในสุดผลตรงบริเวณกึ่งกลางผลคงอยู่ที่ 46 และ 47 °ซ. และคงที่ไม่ต่ำกว่า 46 และ 47 °ซ. เป็นระยะเวลา 0, 1 และ 2 ชม. โดยแต่ละอุณหภูมิและระยะเวลากำหนดมีแก้วมังกรผ่านความร้อนแต่ละกรรมวิธี 12 ผล สำหรับแก้วมังกรที่ใช้เปรียบเทียบมีจำนวน 12 ผล ไม่ต้องผ่านความร้อน อบแก้วมังกรเปรียบเทียบกันแต่ละอุณหภูมิและระยะเวลากำหนด จำนวน 2 ครั้ง

เมื่อแก้วมังกรทดลองมีอุณหภูมิคงอยู่ที่อุณหภูมิกำหนดเป็นระยะเวลานานดังกล่าวมาแล้ว ขึ้นต้น นำแก้วมังกรที่ระยะเวลานั้นออกจากเครื่องตู้อบความร้อน ลดอุณหภูมิผลแก้วมังกรทันทีหลังจากสิ้นสุดการให้ความร้อนด้วยวิธีเป่าด้วยลมนาน 1 ชม. ในเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ จากนั้นแยกเก็บแก้วมังกรแต่ละกรรมวิธีลงในกล่องกระดาษลูกฟูก เก็บแก้วมังกรทดลองทั้งหมดในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น อุณหภูมิ 27 ± 1 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 75 ± 5 เปอร์เซ็นต์

4. ศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันทองระยะไข่และหนอนในผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงต่อวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์

ดำเนินการทดลองด้วยเครื่องอบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ “Sanshu” vapor heat treatment system (differential pressure type) รุ่น EHK-1000B และ EHK-1000D, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan จำนวน 2 เครื่อง (Figure 10) แก้วมังกรเนื้อแดงที่ใช้ในการทดลองเป็นแก้วมังกรขนาดกลางที่มีอายุประมาณ 30 วันคือสีผิวผลมีสีม่วงแดง ผลมีขนาดน้ำหนักอยู่ที่ 300-380 กรัม/ผล การเตรียมแก้วมังกรเนื้อแดงในสภาพที่มีแมลงระยะไข่และหนอน



วัยต่างๆ โดยใช้เทคนิคการใส่ไข่ และหนอนของแมลงวันผลไม้เข้าไปในชิ้นเนื้อแก้วมังกรโดยตรง (Eggs inoculation method) โดยเตรียมแก้วมังกรที่มีแมลงวันผลไม้โดยใช้กรอบพลาสติกสำหรับฟิล์มสไลด์วางทาบบนผลแก้วมังกร ใช้มีดกรีดผลตามรอยกรอบสไลด์รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าจำนวนเพียง 3 ด้าน จำนวน 1 รอยแผล กรีดเนื้อที่เป็ดออกเป็นตารางสี่เหลี่ยมเล็กๆเพื่อช่วยให้หนอนแมลงวันผลไม้ กินเนื้อแก้วมังกรได้ดีขึ้น และบริเวณชิ้นเนื้อที่เป็ดออกใช้ cork borer เบอร์ 2 เจาะรู 1 รู ไข่ของแมลงวันผลไม้ที่ใช้ในการทดลองมีอายุ 24 ชม. ใส่ไข่จำนวน 100 ฟอง/ผล หรือ หนอนวัย 1, 2 หรือ 3 จำนวน 100 ตัว/ผล (Figure 11) การศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ระยะไข่และหนอนวัยต่างๆ แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง แต่ละการทดลองมีขั้นตอนและวิธีการดำเนินการดังรายละเอียดต่อไปนี้

4.1 เปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระหว่างระยะไข่และหนอนวัยต่างๆ

เตรียมแก้วมังกรมีแมลงระยะไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 อยู่ภายในผล นำแก้วมังกรทดลองแต่ละระยะการเจริญเติบโตแยกเก็บในเครื่องตู้อบความร้อน โดยจัดเรียงแก้วมังกรในถาดบรรจุผลไม้จำนวน 5 ผล/ถาด จากนั้นอบแก้วมังกรกำจัดแมลงด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เปรียบเทียบอัตราการตายของแมลงแต่ละระยะการเจริญเติบโตในผลแก้วมังกร เมื่ออบแก้วมังกรให้อุณหภูมิภายในสุดของผลแก้วมังกรเพิ่มขึ้นถึง 45 °C และ 46 °C เป็นระยะเวลา 0, 0:10, 0:20, 0:30 และ 0:40 ชม. โดยช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลแก้วมังกรจากอุณหภูมิห้องถึง 43 °C อาศัยอากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ 50%RH หลังจากแก้วมังกรอุณหภูมิ 43 °C ปรับเปลี่ยนเป็นอากาศร้อนที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 95%RH

ในการทดลองแต่ละครั้ง ใช้แก้วมังกรกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) ขนาดกลางน้ำหนัก 350 ± 2 กรัม/ผล จำนวน 3 ผล เมื่อแก้วมังกรกำหนดอุณหภูมิจำนวน 2 ผล มีอุณหภูมิคงที่ 45 °C หรือ 46 °C เป็นระยะเวลาตามที่กำหนด นำแก้วมังกรทดลองจำนวน 5 ผล ออกจากห้องบรรจุผลไม้และลดอุณหภูมิของแก้วมังกรทันที โดยเป่าด้วยลมนาน 1 ชม. ในเครื่องลดอุณหภูมิลดผลไม้ "Sanshu" shower cooling system (differential pressure type) รุ่น SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan นอกจากแก้วมังกรที่ผ่านความร้อนแล้ว ยังมีแก้วมังกรอีกส่วนหนึ่งเตรียมไว้สำหรับใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (Control) ของแต่ละระยะการเจริญเติบโตซ้ละจำนวน 5 ผล ที่ไม่ต้องผ่านความร้อน แยกเก็บแก้วมังกรทดลองแต่ละระยะเวลาในกล่องพลาสติกทรงสี่เหลี่ยม โดยใส่แก้วมังกร 1 ผล/กล่อง เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงวันผลไม้จากภายนอกเล็ดลอดเข้าไปวางไข่ในแก้วมังกรทดลอง หลังจากนั้นเก็บแก้วมังกรทดลองทั้งหมดไว้ในห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ที่อุณหภูมิ 25-28 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 60-80 °C ตรวจสอบจำนวนแมลงรอดชีวิตในแก้วมังกรแต่ละผลหลังจากผ่านการอบความร้อนเพื่อกำจัดแมลงระยะไข่ หนอนวัย 1, 2 และ 3 เป็นเวลานาน 6, 5, 3 และ 2 วัน ตามลำดับ ดำเนินการทดลองอบแก้ว



มังกรำจัดแมลงแต่ละระยะการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่กำหนดดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นทั้งหมด 12 ครั้ง

4.2 เปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระหว่างระยะไข่และหนอนวัยที่ 1

เตรียมแก้วมังกรมีไข่และหนอนวัยที่ 1 ในผล ตามวิธีการที่ได้กล่าวในขั้นตอนที่ 1 จากนั้นนำแก้วมังกรทดลองซึ่งมีแมลงระยะไข่และหนอนวัยที่ 1 ในผล อย่างละ 5 ผล วางในภาตบรรจุผลไม้เดียวกัน จากนั้นอบแก้วมังกรกำจัดแมลงระยะไข่และหนอนวัยที่ 1 พร้อมกันในเครื่องตู้อบความร้อนเครื่องเดียวกันด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เปรียบเทียบอัตราการตายของไข่และหนอนวัยที่ 1 เมื่อคงความร้อนภายในผลที่อุณหภูมิ 46 °C และ 46.5 °ซ. เป็นระยะเวลา 0, 0:10, 0:20, 0:30 และ 0:40 ชม. โดยช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลแก้วมังกรจากอุณหภูมิห้องขึ้นถึง 43 °ซ. อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ 50% หลังจากแก้วมังกรอุณหภูมิ 43 °ซ. ปรับเปลี่ยนเป็นอากาศร้อนที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มสูงขึ้นที่ระดับมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองแต่ละครั้ง ใช้แก้วมังกรกำหนดอุณหภูมิจำนวน 3 ผล เมื่อแก้วมังกรกำหนดอุณหภูมิ 2 ผล มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 45 °ซ. และคงอยู่ที่อุณหภูมิ 45 °ซ. เป็นระยะเวลาตามกำหนด นำแก้วมังกรทดลองมีแมลงระยะไข่และหนอนวัยที่ 1 ในผล อย่างละจำนวน 5 ผล ออกจากห้องบรรจุผลไม้ ลดอุณหภูมิผลแก้วมังกรทันที โดยเป่าด้วยลมนาน 1 ชม. แก้วมังกรที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ของระยะไข่และหนอนวัยที่ 1 มีไข่จำนวน 5 ผล ไม่ต้องผ่านความร้อน เก็บแก้วมังกรทดลองตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วในขั้นตอนที่ 1 ตรวจนับจำนวนแมลงรอดชีวิตในผลแก้วมังกรแต่ละผลหลังจากอบมั่งคุด 6 วัน ดำเนินการทดลองอบแก้วมังกรกำจัดแมลงระยะไข่และหนอนวัยที่ 1 ที่อุณหภูมิและเวลาที่กำหนดดังกล่าวข้างต้นจำนวน 3 ครั้ง

5. ศึกษาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง

ดำเนินการทดลองโดยใช้เครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ "Sanshu" Vapor Heat Treatment System จำนวน 2 เครื่อง แก้วมังกรทดลองมีขนาดกลาง น้ำหนัก 300-370 กรัม/ผล เตรียมแก้วมังกรที่มีระยะที่ทนทานต่อความร้อนที่สุดของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ให้อยู่ภายในผล ดำเนินการตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จำนวน 100 ฟองหรือตัว/ผล ในการทดลองแต่ละครั้งเตรียมแก้วมังกรทดลองที่มีวัยที่ทนทานต่อความร้อนที่สุดในผลจำนวน 40 ผล นำแก้วมังกรจำนวน 30 ผล จัดเรียงในภาตบรรจุผลไม้จำนวน 10 ผล/ภาต สำหรับแก้วมังกรที่เหลืออีก 10 ผล ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ต้องผ่านความร้อน อบมั่งคุดด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์เหมือนกับการทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดวัยที่ทนทานต่อความร้อนที่สุดของแมลงวันผลไม้ในแก้วมังกรที่อุณหภูมิภายในสุดผลเพิ่มขึ้นถึง 46.5 °ซ. และคงความร้อนภายในผลไว้ที่ 46.5 °ซ. เป็นเวลานาน



0:00, 0:15, และ 0:30 ชม. ดำเนินการทดลองโดยอบแก้วมังกรกำจัดระยะที่มีความหนานต่อ ความร้อนมากที่สุดจำนวน 4 ครั้ง ตรวจสอบผลการทดลองหลังจากอบแก้วมังกร 6 วัน บันทึกจำนวน แผลงรอดชีวิต คำนวณอัตราการตายของแผลงโดยใช้สูตรของ Abbott (Abbott, 1925)

การบันทึกข้อมูล

1. การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)
2. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS)
3. จำนวนแผลงที่รอดชีวิตในแก้วมังกรหลังจากผ่านความร้อนแล้วเป็นเวลานาน 5 วัน
4. อัตราการฟักไข่ (hatching rate)
5. อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate)
6. น้ำหนักของดักแด้
7. อัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio)
8. การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)
9. ปริมาณน้ำตาล (brix value)
10. ลักษณะภายนอก เช่น ขั้ว เที่ยว ผลเที่ยว และเนื้อผลที่เสียหาย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาดำเนินงาน: 3 ปี (ตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2564)

สถานที่ทำการทดลอง:

1. สวนแก้วมังกรในพื้นที่จังหวัดเลย สมุทรสาคร
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการ กักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สำหรับข้อมูลของแก้วมังกร พบว่า แก้วมังกร หรือ Dragon fruit มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hylocereus* spp. เป็นพืชในตระกูลแคคตัส หรือสกุลหนึ่งของกระบองเพชร เป็นพืชไม้เลื้อย มีพื้นเพดั้งเดิมอยู่ในแถบอเมริกากลาง โดยบาทหลวงชาวฝรั่งเศสเป็นผู้นำเข้ามาทางประเทศ เวียดนาม เมื่อ 100 ปีที่ผ่านมา จนกระทั่งเป็นผลไม้ประจำถิ่นของเวียดนาม สำหรับประเทศไทย เริ่มรู้จักผลไม้ชนิดนี้อย่างแพร่หลายเมื่อ พ.ศ. 2534 เนื่องจากมีการนำเข้าต้นพันธุ์ดีจากเวียดนาม มาปลูกเพื่อเป็นพืชเศรษฐกิจ โดยพันธุ์ที่มีการนำเข้ามาในช่วงแรกเป็นพันธุ์เนื้อในสีขาว ต่อมาอีก ระยะเวลาหนึ่งจึงมีการนำเข้าแก้วมังกรพันธุ์เนื้อในสีแดง (*Hylocereus costaricensis*) (Weber) Britton & Rose ที่มีชื่อว่า "แดงสยาม" ซึ่งเป็นพันธุ์มาจากไต้หวัน (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ, มปป.) เข้ามาปลูกในประเทศไทย ลักษณะของต้นแก้วมังกร ลำต้นเป็นแฉก 3 แฉก สีเขียว อวบน้ำ มีความยาวประมาณ 5 เมตร ซึ่งจริง ๆ แล้วเป็นส่วนของใบที่เปลี่ยนรูปร่างไป



ส่วนลำต้นที่แท้จริงอยู่ในตำแหน่งที่เป็นศูนย์กลางของแฉกทั้ง 3 บริเวณตาข้างจะมีหนาม 1 – 5 หนาม มีรากทั้งในดินและรากอากาศ ดอกมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณปลายกิ่งในช่วงเดือนเมษายน เมื่อบานมีลักษณะคล้ายปากแตร โดยจะบานในช่วงหัวค่ำจนถึงเช้า มีกลิ่นหอมอ่อนๆ ดอกจะมีความยาวประมาณเกือบหนึ่งฟุต ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม เป็นช่วงที่แก้วมังกรให้ผลผลิต ผลมีลักษณะเป็นสันเหลี่ยมทู่ๆ เรียงรายอยู่ทั่วไปบนผิวเปลือก เปลือกหนา มีสีชมพูอมส้ม ภายในผลเมื่อผ่าออกจะมีเนื้อสีขาวขุ่น หรือสีชมพู ในเนื้อจะมีเมล็ดเล็กๆ สีดำ คล้ายกับเมล็ดงาฝังตัวอยู่ (Figure1) ในปัจจุบันแก้วมังกรปลูกมากในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นอกจากนี้ยังมีพื้นที่การปลูกในจังหวัดนครปฐม ประจวบคีรีขันธ์ และตรัง มีการนำเข้าแก้วมังกรในหลายประเทศได้แก่ ประเทศไต้หวัน นิวซีแลนด์ ออสเตรเลีย เกาหลีใต้ และญี่ปุ่น โดยมีเงื่อนไขและข้อกำหนดว่าต้องกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยวิธีการอบไอน้ำ (Table1)

การเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ภายในห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้เพียงพอสำหรับที่จะนำไปใช้ในการทดลองในหัวข้อ 1.5 ศึกษาความเป็นไปได้ที่แมลงวันผลไม้เข้าทำลายแก้วมังกรในสภาพห้องปฏิบัติการ และ 1.6 ศึกษาระยะเวลาเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้เมื่ออาศัยอยู่ในผลแก้วมังกร ในไตรมาสที่ 3 และ 4 โดยได้แมลงวันผลไม้จำนวนมากกว่า 50,000 ตัว มีอัตราการฟักไข่ (hatching rate) เฉลี่ย 76-80 % อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) เฉลี่ย 87-94 % น้ำหนักของดักแด้ เฉลี่ย 0.013-0.015 กรัม และมีอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio) เพศผู้เฉลี่ย 42-45 % และเพศเมียเฉลี่ย 44-49 % (1:1)

เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของหนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* โดยวิธีบังคับ (Forced infestation method) พบการเข้าทำลายผลแก้วมังกรของแมลงตัวเมื่อบางบนทรงมีการเข้าทำลายที่ 20 นาที 30 นาที และ 40 นาที ร้อยละ 4.50 9.70 และ 11.90 ตามลำดับ ส่วนในทรงแมลงวางไข่ร้อยละ 24.5 15.8 29.7 (Table2) อาจเกิดจากแก้วมังกรมีเปลือกค่อนข้างหนา ประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ทำให้การวางไข่ให้เข้าถึงเนื้อเป็นไปได้ยาก โดยเฉพาะบริเวณกาบใบที่มีอยู่รอบผล จากรายงานของ รัชญา และคณะ (2555) ให้แมลงวันทองวางไข่บนแก้วมังกรเนื้อขาวเป็นเวลานานเท่ากับการศึกษานี้ พบว่าแมลงสามารถแมลงเจริญเติบโตได้ดีกว่าแก้วมังกรสีแดง โดยมีจำนวนหนอนรอดชีวิตเฉลี่ยเท่ากับ 98.7 91.2 และ 116.9 ตัว ตามลำดับ

แมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* สามารถเข้าทำลายแก้วมังกรได้ทุกระยะการเจริญเติบโตเมื่อเลี้ยงในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยระยะไข่ การใส่ไข่ลงในผลแก้วมังกรที่จำนวน 100 ฟอง และระยะหนอนวัย 1 จำนวน 100 ตัว มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากที่สุด สำหรับระยะหนอนวัย 2 และ 3 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตไม่แตกต่างกันเมื่อใส่หนอนในผลแก้วมังกรที่จำนวน 100 150 และ 200 ตัว (Table 3) จากข้อมูลดังกล่าวนี้สรุปได้ว่าจำนวนที่เหมาะสมในทุกระยะการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้คือ 200 ตัวหรือฟอง ซึ่งสามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวนี้ไปใช้ในงาน



ทดลองการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ให้ได้มากด้วยความร้อนในปิ้งประมาณ 2563 ต่อไป สำหรับระยะเวลาการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้ในผลแก้วมังกรเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยง ในอาหารเทียม พบว่าการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลแก้วมังกรระยะไข่มี อายุ 1 วัน พักเป็นวัย 1 ในวันที่ 2 เริ่มเป็นวัย 2 ในวันที่ 3 และเข้าสู่วัย 3 ในวันที่ 5 ส่วนการ เจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในอาหารเทียม พบว่า ระยะไข่มีอายุ 1 วัน พักเป็นวัย 1 ในวันที่ 2 เริ่มเป็นวัย 2 ในวันที่ 4 ซึ่งช้ากว่าการเจริญเติบโตในแก้วมังกร และเข้าสู่วัย 3 ในวันที่ 5 (Figure 2 and 3) รัชฎา และคณะ (2558) ได้ศึกษาอัตรา การรอดชีวิตและการเจริญเติบโต ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อขาวในสภาพห้องปฏิบัติการ หนอน แมลงวันผลไม้มีอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยสูงสุด คือ 69 เปอร์เซ็นต์ และมีระยะเวลาเจริญเติบโต คือ หนอนวัย 1 อายุ 1 - 2 วัน หนอนวัย 2 อายุ 2 - 3 วัน หนอนวัย 3 อายุ 3 - 7 วัน ตามลำดับ ซึ่งการเจริญเติบโตของหนอนเหมือนกับที่เลี้ยงในแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของตู้อบไอน้ำเพื่อใช้ในการทดลอง ได้ทดสอบความเที่ยงตรง ของแท่งวัดความร้อนและรูปแบบของอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสมของตู้อบไอน้ำเพื่อเตรียม ความพร้อมของอุปกรณ์ก่อนการทดลอง (Figure4) พบว่าแท่งวัดความร้อนสามารถอ่านค่า อุณหภูมิและความชื้นได้เที่ยงตรงเมื่อเทียบกับเทอร์โมมิเตอร์มาตรฐานที่อุณหภูมิ 47 °ซ. ความชื้น สัมพัทธ์ 99.9-100 เปอร์เซ็นต์ เวลา 20 นาที (Table 4) และได้รูปแบบของอุณหภูมิและความชื้น ที่เหมาะสมในการอบแก้วมังกรเนื้อแดงโดยวิธีอบไอน้ำ และอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้น สัมพัทธ์ (Table 5 และ 6) เพื่อใช้ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนของแก้วมังกรเนื้อแดงด้วย วิธีอบไอน้ำ

การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อผลแก้วมังกรเนื้อแดงที่ผ่านความ ร้อน (treatment) และไม่ผ่านความร้อนเป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับ ความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่อุณหภูมิ 46 และ 47 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชม. ความชื้นสัมพัทธ์ มากกว่า 90% ระยะเวลาที่ใช้ในการอบแก้วมังกร รวมทั้งน้ำหนัก แก้วมังกรกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน Table 7 และ 8 เมื่อสิ้นสุดการให้ความร้อนลดอุณหภูมิผล โดยวิธีเป่าด้วยลมนาน 1 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลา นำแก้วมังกรทดลองทั้งหมดที่ผ่านความร้อน และไม่ผ่านความร้อน บรรจุใส่ในกล่องกระดาษ สำหรับการส่งออกจริง เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 12 °ซ. นาน 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด นำแก้วมังกรทั้งหมดที่ผ่านความร้อนและไม่ผ่าน ความร้อนมาประเมินความเสียหายจากความร้อน พบว่า แก้วมังกรที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 46 และ 47 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชม. เปรียบเทียบที่ไม่ผ่านความร้อน มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสีย น้ำหนัก แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (Table 9)

เมื่อให้ความร้อนแก้วมังกรที่ 46 และ 47°ซ. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ไม่มี ความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม แต่เมื่อให้ความร้อนกับแก้วมังกร



เป็นเวลานานขึ้น ทำให้ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยยะสำคัญยิ่ง (Table 10) การวัดความต้านทานต่อแรงกดของผลแก้วมังกรบริเวณเนื้อผิว พบว่าแก้วมังกรที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 และ 47 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชม. มีความแข็งน้อยกว่ากรรมวิธีที่ไม่ผ่านความร้อนแตกต่างทางสถิติ (Table 11) โดยแก้วมังกรที่ผ่านความร้อนเนื้อผิวมีความอ่อนนุ่มมากกว่า

การเปลี่ยนสีของเปลือกแก้วมังกรเนื้อแดง โดยวัดค่าสีในระบบ $L^* a^* b^*$ พบว่าแก้วมังกรก่อนและหลังผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46 และ 47 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชม. หลังจากเก็บไว้ 7 วัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ แก้วมังกรที่ได้รับความร้อนและระยะเวลาเพิ่มขึ้น มีค่าความสว่าง L^* เพิ่มสูงขึ้น ค่า a^* ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงของสีจากเขียวไปเป็นแดงนั้น มีค่าเป็นบวกเพิ่มขึ้น ค่า b^* ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีน้ำเงินไปเป็นสีเหลือง มีค่าเพิ่มสูงขึ้น (Table 12 และ 13) การเปลี่ยนสีของเปลือกแก้วมังกรเป็นสีชมพูเข้มขึ้น ไม่พบความเสียหายของเนื้อผลและผิวเปลือก รวมทั้งไม่มีอาการของโรคปรากฏ

การศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนของผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง (Figure 5) หลังจากผ่านความร้อนวิธีการอบไอน้ำและวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 46.5 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชม. เปรียบเทียบกับแก้วมังกรที่ไม่ผ่านความร้อน (control) ระยะเวลาที่ใช้ในการอบและน้ำหนักของแก้วมังกรกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน (Table 14 and 15) จากการทดลองพบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของแก้วมังกร replication 1 และ 2 โดยวิธีการอบไอน้ำมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ทุกช่วงเวลา แต่วิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์นาน 1 ชม. ของ replication 1 และที่ 2 ชม. ของ replication 2 ปริมาณน้ำตาลซึ่งวัดจากปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ในแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยยะสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Table 16) หลังจากเก็บในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 27 °ซ. นาน 6 วัน ผลแก้วมังกรทดลองเน่าเสียมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ พบวิธีการอบไอน้ำมีเปอร์เซ็นต์การเน่าเสียสูงที่สุด การเปลี่ยนสีเปลือกของแก้วมังกรบริเวณครีบก่อนอบมีสีเหลืองเขียวหลังอบทั้ง 2 วิธี ครีบของผลเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแห้ง และความยาวของครีบหดสั้นลง (Figure 6) วิธีการอบไอน้ำผลภายในเป็นรูปกลวง เนื้อยุบตั้งแต่เริ่มอบที่เวลา 0 ชม. ในขณะที่วิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ เริ่มเสียหายที่ 1 ชม.ขึ้นไป เนื้อรอบๆที่เกิดช่องว่างลักษณะซ้าซึ่งไม่พบลักษณะอาการนี้ในแก้วมังกรที่ไม่ผ่านความร้อน (Table 17 และ Figure 7) สำหรับพืชชนิดอื่นๆที่มีการศึกษาด้านความเสียหายหลังจากผ่านความร้อนได้แก่ พริกหวานพบว่าวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิมากกว่า 46 °ซ. เป็นเวลา 1 ชม.ขึ้นไปทำให้พริกหวานเกิดอาการขั้วเหี่ยวหรือเปลี่ยนเป็นสีดำ (Wilt calyx) เปลือกฝียว่น (shrink) โดยเกิดความเสียหายเล็กน้อยและไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพด้านการบริโภค ส่วนอาการ



เกิดเนือยุบเป็นหลุมหรือมีรอยแตก (pitting) จะพบอาการรุนแรงเมื่อทำการอบไอน้ำผลพริกที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน (อูตรและคณะ, 2554) มลนิภา และคณะ (2555) ได้ศึกษาด้านความเสียหายของมะละกอด้วยวิธีการอบไอน้ำ (VHT) เปรียบเทียบกับวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) พบว่ามะละกที่ผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 °ซ. นาน 2 ชม. จะแสดงความเสียหายภายนอกที่ผิว โดยเกิดรอยบุ๋ม (pitting) และภายในผลเกิดอาการซ้า และนิ่ม (flesh softening) เนื่องจากความร้อนอย่างเด่นชัด ในขณะที่มะละกที่ผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่อุณหภูมิ และระยะเวลาดังกล่าว พบการเปลี่ยนแปลงของสีผิวที่ผลจากสีเขียวเป็นสีเหลือง (skin yellowing) ใกล้เคียงกับมะละกที่ไม่ผ่านความร้อน วิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะละกมากกว่าวิธีการอบไอน้ำ (VHT) นอกจากนี้ Jacobi *et al.* (1996) ได้ศึกษาคุณภาพผลชูกินีหลังจากผ่านการอบไอน้ำที่อุณหภูมิภายในสุดผล 45 °ซ. นาน 30 นาที หลังจากนั้นเก็บไว้ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 7 - 8 °ซ. ผลการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงสีของเปลือกเป็นสีเหลืองเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น และการที่เปลือกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจะถูกกระตุ้นให้เพิ่มมากขึ้นจากการอบไอน้ำ ความเสียหายของมะม่วงพันธุ์ 'Kensington' หลังจากอบไอน้ำ Jacobi and Wong (1992) รายงานว่าเมื่ออบไอน้ำมะม่วงพันธุ์ 'Kensington' จาก 3 แหล่งปลูกที่อุณหภูมิผล 47 °ซ. นานตั้งแต่ 7.5 ถึง 30 นาที ความเสียหายภายในและภายนอกผลเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ความเสียหายภายนอกที่สำคัญได้แก่ อาการผิวเป็นรอยสีน้ำตาล และเซลล์ที่เปลือก (Lenticel) เป็นจุดเข้มนส่วนความเสียหายภายในผลพบอาการเนื้อเกิดเป็นจุดสีขาว (ricy spot) โดยแหล่งปลูกและระดับความแก่ของผลมะม่วงเมื่อนำมาผ่านความร้อนมีอิทธิพลต่อระดับความเสียหายของมะม่วง

เนื่องจากตามนโยบายรัฐบาลกรมวิชาการเกษตรถูกต้องงบประมาณงานวิจัยและในช่วงที่มีผลผลิต แต่ไม่สามารถเดินทางไปนอกพื้นที่ได้เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อโควิด-19 และงบประมาณในการจัดซื้อผลไม้มาทำการทดลองมีไม่เพียงพอ ส่งผลให้งานทดลองล่าช้าไม่เป็นไปตามแผนการดำเนินงานที่วางไว้ จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงแผนการทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระหว่างไข่และหนอนวัยต่างๆ Table 18 และ Figure 8 แสดงข้อมูลระยะเวลาที่ใช้ในการอบแก้วมังกรให้อุณหภูมิผลคงอยู่ที่ 45 และ 46.5 °ซ. เป็นระยะเวลานานต่างๆ ตามกำหนด เมื่ออบแก้วมังกรเนื้อแดงเพื่อกำจัดระยะไข่หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 จากผลการทดลอง 3 ครั้ง ปรากฏว่า ระยะเวลาการให้ความร้อนกับแก้วมังกรเมื่อกำจัดแมลงระยะไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ที่อุณหภูมิผล 46.5 °ซ. ใช้เวลานานเฉลี่ย 4:08, 4:09, 4:15 และ 4:011 ชม. ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการอบแก้วมังกรเนื้อแดงให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 43 °ซ. และจากอุณหภูมิ 43 °ซ. เพิ่มขึ้นถึง 46.5 °ซ. ซึ่งแก้วมังกรอยู่ภายใต้สภาพอากาศร้อนความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ และ มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์



ตามลำดับ (Table 19) พบว่า เมื่ออุณหภูมิผลแก้วมังกรเพิ่มขึ้นถึง 46.5 °ซ. แมลงระยะไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 อยู่ภายในสภาพอากาศร้อนความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ นานเฉลี่ย 3:15, 3:18, 3.20 และ 3:17 ชม. ตามลำดับ (Table 19) ในขณะที่อยู่ภายใต้สภาพอากาศร้อนความชื้นสัมพัทธ์ มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ นานเฉลี่ย 0:50, 0:51, 0:54 และ 0:54 ชม. ใกล้เคียงกัน สำหรับ มังคุดที่มีน้ำหนักประมาณ 85-120 กรัม/ผล ใช้เวลาน้อยกว่าแก้วมังกรเนื้อแดง โดยอุณหภูมิผล มังคุดเพิ่มขึ้นจาก 43 ถึง 45 °ซ. กำจัดแมลงระยะไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 นานเฉลี่ย 0:13 ชม. เหมือนกันหมด (อุตร และคณะ, 2545)

อัตราการตายของแมลงระยะไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ในการทดลองในแต่ละระยะ แสดงใน Table 20 จากผลการทดลองพบว่า หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ตายทั้งหมด หลังอบไอน้ำ เมื่อคงอุณหภูมิผลไว้ที่ 46.5 °ซ. ส่วนระยะไข่ตายทั้งหมดเมื่อคงอุณหภูมิผลไว้ที่ 46.5 °ซ. นาน 10 นาที โดยพบว่ามียอัตราการตายเฉลี่ยของระยะไข่น้อยสุดเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 45 และ 46.5 °ซ. คือ 51.15 และ 99.86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ระยะไข่มีแนวโน้มทนทานต่อความร้อนจากวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์มากกว่าระยะหนอนวัยที่ 1, 2 และ 3

การศึกษาเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระหว่างไข่และหนอนวัย 1 ใช้เวลาการอบโดยแสดงผลใน Table 21 แสดงระยะเวลาอบแก้วมังกรเนื้อแดงให้อุณหภูมิคงอยู่ที่ 45 และ 46.5 °ซ. เป็นระยะเวลานาน 10, 20, 30 และ 40 นาที จากการศึกษาเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระหว่างไข่และหนอนวัยต่างๆข้างต้น เป็นการแยกอบแก้วมังกรเนื้อแดงกำจัดแมลงระยะไข่และหนอนวัย 1 ในเครื่องตู้อบไอน้ำคนละเครื่อง สภาพการอบแก้วมังกรเนื้อแดง อาจจะมีผลแตกต่างกัน ดังนั้น เพื่อยืนยันระยะไข่ทนทานต่อความร้อนได้มากกว่าหนอนวัยที่ 1 จึงทำการอบแก้วมังกรเนื้อแดงกำจัดแมลงระยะไข่ และหนอนวัย 1 อยู่ภายใต้สภาพความร้อนที่เหมือนกัน

ผลการตรวจนับแมลงในแก้วมังกรเนื้อแดงที่ไม่ผ่านความร้อนพบว่า เปอร์เซ็นต์การตายของแมลงระยะไข่สูงกว่าระยะหนอนวัย 1 คือ 67.6 และ 39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จาก Table 22 แสดงอัตราการตายของแมลงที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน พบว่าที่อุณหภูมิ 45 °ซ. มียอัตราการตายของแมลงระยะไข่ต่ำกว่าระยะหนอนวัย 1 ได้แก่ 23.67 และ 49.40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46.5 °ซ. ระยะเวลา 0, 10, 20, 30 และ 40 นาที พบว่าแมลงระยะไข่ และหนอนวัย 1 มียอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลอง แสดงว่าระยะไข่ของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ในผลแก้วมังกรเนื้อแดงมีความทนทานต่อความร้อนมากกว่าหนอนวัยที่ 1

Le et al., (2010) ได้ทำการทดลองความทนทานต่อความร้อนในระยะต่างๆ ของแมลงวันผลไม้ *Dacus dorsalis* Hendel โดยวิธีการอบไอน้ำกับมะม่วงพันธุ์ Tuu Shien



ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไต้หวัน พบว่าระยะไข่เป็นระยะที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าระยะไข่เป็นระยะที่ทนทานต่อความร้อนมากกว่าระยะอื่นๆเมื่อทำการทดลองในมะม่วง ได้แก่ Sein (1935) ทำการทดลองในมะม่วงจากเปอร์โต ริโก, ไต้หวัน (Koidsumi, 1937) ระยะไข่ของแมลงวันแดง *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) ในมะม่วงจากโอกินาวา (Sunagawa *et al.* 1987) สำหรับประเทศไทยผลการศึกษาค้นคว้าความทนทานของแมลงวัน *B. dorsalis* ในมังคุดด้วยวิธีการใช้ความร้อน พบว่าระยะหนอนเป็นระยะที่แมลงตายน้อยที่สุด (Unahawutti *et al.*, 1999)

การศึกษาวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงที่อุณหภูมิ 46.5 °ซ. นาน 0, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที ระยะเวลาที่ใช้ในการอบไอน้ำได้แสดงไว้ใน Table 23 ระยะเวลาการให้ความร้อนกับแก้วมังกรเมื่อกำจัดแมลงระยะไข่ อายุ 24 ชม. (Figure 9) เมื่อพิจารณาถึงช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการอบแก้วมังกรเนื้อแดงให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 43 °ซ. จากอุณหภูมิ 43 °ซ. เพิ่มขึ้นถึง 46.5 °ซ. และที่อุณหภูมิผล 46.5 °ซ. ซึ่งแก้วมังกรอยู่ภายใต้สภาพอากาศร้อนความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ และ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลานานเฉลี่ย 2:07 0:47 และ 2:56 ชม. ตามลำดับ (Table 24) จากการทดลอง 3 ครั้ง พบว่า แก้วมังกรที่ไม่ผ่านความร้อน จำนวน 45 ผล มีแมลงวันผลไม้รอดชีวิต จำนวน 2,420 ตัว ซึ่งในแก้วมังกรที่ผ่านความร้อนแต่ละระยะเวลาที่กำหนดจำนวน 18 ผล แมลงวันผลไม้ระยะไข่ อายุ 24 ชม. รอดชีวิตที่อุณหภูมิลบไอน้ำ 46.5 °ซ. นาน 0, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที จำนวน 32, 7, 11, 0, 1 และ 0 ตัว ตามลำดับ โดยมีอัตราการตายของระยะไข่เฉลี่ย 98.22, 99.52, 99.24, 100, 99.9 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 25) จากการทดลองจึงประมาณการได้ว่าแก้วมังกรซึ่งผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 46.5 °ซ. แต่ละระยะเวลาที่กำหนด จะมีหนอนที่รอดชีวิตได้จำนวนไม่น้อยกว่าประมาณ 4,356 ตัว ผลการตรวจนับจำนวนแมลงในผลส้มโอ จากการทดลองปรากฏว่า ระยะไข่ของแมลงวันผลไม้ในผลแก้วมังกรตายทั้งหมดเมื่อคงความร้อนที่อุณหภูมิ 46.5 °ซ. ที่เวลา 30 นาที

เนื่องจากตามนโยบายรัฐบาลกรมวิชาการเกษตรถูกต้องงบประมาณงานวิจัยและในช่วงที่มีผลผลิต แต่ไม่สามารถเดินทางไปนอกพื้นที่ได้เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อโควิด-19 และงบประมาณในการจัดซื้อผลไม้มาทำการทดลองมีไม่เพียงพอ ส่งผลให้งานทดลองล่าช้าไม่เป็นไปตามแผนการดำเนินงานที่วางไว้ จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงแผนการทดลอง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การวิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลแก้วมังกรเนื้อแดงเพื่อการส่งออก ได้ผลดังนี้ สามารถเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ภายในห้องปฏิบัติการ ได้แมลงวันผลไม้จำนวนมากกว่า 50,000 ตัว



มีปริมาณ มีอัตราการฟักไข่ (hatching rate) เฉลี่ย 76-80% อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) เฉลี่ย 87-94% น้ำหนักของดักแด้ เฉลี่ย 0.013-0.015 กรัม และมีอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio) เพศผู้เฉลี่ย 42-45% และเพศเมียเฉลี่ย 44-49% (1:1) สำหรับข้อมูลของแก้วมังกรพันธุ์เนื้อในสีแดง (*H. costaricensis*) ที่มีชื่อว่า "แดงสยาม" ซึ่งเป็นพันธุ์มาจากไต้หวัน เข้ามาปลูกในประเทศไทย จากการทดลองพบว่าแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* สามารถเข้าทำลายแก้วมังกรได้ทุกระยะการเจริญเติบโตเมื่อเลี้ยงในสภาพห้องปฏิบัติการ จำนวนที่เหมาะสมในทุกระยะการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้คือ 100 ตัวหรือฟอง ซึ่งสามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวนี้ไปใช้ในการทดลองการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ด้วยความร้อนในบึงบประมาณ 2563 ต่อไป สำหรับระยะการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้ในผลแก้วมังกรเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงในอาหารเทียม พบว่าการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในระยะวัย 2 มีช่วงเวลายาวกว่าการเลี้ยงในผลแก้วมังกร การประเมินความเสียหายของกระบวนการอบไอน้ำต่อผลแก้วมังกรเนื้อแดงที่ผ่านความร้อน (treatment) และไม่ผ่านความร้อนเป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ที่อุณหภูมิ 46 และ 47 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชม. ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90% ทำการทดลองกับตู้อบความร้อนขนาดใหญ่เปรียบเทียบที่ไม่ผ่านความร้อน มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักมากกว่าไม่ผ่านความร้อนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง สำหรับความหวานของแก้วมังกรมีผลลดลงเมื่อผ่านความร้อนในเวลาที่นานขึ้น รวมทั้งความแข็งของเนื้อผิวของแก้วมังกรที่ผ่านความร้อนมีเนื้อผิวอ่อนนุ่มมากกว่าที่ไม่ผ่านความร้อน ไม่พบความเสียหายของเนื้อผล และผิวเปลือก รวมทั้งไม่มีอาการของโรคปรากฏ

แหล่งวัดความร้อนสามารถอ่านค่าอุณหภูมิและความชื้นได้เที่ยงตรงเมื่อเทียบกับเทอร์โมมิเตอร์มาตรฐานที่อุณหภูมิ 47 °ซ. เวลา 20 นาที และได้รูปแบบของอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม เพื่อใช้ศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนของแก้วมังกรเนื้อแดงด้วยวิธีอบไอน้ำ การศึกษาด้านความเสียหายจากความร้อนของผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง หลังจากผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำและวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 46.5 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชม. เปรียบเทียบกับแก้วมังกรที่ไม่ผ่านความร้อน (control) พบว่าวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่เวลาใช้เวลานในการอบนานขึ้น ปริมาณน้ำตาลซึ่งวัดจากปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ในแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงมีค่ามากกว่าวิธีการอบไอน้ำ และกรรมวิธีควบคุม หลังจากเก็บในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 27 °ซ. นาน 6 วัน ผลแก้วมังกรทดลองเน่าเสียมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิธีการอบไอน้ำมีเปอร์เซ็นต์การเน่าเสียสูงกว่า และมีความเสียหายภายในผลเป็นรูกลวงเนื่อยุบหลังจากได้รับความร้อนมากกว่าวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ เมื่อมีการอบไอน้ำนานขึ้น

การศึกษาความทนทานของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ในผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงต่อความร้อนด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์



เพื่อเปรียบเทียบอัตราการตายของแมลง ผลการตรวจนับแมลงในแก้วมังกรเนื้อแดงที่ไม่ผ่านความร้อนพบว่า เพอร์เซ็นต์การตายของแมลงระยะไข่สูงกว่าระยะหนอนวัย 1 คือ 67.6 และ 39 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงอัตราการตายของแมลงที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน พบว่าที่อุณหภูมิ 45 °ซ. มีอัตราการตายของแมลงระยะไข่ต่ำกว่าระยะหนอนวัย 1 ได้แก่ 23.67 และ 49.40 เพอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46.5 °ซ. ระยะเวลา 0, 10, 20, 30 และ 40 นาที พบว่าแมลงระยะไข่ และหนอนวัย 1 มีอัตราการตาย 100 เพอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองแสดงว่าระยะไข่ของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลแก้วมังกรเนื้อแดงมีความทนทานต่อความร้อนมากกว่าหนอนวัยที่ 1

การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในผลแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง ในระดับแมลงทดลองจำนวนไม่น้อยกว่า 3,000 ตัว ที่อุณหภูมิ 46.5 °ซ. นาน 0, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที อัตราการตายของแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ เฉลี่ย 100% ในระยะเวลาที่ 30 นาที และสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะไข่ 24 ชม. ในผลแก้วมังกรตายทั้งหมด มีค่าประมาณการในการกำจัดแมลงวันผลไม้ ตาม Abbott (Abbott, 1925) เท่ากับ 4,356 ตัว

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณวลัยกร รัตนเดชากุล ผู้เชี่ยวชาญด้านระบบควบคุมการนำเข้าส่งออกสินค้าพืชและปัจจัยการผลิต สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ที่ให้ความรู้ คำแนะนำและให้คำปรึกษางานวิจัย ขอขอบคุณ คุณสลักจิต พานคำ หัวหน้ากลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช คุณสุภาวดี ภูมิโคกรักษ์ คุณปริยาภรณ์ สาลี และเพื่อนร่วมงาน ทุกท่านที่ช่วยในงานทดลองนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ภฤติยา ไชยนอก. 2559. *บทความเผยแพร่ความรู้สู่ประชาชน แก้วมังกร*. แหล่งที่มา URL <http://www.ppc14th.com/pdf/abstact-ppc14th.pdf> สืบค้นเมื่อวันที่ 5 สิงหาคม 2562.
- ภาสันต์ ศารทูลทัต ธนากร บุญกล้า และ จีรี หะวานนท์. 2559. *การชักนำดอกแก้วมังกรพันธุ์เนื้อขาวและแดงนอกฤดูด้วยสาร Forchlorfenuron*. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ปีที่ 3 ฉบับพิเศษ (I): M04/49-53, 2559
- ภขมน พิชญาจิตติพงษ์. 2556. *การผลิตและสมบัติทางชีวภาพของสืผสมอาหารจากเปลือกแก้วมังกรพันธุ์เนื้อผลสีแดง (Hylocercus polyrhizus)*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา. 127 หน้า.



มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชัยณรัตน์ สนศิริ สลักจิต พานคำ รัชฎา อินทรกำแหง และอุดร อุณหุฒิ. 2555. วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนในผลมะละกอเพื่อการส่งออก. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาศัตรูพืชหมดปัญหาเมื่ออารักขาถูกวิธี. 7-9 สิงหาคม 2555. ณ โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว รีสอร์ท จ. กาญจนบุรี. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร: กรุงเทพฯ.

รัชฎา อินทรกำแหง สลักจิต พานคำ ชัยณรัตน์ สนศิริ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชูติมา อ้อมกิ่ง และอุดร อุณหุฒิ. 2555. วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลแก้วมังกรเพื่อการส่งออก. ในรายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 1939-1951.

รัชฎา อินทรกำแหง สลักจิต พานคำ ชัยณรัตน์ สนศิริ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชูติมา อ้อมกิ่ง อุดร อุณหุฒิ. จารุวรรณ จันทรา วลัยกร รัตนเดชากุล พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์ ปวีณา บุษาทิเยน พงษ์ศักดิ์ ฉิมฤทธิ์ และนวลนิสา ตั้งสัจจะกุล. 2558. กิจกรรมที่ 5 วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดศัตรูพืชกักกันเพื่อการส่งออก. ใน รายงานชุดโครงการวิจัยการกักกันพืช. หน้า 42-62.

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ. มปป. พันธุ์แก้วมังกร. แหล่งที่มา URL <http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=38&chap=4&page=t38-4-infodetail04.html> สืบค้นเมื่อวันที่ 5 สิงหาคม 2562.

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมส่งเสริมการเกษตร, 2562

อุดร อุณหุฒิ สลักจิต พานคำ และพิทวัฒน์ อ่อนทองกลาง. 2545. การวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงวันทองในผลมังคุดเพื่อการส่งออก. คัดเลือกเป็นผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2545. ประเภทงานวิจัยประยุกต์. กรุงเทพฯ. หน้า 1-35.

อุดร อุณหุฒิ รัชฎา อินทรกำแหง สลักจิต พานคำ ชัยณรัตน์ สนศิริ ธาณี นาสแสง มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ และชูติมา อ้อมกิ่ง 2554. การพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนเพื่อการส่งออกพริกหวานไปประเทศญี่ปุ่น ผลงานวิจัยระดับดี โครงการเร่งด่วน กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2554 กรมวิชาการเกษตร: กรุงเทพฯ. 100 หน้า

Armstrong, J.W., J.D. Hansen, B.K.S. Hu and S.A. Brown. 1989. High-temperature, forced-air quarantine treatment for papayas infested with tephritid fruit flies (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 82: 1667-1674.

Baker AC. 1952. The vapor-heat process. In: USDA, editor. Insects: the yearbook of agriculture. Washington (DC):US Gov PBaker KF, Fuller WH. 1969. Soil t

Baker, A.C. 1952. The vapor-heat process. In: USDA, editor. Insects: the yearbook of agriculture. Washington (DC): US Government Print office. p. 401-404.



- Balock, J.W. and T. Kozuma. 1954. Sterilization of papaya by means of vapour heat Quick rRn-up. Special report No. 7, Fruit fly investigations in Hawaii. US department of agriculture, Entomology Research Branch , Honolulu, Hawaii.
- Gaffney, J. J. and J. W. Armstrong. 1990. High-temperature forced-air research facility for heating fruits for insect quarantine treatments. Journal of economic entomology 83(5): 1959-Hansen, J.D., J.W. Armstrong, B.K.S. Hu and S.A Brown. 1990. Thermal death of oriental fruit fly (Diptera :Tephritidae) third instars in developing quarantine treatments for papayas. Journal of Economic Entomology. 83: 160-167.
- Ho Dinh Hai, 2014. *The edible plants in Vietnam*. 61: 237–250. Available at URL <https://www.edibleplantsinvietnam.com/vietnamese-dragon-fruit-thanh-long.html> Accessed on 9/09/2019
- Jacobi, K.K. and L.S. Wong. 1992. Quality of ‘Kensington’ mango (*Mangifera indica* Linn.) following hot water and vapor-heat treatments. Postharvest Biology and Technology. 1: 349-359.
- Jacobi, K.K., L.S. Wong and J.E. Giles, 1996. Effect of hot air disinfestations treatment in combination with simulated airfreight conditions on quality of Kensington mango (*Mangifera indica* Linn.). Aust. J. Exp. Agric., 36: 739-745.
- Jones, W. 1939. The influence of relative humidity on the respiration of papaya at high temperatures. Proceeding of the American Society for Horticultural Science. 37: 700-705.
- Koidsumi, K. 1937. Heat sterilization of Formosan fruits for fruit flies (III). Japanese Society of Tropical Agriculture, 9: 275-286pp.
- LE Bellec, F., F. Vaillant and E. Imbert. 2006. *Pitahaya (Hylocereus spp.): a new fruit crop, a market with a future*. Available at URL <https://www.edpsciences.org/fruits>. Accessed on 5/09/2019
- Le, Thi-Nghiem., Ching-Chang Shiesh, Huey-Ling Lin and E. Lee. 2010. Vapour heat quarantine treatment for Taiwan native mango variety fruits infested with fruit fly. Journal of Applied Horticulture. 12(2): 107-112pp.



- Mangan, R. L. and S. J. Ingle. 1992. Forced hot-air quarantine treatment for mangoes infested with West Indian fruit fly (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 85: 1859-1864.
- Sein, F., Jr. 1935. Heat sterilization of mangoes and guavas for fruit flies. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico, 19:105-115pp.
- Sharp, J.L. 1991. Condition of Florida grapefruit after exposure to vapor heat quarantine treatment. HortScience 26:424.
- Sharp, J.L., J.J. Gaffney, J.I. Moss, and W.P. Gould. 1991. Hot-air treatment device for quarantine research. J. Econ. Entomol. 84:52-527
- Sunagawa, K., K. Kume and R. Iwaizumi, 1987. The effectiveness of vapour heat treatment against the melon fly, *Dacus cucurbitae* Coquillett, in mango and fruit tolerance to the treatment. Research Bulletin of Plant Protection Japan, 23: 13-20pp.
- Unahawutti, U., M. Poomthong, R. Intarakumheng, W. Worawisitthumrong, C. Lapasathukool, E. Smitasiri, P. Srisook and C. Ratanawaraha. 1991. Vapor heat as plant quarantine treatment of 'Nang klarngwan', 'Nam Dorkmai', 'Rad' and 'Pimsen Daeng' mangoes, Infested with fruit flies (Diptera: Tephritidae). A report submitted to the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries for approved of quarantine treatment on Thai mangoes to be exported to Japan. Tech. Plant Quarant. Sub Div., Agr. Regulat. Div., Dept. of Agr., Bangkok. 342 p.
- Wagiyanti, H. and R. Noor. 2017. *Red dragon fruit (Hylocereus costaricensis britt. et r.) peel extract as a natural dye alternative in microscopic observation of plant tissues: The practical guide in senior high school*. Pendidikan Biologi Indonesia Journal 3(3): 232-237.
- Watanabe, N., Ichinohe F. and Sonda M. 1973. *Improvement of corn flour medium for larval culture of oriental fruit fly*. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan. 11. 57-58 pp



Table 1 Ban lifted dragon fruit treated with quarantine vapour heat treatment.

| Exporting Country | Importing Country | Treatment Condition |
|-------------------|-------------------|--|
| Vietnam | Taiwan | 46.8 ⁰ C holding time at 40 minutes |
| Vietnam | New Zealand | 46.5 ⁰ C holding time at 40 minutes |
| Vietnam | Australia | 46.5 ⁰ C holding time at 40 minutes |
| Vietnam | Korea | 46.5 ⁰ C holding time at 40 minutes |
| Vietnam | Japan | 46.5 ⁰ C holding time at 30 minutes |

Table 2 The survival percentage of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) by means of forced infestation method.

| Treatment | Time (minutes) | | |
|-----------|----------------|------|-------|
| | 20 | 30 | 40 |
| On cage | 4.50 | 9.70 | 11.90 |
| In cage | 24.5 | 15.8 | 29.7 |

Table 3 The survival percentage of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) as inoculation on dragon fruit.

| Stage | Number of fruit fly (%) | | |
|------------------------------|-------------------------|-------|-------|
| | 100 | 150 | 200 |
| Eggs | 32.50 | 14.07 | 21.85 |
| 1 st instar larva | 51.20 | 39.27 | 42.45 |
| 2 nd instar larva | 85.70 | 72.87 | 91.70 |
| 3 rd instar larva | 79.00 | 82.67 | 88.65 |



Table 4 Calibration record obtained from each sensor of the VHT system no 1 and 2.

| VHT no.(Time) | (Number of sensor) | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| VHT no. 1 | | | | | | | | | | | | |
| 10:00 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 10:05 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 10:10 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 10:15 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 10:20 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| VHT no. 2 | | | | | | | | | | | | |
| 10:00 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 10:05 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 10:10 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 10:15 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |
| 10:20 | 47.0 | 100.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 | 47.0 |



Table 5 Temperature pattern of modified vapor heat treatment (MVHT) and humidity pattern for red dragon fruit.

| Segment | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------|------|------|------|------|------|------|
| Temperature (C°) | 30 | 30 | 41 | 45 | 48 | 48 |
| Time (hr.) | 0.00 | 0.30 | 0.45 | 0.15 | 0.15 | 5.00 |
| Humidity (% RH) | 65 | 65 | 95 | 95 | - | - |
| Time (hr.) | 0.00 | 5.00 | 0.10 | 5.00 | - | - |

Table 6 Temperature pattern of vapor heat treatment (VHT) and humidity pattern for red dragon fruit.

| Segment | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------------------|------|------|------|------|------|------|
| Temperature (C°) | 30 | 30 | 41 | 45 | 48 | 48 |
| Time (hr.) | 0.00 | 0.30 | 0.45 | 0.15 | 0.15 | 5.00 |
| Humidity (% RH) | 95 | 95 | - | - | - | - |
| Time (hr.) | 0.00 | 8.00 | - | - | - | - |

Table 7 Time for center of red dragon fruit to attain 46°C and 47°C for various holding times during modified vapor heat treatment in fruit injury test.

| Temp. | Holding time (h) | Load factor (kg/cum.) | | | Sensor fruit weight (g) | | | Time (h) ^{1/} |
|-------|------------------|-----------------------|---------|---------|-------------------------|--------|--------|------------------------|
| | | R1 | R2 | R3 | | | | |
| 46 °C | 0 | 6508.89 | 6524.91 | 6268.83 | 280.25 | 280.7 | 281.30 | 3:15 |
| | 1 | 6579.17 | 6556.77 | 6561.87 | 285.74 | 285.70 | 285.84 | 4:42 |
| | 2 | 6594.74 | 6654.28 | 6609.38 | 285.10 | 285.40 | 285.13 | 5:14 |
| 47 °C | 0 | 6531.87 | 6231.82 | 6228.87 | | | | 3:26 |
| | 1 | 6626.62 | 6735.06 | 6693.63 | | | | 4:52 |
| | 2 | 6608.76 | 6605.78 | 6490.68 | 285.39 | 285.48 | 285.04 | 6:43 |

^{1/}Time for center of only 3 sensor fruits to attain target temperature.

Table 8 Time for center of red dragon fruit to attain 43, 46°C and 47°C during modified vapor heat treatment in fruit injury test.

| Temp. | Holding time (h) | Time for fruit center to reach 43°C (h) ^{1/} | Time for fruit center to reach 46, 47°C (h) ^{1/} | Time from 43°C to 46, 47°C (h) ^{1/} |
|---------|------------------|---|---|--|
| 46 °C | 0 | 2:08 | 3:15 | 1:07 |
| | 1 | 2:24 | 3:42 | 1:18 |
| | 2 | 2:03 | 3:14 | 1:11 |
| 47 °C | 0 | 2:56 | 3:26 | 1:30 |
| | 1 | 2:17 | 4:08 | 1:51 |
| | 2 | 2:21 | 4:43 | 2:22 |
| Average | | 2:36 | 3.74 | 1.55 |

^{1/}Time for center of only 3 sensor fruits to attain target temperature.



Table 9 Weight loss (%) of red dragon fruit treated with modified vapor heat treatment center temperature 46 and 47°C for various holding times and 7 days chamber at 12°C.

| Treatment | Weight loss (%) ^{1/} | | |
|-----------|-------------------------------|------|------|
| | 0h | 1h | 2h |
| Control | 6.07 | 6.84 | 4.13 |
| 46°C | 7.48 | 7.68 | 5.47 |
| T-test | ** | ** | ** |
| Control | 6.85 | 6.55 | 4.62 |
| 47°C | 8.16 | 8.11 | 6.31 |
| T-test | ** | ** | ** |

^{1/} The difference was statistically significant by t-test (p < 0.05)

Table 10 Total soluble solid (⁰Brix) of red dragon fruit treated with modified vapor heat treatment center temperature 46 and 47°C for various holding times and 7 days chamber at 12°C.

| Treatment | Brix value (Brix) ^{1/} | | |
|-----------|---------------------------------|-------|-------|
| | 0h | 1h | 2h |
| Control | 11.00 | 11.70 | 13.73 |
| 46°C | 11.00 | 10.99 | 11.97 |
| T-test | ns | ** | ** |
| Control | 10.15 | 11.23 | 12.63 |
| 47°C | 10.19 | 11.30 | 11.55 |
| T-test | ns | ns | ** |

^{1/} The difference was statistically significant by t-test (p < 0.05)

Table 11 Hardness of red dragon fruit treated with modified vapor heat treatment center temperature 46 and 47°C for various holding times and 7 days chamber at 12°C.

| Treatment | Hardness (kgs) ^{1/} | | |
|-----------|------------------------------|------|------|
| | 0h | 1h | 2h |
| Control | 0.35 | 0.35 | 0.33 |
| 46°C | 0.32 | 0.30 | 0.28 |
| T-test | ** | ** | ** |
| Control | 0.33 | 0.35 | 0.37 |
| 47°C | 0.32 | 0.31 | 0.31 |
| T-test | * | ** | ** |

^{1/} The difference was statistically significant by t-test (p < 0.05)



Table 12 Peel color (L*a*b*) of red dragon fruit treated with modified vapor heat treatment center temperature 46 and 46°C for various holding times and 7 days chamber at 12°C.

| Peel color | Treatment | Before Treatment | After Treatment | t-test ^{1/} |
|------------|-----------|------------------|-----------------|----------------------|
| L* | Control | 23.18 | 41.73 | ** |
| | 0 min. | 34.04 | 39.26 | ** |
| | Control | 35.81 | 35.42 | ns |
| | 1 hr. | 35.82 | 37.57 | ** |
| | Control | 10.72 | 36.70 | ** |
| | 2 hr. | 28.18 | 34.33 | ** |
| a* | Control | 30.60 | 41.73 | ** |
| | 0 min. | 32.05 | 42.88 | ** |
| | Control | 33.98 | 26.25 | ** |
| | 1 hr. | 30.77 | 29.83 | ns |
| | Control | 17.28 | 35.14 | ** |
| | 2 hr. | 24.59 | 34.70 | ** |
| b* | Control | 6.65 | 10.32 | ** |
| | 0 min. | 7.84 | 10.73 | ** |
| | Control | 7.72 | 9.61 | ns |
| | 1 hr. | 7.45 | 9.40 | ** |
| | Control | 5.08 | 8.66 | * |
| | 2 hr. | 7.56 | 8.36 | ** |

^{1/}The difference was statistically significant by t-test ($p < 0.05$)



Table 13 Peel color (L*a*b*) of red dragon fruit treated with modified vapor heat treatment center temperature 46 and 47°C for various holding times and 7 days chamber at 12°C.

| Peel color | Treatment | Before Treatment | After Treatment | t-test ^{1/} |
|------------|-----------|------------------|-----------------|----------------------|
| L* | Control | 33.29 | 34.72 | ns |
| | 0 min. | 33.67 | 38.31 | ** |
| | Control | 34.91 | 39.04 | * |
| | 1 hr. | 31.95 | 37.87 | ** |
| | Control | 30.47 | 37.96 | * |
| | 2 hr. | 32.57 | 35.89 | ** |
| a* | Control | 33.10 | 33.16 | ns |
| | 0 min. | 34.78 | 38.84 | ** |
| | Control | 34.14 | 41.81 | ** |
| | 1 hr. | 31.77 | 39.12 | ** |
| | Control | 28.38 | 37.36 | ** |
| | 2 hr. | 30.06 | 35.37 | ** |
| b* | Control | 7.98 | 6.65 | ns |
| | 0 min. | 8.38 | 9.78 | ** |
| | Control | 9.89 | 10.76 | ns |
| | 1 hr. | 7.08 | 8.96 | ** |
| | Control | 8.18 | 9.42 | ns |
| | 2 hr. | 7.65 | 7.88 | ns |

^{1/}The difference was statistically significant by t-test ($p < 0.05$)



Table 14 Time spent for center of red dragon fruit to attain 46.5° C for various holding times during vapor heat treatment and modified vapor heat treatment in fruit injury test.

| Temp. | Rep. | Load factor (kg/cum.) | Sensor fruit weight (g) | | | Time (h) ^{1/} | | |
|-------|------|--------------------------|-------------------------|--------|--------|------------------------|------|------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 0:00 | 1:00 | 2:00 |
| VHT | 1 | 8.91 | 332.19 | 328.79 | 348.48 | 3:24 | 4:24 | 5:24 |
| | 2 | 6.99 | 440.03 | 438.62 | 438.54 | 3:37 | 4:37 | 5:37 |
| MVHT | 1 | 8.70 | 299.87 | 320.81 | 337.36 | 3:20 | 4:20 | 5:20 |
| | 2 | 7.07 | 433.63 | 432.57 | 423.50 | 3:52 | 4:52 | 5:52 |

^{1/}Time for center of only 3 sensor fruits to attain target temperature.

Table 15 Time spent for center of red dragon fruit to attain 43.0 and 46.5 ° C during vapor heat treatment and modified vapor heat treatment in fruit injury test.

| Temp. | Rep. | Time for fruit center to | Time for fruit | Time form |
|---------|------|------------------------------------|--|------------------------------------|
| | | reach 43.0 °C (h) ^{1/} | center to reach 46.5 °C (h) ^{1/} | 43 to 46.5 °C (h) ^{1/} |
| VHT | 1 | 2:20 | 3:24 | 1:04 |
| | 2 | 2:15 | 3:37 | 1:22 |
| MVHT | 1 | 2:23 | 3:20 | 0:57 |
| | 2 | 2:42 | 3:52 | 1:10 |
| Average | | 2.25 | 3:33 | 1:08 |

^{1/}Time for center of only 3 sensor fruits to attain target temperature.



Table 16 Total soluble solid ($^{\circ}$ Brix) of red dragon fruit treated with vapor heat treatment and modified vapor heat treatment center temperature 46.5°C for various holding times and 6 days in room temperature at 27°C .

| Treatment | Rep. | Brix value (Brix) ^{1/} | | |
|-----------|-----------------|---------------------------------|-------|-------|
| | | 0h | 1h | 2h |
| Control | | 12.41 | | |
| VHT | 1 | 13.42 | 13.60 | 12.32 |
| MVHT | | 12.08 | 14.45 | 13.87 |
| T-test | Control vs VHT | ns | ns | ns |
| | Control vs MVHT | ns | ** | ns |
| Control | | 15.08 | | |
| VHT | 2 | 16.15 | 14.18 | 14.08 |
| MVHT | | 15.17 | 15.03 | 16.57 |
| T-test | Control vs VHT | ns | ns | ns |
| | Control vs MVHT | ns | ns | ** |

^{1/} The difference was statistically significant by t-test ($p < 0.05$)

Table 17 The percentage of red dragon fruit were rotten after treated with vapor heat treatment and modified vapor heat treatment center temperature 46.5°C for various holding times and kept 6 days in room temperature at 27°C .

| Treatment | Rep. | Time (h) ^{1/} | | |
|-----------|------|------------------------|-----------|-----------|
| | | 0 | 1 | 2 |
| Control | | 30 | | |
| MVHT | 1 | 40 | 80 (1) | 40 (1) |
| VHT | | 90 (1) ^{2/} | 50 | 40 |
| Control | | 83.33 | | |
| MVHT | 2 | 83.33 | 66.67 (1) | 50 (1) |
| VHT | | 100 (1) | 83.33 (1) | 83.33 (1) |

^{1/}Time for fruits to attain target temperature

^{2/} Number of red dragon fruit were hole in fruit after vapor heat treatment



Table 18 Time for center of red dragon fruits to attain 45 °C and 46.5 °C for various holding time after subjecting to MVHT in experiment 1.

| Stage | Rep. | Sensor fruit weight (g) | | | 45 °C | Time (h) ¹ | | | | |
|-------------------------------|------|-------------------------|----------------|--------|-------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | | | | 46.5 °C | | | | |
| | | | | | | 0:00 | 0:10 | 0:20 | 0:30 | 0:40 |
| Egg | 1 | 348.50 | 350.94 | 352.65 | 3:33 | 4:11 | 4:21 | 4:31 | 4:41 | 4:51 |
| | 2 | 349.25 | 350.87 | 352.62 | 3:33 | 4:03 | 4:13 | 4:23 | 4:33 | 4:43 |
| | 3 | 341.05 | 342.27 | 342.50 | 3:31 | 4:10 | 4:20 | 4:30 | 4:40 | 4:50 |
| | | | Average | | | 3:32 | 4:08 | 4:18 | 4:28 | 4:38 |
| 1 st instar larvae | 1 | 340.86 | 341.06 | 341.33 | 3:30 | 4:00 | 4:10 | 4:20 | 4:30 | 4:40 |
| | 2 | 341.27 | 341.34 | 341.97 | 3:36 | 4:10 | 4:20 | 4:30 | 4:40 | 4:50 |
| | 3 | 354.10 | 354.90 | 354.90 | 3:35 | 4:17 | 4:27 | 4:37 | 4:47 | 4:57 |
| | | | Average | | | 3:34 | 4:09 | 4:19 | 4:29 | 4:39 |
| 2 st instar larvae | 1 | 343.17 | 343.74 | 344.47 | 3:31 | 4:05 | 4:15 | 4:25 | 4:35 | 4:45 |
| | 2 | 344.16 | 344.19 | 344.49 | 3:39 | 4:25 | 4:35 | 4:45 | 4:55 | 5:05 |
| | 3 | 345.59 | 351.52 | 354.87 | 3:39 | 4:15 | 4:25 | 4:35 | 4:45 | 4:55 |
| | | | Average | | | 3:36 | 4:15 | 4:25 | 4:35 | 4:45 |
| 3 rd instar larvae | 1 | 337.80 | 338.40 | 338.50 | 3:33 | 4:03 | 4:13 | 4:23 | 4:33 | 4:43 |
| | 2 | 342.55 | 345.41 | 345.50 | 3:36 | 4:22 | 4:32 | 4:42 | 4:52 | 5:02 |
| | 3 | 326.73 | 335.43 | 336.32 | 3:33 | 4:07 | 4:17 | 4:27 | 4:37 | 4:47 |
| | | | Average | | | 3:34 | 4:11 | 4:21 | 4:31 | 4:41 |

¹ Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature



Table 19 Time for center of red dragon fruits to attain 43 °C and 46.5 °C after subjecting to MVHT in experiment 1.

| Stage | Rep. | Time for fruit center to reach 43 °C (min) ¹ | Time for fruit center to reach 46.5 °C (min) ¹ | Time from 43 to 46.5 °C (min) |
|-------------------------------|----------------|---|---|-------------------------------|
| Egg | 1 | 3:15 | 4:11 | 0:51 |
| | 2 | 3:15 | 4:03 | 0:48 |
| | 3 | 3:15 | 4:10 | 0:50 |
| | Average | 3:15 | 4:08 | 0:50 |
| 1 st instar larvae | 1 | 3:15 | 4:00 | 0:45 |
| | 2 | 3:20 | 4:10 | 0:50 |
| | 3 | 3:20 | 4:17 | 0:57 |
| | Average | 3:18 | 3:09 | 0:51 |
| 2 st instar larvae | 1 | 3:16 | 4:05 | 0:49 |
| | 2 | 3:23 | 4:25 | 0:58 |
| | 3 | 3:20 | 4:15 | 0:55 |
| | Average | 3:20 | 4:15 | 0:54 |
| 3 rd instar larvae | 1 | 3:20 | 4:03 | 0:43 |
| | 2 | 3:15 | 4:22 | 1:07 |
| | 3 | 3:15 | 4:07 | 0:52 |
| | Average | 3:17 | 4:11 | 0:54 |

¹ Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature



Table 20 Mortality¹ of OFF eggs, 1st instar, 2nd instar and 3rd instar larvae in red dragon fruits treated with MVHT in Experiment 1.

| Stage | Treatment ² | Number treated | Number dead | Corrected mortality (%) ³ |
|-------------------------------|------------------------|----------------|-------------|--------------------------------------|
| Eggs | Control | 1,500 | 763 | 0 |
| | 45.0 °C + 0:00 h | 1,500 | 1,140 | 51.15 |
| | 46.5 °C + 0:00 h | 1,500 | 1,500 | 99.86 |
| | 46.5 °C + 0:10 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:20 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:30 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:40 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| 1 st instar larvae | Control | 1,500 | 740 | 0 |
| | 45.0 °C + 0:00 h | 1,500 | 1,184 | 58.42 |
| | 46.5 °C + 0:00 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:10 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:20 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:30 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:40 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| 2 nd instar larvae | Control | 1,500 | 253 | 0 |
| | 45.0 °C + 0:00 h | 1,500 | 1221 | 77.63 |
| | 46.5 °C + 0:00 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:10 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:20 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:30 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:40 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| 3 rd instar larvae | Control | 1,500 | 347 | 0 |
| | 45.0 °C + 0:00 h | 1,500 | 1287 | 81.56 |
| | 46.5 °C + 0:00 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:10 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:20 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:30 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:40 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |

¹ Combined data of 3 replicates

² There are 5 treated fruits and 5 control fruits infested with 100 individuals/fruit in each replicate

³ Mortality is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925)



Table 21 Time for fruit center temperature to attain 45 °C for various holding time after exposure to MVHT in Experiment 2.

| Rep. | Sensor fruit weight (g) | | | Loading (kg/cu.m) | Time (h) ¹ | | | | | |
|------|-------------------------|--------|--------|----------------------|-----------------------|------|------|------|------|------|
| | | | | | 45.0 | | 46.5 | | | |
| | | | | | 0:00 | 0:00 | 0:10 | 0:20 | 0:30 | 0:40 |
| 1 | 342.63 | 343.40 | 343.87 | 19.05 | 3:34 | 4:05 | 4:15 | 4:25 | 4:35 | 4:45 |
| 2 | 346.52 | 349.34 | 355.02 | 18.67 | 3:40 | 4:16 | 4:26 | 4:36 | 4:46 | 4:56 |
| 3 | 344.26 | 344.67 | 345.19 | 18.68 | 3:13 | 4:06 | 4:16 | 4:26 | 4:36 | 4:46 |

¹ Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature

Table 22 Mortality¹ of OFF eggs and 1st instar larvae in red dragon fruits treated with MVHT in Experiment 2.

| Stage | Treatment ² | Number treated | Number dead | Corrected mortality (%) ³ |
|-------------------------------|------------------------|----------------|-------------|--------------------------------------|
| Eggs | Control | 1,500 | 1014 | 0 |
| | 45.0 °C + 0:00 h | 1,500 | 1129 | 23.67 |
| | 46.5 °C + 0:00 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:10 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:20 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:30 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:40 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| 1 st instar larvae | Control | 1,500 | 585 | 0 |
| | 45.0 °C + 0:00 h | 1,500 | 1037 | 49.40 |
| | 46.5 °C + 0:00 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:10 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:20 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:30 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |
| | 46.5 °C + 0:40 h | 1,500 | 1,500 | 100.00 |

¹ Combined data of 3 replicates

² There are 5 treated fruits and 5 control fruits infested with 100 individuals/fruit in each replicate

³ Mortality is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925)



Table 23 Time for center of red dragon fruit to attain 46.5 °C for various holding times during modified vapor heat treatment in intermediate disinfestation test.

| Rep. | Load factor (kg/cum.) | Sensor fruit Weight (g) | | | Time (min.) ^{1/} | | | | | |
|------|--------------------------|----------------------------|--------|--------|---------------------------|------|------|------|------|------|
| | | | | | 0:00 | 0:10 | 0:15 | 0:20 | 0:25 | 0:30 |
| 1 | 15.26 | 423.67 | 423.67 | 424.30 | 3:08 | 3:18 | 3:23 | 3:28 | 3:33 | 3:38 |
| 2 | 13.73 | 377.29 | 378.25 | 381.63 | 2:46 | 2:56 | 3:01 | 3:06 | 3:11 | 3:16 |
| 3 | 11.89 | 330.83 | 331.05 | 332.66 | 2:55 | 3:05 | 3:10 | 3:15 | 3:20 | 3:25 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.

Table 24 Time for center of red dragon fruit to attain 43.0 and 46.5 °C during modified vapor heat treatment in intermediate disinfestation test.

| Rep. | Time for fruit center to reach 43.0 °C (h) ^{1/} | Time for fruit center to reach 46.5 °C (h) ^{1/} | Time form 43 to 46.5 °C (h) ^{1/} |
|---------|---|--|---|
| 1 | 2:13 | 3:08 | 0:55 |
| 2 | 2:05 | 2:46 | 0:41 |
| 3 | 2:02 | 2:55 | 0:53 |
| Average | 2:07 | 2:57 | 0:47 |

^{1/}Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperature.

Table 25 Mortality^{1/} of egg of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in red dragon fruit treated with modified vapor heat treatment in intermediate disinfestation test.

| Treatment ^{2/} | Number of treated (larvae) | Number of alive (larvae) | Number of dead (larvae) | Corrected mortality (%) ^{3/} |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--|
| Control | 4,500 | 2,420 | 2,080 | 0 |
| 46.5 °C + 0 min. | 1,800 | 32 | 1,768 | 98.22 |
| 46.5 °C + 10 min. | 1,800 | 7 | 1,793 | 99.52 |
| 46.5 °C + 15 min. | 1,800 | 11 | 1,789 | 99.24 |
| 46.5 °C + 20 min. | 1,800 | 0 | 1,800 | 100 |
| 46.5 °C + 25 min. | 1,800 | 1 | 1,799 | 99.9 |
| 46.5 °C + 30 min. | 1,800 | 0 | 1,800 | 100 |

^{1/}Combined data of 3 replicates.

^{2/}Treatment: 6 fruits infested with 100 individuals/fruit.

Control: 15 fruits infested with 100 individuals/fruit.

^{3/}Mortality is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925).



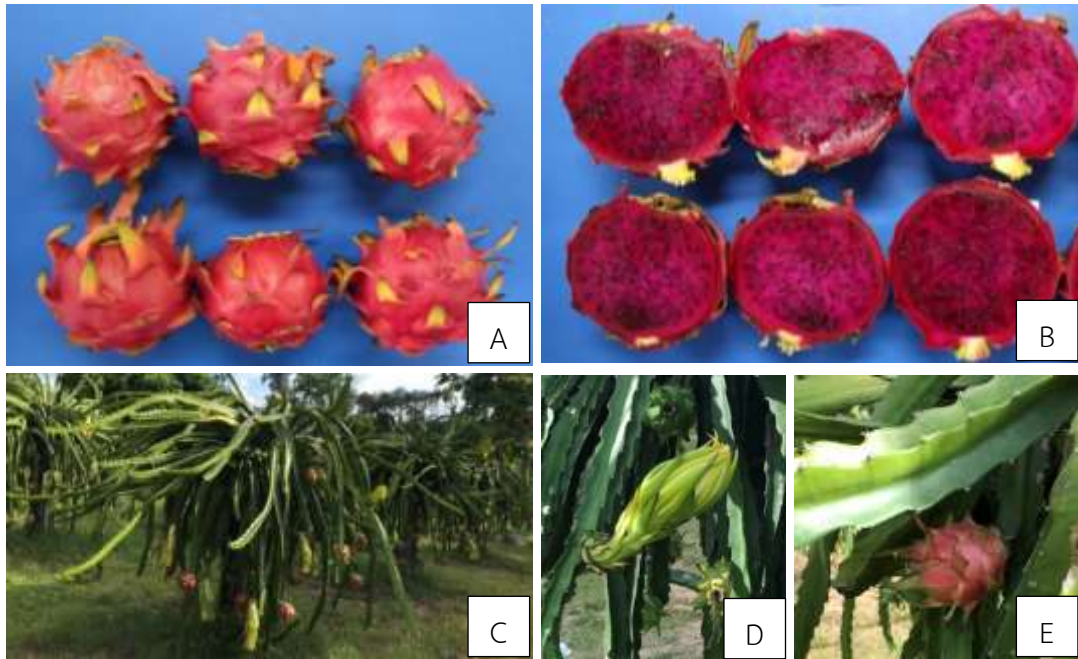


Figure 1 Internal (A), external (B) characteristic, stems (C) flower (D) and fruit (E) of dragon fruit

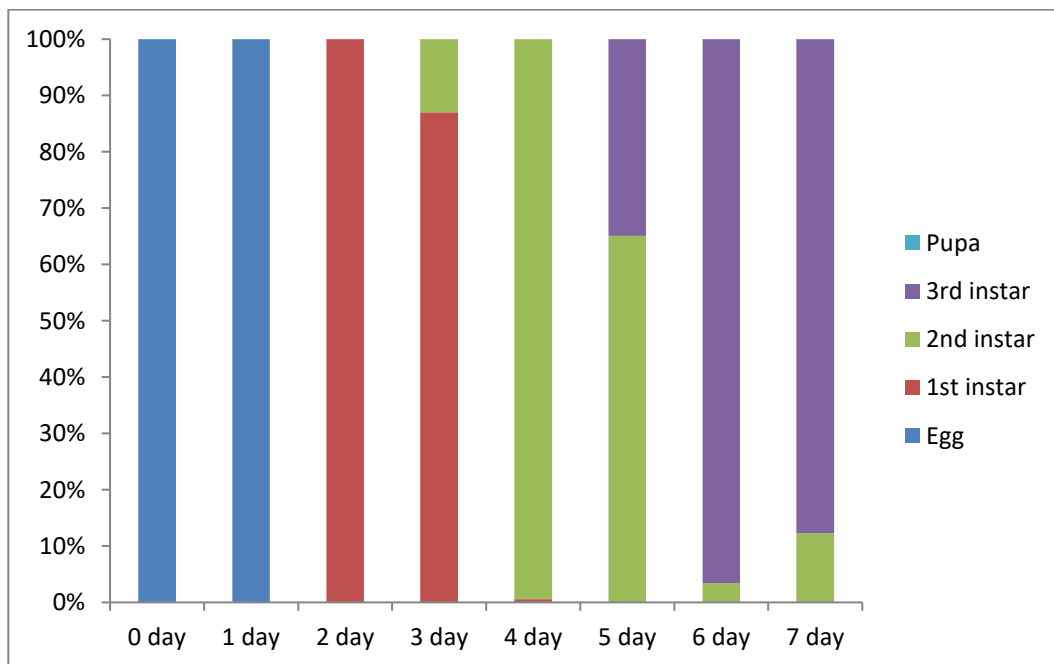


Figure 2 Laval development of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in dragon fruit

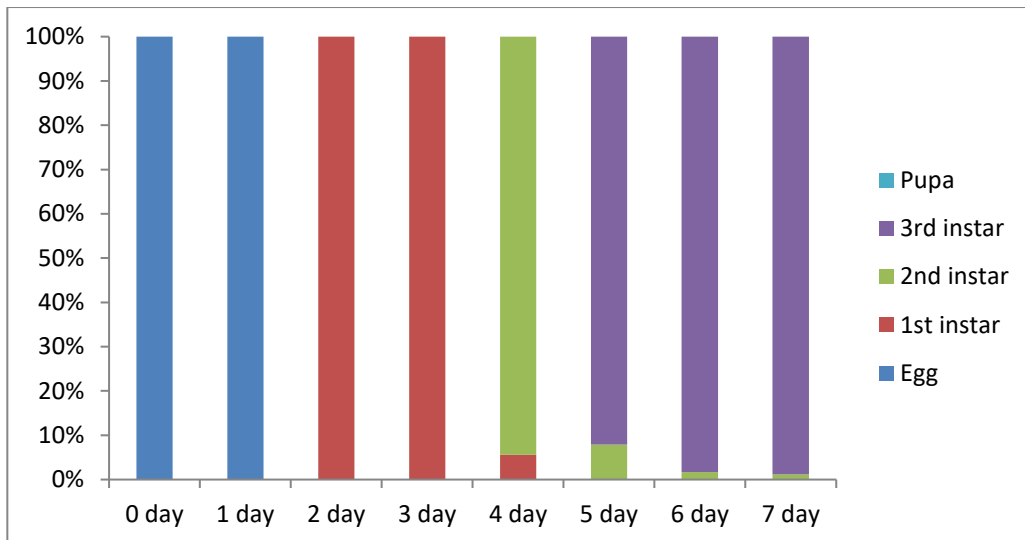


Figure 3 Laval development of *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in artificial diet



Figure 4 Calibration sensors were conducted by dipping all sensors into constant temperature water bath at 47°C for 20 minutes at laboratory of Plant Quarantine Treatment Section, Plant Quarantine Research Group

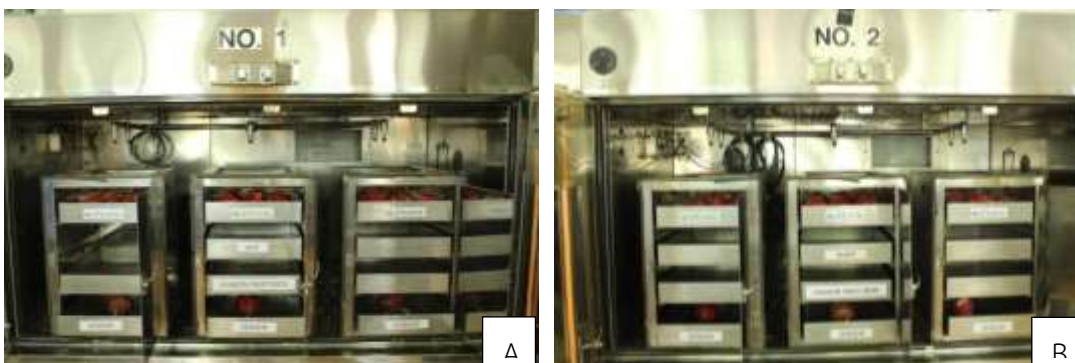


Figure 5 The vapor heat treatment machine no.1 (A) and no.2 (B) for treated reddragon fruit with vapor heat treatment and modified vapor heat treatment in laboratory condition



Figure 6 Characteristic external of red dragon fruit with vapor heat treatment and modified vapor heat treatment center temperature 46.5°C and 6 days in room temperature at 27°C ; (A) And (B) normal condition before treated. (C) Appearance of red dragon fruit after treated (D) Rotten

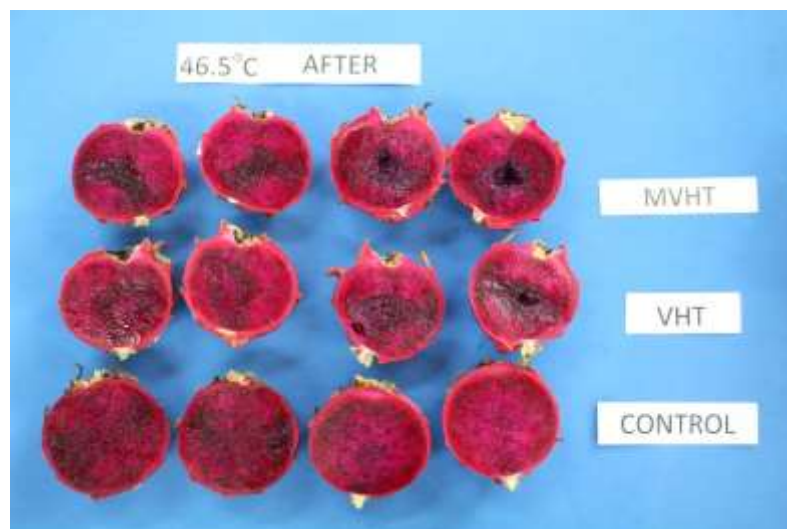


Figure 7 Characteristic internal as abnormal of red dragon fruit with vapor heat treatment and modified vapor heat treatment center temperature 46.5°C and 6 days in room temperature at 27°C



Figure 8 “Sanshu” vapor heat treatment system (differential pressure type) No.1 and No.2 for heat infestation to all stage of *Bactrocera dorsalis* on red dragon fruit at fruit center temperatures attained 45 and 46.5 c° and kept for 10, 20, 30 and 40 minute



Figure 9 Eggs inoculation method of *Bactrocera dorsalis* on red dragon fruit

การศึกษาสถานภาพของเชื้อไวรัส *Pepper Mild Mottle Virus* ของพริก
 A study of the *Pepper Mild Mottle Virus* status of chilipeppers

เยาวภา ตันติวานิช นายภูวนารถ มณีโชติ
 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Pepper mild mottle virus (PMMoV) is a plant virus in the genus Tobamovirus infecting peppers which are economic plants. The virus can be transmitted from plant to plant mechanically and by seed, causing serious yield loss. PMMV infects almost all varieties peppers. The symptoms of disease include chlorosis, curled leaves, stunted plants. The distorted, discolored chilli. A survey of diseases in chili peppers in 17 provinces between October 2018 and September 2021 and PMMV detection in 262 samples found PMMV in Kanchanaburi, Phrae, and Chaiyaphum, each in one sample.

บทคัดย่อ

Pepper mild mottle virus (PMMoV) เป็นเชื้อไวรัสในจีนัส Tobamovirus มีพริกที่เป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นพืชอาศัย สามารถถ่ายทอดโรคด้วยวิธีกลโดยน้ำคั้นพืช และผ่านทางเมล็ด สามารถทำความเสียหายต่อผลผลิตพริกได้มาก PMMV เป็นสาเหตุโรคของพริกในเกือบทุกสายพันธุ์ ลักษณะอาการของโรคขึ้นอยู่กับพันธุ์ของพริกที่เป็นโรค อาการที่พบทั่วไป ได้แก่ อาการใบเหลืองซีด (chlorosis) ใบหงิกม้วนงอ ต้นเตี้ยแคระแกร็น ผลพริกบิดเบี้ยว สีเปลี่ยน มีขนาดเล็กลง การสำรวจโรคในพริกใน 17 จังหวัด ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 และตรวจหาไวรัส PMMV ในตัวอย่าง จำนวน 262 ตัวอย่าง ด้วยวิธี PCR พบ PMMV จากจังหวัดกาญจนบุรี แพร่ ชัยภูมิ อย่างละ 1 ตัวอย่าง

03-30-60-01-01-02-16-63



คำนำ

Pepper mild mottle virus (PMMoV) สร้างความเสียหายกับการปลูกพริกทั่วโลก มีรายงานพบเชื้อ PMMoV ในออสเตรเลีย ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน ยุโรป และแอฟริกาเหนือ ในปี ค.ศ. 1997 เกิดการระบาดของ PMMoV สร้างความเสียหายอย่างมากในรัฐทางตะวันออกเฉียงใต้ของอเมริกา คือ จอร์เจีย และฟลอริดา PMMoV เป็นสาเหตุโรคของพริกในเกือบทุกสายพันธุ์ เป็นเชื้อไวรัสในจีนัสและแฟมิลี Tobamovirus มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ลักษณะอาการของโรคขึ้นอยู่กับพันธุ์ของพริกที่เป็นโรค อาการที่พบทั่วไป ทำให้พริกแสดงอาการ ใบต่าง ใบเหลืองซีด (chlorosis) เนื้อใบมีสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม รูปปร่าง บิดเบี้ยวเสียรูป และเส้นใบหักงอ ส่วนลักษณะอาการ บนผลพริก จะทำให้ผิวขรุขระต่าง บิดเบี้ยว สีเปลี่ยน และมีขนาดผลเล็กกว่าปกติ ทำให้คุณภาพและผลผลิตของพืชลดลง และยังส่งผลต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ทางการค้า เชื้อไวรัสสามารถแพร่ระบาดไปได้ง่ายโดยวิธีกล การสัมผัสระหว่างต้นที่เป็นโรคกับต้นปกติ รวมทั้งติดไปกับเครื่องมือ ถุงมือ เสื้อผ้า นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดโรคโดยติดไปกับส่วนเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ส่วนบริเวณ endosperm พบได้น้อยมาก เชื้อไวรัสชนิดนี้เป็นเชื้อไวรัสที่กักกันในหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศในกลุ่ม ยุโรป สเปน อินเดีย อเมริกา เกาหลีใต้ และญี่ปุ่น เป็นต้น (Department of Agriculture, 2016) ที่ห้าม ปนเปื้อนมากับผลผลิตและส่วนขยายพันธุ์ต่างๆ ต้องมีการออกไปรับรองพืชปลอดโรคซึ่งเป็นข้อบังคับในประเทศผู้ค้า

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานพบโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อไวรัส PMMoV ที่จังหวัดสุโขทัยในการสำรวจโรคไวรัสของพริกในช่วง ปี พ.ศ. 2532- 2534 ซึ่งในปัจจุบัน และยังไม่มีการสำรวจโรคชนิดนี้อีก จึงเห็นว่าควรมีศึกษาสำรวจเชื้อไวรัสดังกล่าวในพริก เพื่อใช้เป็นข้อมูลสถานการณ์การเกิดและการแพร่กระจายของโรคต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการไวรัส
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก มาร์กเกอร์ มีดคัตเตอร์ กรรไกร กล้องเก็บความเย็น
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการไวรัส
4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี PCR



วิธีการ

การสำรวจโรคไวรัส *Pepper Mild Mottle Virus*

สำรวจและเก็บตัวอย่างพริกที่มีลักษณะผิดปกติคล้ายเกิดจากโรคไวรัส *Pepper Mild Mottle Virus* ได้แก่ อาการใบด่างเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม รูปร่างบิดเบี้ยวเสียรูป และเส้นใบหงิกงอ ในแหล่งปลูกพริกในประเทศไทย แต่แปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบโดยเดินตามเส้นทแยงมุม ทุกๆ 10 ก้าว ตรวจโรคจุดละ 10 ต้น จำนวน 10 จุดต่อแปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง เก็บตัวอย่างในถุงพลาสติกและแช่ในกล่องเก็บความเย็นตลอดเวลา จนกระทั่งนำไปเก็บในตู้เย็นในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการตรวจหาไวรัสในตัวอย่างด้วยวิธี PCR

ตรวจหาเชื้อไวรัส *Pepper Mild Mottle Virus* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพริกโดยใช้ชุดสกัด RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Taiwan) นำส่วนของ total RNA ที่ได้ไปเตรียม cDNA library ด้วย Superscript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum (Invitrogen, USA) และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน PMMoV-CP โดยวิธี PCR ใช้ไพรเมอร์ดังนี้

Forward primer คือ 5'-TTT TTG GAT CCA TGG CTT ACA CAG TTT CCA GTG-3' และ Reverse primer คือ 5'-CCT TTA AGC TTT TAA GGA GTT GTA GCC CAG GTG-3'

ปฏิกิริยาสำหรับเพิ่มปริมาณ ซีนียีนมีดังนี้ Total RNA 1 ไมโครลิตร, 2x Reaction mix 25 ไมโครลิตร, Forward primer (10 μM) 1 ไมโครลิตร, Reverse primer (10 μM) 1 ไมโครลิตร, Superscript™ III RT/Platinum Taq Max 2 ไมโครลิตร และ Deionized water (dH₂O) 16 ไมโครลิตร ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 50 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน RT-PCR คือ cDNA synthesis 50 องศาเซลเซียส 30 นาที; Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส 2 นาที; Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที; Annealing 59 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension 68 องศาเซลเซียส 40 วินาที เริ่มกระบวนการที่ 3-5 ซ้ำอีก 34 รอบ และ Final extension 68 องศาเซลเซียส 5 นาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ 16 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดของซินดีเอ็นเอโดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis ใน Tris-borate buffer (TBE) และนำไปย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide ตรวจแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเปรียบ เทียบขนาดของ DNA กับ 100 bp Plus markers (Fermentas, USA)

เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น 2562 – สิ้นสุด 2564 กลุ่มวิจัยโรคพืช
- สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร



ผลและวิจารณ์การทดลอง

การสำรวจโรคไวรัส *Pepper Mild Mottle Virus*

การสำรวจและเก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการผิดปกติคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Pepper Mild Mottle Virus* ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 ในพื้นที่ปลูกพริก จังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรี แพร่ น่าน สุโขทัย ร้อยเอ็ด นครพนม หนองคาย ชัยภูมิ มหาสารคาม บึงกาฬ กาฬสินธุ์ สกลนคร ศรีสะเกษ อุบลราชธานีและมุกดาหาร จำนวนตัวอย่างพริกที่เก็บได้ 262 ตัวอย่าง

ตรวจหาเชื้อไวรัส *Pepper Mild Mottle Virus* ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

จากตัวอย่างพริกทั้งหมด เมื่อทำการเพิ่มปริมาณยีนส่วน PMMV-CP พบว่ามีตัวอย่างพริกที่เก็บจากแปลงปลูกในจังหวัดกาญจนบุรี แพร่ ชัยภูมิ ให้ผลบวก ที่ได้ขึ้นยีนขนาด ประมาณ 474 นิวคลีโอไทด์ อย่างละ 1 ตัวอย่าง

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานพบตรวจพบเชื้อไวรัส PMMoV ในพริกที่จังหวัดสุโขทัย ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ในการสำรวจโรคไวรัสของพริกในช่วงปี พ.ศ. 2532- 2534 (เครือพันธุ์และคณะ, 2536)

จากนั้น Teewasit (2017) ได้สำรวจโรคของพริกใน 15 จังหวัดของประเทศไทย ในช่วงปี 2557-2559 และนำมาตรวจด้วยวิธี Indirect plate trapping antigen enzyme-linked immunosorbent assay (Indirect PTA-ELISA) และตรวจพบเชื้อ PMMV จากพริกที่เก็บมา จำนวน 7 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย 34 ตัวอย่าง แพร่ 1 ตัวอย่าง เชียงใหม่ 10 ตัวอย่าง กาญจนบุรี 23 ตัวอย่าง บุรีรัมย์ 1 ตัวอย่าง สุรินทร์ 2 ตัวอย่าง ชัยภูมิ 2 ตัวอย่าง

ธีรวิศิษฐ์ และคณะ (2560) ได้รายงานการสำรวจและการเก็บตัวอย่างโรคพริกที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคไวรัสใบด่างพริกจากจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี เชียงใหม่ และเชียงราย จำนวนทั้งหมด 70 ตัวอย่าง พบเชื้อไวรัส PMMoV จำนวน 3, 1, 2 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ ด้วยการตรวจด้วยวิธี PCR

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจโรคในพริกในแปลงปลูก 17 จังหวัด ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2564 และตรวจหาไวรัส PMMV ในตัวอย่าง จำนวน 262 ตัวอย่าง ด้วยวิธี PCR พบ PMMV จากจังหวัดกาญจนบุรี แพร่ ชัยภูมิ อย่างละ 1 ตัวอย่าง ซึ่งในแปลงที่พบตัวอย่างโรคได้มีการกำจัดต้นเป็นโรคออกจากแปลงเรียบร้อยแล้ว จากนี้การรายงานการสำรวจและพบโรคในช่วงปีตั้งแต่ปี 2557 เป็นต้นมา แสดงให้เห็นว่ามีการกระจายของเชื้อไวรัส PMMV อยู่ในแปลงปลูกพริกในหลายจังหวัดของประเทศไทย จึงจำเป็นต้องหาแนวทางในการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสม



เพราะเชื้อไวรัสกังก่กล่าว สามารถแพร่ระบาดไปได้ง่ายโดยวิธีกล การสัมผัสระหว่างต้นที่เป็นโรคกับต้นปกติ รวมทั้งติดไปกับเครื่องมือ ถุงมือ เสื้อผ้า นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดโรคโดยติดไป กับส่วนเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat)

คำขอบคุณ

-

เอกสารอ้างอิง

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ Noda, Chiyoichi สุวรรณ กัดพันธุ์ และ นวลจันทร์ ดีมา. 2536. การศึกษาเกี่ยวกับไวรัสของพริกและการคัดเลือกพันธุ์พริกให้ต้านทานต่อไวรัสบางชนิด. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31 สาขาพืช 3-6 กุมภาพันธ์ 2536. หน้า 331-340

ธีรวิศิษฐ์ แพทย์สมาน รัชณี ฮงประยูร และสิริกุล วะสี. 2560. โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างพริก: การผลิต คุณสมบัติและการนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ปีที่ 48 ฉบับที่ 3 หน้า 403-414.

Teewasit Phatsaman. 2017. Epidemiology of Pepper Viruses in Thailand and Development of Diagnostic Techniques for Related Tobamoviruses. Thesis, Kasetsart University.



ภาคผนวก



| สถานที่เก็บตัวอย่าง | จำนวนตัวอย่าง |
|---------------------|---------------|
| จังหวัดกาญจนบุรี | 21 |
| จังหวัดนครปฐม | 5 |
| จังหวัดราชบุรี | 7 |
| จังหวัดแพร่ | 15 |
| จังหวัดน่าน | 17 |
| จังหวัดสุโขทัย | 8 |
| จังหวัดร้อยเอ็ด | 19 |
| จังหวัดนครพนม | 16 |
| จังหวัดหนองคาย | 22 |
| จังหวัดชัยภูมิ | 20 |
| จังหวัดอุบลราชธานี | 23 |
| จังหวัดบึงกาฬ | 17 |
| จังหวัดมหาสารคาม | 19 |
| จังหวัดกาฬสินธุ์ | 14 |
| จังหวัดมุกดาหาร | 12 |
| จังหวัดสกลนคร | 17 |
| จังหวัดศรีสะเกษ | 10 |





ตัวอย่างพริก จังหวัดกาญจนบุรี



ตัวอย่างพริก จังหวัดแพร่



| | |
|-----------------------------|---|
| ตัวอย่างพริก จังหวัดชัยภูมิ |  |
| ตัวอย่างพริก จังหวัดหนองคาย |  |

| | |
|-----------------------------|--|
| ตัวอย่างพริก จังหวัดน่าน |  |
| ตัวอย่างพริก จังหวัดสกลนคร |  |
| ตัวอย่างพริก จังหวัดบึงกาฬ |  |
| ตัวอย่างพริก จังหวัดสุโขทัย |  |

| | |
|--|---|
| <p>ตัวอย่างพริก จังหวัดอุบลราชธานี</p> |  |
| <p>ตัวอย่างพริก จังหวัดมหาสารคาม</p> |  |

การศึกษาและจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของยาสูบที่พบในประเทศไทย
The study and classification of *tobacco virus diseases* in Thailand

เยาวภา ตันติวานิช นายภูวนารถ มณีโชติ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Survey of viral diseases in tobacco in plantations in Thailand. During October 2019 to September 2021, There were 180 *tobacco-like disorders* detected in 15 provinces, including Chiang Mai, Phrae, Nan, Tak, Sukhothai, Roi Et, Nakhon Phanom, Nong Khai, Chaiyaphum, Maha Sarakham, Bueng Kan, Kalasin, Sakon Nakhon, Sisaket and Mukdahan on detection of six types of viruses by ELISA. TLCV and TMV were found to be present in 60 of the samples. For PCR analysis, 24 samples of tobacco were positive for TLCV and 22 were positive for TMV, for a total of 46 samples.

บทคัดย่อ

การสำรวจโรคของไวรัสในยาสูบในแหล่งปลูกของประเทศไทย ในช่วงเดือนตุลาคม 2562 ถึง เดือนกันยายน 2564 พบยาสูบที่มีอาการผิดปกติคล้ายที่เกิดจากเชื้อไวรัสและเก็บตัวอย่างมาทั้งสิ้น จำนวน 180 ตัวอย่าง ในแหล่งปลูกจำนวน 15 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ แพร่ น่าน ตาก สุโขทัย ร้อยเอ็ด นครพนมหนองคาย ชัยภูมิ มหาสารคาม บึงกาฬ กาฬสินธุ์ สกลนคร ศรีสะเกษและมุกดาหาร เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธี ELISA สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส 6 ชนิด คือ TLCV TMV TSV CMV TSWV และ PVY พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวก กับเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ TLCV และ TMV จำนวนทั้งหมด 60 ตัวอย่าง เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวก มาตรวจสอบด้วย PCR พบว่า พบตัวอย่างยาสูบที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อไวรัส TLCV จำนวน 24 ตัวอย่าง และ TMV จำนวน 22 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด จำนวน 46 ตัวอย่าง

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-16-63



คำนำ

ยาสูบจัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับพริก มะเขือ มะเขือเทศ และมันฝรั่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nicotiana tabacum* L. เป็นพืชไร่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายกว่า 120 ประเทศทั่วโลก เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถเติบโตได้ดีภายใต้สภาพอากาศและสภาพดินที่หลากหลาย สายพันธุ์ที่นิยมปลูกมากที่สุด คือ เบอร์เลย์ เตอร์กิชหรือโอเรียนทอล และเวอร์จิเนีย ปลูกกันมากภาคเหนือ เช่น แม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ แพร่ น่าน พะเยา และลำปาง ยาสูบเบอร์เลย์ นิยมปลูกมากในภาคกลางตอนบน เช่น สุโขทัย เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ สุดท้ายพันธุ์เตอร์กิชหรือโอเรียนทอลนิยมปลูกกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ชัยภูมิ ขอนแก่น กาฬสินธุ์ สกลนคร มหาสารคาม ร้อยเอ็ด และยโสธร ไบยามีขนาดเล็ก กลิ่นหอมแรง สำหรับประเทศไทยมีเกษตรกรที่ปลูกไบยาทั้ง 3 สายพันธุ์ กระจายอยู่ในหลายพื้นที่กว่า 1 แสนราย และในปี 2553/2554 สามารถเก็บไบยาส่งออกได้สูงถึงกว่า 60 ล้านกิโลกรัมโดย เป็นสายพันธุ์เวอร์จิเนียมียอดการเก็บสูงถึง 17,500,000 กิโลกรัม ตามมาด้วยพันธุ์เบอร์เลย์ จำนวน 35,000,000 กิโลกรัม สุดท้ายจะเป็นเตอร์กิชหรือโอเรียนทอล ที่จัดเก็บได้เพียง 8,000,000 กิโลกรัมโดยมีมูลค่าการส่งออกสูงถึง 2,523 ล้านบาทในปี 2553 คุณภาพของยาสูบไทยนั้นได้รับการยอมรับจากตลาดโลกและเป็นหนึ่งในสินค้าส่งออกที่สำคัญ

สำหรับปัญหาโรคของยาสูบนั้น พบโรคที่เกิดจากทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไส้เดือนฝอย โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งในช่วงปี 2507 โรคที่พบส่วนใหญ่ คือ โรคใบหด (*Tobacco leaf curl virus*) โรคใบด่าง (*Tobacco mosaic virus*) และแผลละเอียด (*Tobacco streak virus*) จนกระทั่งช่วงปี 2550 ความเสียหายของยาสูบที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่นเพิ่มมากขึ้น ได้แก่ *Cucumber mosaic virus* *Tomato spotted wilt* และ *Potato virus Y* เป็นต้น ซึ่งในต่างประเทศมีรายงานการพบเชื้อไวรัสในยาสูบมากกว่า 10 ชนิด

ในปี 2527 มานพ ได้รายงานโรคไวรัสของยาสูบพันธุ์เวอร์จิเนียที่ปลูกในแถบภาคเหนือของไทย นั้น คือ โรคใบหด (*Tobacco leaf curl virus*) โรคใบด่าง (*Tobacco mosaic virus*) และแผลละเอียด (*Tobacco streak virus*) ต่อมาในปี 2537 พัฒนา และคณะ ได้รายงานโรคไวรัสของยาสูบไว้ในดรชนีโรคพืชในประเทศ ได้แก่ *Cucumber mosaic virus* *Tobacco streak virus* *Tobacco mosaic virus* *Tobacco mosaic virus-Orchid strain* *Tobacco etch virus* *Tobacco vein banding virus* *Tobacco leaf curl virus* และ *Groundnut bud necrosis virus* และในปี 2556 ปรียพรรณ และคณะ ได้ศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์ยาสูบนำเข้าจากบราซิล พบว่าศัตรูพืชที่มีโอกาสติดมากับเมล็ดพันธุ์ยาสูบและไม่มีรายงานพบในประเทศไทยมีทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งรวมถึงเชื้อไวรัส *Tobacco ringspot virus* ด้วย



ในปัจจุบันการศึกษาวีจัยเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของยาสูบในประเทศไทยมีค่อนข้างน้อย ประกอบกับในต่างประเทศมีรายงานการพบเชื้อไวรัสในยาสูบมากกว่า 10 ชนิด และมีหลายชนิดที่มีการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดได้ จึงควรมีการศึกษาวีจัย และการจัดจำแนกเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคของยาสูบในประเทศ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคของยาสูบต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการไวรัส
2. อุปกรณ์ในการสุ่มเก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก มาร์กเกอร์ มีดคัตเตอร์ กรรไกร กล่องเก็บความเย็น
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการไวรัส
4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA และ วิธี PCR

วิธีการ

การสำรวจโรคไวรัสในยาสูบ

สำรวจและเก็บตัวอย่างยาสูบที่มีลักษณะผิดปกติคล้ายเกิดจากโรคไวรัส ได้แก่ อาการใบม้วนงอ หนาแข็ง ใบย่น ใบต่าง สีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน แผลละเอียดเล็กๆ สีขาวและสีน้ำตาล และใบเหลือง ในแหล่งปลูกยาสูบในประเทศไทย แต่แปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบโดยเดินตามเส้นทแยงมุม ทุกๆ 10 ก้าว ตรวจโรคจุดละ 10 ต้น จำนวน 10 จุดต่อแปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง เก็บตัวอย่างในถุงพลาสติกและแช่ในกล่องเก็บความเย็นตลอดเวลา จนกระทั่งนำไปเก็บในตู้เย็นในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการตรวจหาไวรัสในตัวอย่างด้วยวิธี ELISA และวิธี PCR

การตรวจโรคด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ตรวจตัวอย่างใบยาสูบที่เก็บมาโดยใช้ ELISA Reagent สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส 6 ชนิด คือ *Tobacco leaf curl virus* (TLCV) *Tobacco mosaic virus* (TMV) *Tobacco streak virus* (TSV) *Cucumber mosaic virus* (CMV) *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) และ *Potato virus Y* (PVY) โดยทำตามวิธีการตามขั้นตอนของบริษัท (Agdia, Co Ltd, USA)

ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

สกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างยาสูบโดยใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Mini Kit และ RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Taiwan) ตามลำดับ ในส่วนของอาร์เอ็นเอได้นำส่วนของ total RNA ที่ได้ไปเตรียม cDNA library ด้วย Superscript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum



(Invitrogen, USA) เพื่อนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ต่อไป โพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัส ในใบยาสูบมีดังนี้

| โพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|----------|---|
| TLCV | pAL1v 1978 (5'GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT3') pAR1c 715 (5'GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCAT CCA3') (Rojas <i>et al.</i> 1993). |
| TMV | TMV-CPF (5' ATGTCTTACAGTATCACTACTCC 3') TMV-CPR (5' TCAAGTTGCAGGACCAGAGGT-3') (Choi <i>et al.</i> 2009). |
| TSV | TSV CP RNA3 express1 (5' AGGTAGCAGGAGATATAACAATGAATACTTTGATCCAAGG 3') TSV CP RNA3 express2 (5' TCGACTCTAGAACTAGTCTTGATTCACCAGAAAATCTTC 3') |
| CMV | CMV-CPF (5' TTG AGT CGA GTC ATG GAC AAA TC 3') CMV-CPR (5' AAC ACG GAA TCA GAC TGG GAG 3') |
| PVY | PVY-P1 (5' CAACTCCAGATGGAACAATTG 3') PVY-P2 (5' CCATTCATCACAGTTGGC 3') |
| TSWV | TSWV-NPF (5'ATGTCTAAGGTTAAGCTC-3') TSWV-NPR (5'TTAAGCAAGTTCTGTGAG-3') TSWV-LF (5'AATTGCCTTGCAACCAATTC-3') TSWV-LR (5'ATCAGTCGAAATGGTTCGGCA-3') |

เวลาและสถานที่

- 1 ตุลาคม 2562 สิ้นสุด 30 กันยายน 2564
- กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์การทดลอง

การสำรวจโรคไวรัสในยาสูบ

สำรวจเก็บตัวอย่างยาสูบที่แสดงอาการผิดปกติคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส โดยเก็บตัวอย่างยาสูบที่มีลักษณะอาการผิดปกติ คือ อาการใบด่างเหลือง ใบหงิกม้วนงอ ใบหยดน้ำ เส้นใบหงิกงอ และอาการต่างเหลืองเส้นใบเขียว ลำต้นแคระแกร็น ในพื้นที่ปลูกยาสูบ จำนวน 15 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด



เชียงใหม่ แพร่ น่าน ตาก สุโขทัย ร้อยเอ็ด นครพนม หนองคาย ชัยภูมิ มหาสารคาม บึงกาฬ กาฬสินธุ์ สกลนคร ศรีสะเกษและมุกดาหาร และเก็บตัวอย่างมาทั้งหมด 180 ตัวอย่าง

การตรวจโรคด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ตรวจตัวอย่างใบยาสูบที่เก็บมาโดยใช้ ELISA Reagent สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส 6 ชนิด คือ *Tobacco leaf curl virus* (TLCV) *Tobacco mosaic virus* (TMV) *Tobacco streak virus* (TSV) *Cucumber mosaic virus* (CMV) *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) และ *Potato virus Y* (PVY) พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวก กับเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ TLCV และ TMV จำนวนทั้งหมด 60 ตัวอย่าง

ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR)

เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วยวิธี ELISA มาสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ และทำการตรวจสอบไวรัสด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะต่อเชื้อไวรัส TLCV และ TMV

ปฏิกิริยาสำหรับเพิ่มปริมาณ ซีนียีนมีดังนี้

TLCV: ดีเอ็นเอตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (@ThermoFisherScientific) ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 25 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน PCR คือ Denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที Annealing 55 องศาเซลเซียส 2 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ ตรวจสอบขนาดของซีนียีนโดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ใน Tris-borate buffer (TBE) และนำไปย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide ตรวจแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเปรียบเทียบกับขนาดของ DNA กับ 100 bp Plus markers (Fermentas, USA)

TMV: นำส่วนของ total RNA ที่ได้ไปเตรียม cDNA library ด้วย SuperscriptTM III One-Step RT-PCR System with Platinum (Invitrogen, USA) และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน TMV-CP โดยวิธี PCR โดยใช้ cDNA 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 ไมโครโมลาร์ และ DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (@ThermoFisherScientific) ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 25 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน PCR คือ Denaturation 94 องศาเซลเซียส 3 นาที; Denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที; Annealing 66 องศาเซลเซียส 30 วินาที Extension 72 องศาเซลเซียส 40 วินาที เริ่มกระบวนการที่ 2-5 ซ้ำอีก 31 รอบ และ Final extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ลอดอุณหภูมิลงมาที่ 16 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดของซีนียีนโดยใช้ 1.5% agarose gel electrophoresis ใน Tris-borate buffer (TBE) และนำไปย้อมแถบ DNA ด้วย Ethidium bromide ตรวจแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตเปรียบเทียบกับขนาดของ DNA กับ 100 bp Plus markers (Fermentas, USA)



ผลการตรวจสอบด้วย PCR พบว่า มีตัวอย่างยาสูบที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อไวรัส TLCV จำนวน 24 ตัวอย่าง และ TMV จำนวน 22 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด จำนวน 46 ตัวอย่าง ดังนี้

| สถานที่ | TMV | TLCV |
|-----------------------------------|-----|------|
| อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ | - | 1 |
| อำเภอพบพระ จังหวัดตาก | - | 2 |
| อำเภอท่าวังผา จังหวัดน่าน | 2 | 1 |
| อำเภอปัว จังหวัดน่าน | 2 | 2 |
| อำเภอท่าช้าง จังหวัดน่าน | 3 | 1 |
| อำเภอร่องขวาง จังหวัดแพร่ | 2 | 2 |
| อำเภอสอง จังหวัดแพร่ | 1 | 2 |
| อำเภอหนองม่วงไข่ จังหวัดแพร่ | 2 | 1 |
| อำเภอเมือง จังหวัดสุโขทัย | 1 | 1 |
| อำเภอสวรรคโลก จังหวัดสุโขทัย | 2 | 1 |
| อำเภอศรีสำโรง จังหวัดสุโขทัย | 1 | 1 |
| อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดศรีสะเกษ | 1 | 2 |
| อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย | 2 | 2 |
| อำเภอท่าบ่อ จังหวัดหนองคาย | 2 | 1 |
| อำเภอบึงโขงหลง จังหวัดบึงกาฬ | 1 | 1 |
| อำเภอบ้านแพง จังหวัดนครพนม | 1 | - |
| อำเภอเมือง จังหวัดร้อยเอ็ด | - | 1 |
| อำเภอศรีสมเด็จ จังหวัดร้อยเอ็ด | 1 | - |

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจโรคของไวรัสในยาสูบในแหล่งปลูกของประเทศไทย ในช่วงเดือนตุลาคม 2562 ถึง เดือนกันยายน 2564 พบยาสูบที่มีอาการผิดปกติคล้ายที่เกิดจากเชื้อไวรัสและเก็บตัวอย่างมาทั้งสิ้น จำนวน 180 ตัวอย่าง ในแหล่งปลูกจำนวน 15 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ แพร่ น่าน ตาก สุโขทัย ร้อยเอ็ด นครพนม หนองคาย ชัยภูมิ มหาสารคาม บึงกาฬ กาฬสินธุ์ สกลนคร ศรีสะเกษและมุกดาหาร เมื่อนำมาตรวจด้วยวิธี ELISA สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส 6 ชนิด คือ TLCV TMV TSV CMV TSWV และ PVY พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวก กับเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ TLCV และ TMV จำนวนทั้งหมด 60 ตัวอย่าง



เมื่อนำตัวอย่างที่ให้ผลบวก มาตรวจสอบด้วย PCR พบว่า พบตัวอย่างยาสูบที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อไวรัส TLCV จำนวน 24 ตัวอย่าง และ TMV จำนวน 22 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด จำนวน 46 ตัวอย่าง

เชื้อไวรัส *Tobacco Leaf Curl Virus* (TLCV) ที่เป็นสาเหตุโรคใบหด มีแมลงหริ่งขาวเป็นพาหะ ยาสูบทุกพันธุ์อ่อนแอต่อโรคนี้ สามารถเกิดโรคได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต และมีพืชอาศัยหลายชนิด ได้แก่ สาบแร้งสาบกา มะละกอ สาบเสื่อ น้ำมันมราชสีห์ หญ้าขัด มะแว้งนก หญ้าละออง พืชตระกูลมะเขือ พริก

เชื้อไวรัส *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคใบด่างยาสูบ เข้าทำลายได้ทุกส่วนของยาสูบ ทำให้เกิดอาการแคะแกระ็น ใบม้วนงอบิดเบี้ยว ใบด่าง สามารถระบาดไปได้ง่ายโดยการสัมผัส ทาบกิ่ง ติดตา ถึงแม้จะไม่สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด หรือแมลงพาหะ แต่ก็สามารถติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตร มือของเกษตรกร หรือวัสดุอื่นๆ ได้

การดูแลต้นกล้าในแปลงเพาะกล้ายาสูบ ให้ปลอดจากโรค เพื่อป้องกันการติดเชื้อตั้งแต่ระยะกล้า หากพบต้นกล้าที่เป็นโรคควรถอนทิ้งทันที การป้องกันการระบาดของแมลงพาหะรวมทั้งการกำจัดวัชพืชหรือพืชอาศัยในบริเวณรอบแปลงปลูกเพื่อเป็นการลดแหล่งสะสมเชื้อไวรัสได้

คำขอบคุณ

-

เอกสารอ้างอิง

กองโรควิทยา สถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ 2555. คู่มือโรคยาสูบ ฝ้ายใบยา โรงงานยาสูบ กระทรวงการคลัง 58 หน้า
มานพ แก้วกำเนิด อินทร์ทอง เมฆขยาย. 2527. โรคยาสูบเมืองไทย กองโรควิทยา สถานีทดลองยาสูบแม่โจ้ เชียงใหม่ 44 หน้า

ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ วรรณญา มาลี และวันเพ็ญ ศรีชาติ. 2555. การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์ยาสูบนำเข้าจากบราซิล. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. สหมิตรพรีนติ้ง นนทบุรี. 285 หน้า





Chatzivassiliou E. K., E. Konstantinos. D. Elisseos. P. Alexandra. P. Georgios. And N. I. Katis. 2004. A survey of tobacco viruses in tobacco crops and native flora in Greece. European Journal of Plant Pathology. December 2004, Volume 110, Issue 10, pp 1011-1023.







- Choi S-K, Yoon J-Y, Chung B-N (2009) Genome analysis and characterization of a tobacco mosaic virus isolate infecting balsam (*Impatiens balsamina*). *Arch Virol* 154:881–885
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis* 77:340-347.
- Williams-Woodward, J. L. 1999. 1998 Georgia plant disease loss estimates. University of Georgia Crop Ext. Serv. Publ. Path 99-02.



ภาคผนวก

| | |
|---------------|--|
| อาการใบเหี่ยว |  |
| |  |
| |  |
| |  |

| | |
|-------------|--|
| อาการใบต่าง |  |
| |  |
| |  |
| |  |

ต้นแบบการผลิตมวนเพชฌฆาตอย่างเป็นระบบเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน Pilot Plant of Assassin Bug Mass Rearing for Sustainable Pest Control

สาทิพย์ มาลี สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี ประภัสสร เขยคำแหง
ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ นันทนัช พินศรี
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The research project of pilot plant of assassin bug mass rearing for sustainable pest control has been conducted between October 2018 to September 2021 at the Plant Protection Research Development Office Laboratory, Department of Agriculture. This project aims to organize an effective system of simultaneous bio-production to control pests and to produce a prototype bio-product for controlling pests effectively and sustainably and to be able to expand the production of bio-products for commercialization. The results revealed, the prototype production of Assassin bug was able to produce in average of 3,840 Assassin bugs per month. The production costs were 3.24 baht per Assassin bug.

Keywords : Biological control, assassin bug, mass rearing

บทคัดย่อ

ต้นแบบการผลิตมวนเพชฌฆาตอย่างเป็นระบบเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน ดำเนินการในห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 -กันยายน 2564 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อจัดระบบการผลิตชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพให้มีความต่อเนื่องเพื่อควบคุมศัตรูพืช และจัดทำต้นแบบการผลิตชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อควบคุมศัตรูพืชอย่างยั่งยืน และสามารถขยายผลการผลิตชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์ ผลการดำเนินงานสามารถสร้างต้นแบบการผลิตมวนเพชฌฆาตได้ปริมาณมากอย่างต่อเนื่องทุกเดือน โดยมีต้นทุนการเลี้ยงขยายประกอบด้วยค่าแรงงาน ค่าวัสดุคงทนได้แก่ กล่องเลี้ยงแมลง อุปกรณ์เลี้ยงแมลง ถาดเลี้ยงหนอนนก และวัสดุสิ้นเปลืองได้แก่ อาหารไก่ สำลี ฟักทอง น้ำ รังไข่กระดาก สามารถเลี้ยงขยายมวนเพชฌฆาตได้ เฉลี่ย 3,840 ตัวต่อเดือน มีต้นทุนผลิตตัวละ 3.24 บาท

คำหลัก : การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี ,มวนเพชฌฆาต, การผลิตขยาย

รหัสการทดลอง 03-05-62-04-00-01-62



คำนำ

“การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี” เป็นทางเลือกที่สำคัญวิธีการหนึ่งในการจัดการศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน องค์ประกอบการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี ประการสำคัญประกอบด้วยการอนุรักษ์ชีวินทรีย์ (Bio-agents) ได้แก่ ตัวห้ำ ตัวเบียน จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติไว้ให้มากที่สุดเพื่อรักษาสมดุลในธรรมชาติ นอกจากนั้นยังสามารถทำได้โดยวิธีการนำชีวินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เหล่านี้เพาะเลี้ยงและผลิตขยายให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำไปใช้ควบคุมศัตรูพืชโดยตรง หรือใช้ร่วมกันกับสารเคมีหรือวิธีการควบคุมศัตรูพืชอื่น ๆ ที่เหมาะสม จะสามารถควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน หากมีการจัดการที่ดีและถูกต้อง ชิวินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เหล่านี้นับเป็นทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ การวิจัยและพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์จากชีวินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในเวลาที่เหมาะสม จะสามารถเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ไม่มีพิษตกค้างในผลผลิตและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม หากบรรลุตามเป้าหมายที่วางไว้จะสามารถนำมาใช้ทดแทนการใช้สารเคมีที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ รวมทั้งเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับทรัพยากรธรรมชาติด้วย

การนำชีวินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์นั้นที่ต้องอาศัยข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาชีวินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติทั้งในประเทศ หรือชนิดใหม่ ๆ ที่นำเข้าจากต่างประเทศ พบว่ามีศักยภาพในการควบคุมศัตรูพืช จะต้องมีการศึกษาประสิทธิภาพ อัตราการใช้ เวลาที่เหมาะสม การนำไปใช้ประโยชน์ในสภาพไร่ ความสามารถที่จะนำมาผลิตขยายให้ได้ปริมาณมาก ตลอดจนมีรูปแบบบรรจุภัณฑ์ที่สามารถรักษาคุณภาพชีวินทรีย์ที่ผลิตได้ และนำไปใช้ได้สะดวก และเป็นงานวิจัยที่ต้องเร่งวิจัยอย่างครบวงจร เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ชีวินทรีย์ที่ดี มีคุณภาพ สามารถนำไปใช้ควบคุมศัตรูพืชได้ดี

มวนเพชฌฆาต (assassin bug) (Hemiptera: Reduviidae) หลายชนิดเป็นมวนตัวห้ำที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายหนอนศัตรูพืช สามารถอดอาหารได้เป็นเวลานานเมื่อไม่มีเหยื่อ มีอุปนิสัยขยันและมีคุณค่าทางเศรษฐกิจในการทำลายแมลงศัตรูพืช Slater และ Baranowski (1978) กล่าวว่ามวนเพชฌฆาตสามารถเจริญเติบโตอยู่ได้ทั้งใน พืชสวน พืชไร่ และสามารถฆ่าแมลงทั้งที่มีขนาดเล็กและกลาง ซึ่งได้แก่ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยจักจั่น ไข่และหนอนของด้วงที่ทำลายหน่อไม้ฝรั่ง รวมทั้งแมลงศัตรูป่าไม้ โดย Sahayaraj (2002) กล่าวว่า มวนเพชฌฆาต, *Rhynocoris marginatus* (F.) สามารถเลี้ยงขยายพันธุ์ได้ดีด้วยหนอนผีเสื้อข้าวสาร *Corcyra cephalonica* Stainton โดยสามารถกินหนอนผีเสื้อข้าวสารได้วันละ 8 ตัว/มวน 1 ตัว Sahayaraj และ Paulraj (2001) รายงานว่ามวนเพชฌฆาต *Rhynocoris marginatus* (F.) เมื่อเลี้ยงด้วยหนอนกระทู้ฝักสามารถวางไข่ได้ 405.28 ± 22.15 ฟอง มีวงจรชีวิต 103.93 วัน Grundy et al. (2002) กล่าวว่าตัวอ่อนมวนเพชฌฆาต, *Pristhesancus plagipennis* (Walker) สามารถกินหนอนเจาะสมอฝ้ายที่มีขนาดเล็ก - กลางมากกว่า 160 ตัว/9-12 สัปดาห์/มวน 1 ตัว สามารถเลี้ยงขยายปริมาณ และนำไปปล่อยเพื่อควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้ายในอัตรา 1 ตัว/แถวยาว 1 เมตร Sahayaraj et al. (2002) กล่าวว่ามวนเพชฌฆาต, *Rhynocoris marginatus* (F.) เลี้ยงขยายปริมาณได้ดีด้วยหนอนผีเสื้อข้าวสาร สามารถฆ่าแมลงศัตรูพืชได้เกือบ 25 ชนิด เช่น หนอนกระทู้ฝัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย และได้นำไปใช้ควบคุมแมลง



ศัตรูพืชทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นในแปลงถั่วเหลือง Grundy (2007) รายงานว่ามวนเพศเมีย, *Pristhesancus plagipennis* (Walker) เป็นศัตรูธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพที่ใช้ควบคุมหนอน *Helicoverpa* และ *Creontiades* สำหรับในประเทศไทย รัตนาและคณะ (2548) รายงานว่ามวนเพศเมียสกุล *Sycanus* ที่พบมากในประเทศไทยมี 3 สกุล คือ *Sycanus versicolor* Dohrn., *Sycanus collaris* Fabricius และ *Sycanus croceovittatus* Dohrn. ซึ่งเป็นมวนตัวห้ำที่ทำลายหนอนศัตรูพืชได้หลายชนิด สามารถพบได้ทั่วไป

สำหรับมวนเพศเมีย *Sycanus versicolor* Dohrn เป็นชนิดที่พบบ่อยและพบมากกว่าอีก 2 ชนิด การผลิตขยายให้ได้ปริมาณมากเพื่อใช้เป็นชีวภัณฑ์สามารถทำได้ง่าย ดังนั้นมวนเพศเมียจึงเป็นแมลงห้ำอีกชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพน่าสนใจในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มทางเลือกในการนำมาช่วยควบคุมหนอนศัตรูพืช ได้แก่ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย เป็นต้น ซึ่งกำลังมีปัญหาการระบาดในกระเจี๊ยบเขียว หน่อไม้ฝรั่ง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และกะหล่ำ ฯลฯ

การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี จะประสบความสำเร็จในการควบคุมศัตรูพืชอย่างยั่งยืนนั้น จำเป็นต้องศึกษารูปแบบการผลิตที่เป็นระบบที่สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง เพื่อผลิตชีวภัณฑ์ให้มีคุณภาพและมีปริมาณมากเพียงพอต่อการใช้ควบคุมศัตรูพืชได้อย่างทันที่ สามารถจัดทำต้นแบบการผลิตชีววินทรีย์ เพื่อเป็นแหล่งเรียนรู้ สาธิต เผยแพร่วิธีการผลิตชีวภัณฑ์ที่มีคุณภาพ เป็นปริมาณมาก ให้แก่หน่วยงาน องค์กร กลุ่มเกษตรกร และผู้สนใจ นำไปผลิตขยายเพื่อควบคุมศัตรูพืชอย่างยั่งยืน หรือสามารถขยายผลการผลิตชีววินทรีย์สู่เชิงพาณิชย์ ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถาดพลาสติกขนาด
 2. อาหารไก่
 3. ถาดพลาสติกขนาด 28x43x10 เซนติเมตร
 4. สำลี
 5. ตะแกรงสำหรับร่อน
 6. กล่องพลาสติกเหลี่ยมใสขนาด 19x28x10 เซนติเมตร มีช่องระบายอากาศปิดด้วยมุ้งลวด
- ดาด
8. ปากคีบ
 9. หนอนนก
 10. รางไข่กระดาษ

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 เตรียมพ่อแม่พันธุ์มวนเพศเมียและพ่อแม่พันธุ์หนอนนกที่แข็งแรง(2562)

พ่อแม่พันธุ์มวนเพศเมีย



1. เก็บรวบรวมมวนเพศผสมจากธรรมชาติ และตามแหล่งเพาะปลูกทั่วไป
2. นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ คัดแยกมวนเพศผสมตามระยะการเจริญเติบโต
3. คัดเลือกเฉพาะตัวที่สมบูรณ์มาเป็นพ่อแม่พันธุ์ โดยพิจารณาจากความสมบูรณ์และแข็งแรง
4. จัดเตรียมพ่อแม่ให้มือน้อย 10 รุ่นต่อปี

พ่อแม่พันธุ์หนอนนก

คัดเลือกดักด้หนอนนกที่มีขนาดใหญ่และสมบูรณ์ เดือนละ 40 กรัม จำนวน 12 เดือน เพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ในการผลิตหนอนนกให้ได้ตลอดทั้งปี

ขั้นตอนที่ 2. จัดระบบการผลิตหนอนนกเพื่อเป็นเหยื่ออาหารของมวนเพศผสม (2562-2563)

1. ระบบการผลิตหนอนเพื่อเป็นเหยื่ออาหารที่เหมาะสมเพื่อการเลี้ยงขยายมวนเพศผสม(2563)

ดำเนินการวิเคราะห์และจัดทำรูปแบบกระบวนการผลิต หรือจัดการแก้ไขให้ได้รูปแบบที่เหมาะสมสำหรับผลิตขยายมวนเพศผสมและเหยื่ออาหาร โดยวิเคราะห์ถึงประสิทธิภาพ คุณภาพ และต้นทุนผลิตระยะเวลาการผลิต ประกอบด้วย

จัดทำระบบการผลิตหนอนนกเพื่อเป็นเหยื่ออาหารของมวนเพศผสม

วางแผนการผลิตขยายหนอนนกให้ต่อเนื่องให้เพียงพอต่อการเลี้ยงขยายมวนเพศผสมตัววัย 2 3 4, 5 และตัวเต็มวัย เพื่อการผลิตพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพได้ตลอดปี ให้มีความสอดคล้องกับการผลิตขยายมวนเพศผสม และตามวิธีการผลิตขยายหนอนนกที่ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว เพื่อให้ได้ปริมาณมากและในช่วงเวลาที่กำหนด ตามองค์ประกอบต่างๆ เช่น อาหารและปริมาณอาหารที่เหมาะสม จำนวนหนอนที่เหมาะสมต่อภาชนะที่ใช้เลี้ยง

บันทึกผล

1. วิธีการปฏิบัติที่เหมาะสมเป็นระบบ,
2. ปริมาณดักด้ที่ผลิตได้,
3. ปริมาณอาหารไก่ที่ใช้
4. ต้นทุนการผลิต และระยะเวลาการผลิตต่อหน่วยการผลิต

บันทึกผล

วิธีการปฏิบัติที่เหมาะสมเป็นระบบ, ปริมาณหนอนนกที่มีขนาดเหมาะสมสำหรับนำไปเลี้ยงมวนเพศผสม และปริมาณดักด้ที่ผลิตได้, ปริมาณอาหารไก่ที่ใช้ ต้นทุนการผลิต และระยะเวลาการผลิตที่แน่นอนต่อหน่วยการผลิต

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการระบบผลิตมวนเพศผสมให้มีปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง (2563-2564)

วางแผนการผลิตขยายมวนเพศผสมเพื่อให้ได้มวนเพศผสมตัววัย 4 ที่พร้อมนำไปปล่อยควบคุมศัตรูพืชอย่างน้อย 1 รุ่นต่อเดือน ไม่น้อยกว่า 3,000 ตัวต่อรุ่น ให้มีความสอดคล้องกับการผลิตเหยื่ออาหาร และตามวิธีการผลิตขยายมวนเพศผสมที่ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว ให้ได้ปริมาณมากและ



ในช่วงเวลาที่กำหนด โดยกำหนดให้สามารถผลิตมวลเพชฌฆาตที่พร้อมสำหรับปล่อยตามองค์ประกอบต่างๆ เช่น

- ชนิดอาหารที่เหมาะสม
- จำนวนมวลเพชฌฆาตที่เหมาะสมต่อภาชนะที่ใช้เลี้ยง
- ระยะเวลาการเก็บรักษามวลเพชฌฆาตระยะต่างๆ

การบันทึกผล

- บันทึกค่าใช้จ่าย ค่าแรงงาน ค่าวัสดุอุปกรณ์ ในการเลี้ยงขยายมวลเพชฌฆาตและเหยื่ออาหาร
- บันทึกจำนวน มวลเพชฌฆาตที่ผลิตได้ต่อครั้ง และต่อปี
- บันทึกจำนวนเหยื่ออาหารที่ใช้เป็นอาหารของมวลเพชฌฆาตในการผลิตต่อครั้ง และต่อปี
- คำนวณค่าเฉลี่ยของต้นทุนการผลิต และขีดความสามารถในการผลิตขยายมวลเพชฌฆาต โดยคำนึงถึงการคุ้มทุนมากที่สุด

การวิเคราะห์ผล เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายการผลิตต่อพื้นที่การผลิต ระยะเวลาการผลิต และปริมาณมวลเพชฌฆาตที่ผลิตได้

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : เริ่มต้น ตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2564 (รวม 3 ปี)

สถานที่ทำการทดลอง : กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ต้นแบบการผลิตมวลเพชฌฆาต

ต้นแบบการผลิตมวลเพชฌฆาตประกอบด้วย 3 ส่วน

ขั้นตอนที่ 1 เตรียมพ่อแม่พันธุ์มวลเพชฌฆาตและพ่อแม่พันธุ์หนอนนกที่แข็งแรงระบบการ

เก็บรวบรวมมวลเพชฌฆาตจากธรรมชาติ และตามแหล่งเพาะปลูกทั่วไป ในจังหวัดราชบุรี นครปฐม และชลบุรี นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ คัดแยกมวลเพชฌฆาตตามระยะการเจริญเติบโต คัดเลือกเฉพาะตัวที่สมบูรณ์และแข็งแรงมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ (Figure 1)

ขั้นตอนที่ 2 เลี้ยงหนอนนก *Tenebrio molitor* L. เพื่อเป็นเหยื่ออาหารของมวลเพชฌฆาต

1. นำดักแด้นอนนกที่มีขนาดใหญ่และสมบูรณ์จำนวน 50 กรัม ใส่ลงในถาดพลาสติก 1 ถาด จำนวนที่เริ่มผลิตต่อถาดเป็นจำนวนที่เหมาะสมที่ทำให้จำนวนหนอนและดักแด้ที่ผลิตได้มีปริมาณที่พอเหมาะที่ทำให้หนอนและดักแด้ทุกตัวมีขนาดใหญ่และสมบูรณ์ เมื่อดักแด้มีอายุ 8 วัน จะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย

2. โรยอาหารไถ่ลงในถาด 50 กรัม เมื่อดักแด้มีอายุ 7-10 วัน จะเริ่มวางไข่ติดบนพื้นถาด โดยมีเศษอาหารปกคลุม ปล่อยไว้จนตัวเต็มวัยตายหมด และใช้ฟักเป็นหนอนขนาดเล็ก



3. ใช้ตะแกรงร่อนหนอนออกจากอาหาร ใส่ลงถาดใบใหม่เติมอาหารไก่ หนัก 50 กรัม/ถาด ให้อาหารเสริม เช่น ฟักทอง แดงกวา หรือเศษผักต่างๆ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง

4. หนอนนกตั้งแต่วัย 1-13 เลี้ยงด้วยอาหารไก่ เมื่ออาหารในถาดถูกกินจนป็นจะเติมอาหารตามความเหมาะสม เมื่อหนอนนกลอกคราบครั้งสุดท้ายจะเปลี่ยนเป็นดักแด่ อาหารจะถูกกินจนป็นเกือบหมด

5. เมื่อหนอนมีอายุประมาณ 100 วัน จะลอกคราบเป็นดักแด่

6. เก็บดักแด่ที่ได้เพื่อใช้เลี้ยงมวนเพศผสมชาติ

7. ดักแด่บางส่วนทำการเลี้ยงต่อ ดักแด่จะฟักเป็นตัวเต็มวัย เพื่อการผลิตหนอนนกรอบถัดไป

8. การทำความสะอาดถาดเลี้ยงหนอน อาจใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมา และใช้ตะแกรงร่อนเศษอาหารที่ป็นและมูลหนอนออกทิ้งทุก 30 วัน จนถึงหนอนอายุ 90 วัน และหลังจากนี้ทุก 10 วัน จะใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมาเพื่อสะดวกในการเก็บดักแด่ (Figure 2)

ขั้นตอนที่ 3 ระบบผลิตมวนเพศผสมชาติให้มีปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง

การผลิตขยายมวนเพศผสมชาติ *Sycanus versicolor* Dorhn.

1. เลี้ยงมวนเพศผสมชาติพ่อแม่พันธุ์จำนวน 50 คู่ ในกล่องพลาสติก ใช้สำลีขนาดพอประมาณ ชุบน้ำพอมาดวางบนจานรองพลาสติก และให้หนอนนกเป็นอาหาร มวนเพศผสมชาติเริ่มวางไข่หลังจากเป็นตัวเต็มวัยประมาณ 14 วัน เก็บไข่สัปดาห์ละ 1-2 ครั้ง แยกไข่มวนเพศผสมชาติใส่กล่องพลาสติกเพื่อรอการฟัก

2. ไข่ของมวนเพศผสมชาติจะฟักภายใน 14-16 วัน เลี้ยงมวนเพศผสมชาติตัวอ่อนวัย 1-2 จำนวน 600 ตัว/กล่อง ให้น้ำเปล่า และดักแด่หนอนนกเป็นอาหารของมวนเพศผสมชาติวัย 1-2

3. เลี้ยงมวนเพศผสมชาติตัวอ่อนวัย 3-5 แยกเลี้ยงกล่องละ 150 ตัว โดยให้หนอนนกหรือดักแด่หนอนนกเป็นอาหาร เก็บซากหนอนตาย ทำความสะอาดกล่องเลี้ยงหรือเปลี่ยนกล่องเลี้ยงอย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง

4. แบ่งมวนเพศผสมชาติตัวอ่อนวัย 4-5 ไปปล่อยเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช บางส่วนเลี้ยงต่อเป็นตัวเต็มวัยเพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป (Figure 3)

ต้นแบบการผลิตมวนเพศผสมชาตินี้ สามารถเลี้ยงขยายได้ปริมาณมากอย่างต่อเนื่องทุกเดือน โดยเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์มวนเพศผสมชาติ เดือนละอย่างน้อย 4 กล่อง สามารถเลี้ยงขยายมวนเพศผสมชาติได้ 46,080 ตัวต่อปี หรือเฉลี่ย 3,840 ตัวต่อเดือน (Table 1) โดยมีต้นทุนการเลี้ยงขยายประกอบด้วย ค่าแรงงาน ค่าวัสดุคงทนได้แก่ กล่องเลี้ยงแมลง อุปกรณ์เลี้ยงแมลง ถาดเลี้ยงหนอนนก และวัสดุสิ้นเปลืองได้แก่ อาหารไก่ สำลี ฟักทอง น้ำ รังไข่กระดาด จำนวน 149,100 บาทต่อปี ดังนั้นต้นทุนการผลิตมวนเพศผสมชาติ 1 ตัว เท่ากับ 3.24 บาท (Table 2) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาต้นทุนในแต่ละส่วนพบว่า แรงงานที่ใช้จากการทดลองนี้ใช้ในการเลี้ยงขยายพ่อแม่มวนเพศผสมชาติเพียง 4 กล่องเท่านั้น ยังมีศักยภาพพอที่จะเพิ่มการผลิตให้มากขึ้นอีกได้ อีกทั้งอัตราค่าแรงงานที่ใช้จากการทดลองนี้ยังอาจ



สามารถปรับได้อีกตามแต่พื้นที่การจ้างงาน ซึ่งจะทำให้ต้นทุนการผลิตในส่วนนี้ผันแปรไปได้อีก ต้นทุนอีกส่วนหนึ่งคือค่าวัสดุคงทนซึ่งได้แก่ อุปกรณ์เลี้ยงแมลง กล่องเลี้ยงแมลง ภาชนะที่ใช้เลี้ยงหนอนนก เป็นค่าวัสดุที่คิดคำนวณจากปีแรกที่เริ่มต้นการผลิต ทำให้ต้นทุนการผลิตในปีแรกค่อนข้างสูง แต่วัสดุดังกล่าวเป็นวัสดุคงทนที่มีอายุการใช้งานยาวนานหลายปี ซึ่งจะทำให้ต้นทุนการผลิตขยายมวนเพศผสมชาติในปีที่ 2 ลดลงได้อีก ดังนั้นหากพิจารณาต้นทุนเฉพาะวัสดุสิ้นเปลือง ได้แก่ อาหารไก่ ฟักทอง ลำไส้ รังไข่กระดาศ และน้ำ นั้น จะมีต้นทุนเพียง 0.37 บาทเท่านั้น อย่างไรก็ตามค่าวัสดุสิ้นเปลืองนี้ อาจมีการปรับขึ้นลงตามสภาวะตลาด และพื้นที่ได้อีกด้วย

ต้นทุนการผลิตขยายมวนเพศผสมชาติ

| รายการ | รายละเอียด | ค่าใช้จ่ายต่อเดือน (บาท) | รวมค่าใช้จ่ายต่อเดือน (บาท) | ค่าใช้จ่ายต่อปี (บาท) |
|--|---|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| ค่าแรงงาน | เลี้ยงเหยื่ออาหารและมวน เพศผสมชาติ | 10,000 | 10,000 | 120,000 |
| ค่าวัสดุคงทน | กล่องเลี้ยงแมลง 48 กล่อง อุปกรณ์เลี้ยงแมลง (ฟูกัน ปากคืบ ตะแกรง) ภาชนะเลี้ยงหนอนนก 20 ภาชนะ | 10,560 500 1,000 | - | 12,060 |
| ค่าวัสดุ สิ้นเปลือง | อาหารไก่ ลำไส้ ฟักทอง น้ำ รังไข่กระดาศ | 250 600 500 60 10 | 1,420 | 17,040 |
| รวมค่าใช้จ่ายทั้งปี | | | | 149,100 |
| ใน 1 ปี สามารถการผลิตมวนเพศผสมชาติได้จำนวน 46,080 ตัวต่อปี | | | | 3.24 บาท |
| ต้นทุนเฉลี่ยของการผลิตขยายมวนเพศผสมชาติ 1 ตัวเท่ากับ | | | | |

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ต้นแบบการผลิตมวนเพศผสมชาติให้เป็นระบบเพื่อให้ได้ปริมาณมวนเพศผสมชาติจำนวนมากเพียงพอต่อความต้องการใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยประกอบด้วย 2 ส่วน คือระบบการผลิตหนอนนกเพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหาร และระบบการผลิตมวนเพศผสมชาติ พร้อมทั้งข้อมูลต้นทุนการผลิต ค่าวัสดุต่าง รวมทั้งค่าแรงดำเนินงานในกระบวนการผลิตขยายมวนเพศผสมชาติ ซึ่งต้นทุนดังกล่าวเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถปรับหรือประยุกต์ให้เข้ากับแต่ละพื้นที่ เช่น ค่าวัสดุที่ใช้ หรือค่าแรงงาน ซึ่งหากสามารถปรับลดลงได้ ก็จะทำให้สามารถปรับลดต้นทุนการผลิตลงได้อีก และสามารถนำต้นแบบการผลิตชีวภัณฑ์นี้ไปปรับใช้ให้สอดคล้องกับช่วงเวลาและปริมาณการปลูกพืช รวมไปถึงช่วงเวลาการระบาดของศัตรูพืช ซึ่งเกษตรกรสามารถผลิตใช้ได้เลย จะช่วยทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง สามารถลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ลดปริมาณการนำเข้าสารเคมีทางการเกษตร อีกทั้งสามารถใช้ได้ในระบบ



การปลูกพืชแบบเกษตรอินทรีย์ สร้างความปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค และสามารถขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- รัตนา นชะพงษ์ และประภัสสร เขยคำแหง. 2554. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงห้ำ. หน้า 11-30 ใน: เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตร “แมลง-สัตว์ศัตรูพืช และการป้องกันกำจัด” ครั้งที่ 15, 25-29 กรกฎาคม 2554. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- รัตนา นชะพงษ์ และอุราพร หนูนารถ. 2554. การใช้มวนเพชฌฆาต *Sycanus versicolor* Dohrn.ควบคุมแมลงศัตรูพืชในหน่อไม้ฝรั่ง. ผลการวิจัยประจำปี 2554. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- รัตนา นชะพงษ์ ศิริณี พูนไชยศรี ชลิตา อุณหุฒิ พรรณเพ็ญ ชโยภาส สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี ญัฐวัฒน์ แยม ยิ้ม และ สิทธิศิริโรตม แก้วสวัสดิ์. 2548. อนุกรมวิธานมวนในสกุล *Sycanus* และ *Polytoxus* วงศ์ Reduviidae และการเก็บรักษา. หน้า 53-69. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2548 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- รัตนา นชะพงษ์. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงห้ำ. หน้า 22 - 35 ใน: เอกสารประกอบการอบรม “แมลง-สัตว์ศัตรูพืช และการป้องกันกำจัด” ครั้งที่ 11, 19-30 มีนาคม 2544. กองกัญและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- รัตนา นชะพงษ์. 2551. มวนพิฆาต. ใน: เอกสารวิชาการเทคโนโลยีการใช้ชีววินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด: กรุงเทพฯ. หน้า 27 - 42
- รัตนา นชะพงษ์ และสาทิพย์ มาลี. 2555. ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายมวนเพชฌฆาตเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช. ผลการวิจัยประจำปี 2555. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- Grundy, P.R. 2007. Utilizing the assassin bug, *Pristhesancus plagipennis* (Hemiptera: Reduviidae), as a biological control agent within an integrated pest management programme for *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) *Creontiades* spp. (Hemiptera: Miridae) in cotton (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก <http://journals.cambridge.org>. สืบค้น 8 มีนาคม 2550.
- Grundy, P.R., and D.A. Maelzer. 2002. Augmentation of the assassin bug *Pristhesancus plagipennis* (Walker) (Hemiptera: Reduviidae) as a biological control agent for *Helicoverpa* spp. in cotton (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก <http://www.blackwell-synergy.com>. สืบค้น 24 กันยายน 2550.



- Sahayaraj, K. 2002. Small-scale laboratory rearing of a reduviid predator, *Rhynocoris marginatus* Fab. (Hemiptera: Reduviidae) on *Corcyra cephalonica* stainton larvae by larval card method. Journal of Central European Agriculture. 3(4)
- Sahayaraj, K. and M. G. Paulraj. 2001. Rearing and life table of reduviid predator *Rhynocoris marginatus* Fab. (Hemiptera: Reduviidae) on *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Journal of Applied Entomology, 125(6): 321-325(5)
- Sahayaraj, K. and P. Sathiamoorthi. 2002. Influence of different diets of *Corcyra cephalonica* on life history of a reduviid predator *Rhynocoris marginatus* (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก http://www.agr.hr/jeca/issues/jcea3-1/jcea31_8.html. สืบค้น 8 มีนาคม 2550.
- Slater, J. A. and R. M. Baranowski. 1978. How to know the true Bugs. (ออนไลน์) เข้าได้จาก <http://www.ojibway.ca/bugs.asp>. สืบค้น 8 มีนาคม 2550.

Table 1 Number of 4th assassin bug nymph per mass rearing cycle.

| Mass rearing cycle | 4 th assassin bug nymph |
|--------------------|------------------------------------|
| October 2020 | 3,845 |
| November 2020 | 3,810 |
| December 2020 | 3,936 |
| January 2021 | 3,608 |
| February 2021 | 3,650 |
| March 2021 | 3,880 |
| April 2021 | 4,040 |
| May 2021 | 3,915 |
| June 2021 | 3,980 |
| July 2021 | 3,842 |
| August 2021 | 3,850 |
| September. 2021 | 3,724 |
| total | 46,080 |



Table 2 Unit cost of Assassin Bug Mass Rearing.

| COST | Cost /Year (bath) |
|-----------------------------|-------------------|
| Fix cost | 12,060 |
| -insect box | |
| -forceps | |
| -Plastic tray | |
| Etc. | |
| Variable cost | 17,040 |
| -chicken food | |
| -pumpkin | |
| -absorbent cotton | |
| -water | |
| Etc. | |
| Labor cost | 120,000 |
| total | 149,100 |
| unit costs per Assassin bug | 3.24 |





Figure 1 adult of Assassin bug (*Sycanus versicolor*)



Figure 2 Mealworm and pupa for Assassin bug mass rearing



Figure 3 Assassin bug (*Sycanus versicolor*) mass rearing

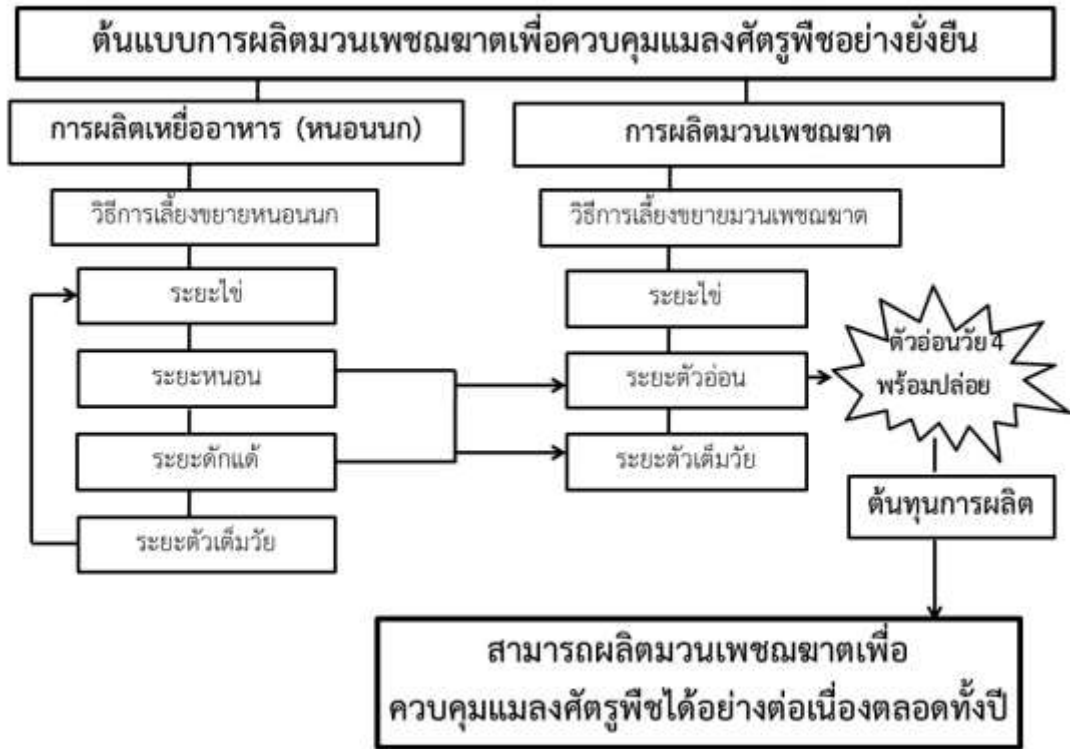


Figure 3 Pilot plant of assassin bug (*Sycanus versicolor*) mass rearing diagram

ต้นแบบการผลิตมวนพิฆาตอย่างเป็นระบบเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน
 Pilot Plant of Predatory Stink bugs Mass Rearing
 for Sustainable Pest Control

สาทิพย์ มาลี สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี ประภัสสร เขยคำแหง
 ภัทรพร สรรพอนุเคราะห์ นันทนัช พินศรี
 กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The research project of pilot plant of predatory stink bugs (*Eocanthecona furcellata* (Wolff)) mass rearing for sustainable pest control has been conducted between October 2019 to September 2021 at the Plant Protection Research Development Office Laboratory, Department of Agriculture. This project aims to organize an effective system of simultaneous bio-production to control pests and to produce a prototype bio-product for controlling pests effectively and sustainably and to be able to expand the production of bio-products for commercialization. The results revealed, the prototype production of Predatory Stink bugs was able to produce in average of 3,631 Predatory Stink bugs per month. The production costs were 3.39 baht per Predatory Stink bugs.

Keywords : Biological control, predatory stink bugs, mass rearing

บทคัดย่อ

ต้นแบบการผลิตมวนพิฆาตอย่างเป็นระบบเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน ทำการศึกษาที่ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างต้นแบบการผลิตมวนพิฆาตให้มีความต่อเนื่อง และสามารถขยายผล การผลิตเป็นชีวิตินทรีย์สู่เชิงพาณิชย์ได้ โดยมีเป้าหมายถ่ายทอดให้แก่เกษตรกรและผู้สนใจสามารถ นำไปปฏิบัติตามได้ จากการทดลองพบว่าสามารถสร้างต้นแบบการผลิตขยายมวนพิฆาตได้ปริมาณมาก อย่างต่อเนื่องทุกเดือน โดยมีต้นทุนการเลี้ยงขยายประกอบด้วยค่าแรงงาน ค่าวัสดุคงทนให้แก่ กล่องเลี้ยงแมลง อุปกรณ์เลี้ยงแมลง ถาดเลี้ยงหนอนนก และวัสดุสิ้นเปลืองให้แก่ อาหารไก่ สาลี ฟักทอง น้ำสามารถผลิตขยายมวนพิฆาตได้เฉลี่ย 3,631 ตัวต่อเดือน โดยมีต้นทุนผลิตตัวละ 3.39 บาท

คำหลัก : การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี, มวนพิฆาต, การผลิตขยาย

รหัสการทดลอง 03-05-62-04-00-04-63



คำนำ

การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีเป็นองค์ประกอบหลักในการแก้ไขปัญหาศัตรูพืชที่ทำลายผลผลิตทางการเกษตร ศัตรูพืชสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในผลผลิตที่ใช้บริโภคและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังช่วยลดการใช้สารฆ่าแมลง และลดมูลค่าการนำเข้าของสารฆ่าแมลง ดังนั้นความพยายามในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีจึงเป็นสิ่งที่ขาดไม่ได้ในปัจจุบันและอนาคต

การผลิตขยายและการนำชีววินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์เป็นงานวิจัยและพัฒนาที่ต้องอาศัยข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาชีววินทรีย์ทั้งที่มีอยู่ในประเทศ หรือชนิดใหม่ๆ ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ต้องวิจัยพัฒนาขบวนการที่เหมาะสมในการผลิตและการนำไปใช้ประโยชน์ในสภาพไร์ หากพบว่ามีศักยภาพที่สามารถนำมาผลิตขยายให้ได้ปริมาณมาก มีรูปแบบการผลิตที่เป็นระบบที่สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง จะต้องมีการศึกษาประสิทธิภาพ อัตราการใช้ เวลาที่เหมาะสม การศึกษารูปแบบบรรจุภัณฑ์ที่สามารถรักษาคุณภาพชีววินทรีย์ที่ผลิตได้ยาวนานและยังคงมีประสิทธิภาพ อีกทั้งสามารถนำไปใช้ได้สะดวก เป็นงานวิจัยที่ต้องวิจัยอย่างครบวงจร เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ชีววินทรีย์ที่ดี มีคุณภาพ สามารถนำไปใช้ควบคุมศัตรูพืชได้ดี การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี จะประสบความสำเร็จในการควบคุมศัตรูพืชอย่างยั่งยืนนั้น จำเป็นต้องศึกษารูปแบบการผลิตที่เป็นระบบที่สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง เพื่อผลิตชีวภัณฑ์ให้มีคุณภาพและมีปริมาณมากเพียงพอต่อการใช้ควบคุมศัตรูพืชได้อย่างทันทั่วถึง

มวนพิฆาต *Eocanthecona furcellata* (Wolff) เป็นแมลงห้ำที่มีประสิทธิภาพในการทำลายแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้ผัก และหนอนใยผัก เป็นต้น ซึ่งศัตรูพืชเหล่านี้กำลังเป็นปัญหาเกี่ยวกับพืชผัก ไม้ดอก ไม้ผล และพืชไร่หลายชนิดเนื่องจากแมลงศัตรูพืชดังกล่าวสามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีฆ่าแมลงจึงมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มพูนความสำคัญมากขึ้นเรื่อยๆ รัตนา (2551) การผลิตขยายมวนพิฆาต ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน

1. การผลิตขยายเหยื่ออาหารของมวนพิฆาต

- 1.1 การผลิตขยายหนอนกระทู้ผักด้วยอาหารเทียม
- 1.2 การผลิตขยายหนอนนกด้วยอาหารไก่สำเร็จรูป

2. การผลิตขยายมวนพิฆาต

- 2.1 การผลิตขยายมวนพิฆาต ตัวอ่อน ระยะ 2-3 โดยใช้ดักแด้หนอนนก
- 2.2 การผลิตขยายมวนพิฆาต ตัวอ่อน ระยะ 3-5 และตัวเต็มวัย โดยใช้หนอนกระทู้ผัก

รัตนา และประภัสสร (2554) รายงานว่า ประสิทธิภาพในการทำลายแมลงศัตรูพืช มวนพิฆาต เป็นแมลงห้ำมีความสามารถสูงในการกินหนอนศัตรูพืช มวนพิฆาตตัวอ่อนวัย 2 – 5 จำนวน 1 ตัว สามารถทำลายหนอนได้เฉลี่ย 80 ตัว มวนพิฆาตตัวเต็มวัยสามารถทำลายหนอนได้เฉลี่ย 130 ตัว และตลอดชีวิตของมวนพิฆาตสามารถทำลายหนอนประมาณ 180 – 260 ตัว หรือโดยเฉลี่ย 5 – 7 ตัว/วัน

มวนพิฆาตจึงเป็นมวนตัวห้ำอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพที่จะส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงขยายเพื่อนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช การควบคุมศัตรูพืชโดยใช้มวนพิฆาตจะประสบความสำเร็จนั้น



จำเป็นต้องศึกษารูปแบบการผลิตที่เป็นระบบที่สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง เพื่อผลิตขยายมวนพินชาติ ให้มีคุณภาพและมีปริมาณมากเพียงพอต่อการใช้ควบคุมศัตรูพืชได้อย่างทันท่วงที สามารถจัดทำต้นแบบการผลิต เพื่อเป็นแหล่งเรียนรู้ สาธิต เผยแพร่วิธีการผลิตขยายมวนพินชาติที่มีคุณภาพ เป็นปริมาณมาก ให้แก่หน่วยงาน องค์กร กลุ่มเกษตรกร และผู้สนใจ นำไปผลิตขยายเพื่อควบคุมศัตรูพืชอย่างยั่งยืน หรือสามารถขยายผลการผลิตสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถาดพลาสติกขนาด
2. อาหารไก่
3. ถาดพลาสติกขนาด 28x43x10 เซนติเมตร
4. สำลี
5. ตะแกรงสำหรับร่อน
6. กล่องพลาสติกเหลี่ยมใสขนาด 19x28x10 เซนติเมตร มีช่องระบายอากาศด้านบนที่ปิดด้วยมุ้งลวดตาถี่
7. พู่กันเบอร์ 12
8. ปากคีบ
9. หนอนนก

วิธีการ

1. ระบบการผลิตหนอนเพื่อเป็นเหยื่ออาหารที่เหมาะสมเพื่อการเลี้ยงขยายมวนพินชาติ (2563)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ดำเนินการวิเคราะห์และจัดทำรูปแบบกระบวนการผลิต หรือจัดการแก้ไขให้ได้รูปแบบที่เหมาะสมสำหรับผลิตขยายมวนพินชาติและเหยื่ออาหาร โดยวิเคราะห์ถึงประสิทธิภาพ คุณภาพ และต้นทุนผลิตระยะเวลาการผลิต ประกอบด้วย

1. จัดทำระบบการผลิตหนอนนกเพื่อเป็นเหยื่ออาหารของมวนพินชาติ

วางแผนการผลิตขยายหนอนนกให้ต่อเนื่องให้เพียงพอต่อการเลี้ยงขยายมวนพินชาติวัย 2 3 4, 5 และตัวเต็มวัย เพื่อการผลิตพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพได้ตลอดปี ให้มีความสอดคล้องกับการผลิตขยายมวนพินชาติ และตามวิธีการผลิตขยายหนอนนกที่ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว เพื่อให้ได้ปริมาณมากและในช่วงเวลาที่กำหนด ตามองค์ประกอบต่างๆ เช่น อาหารและปริมาณอาหารที่เหมาะสม จำนวนหนอนที่เหมาะสมต่อภาชนะที่ใช้เลี้ยง

บันทึกผล

1. วิธีการปฏิบัติที่เหมาะสมเป็นระบบ,



2. ปริมาณดักแด้ที่ผลิตได้
3. ปริมาณอาหารไก่ที่ใช้
4. ต้นทุนการผลิต และระยะเวลาการผลิตที่ต่อหน่วยการผลิต

2 การจัดการระบบผลิตมวนพิฆาตเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน(2564)

วางแผนการผลิตขยายมวนพิฆาตเพื่อให้ได้มวนพิฆาตวัย 3 ที่พร้อมนำไปปล่อยควบคุมศัตรูพืชอย่าง 3,000 ตัวต่อเดือน ให้มีความสอดคล้องกับการผลิตเหยื่ออาหาร และตามวิธีการผลิตขยายมวนพิฆาตที่ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว ให้ได้ปริมาณมากและในช่วงเวลาที่กำหนด โดยกำหนดให้สามารถผลิตมวนพิฆาตที่พร้อมสำหรับปล่อยตามองค์ประกอบต่างๆ เช่น ชนิดอาหารที่เหมาะสม จำนวนมวนพิฆาตที่เหมาะสมต่อภาชนะที่ใช้เลี้ยง ระยะเวลาการเก็บรักษามวนพิฆาตระยะต่างๆ

การบันทึกผล

- ค่าใช้จ่าย ค่าวัสดุอุปกรณ์ ในการเลี้ยงขยายมวนพิฆาตและเหยื่ออาหาร
- จำนวน มวนพิฆาตที่ผลิตได้ต่อครั้ง และต่อปี
- จำนวนเหยื่ออาหารที่ใช้เป็นอาหารของ มวนพิฆาต ในการผลิตต่อครั้ง และต่อปี
- คำนวณค่าเฉลี่ยของต้นทุนการผลิต และขีดความสามารถในการผลิตขยายมวนพิฆาต

โดยคำนึงถึงการคุ้มทุนมากที่สุด

การวิเคราะห์ผล เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายการผลิตต่อพื้นที่การผลิต ระยะเวลาการผลิต และปริมาณมวนพิฆาตที่ผลิตได้

สถานที่ทำการทดลอง : กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564 (รวม 2 ปี)

สถานที่ทำการทดลอง : กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ระบบการผลิตมวนพิฆาต ประกอบด้วย 2 ส่วน

1. ระบบการผลิตหนอนนก *Tenebrio molitor* L. เพื่อเป็นเหยื่ออาหารที่เหมาะสมเพื่อการเลี้ยงขยายมวนพิฆาต

ทดสอบระบบการผลิตหนอนนกเพื่อใช้เลี้ยงมวนพิฆาต ใช้ดักแด้พ่อแม่พันธุ์หนอนนก 50 กรัม ต่อกล่อง รุ่งละ 3 ถาด ให้อาหารไก่สำเร็จรูปและฟักทอง เพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารในการผลิตมวนพิฆาต โดยหนอนนกอายประมาณ 60 วันขึ้นไป จะมีขนาดที่สามารถใช้เลี้ยงมวนพิฆาตได้ดี วิธีการเลี้ยงขยายหนอนนก



1. ใส่อาหารไก่อลงในถาด 50 กรัม นำดักแด้หนอนนกที่มีขนาดใหญ่และสมบูรณ์จำนวน 50 กรัม ใส่ลงในถาดพลาสติก 1 ถาด จำนวนที่เริ่มผลิตต่อถาดเป็นจำนวนที่เหมาะสมที่ทำให้จำนวนหนอนและดักแด้ที่ผลิตได้มีปริมาณที่พอเหมาะที่ทำให้หนอนและดักแด้ทุกตัวมีขนาดใหญ่และสมบูรณ์ เมื่อดักแด้มีอายุ 7-8 วัน จะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย
2. เมื่อตัวเต็มวัยอายุ 7-10 วัน จะเริ่มวางไข่ติดบนพื้นถาดโดยมีเศษอาหารปกคลุม ใช้ตะแกรงร่อนตัวเต็มวัยของหนอนนกออกใส่ถาดใหม่ที่ใส่อาหารไก่อไว้ทุก 2 สัปดาห์ จนตัวเต็มวัยตายหมด
3. ไข่จะฟักเป็นหนอนขนาดเล็ก เติบโตอาหารไก่อ และ ให้อาหารเสริม เช่น ฟักทอง แดงกวา หรือเศษผักต่างๆ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง
4. หนอนนกกตั้งแต่วัย 1-13 เลี้ยงด้วยอาหารไก่อ เมื่ออาหารในถาดถูกกินจนปน ใช้ตะแกรงร่อนหนอนออกจากอาหารและเติมอาหารตามความเหมาะสม จนหนอนนกลอกคราบเปลี่ยนเป็นดักแด้
5. เมื่อหนอนมีอายุประมาณ 100 วัน จะลอกคราบเป็นดักแด้
6. เก็บดักแด้ที่ได้เพื่อใช้เลี้ยงมวนพิฆาต
7. ดักแด้บางส่วนทำการเลี้ยงต่อ ดักแด้จะฟักเป็นตัวเต็มวัย เพื่อการผลิตหนอนนกรอถัดไป
8. การทำความสะอาดถาดเลี้ยงหนอน อาจใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมา และใช้ตะแกรงร่อนเศษอาหารที่ปนและมูลหนอนออกทิ้งทุก 30 วัน จนถึงหนอนอายุ 90 วัน และหลังจากนี้ทุก 10 วัน จะใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมาเพื่อสะดวกในการเก็บดักแด้

2 การจัดการระบบผลิตมวนพิฆาตเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืช

การเพาะเลี้ยงมวนพิฆาต *E. furcellata*

1. เลี้ยงมวนพิฆาตพ่อแม่พันธุ์จำนวน 50 คู่ ต่อกล่อง จำนวน 4 กล่อง ใช้สำลีขนาดพอประมาณ ชุบน้ำพอมาดวางบนจานรองพลาสติก และให้หนอนนกกเป็นอาหาร ใส่วัสดุสำหรับให้มวนพิฆาตเกาะ เช่น กิ่งไม้ มวนพิฆาตจะเริ่มวางไข่หลังจากเป็นตัวเต็มวัย 7 วัน เก็บไข่สัปดาห์ละ 2 ครั้ง แยกไข่มวนพิฆาตใส่กล่องพลาสติกเพื่อรอการฟัก
2. ไข่ของมวนพิฆาตจะฟักภายใน 6-7 วัน ให้นำเปล่า และดักแด้หนอนนกกเป็นอาหารของมวนพิฆาตวัย 1-2
3. เลี้ยงมวนพิฆาตตัวอ่อนวัย 3-5 แยกเลี้ยงกล่องละ 150 ตัว โดยให้หนอนนกกเป็นอาหาร เก็บซากหนอนตาย ทำความสะอาดกล่องเลี้ยงหรือเปลี่ยนกล่องเลี้ยง อย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง
4. แบ่งตัวอ่อนวัย 3-4 ไปปล่อยเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช บางส่วนเลี้ยงต่อเป็นตัวเต็มวัยเพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป

จากการทดสอบระบบการผลิตมวนพิฆาตให้สามารถเลี้ยงขยายได้ปริมาณมากอย่างต่อเนื่องทุกเดือน เดือนละ 4 กล่อง เป็นเวลา 12 เดือน พบว่าสามารถผลิตขยายมวนพิฆาตวัย 3 ได้ เฉลี่ย 3,631 ตัว/เดือน หรือ 43,572 ตัวต่อปี (ตารางที่ 1) โดยมีต้นทุนการผลิตตลอดทั้งปี ดังนี้ ค่าแรงงาน จำนวน 1 คน 120,000 บาท ต่อปี ค่าวัสดุคงทน ได้แก่ อุปกรณ์เลี้ยงแมลง กล่องเลี้ยงแมลง ถาดที่ใช้เลี้ยง



หนอนนก จำนวน 10,260 บาท ค่าวัสดุสิ้นเปลืองได้แก่ อาหารไก่ ฟักทอง สำลี และน้ำ จำนวน 15,480 บาท รวมทั้งสิ้น 147,540 บาทต่อปี ต้นทุนเฉลี่ยของการผลิตขยายมวนพิฆาต 1 ตัวเท่ากับ 3.39 บาท (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาต้นทุนในแต่ละส่วนพบว่า แรงงานที่ใช้จากการทดลองนี้ใช้ในการเลี้ยงขยายพ่อแม่มวนพิฆาตเพียง 4 กล่องเท่านั้น ยังมีศักยภาพพอที่จะเพิ่มการผลิตให้มากขึ้นอีกได้ อีกทั้งอัตราค่าแรงงานที่ใช้จากการทดลองยัง อาจสามารถปรับลงได้อีกตามแต่พื้นที่ การจ้างงาน ซึ่งจะทำให้ต้นทุนการผลิตในส่วนนี้ลดลงได้อีก ต้นทุนอีกส่วนหนึ่งคือค่าวัสดุคงทนซึ่งได้แก่ อุปกรณ์เลี้ยงแมลง กล่องเลี้ยงแมลง ถาดที่ใช้เลี้ยงหนอนนก เป็นค่าวัสดุที่คิดคำนวณจากปีแรกๆ ที่เริ่มต้นการผลิต ทำให้ต้นทุนการผลิตในปีแรกค่อนข้างสูง แต่วัสดุดังกล่าวเป็นวัสดุคงทนที่มีอายุการใช้งานยาวนานหลายปี ซึ่งจะทำให้ต้นทุนการผลิตขยายมวนพิฆาตในปีที่ 2 ลดลงได้อีก ดังนั้นหากพิจารณาต้นทุนเฉพาะวัสดุสิ้นเปลือง ได้แก่ อาหารไก่ ฟักทอง สำลี และน้ำ นั้น จะมีต้นทุนเพียง 0.36 บาทเท่านั้น อย่างไรก็ตามค่าวัสดุสิ้นเปลืองนี้ อาจมีการปรับขึ้นลงตามสภาวะตลาด พื้นที่ได้อีกด้วย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ต้นแบบการผลิตมวนพิฆาต ได้จัดทำรูปแบบการผลิตมวนพิฆาต ให้เป็นระบบแบบครบวงจร เพื่อให้ได้มวนพิฆาตจำนวนมากเพียงพอต่อความต้องการ โดยประกอบด้วย 2 ส่วน คือระบบการผลิตหนอนนกเพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหาร และระบบการผลิตมวนพิฆาต พร้อมทั้งข้อมูลต้นทุนการผลิต ค่าวัสดุต่าง รวมทั้งค่าแรงดำเนินงานในกระบวนการผลิตขยายมวนพิฆาต ซึ่งต้นทุนดังกล่าวเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถปรับหรือประยุกต์ให้เข้ากับแต่ละพื้นที่ เช่น ค่าวัสดุที่ใช้ หรือค่าแรงงานซึ่งหากสามารถปรับลดลงได้ ก็จะทำให้สามารถปรับลดต้นทุนการผลิตลงได้อีก และสามารถนำต้นแบบการผลิตชีวภัณฑ์นี้ไปปรับใช้ให้สอดคล้องกับช่วงเวลาและปริมาณการปลูกพืช รวมไปถึงช่วงเวลาการระบาดของศัตรูพืช ซึ่งเกษตรกรสามารถผลิตใช้ได้เลย จะช่วยทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง สามารถลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ลดปริมาณการนำเข้าสารเคมีทางการเกษตร อีกทั้งสามารถใช้ได้ในระบบการปลูกพืชแบบเกษตรอินทรีย์ สร้างความปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค และสามารถขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- รัตนา นชะพงษ์ สุพันธ์ จิตต์ชื่น สติธัย ปฐมรัตน์ และพิมลพร นันทะ. 2542. การใช้มวนพิฆาตในการควบคุมหน่อไม้ฝรั่ง. รายงานผลการวิจัยปี 2542. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- รัตนา นชะพงษ์. 2543. การนำมวนพิฆาตมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารวิชาการการอบรมหลักสูตรการผลิตศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูพืชเพื่อการค้า. สำนักการศึกษาคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. 81-85.



รัตนา นชะพงษ์. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงห้ำ. เอกสารการอบรมหลักสูตรแมลง
ศัตรูศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด ครั้งที่ 11. กองกสิกรรมและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า
22-35.

อินทวัฒน์ บุรีคำ และบรรพต ณ ป้อมเพชร. 2521. คุณลักษณะทางชีววิทยาของมวนตัวห้ำ
Cantheconidea furcellata (Wolff) (Hemiptera: Pentatomidae). เอกสารวิชาการ
ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวิวิธีแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 13 น.

Chu, Y. I. and C. M. CHU. 1976. Feeding habit of *Eocanthecona furcellata* (Wolff). Rev.
Appl. Entomol. Ser. A. 64(7): 1182.

Table 1 Number of 3th nymph predatory stink bug nymph per mass rearing cycle.

| Mass rearing cycle | 3 th nymph predatory stink bug nymph |
|--------------------|---|
| October 2020 | 3,513 |
| November 2020 | 3,790 |
| December 2020 | 3,712 |
| January 2021 | 3,665 |
| February 2021 | 3,572 |
| March 2021 | 3,472 |
| April 2021 | 3,425 |
| May 2021 | 3,428 |
| June 2021 | 3,810 |
| July 2021 | 3,640 |
| August 2021 | 3,825 |
| September. 2021 | 3,720 |
| total | 43,572 |



Table 2 The unit cost of predatory stink bug (*Eocanthecona furcellata* (Wolff)) mass rearing.

| COST | Cost /Year (bath) |
|------------------------------------|-------------------|
| Fix cost | 12,060 |
| -insect box | |
| -forceps | |
| -Plastic tray | |
| Etc. | |
| Variable cost | 15,480 |
| -chicken food | |
| -pumpkin | |
| -absorbent cotton | |
| -water | |
| Etc. | |
| Labor cost | 120,000 |
| total | 147,540 |
| unit costs per predatory stink bug | 3.39 |



Figure 1 mealworm pupa (*Tenebrio molitor* L.)



Figure 2 meal worm adult (*Tenebrio molitor* L.)



Figure 3 mealworm (*Tenebrio molitor* L.)



Figure 4.1 predatory stink bug (*Eocanthecona furcellata* (Wolff)) mass rearing



Figure 4.2 predatory stink bug (*Eocanthecona furcellata* (Wolff)) mass rearing

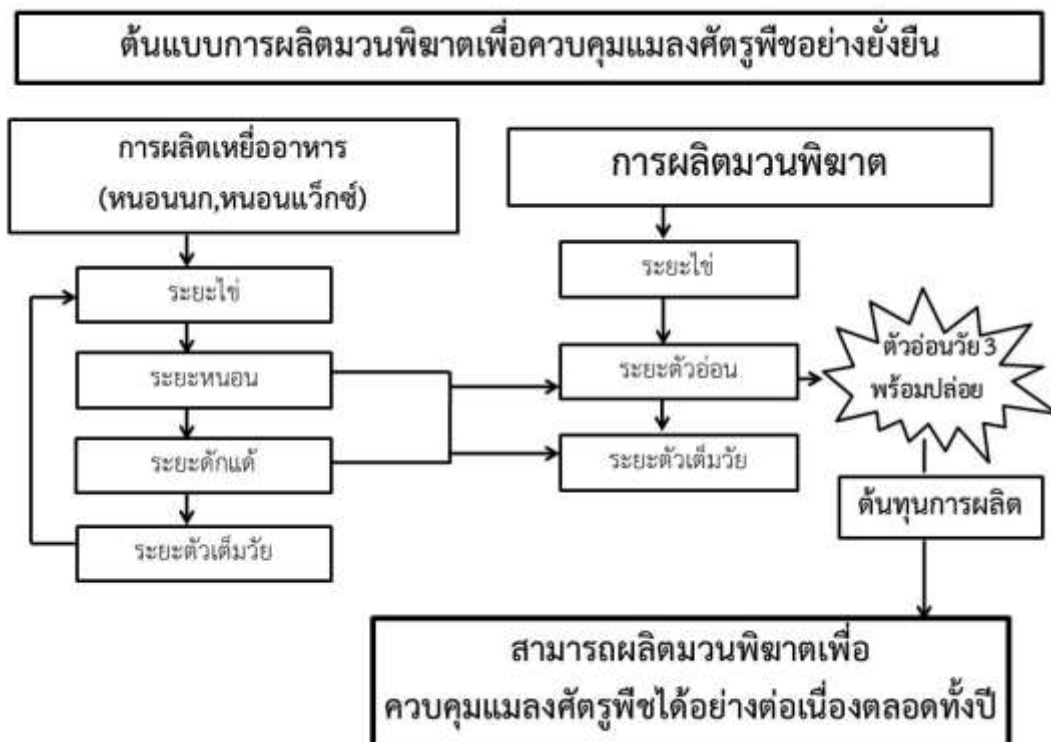


Figure 3 Pilot plant of predatory stink bug (*Eocanthecona furcellata* (Wolff)) mass rearing diagram.

การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลัมสดนำเข้าจาก
สาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล

Study on Pest Risk Analysis of fresh plum fruit imported from
Republic of South Africa and State of Israel

วรัญญา มาลี^{1/} อมรพร คุณะพันธ์^{1/} สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ^{1/}

สุนัดดา เขาวลิต^{2/} ชนินทร ดวงสะอาด^{3/}

^{1/}กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The Study on Pest Risk Analysis of fresh plum fruit imported from the Republic of South Africa and the State of Israel was carried out at the plant quarantine research group, Plant Protection Development Office from October 2018 to September 2021 to identify the quarantine pests of concern of Thailand and phytosanitary measures as a risk management. The risk assessment identified three high-risk quarantine pests, including *Ceratitis capitata* (Mediterranean fruit fly), *Ceratitis rosa* (natal fruit fly), and *Thaumatotibia leucotreta* (False codling moth). There are required specific risk management measures such as pre-shipment cold disinfestation treatment or in-transit cold disinfestation treatment, irradiation or plum fruit must be sourced from the fruit fly free area. Pest risk management for other quarantine pests is methyl bromide fumigation, pest management in orchards, and management in the packing house (sorting, cleaning, and packing in the secure packaging to prevent the re-infestation of pests). The consignments should be inspected and certified that they are free from quarantine pests concerned of Thailand.

Keywords : pest risk analysis, plum, import, South Africa and Israel

รหัสการทดลอง 03-04-59-01-02-00-12-62



บทคัดย่อ

ดำเนินการศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลัมสดนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้ และรัฐอิสราเอล ที่กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างเดือนตุลาคม 2561-กันยายน 2564 มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบรายชื่อศัตรูพืชกักกันและหาแนวทางการกำหนดมาตรการด้านสุขอนามัยพืชสำหรับการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันในการนำเข้าผลพลัมสดจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล โดยดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (ISPM no. 2 และ 11) ผลการศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลัมสดนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล ได้รายชื่อศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูง จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *Ceratitidis Capitata*, *Ceratitidis rosa* และ หนอนผีเสื้อ *Thaumatotibia Leucotreta* ซึ่งมีแนวทางการกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน 3 ชนิดดังกล่าว โดยให้ประเทศคู่ค้าดำเนินการจัดการกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็นก่อนการส่งออกหรือระหว่างการขนส่ง สำหรับมาตรการอื่นๆ ที่กำหนดให้ดำเนินการก่อนส่งออก ณ ประเทศต้นทาง เช่น การรวมผลพลัมสดด้วยสารรมเมทิลโบรไมด์ การบริหารจัดการศัตรูพืชในสวนอย่างถูกต้องและเหมาะสม การจัดการหลังการเก็บเกี่ยวภายในโรงคัดบรรจุที่มีกระบวนการคัดเลือกผลผลิต การทำความสะอาดเพื่อกำจัดศัตรูพืชบางชนิดที่ทำลายอยู่บนผิวของผลไม้ บรรจุในภาชนะที่ป้องกันการเข้าทำลายซ้ำของศัตรูพืชได้ และสุ่มผลพลัมเพื่อตรวจสอบและรับรองว่าปราศจากศัตรูพืชกักกัน เป็นต้น

คำหลัก : วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช พลัม นำเข้า แอฟริกาใต้ อิสราเอล

คำนำ

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ซึ่งมีผลบังคับใช้ในปัจจุบัน ได้แบ่งประเภทของพืชออกเป็น 3 ชนิดคือ สิ่งต้องห้าม สิ่งกักกัก และสิ่งไม่ต้องห้าม การนำเข้าสิ่งต้องห้ามเข้ามาในราชอาณาจักรสามารถกระทำได้ตามวัตถุประสงค์ 3 ประการ คือ (1) เพื่อทำการวิจัย (2) เพื่อการค้า และ (3) เพื่อกิจการอื่น ในพระราชบัญญัติกักพืชดังกล่าว มาตรา 8 (2) ได้ระบุว่า การนำเข้าหรือนำผ่านสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้าต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขที่อธิบดีกำหนด ซึ่งหลังจากพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 มีผลใช้บังคับตั้งแต่ 28 สิงหาคม 2551 ประเทศใดที่ประสงค์ส่งออกพืชหรือผลผลิตพืชที่เป็นสิ่งต้องห้ามเข้ามายังราชอาณาจักรไทยเพื่อการค้า จะต้องแสดงความประสงค์โดยมีหนังสือเป็นทางการมายังกรมวิชาการเกษตรซึ่งเป็นหน่วยงานองค์การอารักขาพืชของประเทศไทยเพื่อพิจารณาและดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชให้เสร็จสิ้น รวมถึงกำหนดเงื่อนไขการนำเข้า สินค้านั้นจึงจะสามารถนำเข้ามาในราชอาณาจักรได้โดยต้องปฏิบัติตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขตามที่กำหนด



สาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอลแจ้งความประสงค์ขออนุญาตนำเข้าผลไม้หลายรายการรวมถึงผลพลัมสด *Prunus salicina* และ *Prunus domestica* ซึ่งจัดเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 สำหรับผลพลัมนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้มีศัตรูพืชที่สำคัญ เช่น แมลงวันผลไม้ *Ceratitis capitata*, *Ceratitis rosa* หนอนเจาะผล *Grapholita molesta*, *Cydia pomonella* เพลี้ยหอย *Lepidosaphes ulmi* รา *Botryotinia fuckeliana* แบคทีเรีย *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* เป็นต้น (CABI, 2020) และศัตรูพลัมที่มีรายงานพบในอิสราเอล เช่น แมลงวันผลไม้ *C. capitata* หนอนเจาะผล *Cydia pomonella*, *Lobesia botrana* ไร *Aculus fockeui* เพลี้ยหอย *Aspidiotus camellaia* เป็นต้น (PPIS, 2008; CABI, 2020) และศัตรูพืชอีกหลายชนิดที่อาจติดมากับผลพลัมนำเข้า หากศัตรูพืชดังกล่าวสามารถเข้ามาเจริญแพร่พันธุ์และทำความเสียหายแก่พืชในประเทศไทย อาจเกิดผลกระทบต่อพืชโดยตรงทำให้สูญเสียผลผลิต หรือมีผลกระทบต่อ การส่งออกผักผลไม้ไทยไปยังประเทศที่เข้มงวดด้านกักกันพืช เช่น สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น อาจระงับการนำเข้าผลไม้ที่เป็นพืชอาศัยของศัตรูพืชกักกันของประเทศดังกล่าวทำให้สูญเสียตลาดและรายได้เข้าประเทศ หรือกำหนดให้ต้องกำจัดศัตรูพืชกักกันก่อนส่งออกซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องดำเนินการศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลัมสด ที่นำเข้าจากแหล่งดังกล่าว โดยใช้แนวทางการวิเคราะห์ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for pest risk analysis 2007) (FAO, 2016a) และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest risk analysis for quarantine pests 2013) (FAO, 2016b) เพื่อทราบชนิดของศัตรูพืชกักกันและมาตรการทางวิชาการด้านสุขอนามัยพืชสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสม ใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการออกกฎระเบียบ/กฎหมายเพื่อควบคุมการนำเข้า ซึ่งเป็นมาตรการป้องกันมิให้ศัตรูพืชร้ายแรงจากต่างประเทศเข้ามาในประเทศไทยต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Framework for Pest Risk Analysis (2007))
2. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (2013))
3. หนังสือ ตำรา วารสาร เอกสารวิชาการที่เกี่ยวข้อง และฐานข้อมูลออนไลน์ เช่น Crop Protection Compendium, Description of Fungi and Bacteria, Description Maps of Plant Pests, Description Maps of Plant Diseases เป็นต้น



วิธีการ

1. การสืบค้นและรวบรวมข้อมูล

1.1 สืบค้นและรวบรวมข้อมูลทั่วไปของพุ่ม เช่น ชื่อ ชนิด สายพันธุ์ สถิติการนำเข้า ส่งออก แหล่งผลิต ผลผลิต เป็นต้น

1.2 สืบค้นและรวบรวมข้อมูลศัตรูพุ่ม เช่น ชื่อ ชนิด สายพันธุ์ พิษอาศัย ลักษณะการทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายของผลผลิตที่เกิดจากการทำลายของศัตรูพุ่ม ศัตรูพุ่มที่มีรายงานว่า เป็นศัตรูพุ่มในสาธารณรัฐแอฟริกาใต้ รัฐอิสราเอล ประเทศไทย และประเทศอื่น ๆ

2. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพุ่ม

ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพุ่มตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการ สุขอนามัยพุ่ม (ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง กรอบสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพุ่ม (Framework for Pest Risk Analysis) (FAO, 2007) และฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพุ่มสำหรับ ศัตรูพุ่มกักกัน (Pest risk analysis for quarantine pests 2013) (FAO, 2014) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพุ่ม (Stage 1: Initiation)

วิเคราะห์เพื่อให้ทราบ

1.1 จุดเริ่มต้นของการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพุ่มว่าอาจเกิดจากศัตรูพุ่ม (pest) หรือ เส้นทางที่ศัตรูพุ่มจะติดเข้ามา (pathway) หรือการทบทวนนโยบาย (policy) ของประเทศ ซึ่งเกี่ยวข้องกับทางกักกันพุ่ม

1.2 กำหนดพื้นที่ที่จะทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพุ่มให้ชัดเจน

1.3 ตรวจสอบว่าเคยมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงโดยศัตรูพุ่ม หรือเส้นทางศัตรูพุ่ม หรือนโยบายของรัฐบาลมาก่อนหรือไม่ ทั้งภายในประเทศและในต่างประเทศ กรณีที่มีการดำเนินการวิเคราะห์ ความเสี่ยงศัตรูพุ่มมาแล้ว ให้ตรวจสอบดูว่ายังมีความเหมาะสมสามารถนำมาใช้ได้หรือไม่ พิจารณาความเป็นไปได้ในการนำเอาการวิเคราะห์ความเสี่ยงจากเส้นทางศัตรูพุ่มที่เหมือนกัน หรือศัตรูพุ่ม ที่เหมือนกัน มาใช้เพียงบางส่วนหรือทั้งหมด

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพุ่ม (Stage 2: Pest Risk Assessment)

มี 4 ขั้นตอน ที่สัมพันธ์กัน ดังนี้

2.1 การจัดกลุ่มศัตรูพุ่ม (Pest categorization)

2.1.1 พิจารณาแบ่งกลุ่มของชนิดศัตรูพุ่ม เช่น แมลง ไร ไวรัส แบคทีเรีย และ รา เป็นต้น

2.1.2 ตรวจสอบว่าเป็นศัตรูพุ่มที่มีพบในประเทศไทยหรือไม่ รวมถึงสถานภาพ การควบคุมศัตรูพุ่มดังกล่าวในประเทศไทย



2.1.3 พิจารณาคัดเลือกเฉพาะศัตรูพืชมที่ไม่พบในประเทศไทย หรือพบแต่มีการควบคุมอย่างเป็นทางการ ที่มีศักยภาพในการเข้ามา ตั้งรกราก และแพร่กระจายในประเทศไทยได้ตลอดจนอาจก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจหากศัตรูเข้ามาได้ในประเทศไทยในภาพรวม

บันทึกข้อมูล: รายละเอียดของศัตรูพืชมแต่ละชนิด ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย/อาศัย และเป็นพาหะของศัตรูพืชชนิดอื่นหรือไม่

2.2 การประเมินโอกาสการนำเข้ามา และแพร่กระจาย (Assessment of the probability of introduction and spread) ของศัตรูพืชในประเทศไทย

2.2.1 ประเมินโอกาสการนำเข้ามา (การนำเข้า และการตั้งรกราก)

2.2.1.1 ประเมินโอกาสการนำเข้า โดยให้ประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชมจะปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืชเข้ามาในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยง โดยมีปัจจัยที่นำมาพิจารณา ได้แก่ ระยะการเจริญเติบโตของศัตรูพืช เช่น ไข่ หนอน สปอร์ ที่มีความเสี่ยงติดเข้ามาพร้อมกับส่วนของพืชที่นำเข้า ลักษณะการติดเข้ามาพร้อมกับส่วนของพืชที่นำเข้า ความยากง่ายในการตรวจพบ การมีชีวิตรอดระหว่างขนส่ง การเล็ดลอดจากการตรวจที่จุดนำเข้า การเคลื่อนย้ายไปยังพืชอาศัย/พืชอาหารที่เหมาะสม

2.2.1.2 ประเมินโอกาสการตั้งรกราก โดยให้ประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชมสามารถมีชีวิตอยู่รอดในประเทศไทยได้ ซึ่งปัจจัยที่นำมาพิจารณาคือ ข้อมูลชีววิทยาของศัตรูพืช เช่น วงจรชีวิต จำนวนรุ่นต่อปี พืชอาหาร/พืชอาศัย จำนวนและการกระจายตัวของพืชอาหาร/พืชอาศัย พาหะ การแพร่ขยายพันธุ์ ความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ เป็นต้น

2.2.2 ประเมินโอกาสการแพร่กระจาย โดยให้ประเมินโอกาสที่ศัตรูพืชมสามารถแพร่กระจายในพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยง ซึ่งปัจจัยที่นำมาพิจารณา ได้แก่ การเคลื่อนย้ายของศัตรูพืชไปกับผลิตภัณฑ์ สินค้า หรือพาหนะขนส่ง ความสามารถในการเคลื่อนย้ายหาพืชอาหารโดยศัตรูพืชเอง หรือต้องอาศัยพาหะ ซึ่งต้องพิจารณาต่อว่าพาหะดังกล่าวมีปรากฏในประเทศไทยหรือไม่ ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมในสภาพธรรมชาติ สิ่งกีดขวางโดยธรรมชาติ และพืชอาหาร/พืชอาศัย (รวมทั้งพืชที่มีความใกล้เคียงกับพืชอาหาร/พืชอาศัย) เป็นต้น

2.3 การประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้น (Assessment of potential economic consequence) ภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืช

นำรายชื่อศัตรูพืชมที่ได้จากข้อ 2.2 มาพิจารณาความเป็นไปได้ที่ศัตรูพืชจะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจทางตรงต่อพืช สัตว์ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม เช่น ทำให้พืชสูญเสียผลผลิต หรือมีผลกระทบทางอ้อม เช่น การเพิ่มต้นทุนในการป้องกันกำจัด กระทบต่อระบบการผลิตพืชภายในประเทศ กระทบต่อการค้าภายในประเทศและระหว่างประเทศ เป็นต้น โดยพิจารณาว่ามีผลกระทบจนถึงระดับที่ประเทศไทยไม่สามารถยอมรับได้



2.4 ข้อสรุปของการประเมินความเสี่ยงของศัตรูพืช (Conclusion of the pest risk assessment stage)

สรุปผลของการประเมินโอกาสการเข้ามา การตั้งรกรากถาวร และการแพร่กระจาย รวมถึงศักยภาพที่อาจเกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจทางตรงและทางอ้อมภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืช โดยใช้แนวทางการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest Risk Management)

การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชโดยจำแนกวิธีการที่จะดำเนินการกับความเสียหายจากการประเมินโอกาสการเข้ามาเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืชและผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ ในขั้นตอนที่ 2 ของศัตรูพืชแต่ละชนิด โดยมีความเป็นไปได้ในทางปฏิบัติโดยไม่เป็นอุปสรรคต่อการค้าระหว่างประเทศ สำหรับนำไปใช้เป็นแนวทางในการกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2551) ประกอบด้วยการพิจารณาในประเด็นต่าง ๆ ดังนี้

3.1 ระดับความเสี่ยง (Level of risk): ใช้หลักการจัดการความเสี่ยงให้อยู่ในระดับที่มีระดับที่สามารถยอมรับได้ (acceptable)

สำหรับการทดลองนี้มีระดับความเสี่ยงที่ยอมรับได้ คือ “ความเสี่ยงในระดับที่ละเลยได้ (negligible)” หมายความว่า ศัตรูพืชที่ประเมินความเสี่ยงแล้วมีความเสี่ยงอยู่ในระดับที่ละเลยได้ไม่จำเป็นต้องกำหนดมาตรการทางสุขอนามัยพืช” ส่วนศัตรูพืชที่มีระดับความเสี่ยงต่ำปานกลาง และสูง มีความจำเป็นต้องกำหนดมาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช

3.2 ข้อมูลวิชาการประกอบการพิจารณาจัดการความเสี่ยง: พิจารณาจากข้อมูลที่สามารถรวบรวมได้

3.3 การยอมรับความเสี่ยง (Acceptable of risk): นำผลของการประเมินความเสี่ยงนับตั้งแต่การเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร การแพร่ระบาด และผลกระทบต่อเศรษฐกิจที่แสดงความเสี่ยงว่าไม่สามารถยอมรับได้นั้นมาจัดการจำแนกมาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อลดความเสี่ยงลงให้ถึงระดับต่ำสุดที่ยอมรับได้

3.4 จำแนกและคัดเลือกวิธีการที่มีประสิทธิภาพ: เพื่อลดความน่าจะเป็นไปได้ของการเข้ามา ตั้งรกราก และ แพร่กระจายของศัตรูพืช ที่เหมาะสม ประกอบด้วยมาตรการที่มีอยู่หรืออาจเป็นมาตรการใหม่ที่พัฒนาขึ้นโดยเฉพาะ เพื่อจัดการกับความเสียหายจากการนำเข้า โดยมาตรการสามารถมีได้ตั้งแต่การห้ามทั้งหมดจนถึงการอนุญาตนำเข้าด้วยการตรวจสอบด้วยสายตา (visual inspection) ในบางกรณีอาจต้องใช้มากกว่าหนึ่งมาตรการเพื่อที่จะลดความเสี่ยงศัตรูพืชให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ประกอบด้วย

- มาตรการนำไปใช้ป้องกันหรือลดการเข้าทำลายของศัตรูพืชในแปลงปลูก
- มาตรการนำไปใช้กับสินค้าที่ส่งมอบ (consignment) หรือสินค้า (commodities)



- มาตรการที่ทำให้มั่นใจได้ว่าพื้นที่ (areas) หรือสถานที่ผลิต (place of production) ปราศจากศัตรูพืช

- มาตรการเกี่ยวกับการจำกัดหรือการห้าม
- มาตรการที่นำไปใช้ในระหว่างการปฏิบัติก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว
- มาตรการที่นำไปใช้ภายในประเทศผู้นำเข้า เช่น การ

3.5 ใบรับรองสุขอนามัยพืช (Phytosanitary certificate): พิจารณากำหนดให้มีการรับรองว่าสินค้าที่นำเข้าปราศจากศัตรูพืชกักกัน เพื่อยืนยันว่าได้มีการจัดการความเสี่ยงตามที่กำหนด และอาจกำหนดให้ระบุข้อความเพิ่มเติม (additional declaration) เพื่อแสดงให้เห็นว่าได้มีการดำเนินมาตรการสุขอนามัยพืชเป็นการเฉพาะซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับในสากล

3. สรุปผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

สรุปผลดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่าง ๆ ได้แก่ รายชื่อศัตรูพืชที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูพืชรุกราน และมีรายงานพบในสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล และประเทศไทย ผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนการจัดกลุ่มศัตรูพืช และผลการประเมินโอกาสการเข้ามาตั้งรกราก แพร่กระจาย รวมถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นทางเศรษฐกิจ ซึ่งจะได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีคุณสมบัติเป็นพืชกักกันของการนำเข้าผลพลั่มสดจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล โดยมีความเสี่ยงของศัตรูพืชกักกันที่ระดับแตกต่างกัน ตลอดจนสรุปมาตรการทางวิชาการด้านสุขอนามัยพืช สำหรับจัดการศัตรูพืชแต่ละชนิด และมาตรการสนับสนุนอื่น ๆ สำหรับใช้เป็นข้อมูลกำหนดมาตรการทางกฎหมายต่อไป

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2561 - กันยายน 2564

สถานที่ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสืบค้นและรวบรวมข้อมูล

1.1 ข้อมูลทั่วไปของพืชม การส่งออก และการรับรองส่งออก

1.1.1 ข้อมูลทั่วไปของพืชม การส่งออก และการรับรองส่งออก ในสาธารณรัฐแอฟริกาใต้

- พื้นที่ปลูก: แหล่งปลูก ได้แก่ Western Cape, Eastern Cape, Northern Cape, Free State, North West, Mpumalanga, Limpopo

- พันธุ์: เช่น African Pride, Casselman, Eldorado, Fortune, Gaviota, Golden King, Harry Pickstone, Kelsey, Lady Red, Lady West, Laetitia, Laroda, Larry Anne (Tegan blue, Freedom), Methley, Mostert, Pioneer, President, Red Beaut, Redgold, Reubennel (Ruby Nel), Roysum, Ruby Red, Santa Rosa, Sapphire, Satsuma, Simka, Songold, Southern Belle, Souvenir, Superplum six (Angeleno), Wickson เป็นต้น



- การปลูก: ระยะปลูก 4.5 × 2 เมตร ให้น้ำแบบหยด ปริมาณน้ำที่ใช้สำหรับการเพาะปลูก 5000-11 000 ลูกบาศก์เมตรต่อปี
- ฤดูเก็บเกี่ยวผลผลิต: เดือนพฤศจิกายน ถึง มีนาคม ขึ้นอยู่กับพันธุ์ที่ปลูก
- การจัดการหลังเก็บเกี่ยว: ดำเนินการในโรงคัดบรรจุสินค้าที่สะอาด คัดเลือกผลไม้ที่ไม่ได้มาตรฐาน เคลือบด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อราเพื่อป้องกันผลไม้เน่าเสีย แล้วเก็บรักษาในห้องเย็น
- การส่งออก: แอฟริกาใต้ส่งออกผลพลัมสดไปยังประเทศต่างๆ เช่น ไต้หวัน และสหรัฐอเมริกา
- การรับรองสุขอนามัยพืช: หน่วยงานที่รับผิดชอบจะดำเนินการตรวจสอบและรับรองสุขอนามัยพืช

1.1.2 ข้อมูลทั่วไปของพลัม การส่งออก และการรับรองส่งออก ในรัฐอิสราเอล

- พื้นที่ปลูก: การผลิตพลัมเชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่อยู่ในหุบเขาฮูลา (80% ของการผลิตทั้งหมด) ส่วนพื้นที่อื่น ๆ เช่น กาลิลีตอนเหนือและตะวันตก และที่ราบชายฝั่ง
- พันธุ์: เช่น Angelina, Black Amber, Black Diamond, Black Jim, Blue Knight, Casselman, Fortune, Frier, Lerian, New Yorker, Oakdale, Queen Rosa, Red Roza, Royal Zee และ Songold เป็นต้น
- ฤดูเก็บเกี่ยวผลผลิต: เริ่มเก็บเกี่ยวเดือนพฤศจิกายน-เดือนมกราคม ของปีถัดไป
- การรับรองแปลงปลูก: เกษตรกรผู้ปลูกพลัม และโรงคัดบรรจุสินค้า ในรัฐอิสราเอล จะได้รับการรับรองจาก กระทรวงเกษตรของอิสราเอล (PPIS) และโรงคัดบรรจุสินค้าหลายแห่งได้รับการรับรองจาก Israeli Bio-Organic Agriculture Association
- การจัดการหลังเก็บเกี่ยว: ลูกพลัมจากสวนถูกขนส่งไปยังโรงคัดบรรจุสินค้า เมื่อมาถึงโรงคัดบรรจุสินค้าจะมีการคัดแยกลูกพลัมที่สกปรกหรือเสียหายออก จากนั้นจึงคัดเลือกลูกพลัมตามคุณภาพและขนาด และตรวจสอบว่าไม่มีข้อบกพร่องทางสรีรวิทยา และต้องไม่พบศัตรูพืช หลังจากคัดแยกผลไม้แล้ว ล้างพลัมด้วยน้ำ/ สารละลายคลอรีน และ/หรือ แปรงปิดสิ่งสกปรกออกจากผลไม้ แล้วนำไปบรรจุในกล่องกระดาษขนาดต่างๆ จากนั้นนำไปเก็บรักษาในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส
- การส่งออก: รัฐอิสราเอลส่งออกผลพลัมสดไปยังประเทศต่างๆ เช่น สิงคโปร์ ฮองกง มาเลเซีย ญี่ปุ่น ยุโรป (สแกนดิเนเวีย เนเธอร์แลนด์ เบลเยียม ฝรั่งเศส เยอรมนี สวิสเซอร์แลนด์ ออสเตรีย) สหราชอาณาจักร บราซิล อเมริกา ออสเตรเลีย แคนาดา แอฟริกาใต้
- การรับรองสุขอนามัยพืช: เจ้าหน้าที่หน่วยงาน Plant Protection and Inspection Services (PPIS) ดำเนินการสุ่มผลพลัมร้อยละ 2 เพื่อตรวจสอบศัตรูพืช และออกไปรับรองสุขอนามัยพืช



1.2 การรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูพุ่มและมีปรากฏในสาธารณรัฐแอฟริกาใต้ อิสราเอล ประเทศไทย และอื่น ๆ ได้ข้อมูลดังนี้

ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูพุ่มและมีรายงานการปรากฏในสาธารณรัฐแอฟริกาใต้ รัฐอิสราเอล ไทย และอื่น ๆ จำนวน 272 ชนิด ได้แก่ แมลง 185 ชนิด ไร 14 ชนิด หอยทาก 3 ชนิด ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด แบคทีเรีย 9 ชนิด รา 42 ชนิด และ ไวรัส 11 ชนิด (Table 1) ข้อมูลศัตรูพืช เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน ลักษณะการทำลายของศัตรูพืช

1.2.1 ศัตรูพุ่มที่มีรายงานพบในแอฟริกาใต้ มีจำนวน 113 ชนิด ได้แก่ แมลง 72 ชนิด ไร 9 ชนิด หอยทาก 2 ชนิด ไส้เดือนฝอย 5 ชนิด แบคทีเรีย 4 ชนิด รา 17 ชนิด และไวรัส 4 ชนิด ดังนี้

แมลง 72 ชนิด ได้แก่ *Anoplolepis steingroeveri*, *Anoplolepis custodiens*, *Antestiopsis orbitalis*, *Aonidiella aurantii*, *Aphis gossypii*, *Aphis pomi*, *Asterolecanium pustulans*, *Bagrada hilaris*, *Brachycaudus helichrysi*, *Brachycaudus persicae*, *Caliroa cerasi*, *Calpe (Oraesia) emarginata*, *Calpe (Oraesia) provocans*, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis (Pterandrus) rosa*, *Chrysomphalus aonidum*, *Chrysomphalus dictyospermi*, *Coccus hesperidum*, *Crematogaster peringueyi*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia pomonella*, *Diaspidiotus africanus*, *Dischista cincta*, *Dugaria scandulata*, *Epichoristodes acerbella*, *Epilachna (Cnootriba) similis*, *Eremnus cerealis*, *Eremnus setulosus*, *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella schulzei*, *Gonocephalum simplex*, *Grylotalpa africana*, *Gymnelema plebigena*, *Helicoverpa armigera*, *Heliothrips haemorrhoidalis*, *Heliothrips sylvanus*, *Hemiberlesia rapax*, *Hypopholis sommeri*, *Hysteroneura setariae*, *Icerya purchasi*, *Latoia lastriga*, *Lepidosaphes ulmi*, *Lindingaspis rossi*, *Linepithema (Iridiomyrmex) humile*, *Macchiademus diplopterus*, *Myzus persicae*, *Nezara viridula*, *Nipaecoccus viridis*, *Oxycarenus hyalinipennis*, *Oxyrhachis fuscicornis (Xipistes furci-cornis)*, *Pachnoda sinuata*, *Parlatoria perganei*, *Pericyma scandulata*, *Phlyctinus callosus*, *Plangia graminea*, *Prasoidea sericea*, *Pseudaulacaspis pentagona*, *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus viburni*, *Quadraspidotus perniciosus*, *Rhopalosiphum padi*, *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, *Rhyparochromus (= Raglius) apicalis*, *Saissetia coffeae*, *Serodes partita*, *Spodoptera littoralis*, *Thrips australis*, *Thrips tabaci*, *Tortrix capensana*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Tribolium castaneum* และ *Xyleborus xylographus*

ไร 9 ชนิด ได้แก่ *Brevipalpus californicus*, *Brevipalpus obovatus*, *Brevipalpus phoenicis*, *Bryobia rubrioculus*, *Oligonychus mangiferus*, *Panonychus ulmi*, *Tetranychus kanzawai*, *Tetranychus turkestani* และ *Tetranychus urticae*,

หอยทาก 2 ชนิด ได้แก่ *Helix aspersa* และ *Theba pisana*



ไส้เดือนฝอย 5 ชนิด ได้แก่ *Criconea mutabile*, *Meloidogyne javanica*, *Mesocriconea xenoplax*, *Pratylenchus vulnus*, *Xiphinema diffusum*

แบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. *Morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* และ *Xanthomonas arboricola* (= *Xanthomonas campestris*) pv. *Pruni*

รา 17 ชนิด ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Armillaria mellea* (= *Armillariella mellea*), *Botrytis cinerea*, *Chondrostereum purpureum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Diaporthe ambigua*, *Gloeodes pomigena*, *Glomerella cingulata*, *Leucostoma persoonii*, *Monilinia laxa*, *Mucor piriformis*, *Mycosphaerella tassiana* (= *Cladosporium herbarum*), *Phytophthora cactorum*, *Rhizopus stolonifer*, *Taphrina pruni*, *Tranzschelia discolor* และ *Venturia carpophila* (= *Cladosporium carpophilum*),

ไวรัส 4 ชนิด ได้แก่ *Apple chlorotic leafspot trichovirus*, *Apple mosaic virus*, *Prune dwarf virus* และ *Prunus necrotic ringspot virus*

1.2.2 ศัตรูพืชมที่มีรายงานพบในอิสราเอล มีจำนวน 134 ชนิด ได้แก่ แมลง 84 ชนิด ไร 4 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด แบคทีเรีย 5 ชนิด รา 22 ชนิด และไวรัส 10 ชนิด ดังนี้

แมลง 84 ชนิด ได้แก่ *Acheta bimaculate*, *Adoxophyes orana*, *Anarsia lineatella*, *Anoxia orientalis*, *Apate monachus*, *Aphis gossypii*, *Aporia crataegi*, *Aromia bungii*, *Aspidiotus (Hemiberlesia) camellia*, *Aurigena chlorana*, *Bactrocera dorsalis*, *Brachycaudus helichrysi*, *Cacoecia rosana*, *Capnodis carbonaria*, *Capnodis tenebrionis*, *Carpocapsa pomonella*, *Carpophilus hemipterus*, *Cerambyx dux*, *Ceratitis capitata*, *Ceroplastes floridensis*, *Cilix glaucata*, *Coccus hesperidum*, *Conotrachelus nenuphar*, *Cossus Cossus*, *Cryptoblabes gnidiella*, *Cydia pomonella*, *Diaspidiotus ostreaeformis*, *Diloba caeruleocephal*, *Drosophila suzukii*, *Ectomyelois ceratoniae*, *Edwardsiana rosae*, *Empoasca decedens*, *Epidiaspis leperii*, *Erythroneura flammigera*, *Eulecanium tiliae*, *poecilia ambiguella*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Forficula Auricularia*, *Frankliniella occidentalis*, *Gelechia vepretella*, *Grapholita funebrana*, *Grapholita prunivoran*, *Haplidia transversa*, *Homalodisca vitripennis*, *Hyalopterus pruni*, *Hyphantria cunea*, *Lepidosaphes (Mytilococcus) ulmi*, *Lobesia botrana*, *Lymantria lapidicola*, *Lyonetia clerkella*, *Malacosoma Neustria*, *Maladera matrida*, *Monolepta lepida*, *Myzus persicae*, *Naupactus xanthographus*, *Nilotaspis halli*, *Otiorhynchus cribricollis*, *Pandemis cerasana*, *Parlatoria oleae*, *Parthenolecanium corni*, *Parthenolecanium persicae*, *Pentodon bispinosa*, *Pholicodes conicollis*, *Pholicodes*



syriacus, *Pholicodes vittatus*, *Phycita pedisignella*, *Proeulia auraria*, *Proeulia chrysopteris*, *Pterochloroides persicae*, *Retithrips syriacus*, *Saissetia coffeae*, *Saturnia pyri*, *Schistocerus bimaculatus*, *Scolytus amygdali*, *Sitona gressorial*, *Sphaerolecanium prunastri*, *Spodoptera littoralis*, *Strophomorphus porcellus*, *Synanthedon pictipes*, *Thrips flavus*, *Trirachys holosericeus*, *Xyleborus dispar*, *Yponomeuta padellu* และ *Zeuzera pyrina*

ไร 4 ชนิด ได้แก่ *Aculus fockeui*, *Bryobia rubrioculus*, *Panonychus ulmi* และ *Tetranychus urticae*

หอยทาก 1 ชนิด ได้แก่ *Candidula intersecta*

ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด ได้แก่ *Helicotylenchus dihystra*, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, *Pratylenchus penetrans*, *Pratylenchus vulnus*, *Xiphinema americanum*, *Xiphinema diversicaudatum* และ *Xiphinema rivesi*

แบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas syringae* pv. *Morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Rhizobium radiobacter* และ *Rhizobium rhizogenes*

รา 22 ชนิด ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Apiosporina morbosa*, *Armillaria heimii*, *Botrytis cinerea*, *Cercospora circumscissa*, *Chalara elegans*, *Dematophora necatrix*, *Diaporthe eres*, *Diplodia seriata*, *Monilinia fructicola*, *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Penicillium expansum*, *Phytophthora megasperma*, *Podosphaera clandestina* var. *clandestina*, *Podosphaera tridactyla*, *Rhizopus stolonifer*, *Rosellinia necatrix*, *Tranzschelia discolor*, *Tranzschelia pruni-spinosae* และ *Verticillium dahlia*

ไวรัส 10 ชนิด ได้แก่ *American plum line pattern virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Arabis mosaic virus*, *Carnation ringspot virus*, *Cherry virus A*, *Plum pox virus*, *Prune dwarf virus*, *Prunus necrotic ringspot virus*, *Strawberry latent ringspot virus*, *Tomato ringspot virus*

2. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation)

1.1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลัมสดนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล เนื่องมาจากการยื่นขอเปิดตลาดสินค้าใหม่จากทั้งสองประเทศ ซึ่งตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2550) ได้กำหนดให้ผลสดของพืชในสกุล *Prunus* ซึ่งรวมถึงผลพลัมสดจากทุกแหล่ง



เป็นสิ่งต้องห้าม การนำเข้าเพื่อการค้าจำเป็นต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและกำหนดเงื่อนไขตามที่อธิบดีกำหนดเสียก่อน การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลัมสดนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอลเป็นการวิเคราะห์เส้นทางศัตรูพืช (pathway)

ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงจำเป็นต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับควบคุมการนำเข้าผลพลัมสดนำเข้าจากทั้งสองประเทศ

1.2 พื้นที่ที่จะทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชคือ “ประเทศไทย”

1.3 จากการตรวจสอบจากเอกสารและข้อมูลต่างๆ พบว่าปัจจุบันประเทศไทยอนุญาตนำเข้าผลพลัมสดจาก เครือรัฐออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา มีข้อมูลดังนี้

การนำเข้าผลพลัมสดจากเครือรัฐออสเตรเลีย: อนุญาตนำเข้าพลัม 1 ชนิด คือ *Prunus domestica* มีศัตรูพืชกักกันจำนวน 16 ชนิด ได้แก่ แมลง *Pantomorus cervinus*, *Bactrocera jarvisi*, *Bactrocera neohumeralis*, *Bactrocera tryoni*, *Ceratitis capitata*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Parthenolecanium corni*, *Diaspidiotus ostreaeformis*, *Lepidosaphes ulmi*, *Lopholeucaspis japonica*, *Parlatoria oleae*, *Pseudaulacaspis pentagona*, *Helicoverpa punctigera*, *Epiphyas postvittana*, *Thrips imaginis* และ รา *Monilinia fructicola* โดยกำหนดให้ผลพลัมสดที่จะส่งออกมายังประเทศไทยจะต้องจัดการความเสี่ยงของแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชกักกัน ด้วยวิธีการใดวิธีการหนึ่ง ดังนี้ (1) ผลพลัมสดต้องมาจากแปลงปลูกในพื้นที่ปลอดแมลงวันผลไม้ หรือ (2) ผลพลัมสดจากแปลงปลูกนอกพื้นที่ปลอดแมลงวันผลไม้ ต้องกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลพลัมสดด้วยวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็นก่อนส่งออกหรือระหว่างขนส่ง (กรมวิชาการเกษตร, 2556)

การนำเข้าผลพลัมสดจากสหรัฐอเมริกา: อนุญาตนำเข้าพลัม 2 ชนิด คือ *P. domestica* และ *P. salicina* จากแหล่งปลูกเฉพาะในรัฐแคลิฟอร์เนีย ซึ่งมีศัตรูพืชกักกันจำนวน 59 ชนิด ได้แก่ แมลง 41 ชนิด ไร 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด และ รา 10 ชนิด โดยกำหนดในเงื่อนไข ดังนี้ (1) อนุญาตผลพลัมสดจากพื้นที่ปลอดแมลงวันผลไม้ที่ได้รับการรับรอง (2) ผลพลัมสดที่มาจากพื้นที่กักกันสำหรับแมลงวันผลไม้ศัตรูพืชกักกันของไทย ต้องผ่านการกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็นก่อนส่งออกหรือระหว่างขนส่ง (กรมวิชาการเกษตร, 2562)

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment)

2.1 การจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization)

2.1.1 ผลการจัดกลุ่มศัตรูพลัมที่มีรายงานพบในสาธารณรัฐแอฟริกาใต้ ได้รายชื่อศัตรูพืชกักกัน จำนวน 24 ชนิด ดังนี้

แมลง 10 ชนิด ได้แก่ *Asterolecanium pustulans*, *Ceratitis capitata*, *Ceratitis rosa*, *Thaumatotibia leucotreta*, *Cydia pomonella*, *Diaspidiotus africanus*, *Epichoristodes acerbella*, *Pseudaulacaspis pentagona*, *Pseudococcus viburni*, *Thrips australis*



ไร 3 ชนิด ได้แก่ *Brevipalpus obovatus*, *Bryobia rubrioculus*, *Panonychus ulmi*

หอยทาก 2 ชนิด ได้แก่ *Helix aspersa*, *Theba pisana*

แบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* และ *Xanthomonas arboricola*

รา 6 ชนิด ได้แก่ *Diaporthe ambigua*, *Gloeodes pomigena*, *Monilinia laxa*, *Mucor piriformis*, *Tranzschelia discolor* และ *Venturia carpophila*

2.1.2 ผลการจัดกลุ่มศัตรูพืชมที่มีรายงานพบในรัฐอิสราเอลได้รายชื่อศัตรูพืช กักกัน จำนวน 14 ชนิด ดังนี้

แมลง 6 ชนิด ได้แก่ *Ceratitis capitata*, *Anarsia lineatella*, *Lepidosaphes ulmi*, *Lobesia botrana*, *Parlatoria oleae*, *Thaumatotibia leucotreta*

แบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*

รา 5 ชนิด ได้แก่ *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, *Tranzschelia discolor*, *Verticillium dahlia*, *Xylella fastidiosa*

2.2 การประเมินโอกาสการเข้ามา ตั้งรกรากถาวร และแพร่กระจาย รวมทั้งผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้นภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืช

2.2.1 ผลการประเมินโอกาสการเข้ามา การตั้งรกราก และการแพร่กระจายของศัตรูพืช และผลการประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้นภายหลังการเข้ามาของศัตรูพืช กักกันทั้ง 32 ชนิด จากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้ (ข้อ 2.1.1) และรัฐอิสราเอล (ข้อ 2.1.2) สามารถจำแนกศัตรูพืชกักกันออกเป็น 3 กลุ่มตามระดับความเสี่ยง ดังนี้

ศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูง จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Ceratitis capitata*, *Ceratitis rosa*, *Thaumatotibia leucotreta*

ศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงปานกลาง จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยหอย *Asterolecanium pustulans*, *Diaspidiotus africanus*, *Parlatoria oleae* *Pseudaulacaspis pentagona* และเพลี้ยแป้ง *Pseudococcus viburni*

ศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงต่ำ จำนวน 25 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟ *Thrips australis* หนอนผีเสื้อ *Anarsia lineatella* *Cydia pomonella*, *Epichoristodes acerbella*, *Lepidosaphes ulmi*, *Lobesia botrana* ไร *Brevipalpus obovatus*, *Bryobia rubrioculus*, *Panonychus ulmi* หอยทาก *Helix aspersa*, *Theba pisana* แบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* และ *Xanthomonas arboricola* และ รา *Diaporthe ambigua*, *Gloeodes pomigena*, *Monilinia fructigena*,



Monilinia laxa, *Mucor piriformis*, *Tranzschelia discolor* และ *Venturia carpophila*
Verticillium dahlia, *Xylella fastidiosa*

การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช: แมลงวันผลไม้ *Ceratitis capitata* และ *Ceratitis rosa*

โอกาสในการเข้ามาของศัตรูพืชในประเทศไทย - สูง

แมลงวันผลไม้ทั้ง 2 ชนิด ในระยะไข่และหนอนมีโอกาสติดมากับผลพลัมสดนำเข้า โดยอาศัย และเจริญเติบโตอยู่ภายในผลพลัม การสังเกตลักษณะการทำลายภายนอกยาก ไม่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า นอกจากนี้ประเทศนิวซีแลนด์รายงานว่าตรวจพบ *C. capitata* 7-33 ครั้งต่อปี ในสินค้า และ 10-28 ครั้งต่อปี ในกระเป๋าผู้เดินทางที่นำเข้ามา

โอกาสการตั้งรกรากของศัตรูพืชในประเทศไทย - สูง

C. capitata มีโอกาสที่จะเจริญและแพร่พันธุ์ได้ในประเทศไทยในบางพื้นที่ เนื่องจากสภาพ ภูมิอากาศเหมาะสม มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี พืชอาหารกว้าง ส่วนใหญ่เป็นไม้ผลและผักซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจของไทย *C. capitata* มีเขตการแพร่กระจายเกือบทั่วทุกทวีป และมีพืชอาศัย มากกว่า 200 ชนิด โดยพบว่าอุณหภูมิ 27-29 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมในการพัฒนาของไข่ นอกจากนี้ตัวหนอนเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 13-28 องศาเซลเซียส ตัวเต็มวัยออกจากดักด้เมื่อ อุณหภูมิประมาณ 24-26 องศาเซลเซียส ในสภาพอากาศอบอุ่นตัวเต็มวัยสามารถผสมพันธุ์ได้ต่อเนื่อง ตลอดทั้งปีและพบแมลงได้ทุกระยะการเจริญเติบโต พืชอาศัย เช่น พริก ส้ม กาแฟ ฝรั่ง มะม่วงหิมพานต์ มะเขือเทศ มังคุด ลิ้นจี่ มะม่วง ละมุด ท้อ ทับทิม และองุ่น เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถ วางไข่ครั้งละจำนวนมาก *C. rosa* มีศักยภาพที่จะตั้งรกรากในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งเขตร้อนที่ของแอฟริกา ละติน อเมริกา และเอเชีย พืชอาศัย เช่น มะละกอ พืชสกุลส้ม มะม่วง ลิ้นจี่ แอปเปิล มะเขือเทศ องุ่น เป็นต้น ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ ในการหา critical thermal maximum (CTmax) and critical thermal minimum (CTmin) ของแมลงวันผลไม้ *C. capitata* และ *C. rosa* พบว่า ค่า CT min ของแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัย 2 ชนิดนี้มีค่าไม่ต่างกันโดยมีค่า 5.4-6.6 องศาเซลเซียส แต่ค่า CTmax ของ *C. capitata* มีค่า 42.4-43.0 องศาเซลเซียส สูงกว่า *C. rosa* อย่างมีนัยสำคัญ 41.8-42.4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตประมาณ 25 องศาเซลเซียส ศัตรูพืชทั้ง 2 ชนิดมีโอกาสที่จะตั้งรกรากได้ในประเทศไทยในบางพื้นที่เนื่องจากสภาพภูมิอากาศเหมาะสมและมีพืชอาหารหลายชนิดและมีแหล่งเพาะปลูกทั่วประเทศ

โอกาสการแพร่กระจายของศัตรูพืชในประเทศไทย -สูง

C. capitata และ *C. rosa* มีการแพร่กระจายโดยติดไปกับผลไม้ ดังนั้นการเคลื่อนย้ายผลไม้ ที่มีหนอนอยู่ภายในทำให้เกิดการแพร่กระจายไปยังแหล่งใหม่ๆ ได้ นอกจากนี้ตัวแมลงเองสามารถบิน และปลิวไปกับลมได้ แมลงวันผลไม้เพศเมีย *C. capitata* สามารถวางไข่ได้ ประมาณ 300 ฟองตลอด อายุขัย และพืชอาหารของแมลงทั้งสองชนิดนี้มีพื้นที่ปลูกทั่วไปในประเทศไทย



ผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้น – สูง

ผลกระทบทางตรง: ทำความเสียหายโดยตรงแก่พืชเศรษฐกิจของไทยหลายชนิด เช่น ส้ม ฝรั่ง มะม่วง ลิ้นจี่ ฝรั่ง ชมพู่ มะละกอ มะเขือเทศ และพืชสกุลแตง เป็นต้น ซึ่งมีแหล่งปลูกกระจายทั่วประเทศไทย การทำลายของศัตรูพืชทำให้พืชสูญเสียผลผลิต นอกจากนี้ผลผลิตที่ไม่มี การป้องกัน การเข้าทำลายมีโอกาสเสียหาย 100 เปอร์เซ็นต์ หากไม่มีการป้องกันกำจัด

ผลกระทบทางอ้อม: การทำลายของแมลงวันผลไม้ทำให้สูญเสียผลผลิต 100 เปอร์เซ็นต์หากไม่มี การกำจัด ทำให้ต้องมีค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมในการป้องกันกำจัดเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต อาจส่งผลให้เกิดข้อจำกัดทางการค้าเนื่องจากประเทศต้นทางกำหนดให้มีการกำจัดศัตรูพืชก่อนการส่งออก และ สูญเสียโอกาสด้านตลาดส่งออก หรือถูกนำมาเป็นประเด็นในการกำหนดมาตรการด้านสุขอนามัยพืชที่ เข้มงวดจากประเทศผู้นำเข้าที่แมลงวันผลไม้ชนิดนี้เป็นศัตรูพืชกักกัน ยกตัวอย่างเช่น ประเทศไทยอาจ สูญเสียตลาดหรือต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายในการกำจัดแมลงวันผลไม้ชนิดนี้ก่อนการส่งออกมะม่วงไปประเทศ ญี่ปุ่น และส่งออกมะม่วงและลิ้นจี่ไปสหรัฐอเมริกา เป็นต้น

รวมผลการประเมินโอกาสการเข้ามา ตั้งรกราก และแพร่กระจายในข้อ 2.2.1-2.2.3 โดยใช้ตาราง กฎการประเมินความน่าจะเป็นไปได้รวม (Matrix of rules for combining descriptive likelihoods) ของออสเตอร์เลีย พบว่า *C. capitata* และ *C. rosa* มีความเสี่ยง สูง

รวมผลการประเมินโอกาสการเข้ามา ตั้งรกราก และแพร่กระจาย กับ ผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้นภายหลังการเข้ามาของแมลงวันผลไม้โดยใช้ตารางกฎการประเมินความน่าจะเป็นไปได้รวม (risk estimation matrix) ของออสเตอร์เลีย พบว่า *C. capitata* และ *C. rosa* มีความเสี่ยงสูง

สรุปความเสี่ยงของ *C. capitata* และ *C. rosa* พบว่ามีความเสี่ยงสูง

การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช: ฟอลซ คีตดิ่ง มีธ *Thaumatotibia leucotreta*

โอกาสในการเข้ามาของศัตรูพืชในประเทศไทย - สูง

T. leucotreta ในระยะไข่และหนอนมีโอกาสติดมากับผลพลัมสดนำเข้าโดยอาศัยและเจริญเติบโตอยู่ภายในผลพลัม

โอกาสการตั้งรกรากของศัตรูพืชในประเทศไทย - สูง

แมผีเสื้อวางไข่ที่ผล ครั้งละ 100-400 ฟอง ตัวหนอนฟักออกมาแล้วจะเจาะเข้าทำลาย ส่วน ของผลมีพืชอาหารกว้างมากกว่า 70 ชนิด พืชอาหารที่สำคัญที่มีการปลูกในประเทศไทย เช่น ส้ม มะม่วง อะโวคาโด กล้วย กาแฟ ลิ้นจี่ ฝรั่ง มะเฟือง พริก และข้าวโพด เป็นต้น แมลงสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยบางพื้นที่ อุณหภูมิที่เหมาะสม 15-25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่แมลงสามารถพัฒนาได้คือ 40 องศาเซลเซียส



โอกาสการแพร่กระจายของศัตรูพืชในประเทศไทย-สูง

T. leucotreta มีการแพร่กระจายโดยติดไปกับผลไม้ ดังนั้นการเคลื่อนย้ายผลไม้ที่มีหนอน ฝัเสื้ออยู่ภายในทำให้เกิดการแพร่กระจายไปยังแหล่งใหม่ๆ ได้ นอกจากนี้ตัวแมลงเองสามารถบินได้จึง เคลื่อนย้ายได้ด้วยตัวเอง แมฝเสื้อสามารถวางไข่ได้ 800 ฟอง ตลอดอายุขัย

ผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้น – สูง

ผลกระทบทางตรง: ทำความเสียหายโดยตรงแก่พืชเศรษฐกิจของไทยหลายชนิด เช่น ส้ม มะม่วง ลิ้นจี่ ฝรั่ง ข้าวโพด เป็นต้น ซึ่งมีแหล่งปลูกกระจายทั่วประเทศไทย รายงานการทำลายส้มใน แอฟริกาใต้ทำให้สูญเสียผลผลิต 10-20%

ผลกระทบทางอ้อม: มีค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมในการป้องกันกำจัดเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต อาจส่งผลให้เกิดข้อจำกัดทางการค้าเนื่องจากประเทศต้นทางกำหนดให้มีการกำจัดศัตรูพืชก่อนการส่งออก และ สูญเสียโอกาสด้านตลาดส่งออก เช่น ประเทศไทยอาจสูญเสียตลาดหรือต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายในการกำจัดแมลงวันผลไม้ชนิดนี้ก่อนการส่งออกมะม่วงไปประเทศญี่ปุ่น และส่งออกมะม่วงและลิ้นจี่ไปสหรัฐอเมริกา เป็นต้น

รวมผลการประเมินโอกาสการเข้ามา ตั้งรกราก และแพร่กระจายในข้อ 2.2.1-2.2.3 โดยใช้ตาราง กฎการประเมินความน่าจะเป็นไปได้รวม (Matrix of rules for combining descriptive likelihoods) ของออสเตรเลีย พบว่า *T. leucotreta* มีความเสี่ยง สูง

รวมผลการประเมินโอกาสการเข้ามา ตั้งรกราก และแพร่กระจาย กับ ผลกระทบทางเศรษฐกิจที่อาจ เกิดขึ้นภายหลังการเข้ามาของ *T. leucotreta* โดยใช้ตารางกฎการประเมินความน่าจะเป็นไปได้รวม (risk estimation matrix) ของออสเตรเลีย พบว่า *T. leucotreta* มีความเสี่ยงสูง

สรุปความเสี่ยงของ *T. leucotreta* พบว่ามีความเสี่ยงสูง

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Management)

3.1 การนำเข้าผลพลัมสดจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้

จากผลการประเมินได้มาตรการสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันทั้ง 24 ชนิด และแนวทางการกำหนดมาตรการทางสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าผลพลัมสดจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้ ดังนี้

3.1.1 มาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูง ดังนี้

(ก) แมลงวันผลไม้ *C. capitata* ต้องจัดการความเสี่ยง ด้วยวิธีการใดวิธีการหนึ่งดังนี้ (1) การกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็นก่อนการส่งออกหรือระหว่างการขนส่ง ที่อุณหภูมิตรงบริเวณกึ่งกลางผล -0.55 องศาเซลเซียส (31 องศาฟาเรนไฮต์) หรือต่ำกว่า เป็นระยะเวลา 22 วันติดต่อกัน (USDA, 2019) (2) การฉายรังสีผลอะโวคาโดที่ปริมาณรังสีดูดกลืนต่ำสุด 100 เกรย์

(ข) แมลงวันผลไม้ *C. rosa* ต้องจัดการความเสี่ยง ด้วยวิธีการใดวิธีการหนึ่ง ดังนี้ (1) การกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็นก่อนการส่งออกหรือระหว่างการขนส่ง ที่อุณหภูมิตรงบริเวณ

กึ่งกลางผล -0.55 องศาเซลเซียส (31 องศาฟาเรนไฮต์) หรือต่ำกว่า เป็นระยะเวลา 22 วันติดต่อกัน (USDA, 2019) (2) การฉายรังสีผลอะโวคาโดที่ปริมาณรังสีดูดกลืนต่ำสุด 150 เกรย์

(ค) หนอนเจาะผล *T. leucotreta* ผลอะโวคาโดต้องมาจากแปลงปลูกในพื้นที่ปลอดศัตรูพืช ซึ่งต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดในมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 4 เรื่อง ข้อกำหนดสำหรับการสถาปนาพื้นที่ปลอดศัตรูพืช (FAO, 2018a) (2) ผลอะโวคาโดต้องมาจากแปลงปลูกในสถานที่ผลิตปลอดศัตรูพืชและแหล่งผลิตปลอดศัตรูพืช ซึ่งต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดในมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 10 เรื่อง ข้อกำหนดสำหรับการสถาปนาสถานที่ผลิตปลอดศัตรูพืชและแหล่งผลิตปลอดศัตรูพืช (FAO, 2018b) (3) แนวทางดำเนินการในรูประบบ (System approach) ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 14 เรื่อง ข้อกำหนดสำหรับการสถาปนาพื้นที่ปลอดศัตรูพืช (FAO, 2018c) (4) การฉายรังสีผลอะโวคาโดที่ปริมาณรังสีดูดกลืนต่ำสุด 400 เกรย์

(ง) แมลงวันผลไม้ *C. capitata*, *C. rosa* และหนอนผีเสื้อ *T. leucotreta* ใช้วิธีกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็น (cold treatment) ที่อุณหภูมิบริเวณกึ่งกลางผล -0.55 องศาเซลเซียส (31 องศาฟาเรนไฮต์) หรือต่ำกว่า เป็นระยะเวลานาน 22 วันติดต่อกัน ได้รับการยอมรับว่าได้รับการยอมรับว่าเป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชสำหรับกำจัดศัตรูพืชทั้ง 3 ชนิด ในผลพลัมสด

3.1.2 มาตรการสำหรับศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงปานกลางและความเสี่ยงต่ำ ดังนี้

ก. เพี้ย หอย *Asterolecanium pustulans*, *Pseudaulacaspis pentagona*, *Diaspidiotus africanus* และเพลี้ยแป้ง *Pseudococcus viburni* เพลี้ยไฟ *Thrips australis* เพลี้ยหอยไร *Brevipalpus obovatus*, *Bryobia rubrioculus* และ *Panonychus ulmi* : ต้องได้รับการจัดการความเสี่ยงด้วยวิธีการใดวิธีการหนึ่งดังนี้

- (1) รมผลพลัมด้วยสารรมเมทิลโบรไมด์ สำหรับแมลงทำลายภายนอกผล
- (2) การสุ่มผลพลัมสดเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชก่อนส่งออก

ข. หนอนเจาะผล *Cydia pomonella* ต้องได้รับการจัดการความเสี่ยงด้วยวิธีการใด วิธีการหนึ่งดังนี้

(1) ผลพลัมต้องมาจากแปลงปลูกในพื้นที่ปลอดศัตรูพืช ซึ่งต้องปฏิบัติตาม ข้อกำหนดในมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (ISPM) ฉบับที่ 4 เรื่อง ข้อกำหนดสำหรับการสถาปนาพื้นที่ปลอดศัตรูพืช (Requirements for the establishment of pest free areas 1995)

(2) ผลพลัมต้องมาจากแปลงปลูกในสถานที่ผลิตปลอดศัตรูพืชและแหล่งผลิต ปลอดศัตรูพืช ซึ่งต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดในมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 10 เรื่อง ข้อกำหนดสำหรับการสถาปนาสถานที่ผลิตปลอดศัตรูพืชและแหล่งผลิตปลอดศัตรูพืช (Pest free places of production and pest free production sites 1999)



(3) แนวทางดำเนินการในรูประบบ (System approach) เช่น การบริหาร จัดการศัตรูพืชในสวนอย่างถูกต้องและเหมาะสม มีการสำรวจศัตรูพืชแบบติดตาม และมีกระบวนการ คัดเลือกผลผลิตให้ได้มาตรฐานในโรงบรรจุสินค้า โดยคัดเลือกผลพลัมที่ดีไม่มีรอยทำลายของแมลง หรือผลแตก ทำความสะอาด เพื่อกำจัดศัตรูพืชบางชนิดที่ทำลายอยู่บนผิวของผลพลัม และการสุ่มผล พลัมเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชก่อนส่งออก เป็นต้น

ค. หนอนผีเสื้อ *Epichoristodes acerbella* หอยทาก *Helix aspersa*, *Theba pisana* ใช้วิธีการสุ่มผลพลัมสดเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชก่อนส่งออก

ง. แบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* และ *Xanthomonas arboricola* และ รา *Diaporthe ambigua*, *Gloeodes pomigena*, *Monilinia laxa*, *Mucor piriformis*, *Tranzschelia discolor* และ *Venturia carpophila* ใช้แนวทางดำเนินการในรูประบบ (System approach) เช่น การบริหาร จัดการศัตรูพืชในสวน และมีกระบวนการคัดเลือกผลผลิตให้ได้มาตรฐานในโรงบรรจุสินค้า และการสุ่มผลพลัมสดเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชก่อนส่งออก เป็นต้น

3.1.3 มาตรการสนับสนุนอื่นๆ ดำเนินการดังนี้

ก. การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชก่อนการส่งออก ณ ประเทศต้นทาง

(1) การจดทะเบียนสวนที่จะส่งออกเพื่อการตรวจสอบย้อนกลับกรณีตรวจพบศัตรูพืชในสินค้า

(2) การจัดการก่อนการเก็บเกี่ยว ต้องมีการบริหารจัดการที่ดีในแปลงปลูก ได้แก่ การป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแปลงปลูกอย่างถูกต้องและเหมาะสม

(3) การจัดการขณะเก็บเกี่ยว ต้องมีการจัดการที่ดี การเก็บผลผลิตต้องมีภาชนะรองรับ การขนย้ายผลผลิตต้องแน่ใจว่าไม่มีศัตรูพืชเข้าทำลายซ้ำ

(4) การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว: การจัดการในโรงคัดบรรจุที่ได้มาตรฐาน มีกระบวนการคัดเลือกผลผลิตให้ได้มาตรฐาน โดยคัดผลที่ดีไม่มีรอยทำลายของแมลงหรือผลแตก ล้าง ทำความสะอาด เพื่อกำจัดศัตรูพืชบางชนิดที่ทำลายอยู่บนผิวของผลสาลี สุ่มตรวจศัตรูพืชและบรรจุลงในภาชนะที่ป้องกันการเข้าทำลายซ้ำของศัตรูพืชได้

ข. การจัดการความเสี่ยง ณ จุดนำเข้า ที่ด่านตรวจพืช

การตรวจนำเข้า เจ้าหน้าที่กักพืชตรวจเอกสารการนำเข้าตามเงื่อนไข และสุ่มผลพลัมเพื่อตรวจสอบว่ามีศัตรูพืชติดมาหรือไม่ดังนี้ (1) นำเข้าจำนวนน้อยกว่า 1,000 ผล สุ่มตัวอย่างผลไม้จำนวน 450 ผล หรือทั้งหมด (2) นำเข้าจำนวนเท่ากับหรือมากกว่า 1,000 ผล สุ่มตัวอย่างผลไม้จำนวน 600 ผล (Whyte, 2009)

หากพบศัตรูพืชกักกันให้ดำเนินการปฏิเสธการนำเข้า ยึดเพื่อทำลาย หรือกำจัดศัตรูพืช ตามความเหมาะสม



3.2 การนำเข้าผลพลัมสดจากรัฐอิสราเอล

จากผลการประเมินได้มาตรการสำหรับจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันทั้ง 15 ชนิด และแนวทางการกำหนดมาตรการทางสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าผลพลัมสดจากรัฐอิสราเอล ดังนี้

3.2.1 มาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *C. capitata*, และหนอนผีเสื้อ *T. leucotreta* ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.1.1 เช่น การกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็น (cold treatment) ที่อุณหภูมิบริเวณกึ่งกลางผล -0.55 องศาเซลเซียส (31 องศาฟาเรนไฮต์) หรือต่ำกว่า ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 22 วัน ก่อนการส่งออกหรือระหว่างการขนส่ง และการฉายรังสีที่ปริมาณรังสีดูดกลืนต่ำสุด 400 เกรย์

3.2.2 มาตรการสำหรับศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงปานกลางและความเสี่ยงต่ำ ดังนี้

ก. เพลี้ยหอย *Lepidosaphes ulmi*, *Parlatoria oleae* ต้องได้รับการจัดการความเสี่ยงด้วยวิธีการใดวิธีการหนึ่งดังนี้

(1) รมผลพลัมด้วยสารรมเมทิลโบรไมด์ สำหรับแมลงทำลายภายนอกผล

(2) การสุ่มผลพลัมสดเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชก่อนส่งออก

ข. หนอนผีเสื้อ *Anarsia lineatella* และ *Lobesia botrana* ใช้วิธีการสุ่มผลพลัมสดเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชก่อนส่งออก

ง. แบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* และรา *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, *Tranzschelia discolor*, *Verticillium dahlia*, *Xylella fastidiosa* ใช้แนวทางดำเนินการในรูประบบ (System approach) เช่น การบริหารจัดการศัตรูพืชในสวน และมีกระบวนการคัดเลือกผลผลิตให้ได้มาตรฐานในโรงบรรจุสินค้า และการสุ่มผลพลัมสดเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชก่อนส่งออก เป็นต้น

3.2.3 มาตรการสนับสนุนอื่นๆ ดำเนินการเช่นเดียวกับที่กำหนดสำหรับการนำเข้าผลพลัมสดจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้ ข้อ 3.1.3

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการศึกษาระหว่างเดือนตุลาคม 2561-กันยายน 2564 ได้ข้อมูลทั่วไปของพลัมที่ปลูกในสาธารณรัฐแอฟริกาใต้ และรัฐอิสราเอล เช่น พื้นที่ปลูก พันธุ์ การปลูก ฤดูเก็บเกี่ยวผลผลิต การจัดการหลังเก็บเกี่ยว การรับรองสุขอนามัยพืช นอกจากนี้ ได้ข้อมูลศัตรูพลัม จำนวน 272 ชนิด ได้แก่ แมลง 185 ชนิด ไร 14 ชนิด หอยทาก 3 ชนิด ไส้เดือนฝอย 8 ชนิด แบคทีเรีย 9 ชนิด รา 42 ชนิด และไวรัส 11 ชนิด โดยเป็นศัตรูพลัมที่มีรายงานพบในสาธารณรัฐแอฟริกาใต้ จำนวน 113 ชนิด และมีรายงานพบในรัฐอิสราเอล จำนวน 134 ชนิด

ผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช พบว่าศัตรูพืชกักกันของผลพลัมสดนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้ มีจำนวน 24 ชนิด แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้



ศัตรูพืชชุกักกันที่มีความเสี่ยงสูง จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Ceratitis capitata*, *Ceratitis rosa*, *Thaumatotibia leucotreta*

ศัตรูพืชชุกักกันที่มีความเสี่ยงปานกลาง จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยหอย *Asterolecanium pustulans*, *Diaspidiotus africanus*, *Pseudaulacaspis pentagona* และ เพลี้ยแป้ง *Pseudococcus viburni*

ศัตรูพืชชุกักกันที่มีความเสี่ยงต่ำ จำนวน 17 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟ *Thrips australis* หนอนผีเสื้อ *Cydia pomonella*, *Epichoristodes acerbella*, ไร *Brevipalpus obovatus*, *Bryobia rubrioculus*, *Panonychus ulmi* หอยทาก *Helix aspersa*, *Theba pisana* แบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* และ *Xanthomonas arboricola* และ ๖ รา *Diaporthe ambigua*, *Gloeodes pomigena*, *Monilinia laxa*, *Mucor piriformis*, *Tranzschelia discolor* และ *Venturia carpophila*

ศัตรูพืชชุกักกันของผลพลัมสดนำเข้าจากรัฐอิสราเอล มีจำนวน 14 ชนิด แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

ศัตรูพืชชุกักกันที่มีความเสี่ยงสูง จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Ceratitis capitata*, *Thaumatotibia leucotreta*

ศัตรูพืชชุกักกันที่มีความเสี่ยงปานกลาง จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยหอย *Parlatoria oleae*

ศัตรูพืชชุกักกันที่มีความเสี่ยงต่ำ จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ หนอนผีเสื้อ *Anarsia lineatella*, *Lepidosaphes ulmi*, *Lobesia botrana* แบคทีเรีย *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* และ *Xanthomonas arboricola* และ ๖ รา *Monilinia fructigena*, *Monilinia laxa*, *Tranzschelia discolor* และ *Verticillium dahlia*, *Xylella fastidiosa*

แนวทางการกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชุกักกัน มีดังนี้

(1) ศัตรูพืชชุกักกันที่มีความเสี่ยงสูง ได้แก่ แมลงวันผลไม้ *C. capitata*, *C. rosa* และ หนอนผีเสื้อ *T. leucotreta* ใช้วิธีกำจัดศัตรูพืชด้วยความเย็น (cold treatment) โดยกำหนดให้อุณหภูมิตรงบริเวณกึ่งกลางผล -0.55 องศาเซลเซียส (31 องศาฟาเรนไฮต์) หรือต่ำกว่า ระยะเวลา 22 วันติดต่อกัน

(2) ศัตรูพืชชุกักกันที่มีความเสี่ยงปานกลางและความเสี่ยงต่ำ

- เพลี้ยหอย เพลี้ยแป้ง เพลี้ยไฟ ไร กำหนดให้ใช้วิธีการ รดผลพลัมด้วยสารรมเมทิลโบรไมด์ และการสุ่มผลพลัมสดเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชก่อนส่งออก

- หนอนเจาะผล *Cydia pomonella* ต้องได้รับการจัดการความเสี่ยงโดยผลพลัมต้องมาจากแปลงปลูกในพื้นที่ปลอดศัตรูพืช หรือมาจากแปลงปลูกในสถานที่ผลิตปลอดศัตรูพืช และแหล่งผลิตปลอดศัตรูพืช หรือต้องมีการดำเนินการในรูประบบ



- หนอนผีเสื้อ *Epichoristodes acerbella* หอยทาก *Helix aspersa*, *Theba pisana* ใช้วิธีการสุ่มผลพลัมสดเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชก่อนส่งออก

- แบคทีเรีย และรา ใช้แนวทางดำเนินการในรูประบบ (System approach) เช่น การบริหารจัดการศัตรูพืชในสวน และมีกระบวนการคัดเลือกผลผลิตให้ได้มาตรฐานในโรงบรรจุสินค้า และการสุ่มผลพลัมสดเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชก่อนส่งออก เป็นต้น

(3) การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชก่อนการส่งออก ณ ประเทศต้นทาง โดยกำหนดให้มีการจดทะเบียนสวนส่งออก และโรงคัดบรรจุ การบริหารจัดการศัตรูพืชในสวน การจัดการขณะเก็บเกี่ยวเพื่อไม่ให้ศัตรูพืชเข้าทำลายซ้ำ และการจัดการภายหลังเก็บเกี่ยวในโรงคัดบรรจุ ที่มีกระบวนการคัดเลือกผลที่ถูกศัตรูพืชทำลาย การทำความสะอาดผลพลัม เป็นต้น

(4) การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช ณ จุดนำเข้า ที่ด่านตรวจพืช โดยกำหนดให้มีการสุ่มผลพลัมมาตรวจสอบว่ามีศัตรูพืชติดมาหรือไม่ โดยมีจำนวนที่สุ่มตัวอย่าง ดังนี้ (1) หากนำเข้าจำนวนน้อยกว่า 1,000 ผล สุ่มตัวอย่างผลไม้จำนวน 450 ผล หรือทั้งหมด (2) นำเข้าจำนวนเท่ากับหรือมากกว่า 1,000 ผล สุ่มตัวอย่างผลไม้จำนวน 600 ผล หากตรวจพบศัตรูพืชก็กักกันให้ดำเนินการ ปฏิเสธการนำเข้า ยึดเพื่อทำลาย หรือกำจัดศัตรูพืช ตามความเหมาะสม

สำหรับการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของผลพลัมสดนำเข้าจากรัฐอิสราเอลจะดำเนินการต่อในปี 2564

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2556. *ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าผลพลัมสดจากเครือรัฐออสเตรเลีย พ.ศ. 2556*. ประกาศ ณ วันที่ 27 ธันวาคม 2556. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 131 ตอนพิเศษ 9 ง. ลงวันที่ 15 มกราคม 2557.

กรมวิชาการเกษตร. 2562. *ประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เงื่อนไขการนำเข้าผลพลัมสดจากสหรัฐอเมริกา พ.ศ. 2562*. ประกาศ ณ วันที่ 13 กันยายน 2562. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 136 ตอนพิเศษ 250 ง ลงวันที่ 8 ตุลาคม 2562.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. *ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และ เงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550*. ประกาศ ณ วันที่ 26 เมษายน พ.ศ. 2550 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 124 ตอนพิเศษ 66 ง ลงวันที่ 1 มิถุนายน 2550.

CABI (Centre for Agriculture and Biosciences International). 2021. *Crop Protection Compendium*. Walling ford, UK: CAB International. (Online). Available. <http://www.cabi.org/cpc/> (December 16, 2020).

DAFF (Department of Agriculture, Forestry and Fisheries). 2008. *Phytosanitary Information Assessment Programme for South African Fresh Fruit: Plum*. The



- information for pest risk analysis submitted by the Directorate Plant Health, Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Republic of South Africa.
- FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations). 2016a. *International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) 2: Framework for Pest Risk Analysis (adopted 2007)*. International Plant Protection Convention (IPPC). Rome, Italy.
- FAO. (Food and Agricultural Organization of the United Nations). 2016b. *International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) 11: Pest Risk Analysis for Quarantine Pests (adopted 2013)*. International Plant Protection Convention (IPPC). Rome, Italy.
- PPIS (Plant Protection and Inspection Services). 2008. *Information for the PRA regarding the importation of Israeli fresh plum fruit to Thailand*. Plant Protection and Inspection Services, Ministry of Agriculture and Rural Development, State of Israel.
- Whyte, C.F. 2009. *Explanatory Document on International Standard for Phytosanitary Measures No.31 (Methodologies for Sampling of Consignments)* (Online). Available. <https://www.ippc.int/en/publications/43/>. (January 20, 2021)



Table 1 Pest associated with plum. (*Prunus domestica* and *Prunus salicina*)

| Plant pests | Scientific name |
|---------------|--|
| Insects (185) | <i>Acheta bimaculate</i> , <i>Adoxophyes orana</i> , <i>Amyelois transitella</i> , <i>Anarsia lineatella</i> , <i>Anoplolepsis custodiens</i> , <i>Anoplolepsis steingroeveri</i> , <i>Anoxia orientalis</i> , <i>Antestiopsis orbitalis</i> , <i>Anthonomus quadrigibbus</i> , <i>Aonidiella aurantii</i> , <i>Apate monachus</i> , <i>Aphis gossypii</i> , <i>Aphis pomi</i> , <i>Aporia crataegi</i> , <i>Archips argyrospila</i> , <i>Archips fuscocupreanus</i> , <i>Archips podana</i> , <i>Archips rosana</i> , <i>Argyrotaenia citrana</i> , <i>Aromia bungii</i> , <i>Aspidiotus (Hemiberlesia) camellia</i> , <i>Asterolecanium pustulans</i> , <i>Aurigena chlorana</i> , <i>Bactrocera dorsalis</i> , <i>Bactrocera jarvisi</i> , <i>Bactrocera neohumeralis</i> , <i>Bactrocera tryoni</i> , <i>Bagrada hilaris</i> , <i>Brachycaudus helichrysi</i> , <i>Brachycaudus persicae</i> , <i>Cacoecia rosana</i> , <i>Caliroa cerasi</i> , <i>Calpe (Oraesia) emarginata</i> , <i>Calpe (Oraesia) provocans</i> , <i>Capnodis carbonaria</i> , <i>Capnodis tenebrionis</i> , <i>Carpocapsa pomonella</i> , <i>Carpophilus hemipterus</i> , <i>Cerambyx dux</i> , <i>Ceratitis (Pterandrus) rosa</i> , <i>Ceratitis capitata</i> , <i>Ceroplastes floridensis</i> , <i>Choristoneura rosaceana</i> , <i>Chrysomphalus aonidum</i> , <i>Chrysomphalus dictyospermi</i> , <i>Cilix glaucata</i> , <i>Closterotomus norvegicus</i> , <i>Coccus hesperidum</i> , <i>Conotrachelus nenuphar</i> , <i>Cossus Cossus</i> , <i>Crematogaster peringueyi</i> , <i>Cryptoblabes gnidiella</i> , <i>Cryptophlebia leucotreta</i> , <i>Cydia latiferreana</i> , <i>Cydia pomonella</i> , <i>Diaspidiotus africanus</i> , <i>Diaspidiotus ancyclus</i> , <i>Diaspidiotus forbesi</i> , <i>Diaspidiotus juglansregiae</i> , <i>Diaspidiotus ostreaeformis</i> , <i>Diloba caeruleocephal</i> , <i>Dischista cincta</i> , <i>Drosophila suzukii</i> , <i>Dugaria scandulata</i> , <i>Ectomyelois ceratoniae</i> , <i>Edwardsiana rosae</i> , <i>Empoasca decedens</i> , <i>Epichoristodes acerbella</i> , <i>Epidiaspis leperii</i> , <i>Epilachna (Cnootriba) similis</i> , <i>Epiphyas postvittana</i> , <i>Eremnus cerealis</i> , <i>Eremnus setuloses</i> , <i>Erythroneura flammigera</i> , <i>Eulecanium tiliae</i> , <i>Euproctis chrysorrhoea</i> , <i>Forficula Auricularia</i> , <i>Frankliniella occidentalis</i> , <i>Frankliniella schulzei</i> , <i>Frankliniella tritici</i> , <i>Gelechia vepretella</i> , <i>Gonocephalum simplex</i> , <i>Grapholita funebrana</i> , <i>Grapholita molesta</i> , <i>Grapholita packardi</i> , <i>Grapholita prunivora</i> , <i>Gryllotalpa africana</i> , <i>Gymnelema plebigena</i> , <i>Haplidia transversa</i> , <i>pyrina</i> |



Table 1 Pest associated with plum. (*Prunus domestica* and *Prunus salicina*) (continue)

| Plant pests | Scientific name |
|----------------|---|
| Insect (cont.) | <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>Helicoverpa punctigera</i> , <i>Heliothrips haemorrhoidalis</i> , <i>Heliothrips sylvanus</i> , <i>Hemiberlesia rapax</i> , <i>Hippodamia convergens</i> , <i>Homalodisca vitripennis</i> , <i>Hyalopterus pruni</i> , <i>Hyphantria cunea</i> , <i>Hypopholis sommeri</i> , <i>Hysteroneura setariae</i> , <i>Icerya purchasi</i> , <i>Latoia lastriga</i> , <i>Lepidosaphes ulmi</i> , <i>Lindingaspis rossi</i> , <i>Linepithema (Iridiomyrmex) humile</i> , <i>Lobesia botrana</i> , <i>Lopholeucaspis japonica</i> , <i>Lygus elisus</i> , <i>Lygus hesperus</i> , <i>Lygus lineolaris</i> , <i>Lymantria lapidicola</i> , <i>Lyonetia clerkella</i> , <i>Macchiademus diplopterus</i> , <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Malacosoma Neustria</i> , <i>Maladera matrida</i> , <i>Monolepta lepida</i> , <i>Myzus persicae</i> , <i>Naupactus xanthographus</i> , <i>Nezara viridula</i> , <i>Nilotaspis halli</i> , <i>Nipaecoccus viridis</i> , <i>Orius insidiosus</i> , <i>Orius tristicolor</i> , <i>Otiiorhynchus cribricollis</i> , <i>Oxycarenum hyalinipennis</i> , <i>Oxyrhachis fuscicornis (Xipistes furci-cornis)</i> , <i>Pachnoda sinuata</i> , <i>Pandemis cerasana</i> , <i>Pandemis pyrusana</i> , <i>Pantomorus cervinus</i> , <i>Parlatoria oleae</i> , <i>Parlatoria perganei</i> , <i>Parthenolecanium corni</i> , <i>Parthenolecanium persicae</i> , <i>Pentodon bispinosa</i> , <i>Pericyma scandulata</i> , <i>Phenacoccus aceris</i> , <i>Phlyctinus callosus</i> , <i>Pholicodes conicollis</i> , <i>Pholicodes syriacus</i> , <i>Pholicodes vittatus</i> , <i>Phycita pedisignella</i> , <i>Plangia graminea</i> , <i>Platynota stultana</i> , <i>poecilia ambiguella</i> , <i>Prasoidea sericea</i> , <i>Proeulia auraria</i> , <i>Proeulia chrysopteris</i> , <i>Pseudaulacaspis pentagona</i> , <i>Pseudococcus calceolariae</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i> , <i>Pseudococcus maritimus</i> , <i>Pseudococcus viburni</i> , <i>Pterochloroides persicae</i> , <i>Quadraspidiotus perniciosus</i> , <i>Retithrips syriacus</i> , <i>Rhagoletis completa</i> , <i>Rhagoletis pomonella</i> , <i>Rhopalosiphum padi</i> , <i>Rhopalosiphum rufiabdominalis</i> , <i>Rhyparochromus (= Raglius) apicalis</i> , <i>Saissetia coffeae</i> , <i>Saturnia pyri</i> , <i>Schistocerus bimaculatus</i> , <i>Scolytus amygdali</i> , <i>Serrodus partita</i> , <i>Sitona gressorial</i> , <i>Sphaerolecanium prunastri</i> , <i>Spodoptera littoralis</i> , <i>Strophomorphus porcellus</i> , <i>Synanthedon pictipes</i> , <i>Taeniothrips inconsequens</i> , <i>Thrips australis</i> , <i>Thrips flavus</i> , <i>Thrips imaginis</i> , <i>Thrips tabaci</i> , <i>Tortrix capensana</i> , <i>Trialeurodes vaporariorum</i> , <i>Tribolium castaneum</i> , <i>Tirachys holosericeus</i> , <i>Xyleborus dispar</i> , <i>Xyleborus xylographus</i> , <i>Yponomeuta padellu</i> , <i>Zeuzera</i> |



Table 1 Pest associated with plum. (*Prunus domestica* and *Prunus salicina*) (continue)

| Plant pests | Scientific name |
|---------------|--|
| Mite (14) | <i>Aculus fockeui</i> , <i>Brevipalpus californicus</i> , <i>Brevipalpus obovatus</i> , <i>Brevipalpus phoenicis</i> , <i>Bryobia rubrioculus</i> , <i>Cenopalpus pulcher</i> , <i>Oligonychus mangiferus</i> , <i>Panonychus ulmi</i> , <i>Tetranychus canadensis</i> , <i>Tetranychus kanzawai</i> , <i>Tetranychus mcdanieli</i> , <i>Tetranychus pacificus</i> , <i>Tetranychus turkestanii</i> , <i>Tetranychus urticae</i> |
| Snail (3) | <i>Helix aspersa</i> , <i>Theba pisana</i> , <i>Candidula intersepta</i> |
| Nematodes (8) | <i>Helicotylenchus dihystra</i> , <i>Meloidogyne incognita</i> , <i>Meloidogyne javanica</i> , <i>Pratylenchus penetrans</i> , <i>Pratylenchus vulnus</i> , <i>Xiphinema americanum</i> , <i>Xiphinema diversicaudatum</i> , <i>Xiphinema rivesi</i> |
| Bacteria (9) | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Rhizobium rhizogenes</i> , <i>Xanthomonas arboricola</i> (= <i>Xanthomonas campestris</i>) pv. <i>pruni</i> , <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>pruni</i> , <i>Xylella fastidiosa</i> |
| Fungi (42) | <i>Alternaria alternata</i> , <i>Apiosporina morbosa</i> , <i>Armillaria heimii</i> , <i>Armillaria mellea</i> (= <i>Armillariella mellea</i>), <i>Blumeriella hiemalis</i> , <i>Botryosphaeria dothidea</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cercospora circumscissa</i> , <i>Chalara elegans</i> , <i>Chondrostereum purpureum</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Dematophora necatrix</i> , <i>Diaporthe ambigua</i> , <i>Diaporthe eres</i> , <i>Diplodia seriata</i> , <i>Gloeodes pomigena</i> , <i>Glomerella cingulata</i> , <i>Leucostoma personii</i> , <i>Monilinia fructicola</i> , <i>Monilinia fructigena</i> , <i>Monilinia laxa</i> , <i>Mucor piriformis</i> , <i>Mycosphaerella tassiana</i> (= <i>Cladosporium herbarum</i>), <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> , <i>Passalora circumscissa</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Phytophthora cactorum</i> , <i>Phytophthora megasperma</i> , <i>Podosphaera clandestina</i> , <i>Podosphaera clandestina</i> var. <i>clandestina</i> , <i>Podosphaera tridactyla</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Rosellinia necatrix</i> , <i>Taphrina communis</i> , <i>Taphrina deformans</i> , <i>Taphrina pruni</i> , <i>Thyrostroma carpophilum</i> , <i>Tranzschelia discolor</i> , <i>Tranzschelia pruni-spinosae</i> , <i>Venturia carpophila</i> , <i>Venturia carpophila</i> (= <i>Cladosporium carpophilum</i>), <i>Verticillium dahlia</i> |



Table 1 Pest associated with plum. (*Prunus domestica* and *Prunus salicina*) (continue)

| Plant pests | Scientific name |
|-------------|--|
| Virus (11) | <i>American plum line pattern virus, Apple chlorotic leaf spot virus, Apple chlorotic leafspot trichovirus, Apple mosaic virus, Carnation ringspot virus, Cherry virus A, Plum pox virus, Prune dwarf ilavirus, Prune dwarf virus, Prunus necrotic ringspot virus, Strawberry latent ringspot virus, Tomato ringspot virus</i> |

References : กรมวิชาการเกษตร 2556, กรมวิชาการเกษตร 2562; CABI, 2020; DAFF, 2008; PPIS, 2008



ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออกผลขนุน
Study on Phytosanitary Measures for the Exportation of Jackfruit

วรัญญา มาลี^{1/} สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ^{1/} อมรพร คุณะพันธ์^{1/} คมศร แสงจินดา^{1/}

บุษบง มั่นสมั่นคง^{2/} สุนัดดา เขาวลิต^{3/} ชนินทร ดวงสะอาด^{4/}

^{1/}กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{4/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The Study on phytosanitary measures for the exportation of jackfruit was carried out at the plant quarantine research group, Plant Protection Development Office, jackfruit orchard and packinghouse in Ra-yong province from October 2019 to September 2021 to identify the quarantine pests and phytosanitary measures for export fresh jackfruit from Thailand to the United States of America and the Republic of the Union of Myanmar. The results of the study obtained crop information, cultivation, export statistics, and phytosanitary measures for managing the quarantine pests required by importing countries. The result of preliminary pest risk assessment show that there are two potential quarantine pests of jackfruit for the export to the Republic of the Union of Myanmar, including *Bactrocera umbrosa*, and *Dysmicoccus neobrevipes*. There are five potential quarantine pests of jackfruit for the exports to the United States, including *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera umbrosa*, *Dysmicoccus neobrevipes*, *Nipaecoccus viridis* and *Glyphodes caesalis*. Phytosanitary measures for the potential quarantine pests such as systematic approach or radiation could be propose to the importing country for consideration.

Keywords : phytosanitary measures, export, jackfruit

รหัสการทดลอง 03-04-59-01-04-00-08-63



บทคัดย่อ

ดำเนินการศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออกผลขนุน ที่กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างเดือนตุลาคม 2562-กันยายน 2564 มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบรายชื่อศัตรูพืชกักกันและหาแนวทางการกำหนดมาตรการด้านสุขอนามัยพืชสำหรับการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน สำหรับการส่งออกผลขนุนสดจากไทยไปยังสาธารณรัฐอเมริกา และสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมา โดยดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเบื้องต้น ผลการศึกษาได้ข้อมูลพืช (crop information) ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ พันธุ์ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ แหล่งปลูกในประเทศไทย สถิติการส่งออก และการรับรองสุขอนามัยพืชที่ใช้ในปัจจุบัน จากการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชเบื้องต้นทำให้ทราบชนิดของศัตรูพืชที่ประเทศคู่ค้าอาจกำหนดเป็นศัตรูพืชกักกัน (ศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน) ดังนี้ ศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของการส่งออกขนุนไปยังสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมา มีจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera umbrosa*, และ *Dysmicoccus neobrevipes* และศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของการส่งออกขนุนไปยังสหรัฐอเมริกา มีจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera umbrosa*, *Dysmicoccus neobrevipes*, *Nipaecoccus viridis*, *Glyphodes caesalis* และได้แนวทางการเสนอมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการจัดการศัตรูขนุนที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันก่อนการส่งออกสินค้าดังกล่าวให้ประเทศคู่ค้า ประกอบการพิจารณาอนุญาตการนำเข้าสินค้าพืชจากประเทศไทย เช่น การบูรณาการในแนวทางดำเนินการในรูประบบสำหรับการบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (system approach) หรือ การฉายรังสี (irradiation) เป็นต้น

คำหลัก : มาตรการสุขอนามัยพืช ส่งออก ขนุน

คำนำ

ขนุน เป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศและมีโอกาสที่ดีในการส่งออกไป สหรัฐอเมริกา สำนักงานส่งเสริมการค้าภายในต่างประเทศ ณ นครลอสแอนเจลิส ได้กล่าวถึงโอกาสขนุนในตลาดสหรัฐอเมริกา ว่า ขนุนสดและผลิตภัณฑ์สินค้าจากขนุนมีวางจำหน่ายแพร่หลายมากขึ้นในตลาดสหรัฐฯ ทั้งในตลาดค้าปลีกที่เป็นของคน เอเชียและตลาดค้าปลีกเครือข่ายที่ให้บริการผู้บริโภคคนพื้นเมืองทั่วไปเช่น Whole Foods Market โดยลักษณะขนุนที่วางขายในตลาดสหรัฐฯ ได้แก่ ขนุนสด ผลิตภัณฑ์ขนุน อาหารที่ทำจากขนุนที่ให้บริการในร้านอาหาร และขนุนแช่เยือกแข็ง ซึ่งความต้องการในตลาดยังคงอยู่ในระดับต่ำ สำหรับสินค้าที่ยังไม่แพร่หลายในตลาดแต่มีศักยภาพสูงในตลาด ได้แก่ เม็ดขนุน เนื้อขนุนตากแห้ง และไม้ขนุน สำหรับโอกาสของไทยตั้งอยู่บนข้อเท็จจริงสองประการคือ ประเทศไทยอุดมไปด้วยวัตถุดิบ และมีการผลิตสินค้าจากขนุนแล้ว จึงมีความพร้อมในการเข้าสู่ตลาดสหรัฐฯ และจากการที่ตลาดการบริโภคผลิตภัณฑ์ขนุน ของสหรัฐฯยังอยู่ในระยะเริ่มต้น การแข่งขันในตลาดจึงยังคงอยู่ในระดับต่ำ การเข้าสู่ตลาดได้ก่อนเปิดโอกาสให้แก่การสร้าง ความเติบโตในตลาด (สำนักงานส่งเสริมการค้าภายในต่างประเทศ, 2559)



การเปิดตลาดสินค้าเกษตรส่งออกต่างประเทศในปัจจุบันประเทศผู้นำเข้าจะเป็นผู้ร้องขอข้อมูลจากประเทศผู้ส่งออกเพื่อใช้ประกอบการพิจารณา เช่น ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพืช และศัตรูพืชของพืชที่จะส่งออก รวมถึงมาตรการและการรับรองทางสุขอนามัยพืช เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ซึ่งพบว่าการเตรียมข้อมูลดังกล่าวมักต้องการความเร่งด่วนตามนโยบายรัฐหรือความต้องการตลาด ซึ่งใช้ระยะเวลาเตรียมการนานหรือล่าช้า เนื่องจากขาดข้อมูล ข้อมูลไม่ชัดเจนหรือเก่าเกินไป ไม่ถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์ ไม่ทราบสถานการณ์ของศัตรูพืชขึ้น ๆ ในปัจจุบัน รวมถึงอาจไม่มีตัวอย่างใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ยืนยัน บางชนิดมีการรายงานพบเมื่อนานมาแล้ว แต่ในปัจจุบันไม่เคยมีการตรวจพบอีก หรือข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานการตรวจพบติดไปกับสินค้าเกษตรส่งออกของประเทศไทย ซึ่งส่งผลกระทบต่อ การเปิดตลาด หรือขยายตลาด ดังนั้นการเตรียมข้อมูลพืช และศัตรูพืชที่สมบูรณ์ และมีผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของประเทศไทยล่วงหน้า จะทำให้ทราบชนิดของศัตรูพืชที่มีศักยภาพในการเป็นศัตรูพืชกักกันของการส่งออกสินค้า เพื่อจะได้เสนอมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชขึ้น ๆ ให้ประเทศผู้นำเข้าพิจารณา และประเทศไทยเองได้เตรียมความพร้อมที่จะต้องจัดการศัตรูพืชขึ้นไว้ด้วย อาจารย์ระยะเวลาการดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผู้นำเข้าให้รวดเร็วยิ่งขึ้น ส่งผลดีต่อระบบการตลาดในสากลที่ปัจจุบันมีการแข่งขันสูง และสามารถเพิ่มมูลค่าการส่งออกสินค้าเกษตรของประเทศได้อย่างยิ่ง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างศัตรูพืช เช่น พู่กัน กล้องพลาสติก เป็นต้น
2. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope
3. วัสดุเกษตร ได้แก่ ผลขนุน
5. กล้องถ่ายรูป
6. หนังสือ ตำรา วารสาร เอกสารวิชาการที่เกี่ยวข้อง (ภาษาไทยและอังกฤษ) เอกสารMarket access: A guide to phytosanitary issues for national plant protection organizations และฐานข้อมูลออนไลน์ เช่น Crop Protection Compendium, Description of Fungi and Bacteria, Description Maps of Plant Pests, Description Maps of Plant Diseases เป็นต้น

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมข้อมูลพืชและศัตรูพืช

1.1 สืบค้นและรวบรวมข้อมูลพืช (2563)

1.1.1 สืบค้นและรวบรวมข้อมูลทั่วไปของขนุน ที่จะส่งออก เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ อนุกรมวิธานของพืช ชื่อ พ้อง ชื่อสามัญ พันธุ์หรือสายพันธุ์ส่วนของพืชที่สามารถส่งออก เช่น ผล เป็นต้น จุดประสงค์ของการส่งออกพืช เช่น บริโภค อุตสาหกรรม เป็นต้น ประเทศปลายทางที่จะส่งออกไป (ประเทศผู้นำเข้า) และภาพถ่ายของขนุน ที่ต้องการส่งออกและที่เกี่ยวข้องจากของจริง



บันทึกข้อมูลทั่วไปของขนุน พันธุ์ หรือสายพันธุ์

1.1.2 สืบค้นและรวบรวมข้อมูลการผลิตและแหล่งเพาะปลูกขนุน ได้แก่ ภูมิภาค จังหวัด ตำบล และอื่น ๆ แผนที่แสดงแหล่งปลูกพืช สภาพภูมิอากาศของแหล่งปลูกขนุน ในประเทศไทย ปริมาณที่คาดว่าจะส่งออก แผนการบริหาร จัดการศัตรูพืช การผลิต วิธีการเก็บเกี่ยว ช่วงเวลาเก็บเกี่ยว และระบบการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืช

บันทึกข้อมูลการผลิต/การปลูก แหล่งเพาะปลูก การบริหารจัดการศัตรูพืช และการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืช

1.2 สืบค้นและรวบรวมข้อมูลศัตรูขนุน รวมถึงการจัดการหลังเก็บเกี่ยว

1.2.1 สืบค้นข้อมูลศัตรูขนุน ที่มีรายงานพบในประเทศไทยและต่างประเทศ ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ชื่อพ้อง ชื่อสามัญ อนุกรมวิธานของศัตรูพืช ชื่อพืชอาศัย ส่วนของพืชที่ศัตรูพืชเข้าทำลาย อาการ หรือลักษณะการทำลาย การแพร่กระจาย วิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืช พาหะ และเอกสารอ้างอิงทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับศัตรูพืช

บันทึกข้อมูลศัตรูขนุน เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ แหล่งแพร่กระจาย ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย/อาศัย และเป็นพาหะของศัตรูพืชชนิดอื่นหรือไม่

1.2.2 สืบค้นข้อมูลและออกไปดำเนินการเก็บข้อมูลในแปลงปลูกขนุน ที่จะส่งออก และสถานที่คัดบรรจุ เกี่ยวกับการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว เช่น วิธีการบรรจุกระบวนการตรวจก่อนส่งออก การกำจัดศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยว การเก็บรักษาสินค้าและมาตรฐานการป้องกันศัตรูพืช การขนส่งสินค้า (ภายในประเทศและระหว่างประเทศ) การส่งออก รวมทั้งกระบวนการที่ใช้ปัจจุบันสำหรับการให้การรับรองสุขอนามัยกับพืชที่จะส่งออก เช่น การตรวจสอบศัตรูพืชในแปลง ปลูก การสุ่มตัวอย่างผลขนุน เพื่อตรวจสอบศัตรูพืช การระบุข้อความรับรองพิเศษ เป็นต้น

บันทึกข้อมูลการจัดการในแปลงปลูกก่อนเก็บเกี่ยว การจัดการหลังเก็บเกี่ยว ในสถานที่คัดบรรจุ กระบวนการที่ใช้ปัจจุบันสำหรับการให้การรับรองสุขอนามัยในการส่งออก

1.2.3 นำข้อมูลจากข้อ 1.2.1 จัดทำตารางศัตรูขนุน ที่มีรายงานพบในประเทศไทย

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเบื้องต้น (2563-2564)

ดำเนินการประเมินความเสี่ยงศัตรูขนุน ที่มีรายงานพบในประเทศไทยในขั้นตอนการจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization) เพื่อตรวจสอบศัตรูพืชแต่ละชนิดว่าเข้าอยู่ในหลักเกณฑ์ที่กำหนด ในคำนิยามสำหรับศัตรูพืชกักกันหรือไม่ พิจารณาจากหลักพื้นฐาน ดังนี้

2.1 พิจารณาแบ่งกลุ่มชนิดของศัตรูขนุน เช่น แมลง ไร ไวรัส แบคทีเรีย และรา เป็นต้น โดยระบุชนิดของศัตรูพืช (identity of pest) ในระดับสปีชีส์ในกรณีที่ระบุระดับต่ำกว่าสปีชีส์ควรต้องมีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความแตกต่างในด้านความรุนแรง ขอบเขตของพืชอาศัย หรือความสัมพันธ์ของพาหะกับศัตรูพืชนั้น เป็นปัจจัยสำคัญอย่างมาก เพียงพอที่จะมีผลกระทบต่อสถานภาพทางสุขอนามัยพืช และในกรณีที่ศัตรูพืชมีพาหะเข้ามาเกี่ยวข้อง พาหะอาจได้รับการ

พิจารณาครอบคลุมไปเป็นศัตรูพืชชนิดหนึ่ง ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับศัตรูพืชสาเหตุและจำเป็นสำหรับการถ่ายทอดเชื้อของ ศัตรูพืชชนิดนั้น

2.2 ตรวจสอบศัตรูพืชในข้อ 2.1 ว่าเป็นศัตรูพืชที่มีรายงานพบในประเทศผู้นำเข้า ได้แก่ สหรัฐอเมริกา และสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมาหรือไม่ รวมถึงสถานภาพการควบคุมศัตรูพืชดังกล่าวในประเทศผู้นำเข้า

2.3 พิจารณาศักยภาพของศัตรูพืชแต่ละชนิดในการเข้ามา ตั้งรกราก แพร่กระจายในพื้นที่ที่วิเคราะห์ ความเสี่ยงศัตรูพืช (Potential for establishment and spread in PRA area) ได้แก่ สหรัฐอเมริกา และสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมา โดยมีหลักฐานสนับสนุน ได้แก่ สภาพแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศเหมาะสมต่อการเจริญแพร่ขยายพันธุ์ แพร่ระบาด/แพร่กระจายของศัตรูพืช การมีพืชอาศัย (รวมทั้งพืชที่มีความใกล้เคียงกับพืชอาศัย) มีพืชอาศัยสลับ และมีพาหะศัตรูพืชปรากฏในพื้นที่ประเทศผู้นำเข้า

2.4 พิจารณาศักยภาพการก่อให้เกิดสิ่งติดตามมาทางเศรษฐกิจในพื้นที่ที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Potential of economic consequences in PRA area) โดยพิจารณาการบ่งชี้ที่ชัดเจนว่าศัตรูพืชน่าจะมีผลกระทบทางเศรษฐกิจ ผลกระทบทางเศรษฐกิจทางตรงต่อพืช สัตว์ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อมที่ไม่อาจยอมรับได้ในประเทศผู้นำเข้า ได้แก่ สหรัฐอเมริกา และสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมา ผลกระทบทางเศรษฐกิจทางตรงต่อพืช สัตว์ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม เช่น ทำให้พืชสูญเสียผลผลิต หรือมีผลกระทบทางอ้อม เช่น การเพิ่มต้นทุนในการป้องกันกำจัด มีผลกระทบต่อระบบการผลิตพืช ภายในประเทศผู้นำเข้า หรือมีผลกระทบต่อการค้าระหว่างประเทศ เป็นต้น

บันทึกชนิดของศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันและแนวทางของมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันของผลขนุนส่งออกปสหรัฐอเมริกา และสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมา

2.5 พิจารณาคัดเลือกเฉพาะศัตรูขนุน ที่ไม่มีรายงานพบในสหรัฐอเมริกา และสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมา หรือพบแต่มีการควบคุม อย่างเป็นทางการ มีศักยภาพในการเข้ามาตั้งรกราก แพร่กระจาย และมีศักยภาพในการก่อให้เกิดสิ่งติดตามมาทาง เศรษฐกิจในประเทศดังกล่าว ซึ่งเป็นคุณสมบัติของศัตรูพืชกักกัน

2.6 จัดเตรียมข้อมูลศัตรูขนุน ที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน (datasheet) ที่ได้จากข้อ 2.5 เช่น ข้อมูลทาง ชีววิทยา สัณฐานวิทยา พืชอาศัย ศัตรูธรรมชาติลักษณะการทำลาย และการป้องกันกำจัด เป็นต้น

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest Risk Management)

การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชโดยจำแนกวิธีการที่จะดำเนินการกับศัตรูพืชแต่ละชนิด โดยมีความเป็นไปได้ ในทางปฏิบัติและไม่เป็นอุปสรรคต่อการค้าระหว่างประเทศ โดยการจำแนกและคัดเลือกวิธีการที่มีประสิทธิภาพ เพื่อลดโอกาสที่ศัตรูพืชจะติดไปกับสินค้าส่งออก เพื่อใช้เสนอให้กับประเทศคู่ค้าพิจารณาประกอบด้วยมาตรการ ดังต่อไปนี้



- มาตรการที่ใช้กับสินค้าโดยตรง เช่น กำหนดเงื่อนไขสำหรับการเตรียมสินค้า กำหนดมาตรการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่อาจติดมากับสินค้า โดยวิธีการกำจัดศัตรูพืชอาจดำเนินการหลังการเก็บเกี่ยว และอาจจะรวมถึงการใช้สารเคมี อุณหภูมิรังสีและวิธีการทางฟิสิกส์อื่นๆ

- มาตรการเพื่อป้องกันหรือลดการเข้าทำลายของศัตรูพืชในแหล่งผลิต เช่น การป้องกันกำจัดศัตรูพืช ในแปลงผลิต หรือสถานที่ผลิต การปลูกภายใต้สภาพควบคุมเฉพาะ เก็บเกี่ยวพืชในช่วงอายุที่เหมาะสม หรือผลิตพืชภายใต้กระบวนการที่ได้รับการรับรอง

- มาตรการที่ทำให้เชื่อมั่นว่าพื้นที่ผลิตหรือสถานที่ผลิตปราศจากศัตรูพืช เช่น การกำหนดพื้นที่ผลิต ปลอดศัตรูพืช แหล่งผลิตปลอดศัตรูพืช และการตรวจสอบพืชเพื่อยืนยันว่าสินค้าปราศจากศัตรูพืช ใบรับรองสุขอนามัยพืช (Phytosanitary certificate) พิจารณากำหนดให้มีการรับรองว่าสินค้าที่ส่งออกปราศจาก ศัตรูพืชกักกัน เพื่อยืนยันว่าได้มีการจัดการความเสี่ยงตามที่กำหนด และอาจกำหนดให้ระบุข้อความเพิ่มเติม (additional declaration) เพื่อแสดงให้เห็นว่าได้มีการดำเนินการมาตรการสุขอนามัยพืชเป็นการเฉพาะซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับในสากล

ขั้นตอนที่ 4 สรุปผลการศึกษา

เรียบเรียงข้อมูลที่ได้จากการดำเนินในขั้นตอนที่ 1 - 3 ได้แก่ ข้อมูลเกี่ยวกับผลขนุนที่จะส่งออก ข้อมูลศัตรูขนุนที่มีรายงานพบในประเทศ รายชื่อศัตรูขนุน ที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศผู้นำเข้า และวิธีการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศผู้นำเข้าแต่ละชนิด

เวลาและสถานที่

| | |
|---------|---|
| เวลา | ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564 |
| สถานที่ | กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สวนขนุนปลูกเพื่อส่งออกและโรงคัดบรรจุ จ.ระยอง |

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การสืบค้นและรวบรวมข้อมูล

1.1 ผลการสืบค้นและรวบรวมข้อมูลทั่วไปของขนุน ได้ข้อมูล การจำแนกทางอนุกรมวิธาน ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ พันธุ์ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ แหล่งปลูกในประเทศไทย สถิติการส่งออก และการรับรองสุขอนามัยพืชที่ใช้ในปัจจุบัน ดังนี้

ขนุนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Artocarpus heterophyllus* Lam. เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Moraceae ถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดียและในแหลมมาลายู เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางจนถึงใหญ่ อายุยืน มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว สูงประมาณ 10-25 เมตร เช่นเดียวกับสาเก ขนุนสำปะลอ จำปาตะขุนุ่นป่า และขนุนบ้าน เป็นต้น นิยมปลูกในประเทศอินเดีย ศรีลังกา พม่า อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย



การจำแนกทางอนุกรมวิธาน

Domain: Eukaryota

Kingdom: Plantae

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Class: Dicotyledonae

Order: Urticales

Family: Moraceae

Genus: Artocarpus

Species: *Artocarpus heterophyllus*

ชื่อ พ้อง (Synonym) ได้แก่ *Artocarpus brasiliensis* Gomez, *Artocarpus integrifolius* auct., *Artocarpus maxima* Blanco และ *Artocarpus philippensis* Lam.

ชื่อสามัญ jackfruit (อังกฤษ) ขนุน (ไทย)

ชื่อท้องถิ่น ขะนู (จันทบุรี), นะยวยชะ (กาญจนบุรี), เนน (นครราชสีมา), ซี้คียปะหน้อย หมากกลาง (แม่ฮ่องสอน), นากอ (ปัตตานี), มะหนุน (ภาคเหนือ ภาคใต้), ลานล้า (ภาคเหนือ), หมักหมี่ (ตะวันออกเฉียงเหนือ) เป็นต้น ถิ่นกำเนิด : ประเทศอินเดีย และถูกนำมาปลูกในประเทศไทยนานแล้ว หลักฐานเท่าที่ทราบคือสมัยกรุงศรีอยุธยามีปลูกทั่วทุกภาคของประเทศ เขตที่มีการปลูกขนุนมานานแล้ว คือ จังหวัดชลบุรี ระยอง ราชบุรี และ กาญจนบุรี (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดประจวบคีรีขันธ์, 2562)

พันธุ์ ขนุนที่นิยมปลูกเป็นการค้าคือขนุนหนึ่ง ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) ขนุนฝ้าย เป็นขนุนที่มีเนื้อยวงสีขาวหรือสีครีมปลูกกันน้อย ไม่เป็นที่นิยม (2) ขนุนเหลือง เป็นขนุนที่มีเนื้อยวงสีเหลืองอ่อน สีเหลืองทอง สีเหลืองเข้ม เป็นขนุนที่นิยมปลูกกันมากที่สุดและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (3) ขนุนจำปา เป็นขนุนที่มีเนื้อยวงสีนาก สีครั่ง สีปูนแห้ง สีเหลืองอมส้ม สีจำปา ปลูกน้อยกว่าขนุนเหลือง เป็นขนุนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง (สถาบันวิจัยพืชสวน, ม.ป.ป.) ปัจจุบันมีขนุนพันธุ์ใหม่ ๆ เกิดขึ้นอีกหลายพันธุ์และเป็นที่นิยมปลูกเพื่อส่งออก เช่น พันธุ์ทองประเสริฐ (จากการผสมข้ามพันธุ์)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ขนุนเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่ อายุหลายสิบปี ไม่ผลัดใบสูง 15-30 เมตร ทรงพุ่มทึบ

ลำต้น ลักษณะทรงต้นตั้งตรง เนื้อไม้เป็นไม้เนื้ออ่อน มีสีเหลือง

ใบ แผ่นใบรูปรี ขนาดกว้าง 5-8 เซนติเมตร ยาว 10-15 เซนติเมตร ผิวใบด้านบนสีเขียวเข้มเป็นมัน เนื้อใบหนาหยาบ เส้นกลางใบเด่นชัด ใบเดี่ยว เรียงสลับกัน

ดอก เป็นช่อสีเขียว อัดกันแน่น แยกเพศ แต่อยู่บนต้นเดียวกัน ช่อดอกตัวผู้ออกตามปลายกิ่งหรือชอกใบ เป็นแท่งยาว ช่อดอกตัวเมียเป็นแท่งกลมยาว ออกตามลำต้นหรือกิ่งใหญ่ การออก



ดอกของขุ่นในแต่ละครั้งจะออกเป็นจำนวนมาก จำนวนของดอกตัวผู้จะมากกว่าดอกตัวเมีย ทอยออกทั้งปี แต่ช่วงที่ขุ่นออกดอกมากๆ จะเป็นช่วงเดือนธันวาคม - มกราคม

ผล ดอกทั้งช่อจะเจริญร่วมกันเป็นผลรวม โดย 1 ดอกกลายเป็น 1 ยวง (เนื้อขุ่น) ใน 1 ผลจึงมีหลายเมล็ด ผลดิบเปลือกสีเขียว หนามหุ้ม ถ้ารีดเปลือกจะมียางเหนียว เมื่อแก่ เปลือกสีน้ำตาลอ่อนอมเหลือง หนามจะป้านขึ้น ภายในผลมีขั้วขุ่นหุ้มยวงสีเหลืองไว้ เมล็ดอยู่ในยวง น้ำหนักผลเฉลี่ย 15 กิโลกรัม และอาจหนักถึง 50 กิโลกรัม/ผล

แหล่งปลูก/การผลิตในประเทศไทย ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกขุ่นหน้างมาก เช่น จังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ ชลบุรี ระยอง เพชรบุรี และจันทบุรี พื้นที่ปลูกรวมทั้งประเทศ ในปี 2560 มีจำนวนทั้งหมด 48,406 ไร่ เป็นพื้นที่ที่ให้ผลผลิตแล้ว 34,559 ไร่ ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ประมาณ 68,500,166 กิโลกรัม (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2561) ช่องทางการตลาดของขุ่นในปัจจุบันแบ่งเป็น 4 ส่วนหลัก คือ (1) ตลาดในแต่ละท้องถิ่น เป็นตลาดซื้อขายผลผลิตในแหล่งผลิต มีการซื้อขายกันถึงสวนกับเจ้าของสวนโดยตรง (2) ตลาดรวมท้องถิ่น เป็นตลาดที่ซื้อขายจากตลาดในท้องถิ่น แล้วนำมารวมกันยังแหล่งจำหน่ายที่มีสถานที่แน่นอน (3) ตลาดกลางหรือตลาดขนส่ง เป็นศูนย์กลางการค้าขุ่น และเป็นตลาดขนาดใหญ่ เช่น ตลาดปากคลองตลาด ตลาดสะพานขาว ตลาดมหานาค เป็นต้น โดยเฉพาะตลาดสี่มุมเมือง และตลาดไทเป็นตลาดที่ใหญ่ สามารถรับผลผลิตได้มาก (4) ตลาดส่งออก ตลาดใหญ่ๆ ได้แก่ ฮองกง สิงคโปร์ (สถาบันวิจัยพืชสวน, มปป.)

สภาพภูมิอากาศและสภาพของดิน อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของขุ่นจะอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75-85 เปอร์เซ็นต์ หากความชื้นในอากาศต่ำขุ่นจะออกดอกช้า สภาพของดินที่ใช้ปลูกไม่ควรเป็นกรดมากเกินไป สภาพความเป็นกรดต่างของดินควรอยู่ระหว่าง 5.5-7.5 มีความลึกของหน้าดินไม่น้อยกว่า 1 เมตร ดินควร เป็นดินร่วนหรือร่วนปนทรายมีการระบายน้ำดีมีสีดำจึงจะเป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ สูงถ้าเป็นพื้นที่ดอนไม่ควรมีดินดานหรือตอไม้ขนาดใหญ่ปะปนอยู่ส่วนในพื้นที่ลุ่มควรเป็นพื้นที่ที่มีระดับน้ำใต้ดินไม่สูงเกินไปน้ำไม่ท่วมสภาพของพื้นที่ควรจะเป็นพื้นที่ราบ (กรมส่งเสริมการเกษตร, มปป.)

การปลูก การปลูกขุ่นสามารถปลูกได้ทั้งแบบยกร่องและปลูกแบบไร่ควรปลูกให้เป็นแถวเป็นแนวเพื่อสะดวกในการดูแลรักษาและการปฏิบัติงานสวน การปลูกแบบไร่ในพื้นที่ 1 ไร่ จะปลูกได้ประมาณ 16-25 ต้น การปลูกแบบยกร่องต้นมักมีขนาดเล็กกว่าแบบไร่ระยะระหว่างต้นอาจถี่กว่าในพื้นที่ 1 ไร่จะปลูกได้ประมาณ 35 ต้น

การเตรียมหลุมปลูก หลุมปลูกขนาดความกว้างยาวลึก ประมาณ 50x50x50 เซนติเมตร

วิธีการปลูก ช่วงเวลาที่เหมาะสมให้ปลูกช่วงต้นฤดูฝน ให้นำดินบนที่ขุดตากไว้ใส่ลงไป ใน หลุมผสมกับปุ๋ยคอกประมาณ 5 กิโลกรัม ร็อคฟอสเฟต 0.5 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้ได้ดินผสมกันมีปริมาตร 2 ใน 3 ของปริมาตรของหลุมแล้วนำต้นพันธุ์ขุ่นที่ถอดกระถางหรือถุงพลาสติกแล้ววางบนดินผสมแล้วกลบดินส่วนที่เหลือให้สูงถึงปากหลุม ปักไม้ยึดลำต้นมัดด้วยเชือก



การให้น้ำ โดยปกติขุ่นเป็นพืชที่ทนแล้งอยู่แล้วแต่อย่างไรก็ตามการปลูกเพื่อให้ได้ผลเต็มทีนั้นควรให้น้ำอย่างสม่ำเสมอในฤดูแล้ง พวกที่เริ่มปลูกเป็นปีแรกควรรดน้ำทุกระยะ 7 วัน และการให้น้ำในฤดูแล้งปีที่ 2 สามารถยืดเวลาให้น้ำออกไปเป็น 10-15 วัน/ครั้ง หรือช่วงที่ขาดฝนนาน ๆ ควรให้น้ำช่วยบ้างจะทำให้การเจริญเติบโตเป็นไปตามปกติ (กรมส่งเสริมการเกษตร, มปป.)

การเก็บเกี่ยวผลขุ่น ขุ่นที่ปลูกด้วยกิ่งตอนกิ่งทาบจะออกดอกและผลประมาณปีที่ 3 - 4 หลังจากปลูก ส่วนที่ปลูกด้วยเมล็ดจะให้ผลประมาณปีที่ 6 - 7 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการบำรุงรักษาด้วย ขุ่นมีดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน แต่แยกกันเป็นคนละช่อดอก ดอกตัวผู้เรียกว่า “สำ” เพราะมีกลิ่นคล้ายสำเหล้า ซึ่งจะร่วงไปในเวลาต่อมา ส่วนดอกตัวเมียมีสีเขียวและขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้ เมื่อได้รับการผสมแล้วจะเจริญเติบโตเป็นผลแก่ภายใน 8 เดือน บางพันธุ์ 3 เดือน ปกติขุ่นจะออกผลปีละ 2 ครั้ง คือครั้งแรกราวเดือน ธันวาคม - มกราคม ครั้งที่สอง ราวเดือน เมษายน - พฤษภาคม บางพันธุ์ให้ผลเรื่อย ๆ ตลอดทั้งปี สำหรับผลผลิตต้นอายุ 7 ปี มีผลประมาณ 10 - 15 ผล/ต้น/ปี ต้นอายุ 10 ปีขึ้นไป จะออกผลประมาณ ปีละ 40 - 50 ผล เพื่อให้ได้ขุ่นคุณภาพดี ควรไว้ผลให้กระจายทั่วต้น ตัดผลที่เบียดกันแน่นและไม่สมบูรณ์ออกขายเป็นขุ่นอ่อน

ระยะเก็บเกี่ยวโดยการนับอายุของผล ตั้งแต่ดอกเริ่มผสมติดจนผลแก่ประมาณ 120 - 160 วัน (พันธุ์เบาจะสุกเร็วกว่าพันธุ์หนัก) ก่อนเก็บเกี่ยวผลขุ่นต้องงดการให้น้ำอย่างน้อย 10 วัน การตัดขุ่นให้ตัดที่ก้านขั้วจนชิดกิ่ง (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์จังหวัดประจวบคีรีขันธ์, 2562)

การส่งออก สถิติการส่งออกขุ่นเดือนมกราคม-พฤศจิกายน ปี 2562 พบว่าประเทศไทยมีการส่งออกขุ่นไปยังต่างประเทศ เช่น จีน เวียดนาม มาเลเซีย สหรัฐอาหรับเอมิเรต ลาว ฝรั่งเศส ญี่ปุ่น เยอรมนี และเนเธอร์แลนด์ เป็นต้น โดยส่งออกปริมาณประมาณ 36,216 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 447 ล้านบาท โดยประเทศที่นำเข้าขุ่นไทยปริมาณมาก 3 อันดับแรก ได้แก่ จีน เวียดนาม และมาเลเซีย ตามลำดับ (กรมศุลกากร, 2563)

การรับรองสุขอนามัยพืชที่ใช้ในปัจจุบัน การอนุญาตนำเข้าขุ่นสำหรับประเทศที่มีความเข้มงวดด้านกักกันพืช จำเป็นต้องมีมาตรการทางสุขอนามัยพืชที่ทำให้แน่ใจว่าไม่มีศัตรูพืชกักกันติดมากับผลขุ่นที่ส่งออกจากประเทศไทย เช่น ญี่ปุ่น กำหนดให้ผลขุ่นเป็นสิ่งต้องห้าม มีศัตรูพืชกักกันคือ *Bactrocera dorsalis* ด้หว้นกำหนดให้ผลขุ่นเป็นสิ่งต้องห้าม มีศัตรูพืชกักกันคือ *B. carambolae* ปัจจุบันประเทศจีนอนุญาตให้นำเข้าผลขุ่นได้ตามพิธีสารไทย-จีน (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2559) อินโดนีเซีย และเมียนมา มีการปรับปรุงกฎระเบียบการนำเข้าพืชและผลิตผลพืช เป็นต้น

1.2 ผลการรวบรวมข้อมูลการจัดการในสวนขุ่นสำหรับส่งออกของเกษตรกร และในโรงคัดบรรจุก่อนการส่งออก

(1) การจัดการในสวนขุ่นของคุณเจริญขวัญ เอ็มเจริญ ต.วังจันทร์ อ.วังจันทร์ จ.ระยอง: ปลูกขุ่นพันธุ์ทองประเสริฐ สวนที่มีการส่งออกผลขุ่นจะมีการขึ้นทะเบียนแปลง GAP เกษตรกรมีการปลูกขุ่นแบบยกพื้นที่ปลูก เพื่อให้ในดินอากาศมีการถ่ายเทได้สะดวก ไม่ข่มน้ำ



จนเกินไป ต้นขุ่นแต่ละต้นจะมีเสาเพื่อช่วยค้ำกิ่งขนาดใหญ่ที่แตกออกมาและโยงกิ่งด้วยเชือก เพื่อไม่ให้ต้นขุ่นล้มได้ง่ายในช่วงที่มีลมพัดแรง ต้นขุ่นจะถูกตัดแต่งกิ่ง ใบ หลังจากปลูกต้นกล้าขุ่น ประมาณ 28 เดือน ขุ่นจะเริ่มออกผลผลิตรุ่นแรก เกษตรกรจะตัดผล ให้เหลือผลขุ่นไม่เกิน 10 ผล ต่อต้น และท่อผลขุ่นที่มีรูปทรงตามมาตรฐานของสวนด้วยถุงตาข่ายพลาสติกสีฟ้า และมีการพันสาร ป้องกันกำจัดศัตรูพืช หากในช่วงที่มีวัชพืชขึ้นเป็นจำนวนมากจะกำจัดโดยใช้สารป้องกันกำจัดวัชพืช

การเก็บเกี่ยวผลขุ่น เกษตรกรจะตัดผลขุ่นลงมาวางบนพื้นไต้ต้นก่อนที่จะ นำใส่ลงในตะกร้าขนาดใหญ่ที่ต่อพ่วงกับรถยก (Figure 1) เพื่อนำมาคัดขนาด รูปทรง และน้ำหนัก ก่อนนำขึ้นรถบรรทุกไปยังโรงคัดบรรจุ

(2) กระบวนการภายหลังการเก็บเกี่ยวในโรงคัดบรรจุ

สถานที่ 1) โรงคัดบรรจุ บริษัท แสงโสภณ จำกัด

ที่อยู่ 219 หมู่ 14 จ.กระแสน อ.แกลง จ.ระยอง 21110

2) โรงคัดบรรจุเจ้าเล็ก (วังจันทร์)

ที่อยู่ 121 หมู่ 3 ต.พลงตาเอี่ยม อ.วังจันทร์ จ.ระยอง

เจ้าหน้าที่ของโรงคัดบรรจุจะนำผลขุ่นไปชั่งน้ำหนักและล้างทำความสะอาด ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อสำหรับอาหาร (food grade) และผึ่งให้แห้งบนตะแกรง สำหรับบางโรงคัดบรรจุจะใช้ วิธีการเป่าลม เพื่อทำความสะอาดผลขุ่น จากนั้นผลขุ่นจะถูกย้ายไปเก็บไว้ในตะกร้าขนาดใหญ่ สำหรับคัดแยกแยกคุณภาพเป็นระดับ A, B, C, D ซึ่งใช้รูปร่างลักษณะของผลในการแบ่งคุณภาพเป็น ระดับต่าง ๆ เพื่อเตรียมนำไปห่อด้วยกระดาษ ผลขุ่นที่ผ่านการห่อกระดาษจะถูกทำเครื่องหมายเพื่อ แยกตามระดับคุณภาพตามที่ลูกค้าปลายทางกำหนด และเรียงลงในตะกร้าขนาดใหญ่ก่อนนำไปแช่ในตู้ แช่เย็น (Figure 2) ในกรณีที่บรรจุลงกล่องกระดาษ ผลขุ่นจะถูกชุบน้ำยาฆ่าเชื้อราและผึ่งให้แห้งก่อน นำไปบรรจุลงกล่องเพื่อก่อนนำไปแช่ในตู้แช่เย็น เมื่อรถบรรทุกขนส่งมารับสินค้าผลขุ่นจะถูกย้ายออก จากห้องเย็นเพื่อนำไปชั่งน้ำหนักก่อนนำไปติดสติ๊กเกอร์ และบรรจุลงในตู้คอนเทนเนอร์เพื่อขนส่งไปยัง ปลายทาง ทั้งนี้ โรงคัดบรรจุมีการทำความสะอาดตู้คอนเทนเนอร์และตู้แช่ที่ใช้ในการบรรจุผลขุ่นเพื่อ ส่งออกด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อก่อนและหลังการใช้งาน รวมถึงการทำความสะอาดพื้นโรงคัดบรรจุด้วยน้ำยา ฆ่าเชื้อเช่นเดียวกัน

1.3 ผลการสืบค้นและรวบรวมข้อมูลศัตรูขุ่น

1.3.1 ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูขุ่น จากแหล่งข้อมูลภายในประเทศ เช่น หนังสือ เอกสารวิชาการ วารสาร และรายงานผลงานวิจัย และแหล่งข้อมูลจากต่างประเทศ เช่น หนังสือ ฐานข้อมูล Crop Protection Compendium (CABI, 2020) วารสาร (Chakraborty, 2017) และ Federal Register ของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (USDA, 2014) ที่ประกาศอนุญาตนำเข้าผล ขุ่นจากประเทศมาเลเซียรวมถึงรายชื่อศัตรูพืชก็ักกัน ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูขุ่น จำนวน 194 ชนิด ได้แก่ แมลง 59 ชนิด ไร 5 ชนิด รา 18 ชนิด แบคทีเรีย 1 ชนิด วัชพืช 111 ชนิด (Table 1)



ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในเบื้องต้น

ผลการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชนอกจากแหล่งข้อมูลภายในประเทศ และต่างประเทศ รวมถึงเอกสารวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชนำเข้า และฐานข้อมูลศัตรูพืช พบว่า ศัตรูพืชที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูพืชนำเข้า และฐานข้อมูลศัตรูพืช พบว่า ศัตรูพืชที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูพืชนำเข้า และเป็นศัตรูพืชนำเข้าพบในประเทศไทย ศัตรูพืชที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูพืชนำเข้า มีจำนวน 194 ชนิด ได้แก่ แมลง 59 ชนิด ไร 5 ชนิด รา 18 ชนิด แบคทีเรีย 1 ชนิด วัชพืช 111 โดยศัตรูพืชที่มีรายงานว่าเป็นศัตรูพืชนำเข้าในประเทศไทย มีจำนวน 148 ชนิด ได้แก่ แมลง 12 ชนิด ไร 5 ชนิด รา 9 ชนิด แบคทีเรีย 1 ชนิด และวัชพืช 111 ชนิด ผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชเบื้องต้น พบว่าศัตรูพืชที่ทำลายหรือพบบนผลพืชมงคลที่ไม่มีรายงานพบในรัฐอเมริกาหรือสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมาและอาจติดไปกับผลพืชมงคลส่งออกจากประเทศไทยซึ่งมีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศผู้นำเข้า ดังนี้ ศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของการส่งออกพืชมงคลไปยังสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมา มีจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera umbrosa*, และ *Dysmicoccus neobrevipes* และศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของการส่งออกพืชมงคลไปยังสหรัฐอเมริกา มีจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera umbrosa*, *Dysmicoccus neobrevipes*, *Nipaecoccus viridis*, *Glyphodes caesalis* ซึ่งจำเป็นต้องมีมาตรการทางสุขอนามัยพืช

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest Risk Management)

มาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชก่อนส่งออก ได้แก่ (1) การขึ้นทะเบียนแปลงปลูก และสถานที่คัดบรรจุผลไม้/โรงคัดบรรจุผลไม้ เพื่อการตรวจสอบย้อนกลับ (traceability) (2) การบูรณาการในแนวทางการดำเนินการในรูประบบสำหรับการบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (system approach) โดยกำหนดให้มีการจัดการศัตรูพืชในแปลงปลูก การจัดการหลังเก็บเกี่ยวในโรงคัดบรรจุ ซึ่งต้องมีกระบวนการทำความสะอาด คัดเลือกผลผลิตที่มีคุณภาพไม่มีร่องรอยการทำลายหรือความเสียหายจากศัตรูพืช หรือ การฉายรังสี (irradiation) (3) การตรวจสอบศัตรูพืช (inspection) ก่อนส่งออก และการรับรองว่าปลอดจากศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อการเปิดตลาดพืชมงคลส่งออกไปยังสหรัฐอเมริกาและสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมา ทำให้ทราบชนิดของศัตรูพืชที่ประเทศคู่ค้าอาจกำหนดเป็นศัตรูพืชกักกัน (ศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน) ดังนี้ ศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของการส่งออกพืชมงคลไปยังสาธารณรัฐแห่งสหภาพเมียนมา มีจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera umbrosa*, และ *Dysmicoccus neobrevipes* และศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของการส่งออกพืชมงคลไปยังสหรัฐอเมริกา มีจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera umbrosa*, *Dysmicoccus neobrevipes*, *Nipaecoccus viridis*, *Glyphodes caesalis* รวมถึงได้แนวทางการเสนอมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับจัดการศัตรูพืชมงคลที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันก่อนการส่งออกสินค้าดังกล่าวให้ประเทศคู่ค้าประกอบการพิจารณาอนุญาตการนำเข้าสินค้าพืชมงคลจากประเทศไทย



เช่น การบูรณาการในแนวทางดำเนินการในรูประบบสำหรับการบริหารจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (system approach) โดยกำหนดให้มีการจัดการศัตรูพืชในแปลงปลูก การจัดการหลังเก็บเกี่ยวในโรงคัดบรรจุ ซึ่งต้องมีกระบวนการทำความสะอาด คัดเลือกผลผลิตที่มีคุณภาพไม่มีร่องรอยการทำลายหรือความเสียหายจากศัตรูพืช หรือ การฉายรังสี (irradiation) และมีการตรวจสอบศัตรูพืช (inspection) ก่อนส่งออก โดยการรับรองว่าผลขนุนจากไทยปลอดจากศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศคู่ค้า

เอกสารอ้างอิง

- กรมศุลกากร.2563. สถิติการนำเข้า-ส่งออก. สืบค้นจาก <http://www.customs.go.th/statisticResult.jsp> (20 สิงหาคม 2563)
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2561. รายงานข้อมูลภาวะการผลิตพืช ขนุนหนึ่ง ปี 2560 จำแนกตามรายจังหวัด. สนเทศส่งเสริมการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร. (ระบบออนไลน์) แหลงข้อมูล : http://www.agriinfo.doae.go.th/year6_1/plant/rortor/fruit/province/jackfruit1.pdf (1 กุมภาพันธ์ 2562).
- สถาบันวิจัยพืชสวน. มปป. การจำแนกลักษณะความแตกต่างของขนุนที่ลักลอบนำเข้าและที่ปลูกในประเทศไทย. สถาบันวิจัย พืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2559. การฝึกอบรมหลักสูตร ศัตรูพืช ภาวะเป็ยบ และข้อกำหนดในการนำเข้าพืชของประเทศปลายทาง วันที่ 25 สิงหาคม 2559. กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 539 หน้า.
- CABI (CAB International). 2020. *Crop Protection Compendium*. Walling ford, UK: CAB International. (Online). Available. <http://www.cabi.org/cpc/> (October 15, 2020).
- FAO. 2013. Market access: A guide to phytosanitary issues for national plant protection organizations. Rome, IPPC, FAO.
- Kuroko, H. and A. Lewvanich. 1993. Lepidopterous Pests of Tropical Fruit Trees in Thailand. Japan International Cooperation Agency. 132 pp.
- USDA. 2014. Importation of Jackfruit, Pineapple, and Starfruit From Malaysia Into the Continental United States. (Online). Available. <https://www.federalregister.gov/documents/2014/03/19/2014-06017/importation-of-jackfruit-pineapple-and-starfruit-from-malaysia-into-the-continental-united-states> (November 15, 2020).



Table 1 Pests associated with jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.)

| Type of Pests | Scientific name |
|---------------|--|
| Insect (59) | <i>Aleurodicus disperses</i> , <i>Apriona germari</i> , <i>Archips micaceana</i> , <i>Archips tabescens</i> , <i>Bactrocera albistrigata</i> , <i>Bactrocera carambolae</i> , <i>Bactrocera cucurbitae</i> , <i>Bactrocera dorsalis</i> , <i>Bactrocera frauenfeldi</i> , <i>Bactrocera kandiensis</i> , <i>Bactrocera papaya</i> , <i>Bactrocera tau</i> , <i>Bactrocera umbrosa</i> , <i>Batocera rubus</i> , <i>Batocera rufomaculata</i> , <i>Calliteara horsfieldii</i> , <i>Cerogria anisocera</i> , <i>Ceroplastes rubens</i> , <i>Ceroplastes rubina</i> , <i>Coccotrypes gedeanus</i> , <i>Coccotrypes medius</i> , <i>Coccus formicarii</i> , <i>Conogethes punctiferalis</i> , <i>Cosmoscarta relata</i> , <i>Diaphania bivitalis</i> , <i>Diaphania caesalis</i> , <i>Dysmicoccus neobrevipes</i> , <i>Elaphidion mucronatum</i> , <i>Exallomochlus hispidus</i> , <i>Ferrisia virgata</i> , <i>Glyphodes caesalis</i> , <i>Greenidea artocarpi</i> , <i>Icerya aegyptiaca</i> , <i>Indarbela dea</i> , <i>Indarbela tetraonis</i> , <i>Indarbela tetraonis</i> , <i>Latoia lepida</i> , <i>Lepidiota bimaculate</i> , <i>Leptostylopsis terraecolor</i> , <i>Margaronia caecalis</i> , <i>Neosaissetia laos</i> , <i>Nipaecoccus viridis</i> , <i>Nyssodrysinia haldemani</i> , <i>Ochyromera artocarpi</i> , <i>Olenecamptus bilobus</i> , <i>Parasa lepida</i> , <i>Perina nuda</i> , <i>Planococcus lilacinus</i> , <i>Planococcus minor</i> , <i>Pseudococcus corymbatus</i> , <i>Pseudodendrothrips dwivarna</i> , <i>Pterolophia discalis</i> , <i>Rastrococcus iceryoides</i> , <i>Rastrococcus invadens</i> , <i>Rastrococcus spinosus</i> , <i>Toxoptera aurantia</i> , <i>Trilocho varians</i> , <i>Unaspis citri</i> , <i>Xenolea tomenlosa asiatica</i> |
| Mite (5) | <i>Brevipalpus californicus</i> , <i>Brevipalpus phoenicis</i> , <i>Eutetranychus africanus</i> , <i>Oligonychus biharensis</i> , <i>Tegolophus artocarpi</i> |
| Fungi (18) | <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum artocarpi</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Colletotrichum lagenarium</i> , <i>Colletotrichum orbiculare</i> , <i>Diplodia artocarpi</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Gloeosporium</i> sp., <i>Meliola artocarpi</i> , <i>Pellicularia (Corticium) Salmonicolor</i> , <i>Pestalotia elasticola</i> , <i>Phomopsis artocarpina</i> , <i>Phyllosticta artocarpi</i> , <i>Phyllosticta artocarpicola</i> , <i>Physopella artocarpi</i> , <i>Phytophthora botryose</i> , <i>Phytophthora meadii</i> , <i>Phytophthora</i> spp., <i>Pythium splendens</i> , <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Rhizopus artocarpi</i> , <i>Rosellinia arcuata</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Septoria artocarpi</i> , <i>Uredo artocarpi</i> , <i>Ustilana zonata</i> |
| Bacteria (1) | <i>Erwinia carotovora</i> |



Table 1 Pests associated with jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) (continue)

| Type of Pests | Scientific name |
|---------------|--|
| Weed (111) | <i>Acalypha indica</i> , <i>Achyranthes aspera</i> , <i>Acrachne racemosa</i> , <i>Aeschynomene americana</i> , <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Alternanthera sessilis</i> , <i>Amaranthus viridis</i> , <i>Asystasia gangetica</i> , <i>Axonopus compressus</i> , <i>Boerhavia diffusa</i> , <i>Boerhavia repens</i> , <i>Brachiaria reptans</i> , <i>Cenchrus brownii</i> , <i>Cenchrus echinatus</i> , <i>Centrosema pubescens</i> , <i>Chloris barbata</i> , <i>Chromolaena odorata</i> , <i>Cleome chelidonii</i> , <i>Cleome gynandra</i> , <i>Cleome rutidosperma</i> , <i>Cleome viscosa</i> , <i>Coccinia grandis</i> , <i>Commelina benghalensis</i> , <i>Commelina diffusa</i> , <i>Conyza sumatrensis</i> , <i>Corchorus olitorius</i> , <i>Crassocephalum crepidioides</i> , <i>Cyanthillium cinereum</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Cynoglossum lanceolatum</i> , <i>Cyperus compactus</i> , <i>Cyperus digitatus</i> , <i>Cyperus haspan</i> , <i>Cyperus iria</i> , <i>Cyperus kyllingia</i> , <i>Cyperus laxus</i> , <i>Cyperus rotundus</i> , <i>Cyperus trialatus</i> , <i>Cyrtococcum patens</i> , <i>Dactyloctenium aegyptium</i> , <i>Desmodium triflorum</i> , <i>Dichanthium annulatum</i> , <i>Digitaria adscendense</i> , <i>Digitaria ciliaris</i> , <i>Digitaria sacchariflora</i> , <i>Diplazium esculentum</i> , <i>Echinochloa colona</i> , <i>Eclipta prostrata</i> , <i>Eleusine indica</i> , <i>Eleutheranthera ruderalis</i> , <i>Emilia sonchifolia</i> , <i>Eragrostis sp.</i> , <i>Euphorbia hirta</i> , <i>Euphorbia thymifolia</i> , <i>Evolvulus nummularius</i> , <i>Fimbristylis dichotoma</i> , <i>Fimbristylis quinquangularis</i> , <i>Glinus oppositifolius</i> , <i>Gomphrena celosioides</i> , <i>Gymnopetalum scabrum</i> , <i>Heliotropium indicum</i> , <i>Imperata cylindrica</i> , <i>Ipomea sp.</i> , <i>Ipomea obscura</i> , <i>Ipomea pes-tigridis</i> , <i>Ischaemum rugosum</i> , <i>Leptochloa chinensis</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Lindernia crustacea</i> , <i>Lindernia sp.</i> , <i>Ludwigia hyssopifolia</i> , <i>Lygodium sp.</i> , <i>Macroptilium lathyroides</i> , <i>Melinis repens</i> , <i>Mikania micrantha</i> , <i>Mimosa diplotricha</i> , <i>Mimosa invisa</i> , <i>Mimosa pudica</i> , <i>Mitracarpus hirtus</i> , <i>Mollugo pentaphylla</i> , <i>Momordica charantia</i> , <i>Murdannia nudiflora</i> , <i>Oxalis corniculata</i> , <i>Paspalum conjugatum</i> , <i>Paspalum scrobiculatum</i> , <i>Passiflora foetida</i> , <i>Pennisetum pedicellatum</i> , <i>Pennisetum polystachyon</i> , <i>Pennisetum setosum</i> , <i>Peperomia pellucida</i> , <i>Phaseolus lathyroides</i> , <i>Phyllanthus amarus</i> , <i>Phyllanthus urinaria</i> , <i>Physalis minima</i> , <i>Poederia sp.</i> , <i>Praxelis clematidea</i> , <i>Richardia brasiliensis</i> , <i>Rottboellia cochinchinensis</i> , <i>Ruellia tuberosa</i> , <i>Scoparia dulcis</i> , <i>Senna tora</i> , <i>Solanum anguivi</i> , <i>Spermacoce laevis</i> , <i>Sphagneticola trilobata</i> , <i>Spigelia anthelmia</i> , <i>Stachytarpheta jamaicensis</i> , <i>Synedrella nodiflora</i> , <i>Tiliacora triandra</i> , <i>Trianthema portulacastrum</i> , <i>Tridax procumbens</i> , <i>Typhonium trilobatum</i> , |



Table 2 Quarantine pests and phytosanitary measures for the exportation of jackfruit.

| Plant name | Importing country | Quarantine pest | phytosanitary measures |
|---|--------------------------------------|---|---|
| Jackfruit (<i>Artocarpus heterophyllus</i>) fruit | United States of America | Fruit fly: แมลงวันผลไม้ <i>Bactrocera dorsalis</i> and <i>Bactrocera umbrosa</i> Mealybug: เพลี้ยแป้ง <i>Dysmicoccus neobrevipes</i> , <i>Nipaecoccus viridis</i> , Borer: <i>Glyphodes caesalis</i> Fungi: <i>Meliola artocarp</i> i and <i>Colletotrichum artocarp</i> i (Hawaii) | - system approach System approach (bagging, apply insecticides and fungicides) or irradiation 400 grays - export inspection |
| | the Republic of the Union of Myanmar | Fruit fly <i>Bactrocera umbrosa</i> mealybug <i>Dysmicoccus neobrevipes</i> fungi <i>Meliola artocarp</i> i และ <i>Colletotrichum artocarp</i> i | - System approach (bagging, apply insecticides and fungicides) - export inspection |





Figure 1 Harvesting of jackfruit and transportation to packinghouse



Figure 2 Labeling, packaging and loading for exportation of jackfruit

การจัดการศัตรูหอมแดงแบบผสมผสาน
Integrated Pests Management on Shallot

วิภาดา ปลอดภัยบุรี^{1/} นพพล สัทยาสัย^{1/} สิริชัย สาธุวิจารณ์^{1/} สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น^{1/}
สุนิรัตน์ สีมะเดื่อ^{2/} ศิริพันธ์ สมุทรศรี^{3/}
^{1/}กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{3/}กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กองวิจัยและพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

ดำเนินการทดลองในแปลงของเกษตรกร ที่ ต. พุ่งทอง และ ต.วังขนาย อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนมกราคม – เมษายน 2564 เปรียบเทียบระหว่าง 2 วิธี คือ วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM) และวิธีการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีของเกษตรกร (F) แปลงทดลองที่ ต.พุ่งทอง หลังปลูกหอมแดงพันธุ์สารก้ำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชออก oxadiazon 25%EC ใช้อัตรา 300-400 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 60-80 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 ไร่ ขณะดินมีความชื้น จำนวน 1 ครั้ง และกำจัดด้วยการถอนโดยใช้แรงงานคน จำนวน 2 ครั้ง สุ่มตรวจนับแมลงศัตรูพืชทุก 5 วัน ถ้าพบศัตรูพืชเกินระดับเศรษฐกิจที่กำหนด จึงพิจารณาใช้วิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืช **แปลง IPM** พบการระบาดของหนอนกระทู้หอม หนอนแมลงวันชอนใบ ทำการพ่นสารป้องกันกำจัด chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง fipronil 5%SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร ผสมกับ fipronil 5%SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร (กำจัดทั้งหนอนกระทู้หอมและหนอนแมลงวันชอนใบ) จำนวน 1 ครั้ง emamectin benzoate 1.92%EC อัตรา 30 มล. จำนวน 2 ครั้ง และ fipronil 5%SC อัตรา 30 มล. ผสมกับ beta-cyfluthrin 2.5%EC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 7 ครั้ง ส่วนใน**แปลง F** พ่นกำจัดหนอนกระทู้หอมและหนอนแมลงวันชอนใบ ด้วยสาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร ผสมกับ fipronil 5%SC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง สาร cypermethrin 35%EC อัตรา 20 มล. ผสมกับ fipronil 5%SC อัตรา 20 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร จำนวน 6 ครั้ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 8 ครั้ง มากกว่าแปลงวิธีผสมผสาน ส่วน**แปลงทดลองที่ ต.วังขนาย** หลังปลูกหอมแดง 1 วัน พ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชออก oxyfluorfen 23.5%EC ใช้อัตรา 150-200 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 60-80 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 ไร่ ขณะดินมีความชื้น จำนวน 1 ครั้ง และกำจัดด้วยการถอนโดยใช้แรงงานคน จำนวน 1 ครั้ง สุ่มตรวจนับแมลงศัตรูพืชทุก 5 วัน **แปลง IPM** พบการระบาดของหนอนกระทู้หอม หนอนแมลงวันชอนใบ จึงพ่นสารป้องกันกำจัด emamectin benzoate 1.92%EC อัตรา 30 มล./น้ำ

คำหลัก : หอมแดง ศัตรูหอมแดง การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน

รหัสการทดลอง 03-34-60-01-02-00-11-63



20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล. ผสมกับ fipronil 5%SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง spinetoram 12%SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร emamectin benzoate 1.92%EC อัตรา 30 มล. ผสมกับสารป้องกันกำจัดโรคพืช prochloraz 45%EC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร (พบโรคแอนแทรคโนสร่วมกับหนอนกระทู้หอม) จำนวน 1 ครั้ง และพ่น prochloraz 45%EC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 5 ครั้ง ส่วนในแปลง F พ่นกำจัดหนอนแมลงวันชอนไบ ด้วยสาร acetamiprid 20%SP อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง กำจัดหนอนกระทู้หอมด้วยสาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล. ผสมกับ abamectin 1.8%EC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร emamectin benzoate 1.92%EC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล. ผสมกับสารป้องกันกำจัดโรคหอย เลื้อย azoxystrobin 25%SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 6 ครั้ง มากกว่าแปลงวิธีผสมผสาน ทั้งสองแปลงทดลองพบว่าแปลงวิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน สามารถลดการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้ 12.50% และ 16.67% ตามลำดับ

คำนำ

หอมแดง (shallot, *Allium ascalonicum* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ Amaryllidaceae นิยมบริโภคกันมากทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ พบเห็นได้ทั่วครัวไทย ใช้เป็นส่วนประกอบ เครื่องแกงเผ็ด แกงเลียง ต้มยำ ซุปหางวัว รับประทานสดโดยฝานเป็นแว่นบางๆ รับประทานร่วมกับ แหนมสด เมี่ยงคำ ปลาเค็มทอดบิษมะนาว หอมแดงซอย กับพริกชี้หูสวนหั่นฝอย เป็นส่วนประกอบ ของน้ำพริกกะปิ หอมแดงเผาตำผสมกับน้ำพริกปลาร้า และเป็นส่วนประกอบของหลนทุกอย่าง รวมทั้ง เป็นส่วนประกอบของขนมหวาน เช่น หอมแดงซอยเจียว ใส่ในข้าวเหนียวหน้าปลาแห้ง ขนมหม้อแกง ถั่ว และไข่ลูกเขย (อาหารคาวหวาน) ฯลฯ และยังมีสรรพคุณทางยา เช่น ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล ในเลือด แก้อาการคัดจมูก แก้อหอบหืด เป็นต้น ในปี 2562 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกหอมแดง 61,203 ไร่ พื้นที่เก็บเกี่ยว 58,688 ไร่ ผลผลิต 118,055 ตัน ผลผลิตต่อไร่ 2,012 กิโลกรัม (สำนักงานเศรษฐกิจ การเกษตร, 2562) พื้นที่การปลูกหอมแดงมากที่สุด คือ จังหวัดศรีสะเกษ รองลงมา คือ จังหวัดพะเยา อุตรดิตถ์ ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย เพชรบูรณ์ สุโขทัย บุรีรัมย์ ชัยภูมิ ลำปาง ยโสธร สุรินทร์ น่าน อุบลราชธานี และแม่ฮ่องสอน นอกจากนี้ยังมีปลูกกันที่จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และนครปฐม ด้วย ฤดูปลูกที่เหมาะสมที่สุด คือ เดือนพฤศจิกายน - กุมภาพันธ์ สถิติการส่งออกผักสด ปี 2549 หอมแดงมีปริมาณการส่งออกสูงสุด 74,053,150 กิโลกรัม มูลค่า 598,424,831 บาท โดยส่งออกไปยัง ประเทศอินโดนีเซียมากที่สุด รองลงมา คือ ไต้หวัน สิงคโปร์ จีน มาเลเซีย และประเทศในสหภาพยุโรป เช่น อังกฤษ เยอรมัน เบลเยียม สวีเดน เป็นต้น (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2550) แต่การผลิตหอมแดงมักประสบปัญหาจากโรค แมลงศัตรูพืช และวัชพืช เข้าทำลายหลายชนิด แมลงศัตรูสำคัญ ได้แก่ หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* (Hübner)) หนอนกระทู้ผัก



(*Spodoptera litura* (Fabricius) หนอนแมลงวันชอนใบ (*Liriomyza chinensis* Kato) และเพลี้ยไฟ (*Thrips tabaci* Lindeman) โรคที่พบเป็นปัญหามากในหอมแดง ได้แก่ โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose disease) และโรคหอมเลื้อย (Onion twister disease) เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. โรคหัวและรากเน่า (Sclerotium rot disease) เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Sclerotium rolfii* Sacc. โรคใบจุดสีม่วง (Purple blotch disease) เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Alternaria porri* (ELL.) Cif ส่วนวัชพืชที่พบเสมอในแปลงมักเป็นวัชพืชที่งอกจากเมล็ด วัชพืชประเภทใบแคบที่งอกจากเมล็ด เช่น หญ้าตีนนก หญ้าตีนกา หญ้าดอกขาว หญ้านกสีชมพู หญ้าข้าวนกหญ้าที่มีส่วนขยายพันธุ์ข้ามปี ได้แก่ หญ้าตีนติด หญ้าแพรก วัชพืชประเภทใบกว้าง ส่วนใหญ่เป็นวัชพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น ผักเบี้ยใหญ่ ผักเบี้ยหิน ผักโขม ผักโขมหนาม สาบแร้งสาบกา และวัชพืชประเภทกก เช่น กกทราย กกที่ขยายพันธุ์ด้วยหัว และพบมากในแปลงผักคือ เหี่ยวหมู จะเห็นได้ว่าการผลิตหอมแดงมีปัญหาจากศัตรูพืชหลายชนิด ทำให้ผลผลิตลดลง เกษตรกรจำเป็นต้องใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดบ่อยครั้ง ดังนั้น การวิจัยและพัฒนาวิธีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช โรคพืช และวัชพืช โดยนำหลาย ๆ วิธีมาใช้ร่วมกันในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืช หรือใช้แบบผสมผสาน เพื่อหารูปแบบที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดศัตรูหอมแดง โดยมีการสุ่มสำรวจศัตรูพืช ก่อนตัดสินใจเลือกใช้วิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชก่อนที่จะถึงระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ เป็นการช่วยลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ผลผลิตมีคุณภาพตามความต้องการของตลาด และปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม เกษตรกรสามารถนำไปใช้ปฏิบัติได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์หอมแดงศรีสะเกษ
2. สารกำจัดวัชพืช oxyfluorfen 23.5% EC
3. สารกำจัดโรคพืช prochloraz 50% WP, mancozeb 80% WP, difenoconazole 25% EC และ azoxystrobin 25% SC
4. สารฆ่าแมลง chlorfenapyr 10% SC, spinetoram 12% SC, emamectin benzoate 1.92% EC, bata-cyfluthrin 2.5% EC และ fipronil 5% SC
5. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* หรือ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*
6. เครื่องพ่นสารแบบเครื่องยนต์สะพายหลังแบบแรงดันน้ำสูง
7. ปุ๋ยเคมี สูตร 21-0-0, 0-46-0, 0-0-60 และ 25-7-7
8. อุปกรณ์การตรวจนับศัตรูพืช เช่น ควอดเรท (Quadrat) ปากกา สมุดบันทึก เครื่องนับจำนวน เป็นต้น



วิธีการ

แบบและวิธีทดลอง

แบ่งเป็น 2 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM) และกรรมวิธีจัดการศัตรูพืชโดยวิธีของเกษตรกร (F)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เปรียบเทียบชนิดและปริมาณวัชพืช แมลงศัตรูพืช เพอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค ชนิด อัตราการใช้ ราคา และจำนวนครั้งที่ใช้ของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ผลผลิตและราคา ต้นทุนการผลิต ระหว่างการจัดการศัตรูพืชมแดงแบบผสมผสาน (IPM) และการจัดการศัตรูพืชมแดงโดยวิธีของเกษตรกร

2. ขั้นตอนและวิธีดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

(1) เลือกแปลงเกษตรกรทดสอบการจัดการศัตรูพืชมแดงแบบผสมผสาน (IPM) โดยการควบคุมดูแลของนักวิชาการเปรียบเทียบกับวิธีของเกษตรกร (F) โดยเกษตรกรเป็นผู้ดูแลรับผิดชอบเอง ทดสอบในแปลงของเกษตรกรจำนวน 2 ราย โดยแบ่งพื้นที่ออกเป็น 2 แปลงๆ ละ 1 ไร่

(2) การจัดการศัตรูพืชมแดง

แปลง IPM เตรียมพื้นที่ปลูกโดยการไถตากดินไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อกำจัดวัชพืช โรค และแมลง ที่สะสมอยู่ในดิน (วิธีเขตกรรม) ระยะการปลูกพืชมแดง ระยะระหว่างแถว 25 เซนติเมตร ระยะระหว่างต้น 20 เซนติเมตร สุ่มตรวจนับกลุ่มไข่ จำนวนหนอนกระทู้หอม การทำลายของหนอนแมลงวันซอนไบ และแมลงศัตรูธรรมชาติ ทุก 5 วัน จำนวน 25 จุดต่อพื้นที่ 1 ไร่ สุ่มจุดละ 1 ตารางเมตร สุ่มโดยใช้ตารางไม้ขนาด 50x50 เซนติเมตร ทำการพ่นสารเมื่อสำรวจศัตรูพืชเกินระดับเศรษฐกิจ พ่นด้วยเครื่องพ่นสารแบบเครื่องยนต์สะพายหลังชนิดแรงดันน้ำ ที่สามารถควบคุมความดันได้ โดยใช้ อัตราพ่น 80 ลิตรต่อไร่

การป้องกันกำจัดวัชพืช

หลังพรวนย่อยดิน ควรคราดเก็บส่วนขยายพันธุ์ของวัชพืชข้ามปีออกจากแปลง (วิธีเขตกรรม) หลังกร่องให้น้ำแบบพ่นฝอยเพื่อให้ความชื้น พ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชของ oxadiazon 25%EC ใช้อัตรา 300-400 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 60-80 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 ไร่ หรือ 75-80 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 15-20 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 งาน หรือ oxyfluorfen 23.5% EC อัตรา 150-200 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 60-80 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 ไร่ หรือ 40-50 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 15-20 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 งาน ประกอบหัวฉีดแบบพัด ใช้ขณะดินมีความชื้น และหลังจากปลูกแล้วถ้ามีวัชพืชงอก ให้กำจัดด้วยการถอนโดยใช้แรงงานคน

การป้องกันกำจัดแมลง

หนอนกระทู้หอม หากพบการระบาดเข้าทำลายของหนอนกระทู้หอมเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 4 ตัว ต่อ 1 ตารางเมตร ให้พ่นด้วยสารฆ่าแมลง chlorfenapyr 10% SC หรือ spinetoram 12% SC หรือ emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 40, 30, และ 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ตามลำดับ



เลือกใช้สารอย่างใดอย่างหนึ่ง ช่วงเวลาการพ่นสาร 5 วัน หรือตามการระบาด แต่ถ้าพบการระบาดของหนอนกระทู้หอมที่มีขนาดเล็ก หรือพบกลุ่มไข่ของหนอนกระทู้หอมเฉลี่ยมากกว่า 1 กลุ่มต่อตารางเมตร หรือใกล้ระยะการเก็บเกี่ยว ให้พิจารณาใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* หรือ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* อัตรา 80 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

หนอนแมลงวันชอนใบหอม หากพบการระบาดของหนอนแมลงวันชอนใบหอมในแปลงทดสอบเกิน 10% ให้พ่นด้วยสารฆ่าแมลง bata-cyfluthrin 2.5% EC หรือ fipronil 5% SC หรือ emamectin benzoate 1.92%EC อัตรา 30, 20 และ 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ตามลำดับ

เพลี้ยไฟหอม หากพบการระบาดของเพลี้ยไฟหอม มากกว่า 5 ตัวต่อกอ ให้พ่นด้วยสารฆ่าแมลง เช่น fipronil 5% SC หรือ spinetoram 12%SC อัตรา 30 และ 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ตามลำดับ

(กลุ่มบริหารศัตรูพืชและกลุ่มกีฏและสัตววิทยา, 2559; สุภราดา และคณะ, 2563)

การป้องกันกำจัดโรคพืช

โรคแอนแทรคโนส สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum circinans* หากพบการระบาดของโรคแอนแทรคโนส ให้ทำลายต้นพืชที่เป็นโรคโดยการถอนไปเผาทิ้งแล้วพ่นต้นที่เหลือด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดโรค เช่น prochloraz 45%EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ mancozeb 80% WP อัตรา 40-50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ difenoconazole 25% EC อัตรา 15-20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อย่างไรก็ตาม ช่วงการพ่น 3-5 วันต่อครั้ง สำหรับสาร prochloraz ไม่ควรพ่นเกิน 4 ครั้งติดต่อกัน ควรพ่นสลับกับ mancozeb เพื่อลดปัญหาการต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดโรคพืช ประเมินเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคจากพืชแต่ละต้น โดยสุ่มตรวจนับจำนวน 10 ต้นต่อจุด สุ่มจำนวน 25 จุดต่อพื้นที่ 1 ไร่ สุ่มตรวจนับทุก 5 วัน

โรคใบจุดสีม่วง สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria porri* (ELL.) Cif. หากพบอาการของโรคใบจุดสีม่วง พ่นด้วยสาร azoxystrobin 25% W/V SC อัตรา 5-10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ difenoconazole 25% EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อย่างไรก็ตาม และควรพ่นสลับกับ mancozeb 80% WP อัตรา 40-50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร เพื่อลดปัญหาการต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดโรคพืช ประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยสุ่มตรวจนับใบที่ 4 และ 5 จากยอด จำนวน 10 ต้นต่อจุด สุ่มจำนวน 25 จุดต่อพื้นที่ 1 ไร่ สุ่มตรวจนับทุก 5 วัน

กรรมวิธีการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีของเกษตรกร (F) ดำเนินจัดการศัตรูหอมแดง โคนพ่นสารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช เช่น chlorfenapyr 10 %SC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร หรือ สาร acetamiprid 20 % SP อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับสาร chlorfenapyr 10 %SC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร เมื่อหอมแดงอายุ 20 วันหลังปลูก ใส่ปุ๋ยสูตร 25-7-7 อัตรา 30 กิโลกรัมต่อไร่ และทำการเก็บข้อมูลและการปฏิบัติงานในแปลงของเกษตรกรเหมือนกันกับกรรมวิธีการจัดการศัตรูหอมแดงแบบผสมผสาน (IPM)



แปลง ต.ทุ่งทอง หลังปลูกหอมแดงขณะดินมีความชื้น พ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืช ออก oxadiazon 25%EC ใช้อัตรา 300-400 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 60-80 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 ไร่ หรือ 75-80 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 15-20 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 งาน จำนวน 1 ครั้ง สุ่มตรวจนับแมลงศัตรูพืชทุก 5 วัน พ่นกำจัดหนอนกระทู้หอมและหนอนแมลงวันชอนใบ ด้วยสาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร ผสมกับ fipronil 5%SC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง สาร cypermethrin 35%EC อัตรา 20 มล. ผสมกับ fipronil 5%SC อัตรา 20 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร จำนวน 6 ครั้ง และทำการเก็บข้อมูลและการปฏิบัติงานในแปลงของเกษตรกรเหมือนกันกับกรรมวิธีการจัดการศัตรูหอมแดงแบบผสมผสาน (IPM)

ส่วนแปลงทดลองที่ **ต.วังขนาย** พ่นกำจัดหนอนแมลงวันชอนใบ ด้วยสาร acetamiprid 20%SP อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง กำจัดหนอนกระทู้หอมด้วยสาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล. ผสมกับ abamectin 1.8%EC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร emamectin benzoate 1.92%EC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล. ผสมกับสารป้องกันกำจัดโรคหอมกล้วย azoxystrobin 25%SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 6 ครั้ง และทำการเก็บข้อมูลและการปฏิบัติงานในแปลงของเกษตรกรเหมือนกันกับกรรมวิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM)

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนและชนิดของแมลงศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ
- เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
- ชนิดและจำนวนต้นของวัชพืช
- ชนิด จำนวนครั้ง และปริมาณการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ใช้
- ต้นทุนการใช้สารเคมี ข้อมูลค่าใช้จ่ายที่เป็นต้นทุนการผลิตทั้งหมด
- บันทึกผลผลิตและราคา
- วิเคราะห์ผลตอบแทนการลงทุน (B/C ratio) ระหว่างแปลง IPM และ แปลงเกษตรกร

เวลาและสถานที่- สถานที่ดำเนินการ

แปลงหอมแดงของเกษตรกรใน ตำบลทุ่งทอง และ ตำบลวังขนาย อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนมกราคม – เมษายน 2564

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ดำเนินการทดลองในแปลงของเกษตรกร ที่ ต. ทุ่งทอง และ ต.วังขนาย อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนมกราคม – เมษายน 2564 เปรียบเทียบระหว่าง 2 วิธี คือ วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน และวิธีการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีของเกษตรกร



แปลงทดลองที่ ต.ทุ่งทอง ไถพรวนตากดินนาน 2 สัปดาห์ หลังพรวนย่อยดินคราดเก็บส่วนขยายพันธุ์ของวัชพืชข้ามปีออกจากแปลง หลังปลูกหอมแดงพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอก oxadiazon 25%EC ใช้อัตรา 300-400 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 60-80 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 ไร่ หรือ 75-80 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 15-20 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 งาน ขณะดินมีความชื้น จำนวน 1 ครั้ง และกำจัดด้วยการถอนโดยใช้แรงงานคน จำนวน 2 ครั้ง สุ่มตรวจนับแมลงศัตรูพืชทุก 5 วัน ถ้าพบศัตรูพืชเกินระดับเศรษฐกิจที่กำหนด จึงพิจารณาใช้วิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืช **แปลงกรรมวิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM)** พบการระบาดของหนอนกระทู้หอม หนอนแมลงวันชอนใบ ทำการพ่นสารป้องกันกำจัด chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง fipronil 5%SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร ผสมกับ fipronil 5%SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร (กรณีกำจัดทั้งหนอนกระทู้หอมและหนอนแมลงวันชอนใบ) จำนวน 1 ครั้ง emamectin benzoate 1.92%EC อัตรา 30 มล. จำนวน 2 ครั้ง และ fipronil 5%SC อัตรา 30 มล. ผสมกับ beta-cyfluthrin 2.5%EC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 7 ครั้ง ส่วนในแปลงกรรมวิธีจัดการศัตรูพืชโดยวิธีของเกษตรกร (F) พ่นกำจัดหนอนกระทู้หอมและหนอนแมลงวันชอนใบ ด้วยสาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร ผสมกับ fipronil 5%SC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง สาร cypermethrin 35%EC อัตรา 20 มล. ผสมกับ fipronil 5%SC อัตรา 20 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร จำนวน 6 ครั้ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 8 ครั้ง มากกว่าแปลงวิธีผสมผสาน

ส่วนแปลงทดลองที่ **ต.วังขนาบ** ไถพรวนตากดินนาน 2 สัปดาห์ หลังพรวนย่อยดินคราดเก็บส่วนขยายพันธุ์ของวัชพืชข้ามปีออกจากแปลง หลังปลูกหอมแดง 1 วัน พ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอก oxyfluorfen 23.5%EC ใช้อัตรา 150-200 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 60-80 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 ไร่ หรือ 40-50 มิลลิลิตร ผสมน้ำ 15-20 ลิตร พ่นบนพื้นที่ 1 งาน ขณะดินมีความชื้น จำนวน 1 ครั้ง และกำจัดด้วยการถอนโดยใช้แรงงานคน จำนวน 1 ครั้ง สุ่มตรวจนับแมลงศัตรูพืชทุก 5 วัน ถ้าพบศัตรูพืชเกินระดับเศรษฐกิจที่กำหนด จึงพิจารณาใช้วิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืช **แปลงกรรมวิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM)** พบการระบาดของหนอนกระทู้หอม หนอนแมลงวันชอนใบ ทำการพ่นสารป้องกันกำจัด emamectin benzoate 1.92%EC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล. ผสมกับ fipronil 5%SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง spinetoram 12%SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร emamectin benzoate 1.92%EC อัตรา 30 มล. ผสมกับสารป้องกันกำจัดโรคพืช prochloraz 45%EC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร (พบโรคแอนแทรคโนสร่วมกับหนอนกระทู้หอม) จำนวน 1 ครั้ง และพ่น prochloraz 45%EC อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 5 ครั้ง ส่วนในแปลงกรรมวิธีจัดการศัตรูพืชโดยวิธีของเกษตรกร (F) พ่นกำจัดหนอนแมลงวันชอนใบ ด้วยสาร acetamiprid 20%SP อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง กำจัดหนอนกระทู้หอมด้วยสาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล.



ผสมกับ abamectin 1.8%EC อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร emamectin benzoate 1.92%EC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 1 ครั้ง สาร chlorfenapyr 10%SC อัตรา 40 มล. ผสมกับสารป้องกันกำจัดโรคหอยมด azoxystrobin 25%SC อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร จำนวน 2 ครั้ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 6 ครั้ง มากกว่าแปลงวิธีผสมผสาน

ทั้งสองแปลงทดลองพบว่าแปลงวิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน สามารถลดการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้ 12.50% และ 16.67% ตามลำดับ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานในหอมแดง หากพบพบศัตรูพืชเกินระดับเศรษฐกิจที่กำหนด จึงพิจารณาใช้วิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืช พบว่า การดำเนินการในแปลงทดลองที่ 1 ที่ ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี แปลงกรรมวิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM) มีการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช 7 ครั้ง เพื่อใช้ป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม และหนอนแมลงวันชอนใบ ส่วนแปลงกรรมวิธีการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีของเกษตรกร (F) มีการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช 8 ครั้ง เพื่อใช้ป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอมและหนอนแมลงวันชอนใบเช่นเดียวกัน จากการดำเนินการในแปลง IPM พบว่าสามารถลดจำนวนการใช้สารกำจัดแมลงศัตรูพืชได้ 12.50%

การดำเนินการในแปลงทดลองที่ 2 ที่ ต.วังขนาย อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี แปลงกรรมวิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM) มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช 5 ครั้ง เพื่อใช้ป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม หนอนแมลงวันชอนใบ และโรคแอนแทรกโนส ส่วนแปลงกรรมวิธีการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีของเกษตรกร (F) มีการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช 6 ครั้ง เพื่อใช้ป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม หนอนแมลงวันชอนใบ และโรคแอนแทรกโนสเช่นเดียวกัน จากการดำเนินการในแปลง IPM พบว่าสามารถลดจำนวนการใช้สารกำจัดแมลงศัตรูพืชได้ 16.67%

ทั้งสองแปลงทดลองพบว่ากรรมวิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน สามารถลดการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงได้ แต่งานวิจัยการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานมีข้อดีจากการเลือกใช้วิธีการป้องกันกำจัดหลาย ๆ วิธีมาใช้ร่วมกัน และมีการใช้ระดับเศรษฐกิจประกอบการตัดสินใจเลือกวิธีการป้องกันกำจัด โดยเลือกใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเท่าที่จำเป็น แต่ก็มีข้อจำกัด มีความยุ่งยากในการดำเนินการวิจัย อีกทั้งเกษตรกรส่วนใหญ่ไม่ใช้ระดับเศรษฐกิจในการตัดสินใจก่อนการพ่นสารไม่ชอบการสำรวจชนิดและศัตรูพืชก่อนการพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชหรือคาดการณ์การระบาดของศัตรูพืช การศึกษาติดตามสถานการณ์การระบาดของศัตรูพืชมีข้อจำกัดทั้งนักวิชาการและเกษตรกรที่ต้องดำเนินการเป็นประจำ นอกจากนั้นในการนำไปประยุกต์ใช้อาจมีข้อจำกัดในการใช้ในแต่ละพื้นที่ เพราะเป็นการศึกษาในสภาพแวดล้อม นิเวศวิทยาของพื้นที่ได้ทำการวิจัย ดังนั้น ควรนำไปทดสอบในพื้นที่อื่น ๆ ต่อไป เพื่อให้เกิดการยอมรับแนวทางและหลักในการบริหารศัตรูพืชแบบผสมผสาน



คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนักวิชาการและเจ้าหน้าที่ของกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ช่วยดำเนินการทดลอง ตรวจนับศัตรูพืช บันทึก และรวบรวมข้อมูล ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มบริหารศัตรูพืชและกลุ่มกีฏและสัตววิทยา. 2559. แมลงศัตรูผัก เห็ด และไม้ดอก. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. 74 หน้า.
- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2550. สถิติการส่งออกผักสด ปี 2549. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. 173 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. หอมแดง: เนื้อที่เพาะปลูก เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2562. [ออนไลน์]. แหล่งข้อมูล: [http://www.oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/shallot%2062%20\(1\).pdf](http://www.oae.go.th/assets/portals/1/fileups/prcaidata/files/shallot%2062%20(1).pdf). (25 เมษายน 2564).
- สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ ศรีจันทรรจ ศรีจันทรา และพฤทธิชาติ ปุณฺณวัฒน์. 2563. เอกสารวิชาการคำแนะนำการป้องกันแมลง-สัตว์ศัตรูพืช อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยจากงานวิจัย. กลุ่มบริหารศัตรูพืช/กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 230 หน้า.



การฉีดสารเข้าต้นเพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ เพลี้ยไก่อแจ้ และหนอนขอนใบส้มเขียวหวาน
Control of Tangerine Insect Pests by Trunk Injection

สุภางคนา ธีรวิฑูร พุทธิชาติ ปุญวัฒน์โท สิริกัญญา ชุนวิเศษ
วรวิษ สุตจรีตรธรรมจริยางกูร สรรชัย เพชรธรรมรส
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส COVID 19 ทำให้ผู้วิจัยประสบปัญหาไม่สามารถเดินทางออกไปดำเนินการทดลองในสภาพไร่ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองในสภาพโรงเรือน โดยได้ดำเนินการทดลอง ณ โรงเรือนกลุ่มงานวิจัยการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ระหว่างเดือนกรกฎาคม – กันยายน 2564 โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง ได้แก่ การศึกษาประสิทธิภาพการฉีดสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ เข้าสู่ลำต้นส้มเขียวหวานเพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไก่อแจ้ส้ม (*Diaphorina citri* Kuawayama) และ การศึกษาประสิทธิภาพการฉีดสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ เข้าสู่ลำต้นส้มเขียวหวานเพื่อป้องกันกำจัดหนอนม้วนใบส้ม (*Archips micaceana* Walker) จากการศึกษาประสิทธิภาพการฉีดสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ เข้าสู่ลำต้นส้มเขียวหวานเพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไก่อแจ้ส้ม ทำการทดลอง 2 การทดลองระหว่างเดือนเมษายน – มิถุนายน 2563 และ เมษายน – มิถุนายน 2564 ผลการทดลองทั้งสองการทดลองให้ผลที่สอดคล้องกันคือ พบว่าสาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไก่อแจ้ส้มได้ดีที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และ emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ยกเว้นกรรมวิธีฉีดสารเข้าต้น abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ซึ่งมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไก่อแจ้ส้มต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารกำจัดแมลงชนิดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามทุกกรรมวิธีที่ฉีดสารเข้าต้นมีจำนวนเพลี้ยไก่อแจ้สมน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดแมลง สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพการฉีดสารกำจัดแมลงชนิดต่าง ๆ เข้าสู่ลำต้นส้มเขียวหวานเพื่อป้องกันกำจัดหนอนม้วนใบส้ม (*A. micaceana* Walker) ทำการทดลอง ระหว่างเดือนสิงหาคม – กันยายน 2564 ผลการทดลองพบว่าพบว่ามีเพียงกรรมวิธีฉีดสารเข้าต้นด้วย emamectin benzoate 1.92% EC และ abamectin 1.8% EC ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนม้วนใบส้ม โดยพบจำนวนหนอนม้วนใบสมน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC, clothianidin 16% SG, dinotefuran 10% SL, thiamethoxam 25% WG และกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลง ตลอดการทดลองไม่พบอาการเป็นพิษ (phytotoxicity) ด้วยการฉีดสารเข้าต้นในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูที่สำคัญในส้มเขียวหวาน

รหัสสารทดลอง 03-33-60-01-01-00-08-62



คำนำ

ส้มเขียวหวานถือเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง เป็นผลไม้ที่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค โดยในปี 2563 สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรรายงานว่าประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกส้มเขียวหวานรวมทั้งสิ้นจำนวน 109,300 ไร่ โดยพื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ในเขตภาคเหนือจำนวน 104,408 ไร่ รองลงมา ได้แก่ภาคกลาง, ภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นจำนวน 3,445, 1,245, และ 202 ไร่ ตามลำดับ โดยในปี 2563 มีจำนวนผลผลิตรวมทั้งประเทศ 204,737 ตัน ส้มเขียวหวานเป็นพืชที่มีแมลงศัตรูเข้าทำลายเป็นจำนวนมาก แมลงศัตรูที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง ได้แก่ เพลี้ยไก่อ๊แจ้ส้ม (Asian citrus psyllid) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Diaphorina citri* Kuawayama วงศ์ Phyllidae อันดับ Hemiptera เป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของพืชตระกูลส้ม ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากตา และยอดอ่อน ตัวอ่อนจะกลั่นสารสีขาวยามีลักษณะเป็นเส้นด้าย และอาจทำให้เกิดราดำติดตามมา ใบที่ถูกทำลายจะเป็นคลื่น ถ้าทำลายรุนแรงจะทำให้ใบร่วงติดผลน้อยหรือไม่ติดผลเลย เพลี้ยไก่อ๊แจ้ส้มนอกจากจะทำความเสียหายยังเป็นพาหะถ่ายทอดโรคใบเหลืองต้นโทรม หรือกรีนนิ่ง ในพืชตระกูลส้ม ต้นจะทรุดโทรมและตายในที่สุด ปัจจุบันพื้นที่ปลูกส้มเขียวหวานมีพื้นที่ลดลงอย่างมากเนื่องจากโรคกรีนนิ่งระบาด และยังไม่สามารถแก้ไขปัญหาค้นหาได้ การป้องกันกำจัดโรคกรีนนิ่งให้ได้ผลต้องใช้กิ่งพันธุ์ส้มปลอดโรค และมีการดูแลรักษา ป้องกันกำจัดเพลี้ยไก่อ๊แจ้ซึ่งเป็นแมลงพาหะโรคดังกล่าว การฉีดสารเข้าต้นเป็นเทคนิคการใช้สารอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ เช่น การฉีดสารเข้าต้นมะพร้าวเพื่อป้องกันกำจัดหนอนหัวดำ และแมลงดำหนามมะพร้าวในประเทศมาเลเซีย สิงคโปร์ ศรีลังกา อินเดีย และฟิลิปปินส์ รวมทั้งประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องวิจัยและพัฒนาเทคนิคการฉีดสารเข้าต้นส้มเขียวหวาน เพื่อหาวิธีการป้องกันกำจัดเพลี้ยไก่อ๊แจ้ส้ม รวมทั้งแมลงศัตรูส้มชนิดอื่น ๆ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นส้มเขียวหวาน
2. สารกำจัดแมลง imidacloprid 35% SC, clothianidin 16% SG, dinotefuran 10% SL, emamectin benzoate 1.92% EC, thiamethoxam 25% WG, abamectin 1.8% EC
3. สว่าน
4. ตะปู
5. กระบอกฉีดยา
6. อุปกรณ์วัดอุณหภูมิ, วัดความชื้นสัมพัทธ์ และนาฬิกาจับเวลา
7. ถุงมือ
8. อุปกรณ์ชั่งตวงวัด



วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ จำนวน 7 กรรมวิธี ดังนี้

- | | |
|--------------------------------|-----------------------|
| 1. imidacloprid 35% SC | อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น |
| 2. clothianidin 16% SG | อัตรา 4 กรัม/ต้น |
| 3. dinotefuran 10% SL | อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น |
| 4. emamectin benzoate 1.92% EC | อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น |
| 5. thiamethoxam 25% WG | อัตรา 4 กรัม/ต้น |
| 6. abamectin 1.8% EC | อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น |
| 7. ไม่ใช้สารฆ่าแมลง | |

ดำเนินการในต้นส้มเขียวหวานที่ปลูกในกระถาง จำนวน 2 ต้น/ซ้ำ ขนาดเส้นรอบวงลำต้น 15.8 - 21.7 เซนติเมตร ขนาดความสูงลำต้น 122 - 148 เซนติเมตร ทำการตรวจนับแมลงก่อนใช้สาร ในกรณีเพลี้ย ไข่แมลงทำการตรวจนับจำนวน 5 ยอด/ต้น เริ่มดำเนินการทดลองเมื่อพบเพลี้ยไข่แมลงมากกว่า 2 ตัว/ยอด ในกรณีหนอนม้วนใบส้มทำการตรวจนับจำนวน 5 กิ่ง/ต้น ดำเนินการทดลองเมื่อพบหนอนม้วนใบส้มมากกว่า 2 ตัว/ยอด เริ่มดำเนินการทดลองเมื่อพบหนอนม้วนใบส้มมากกว่า 1 ตัว/กิ่ง การฉีดสารเข้าสู่ลำต้นพืชใช้กระบอกฉีดยาดูดสารเข้มข้นสำหรับสารที่เป็นของเหลว ส่วนสารรูปแบบผงละลายน้ำ 10 ml แล้วฉีดเข้าสู่ลำต้นสูงเหนือพื้นดินประมาณ 10 นิ้ว ลึกแค่บริเวณเปลือกของลำต้น ใช้ตะปุดรีดที่บังคับสารให้ติงพอประมาณ เพื่อให้ค่อย ๆ ปลดปล่อยสารออกไป แบ่งใส่ 4 รุ เท่า ๆ กันตามทิศเหนือ ใต้ ตะวันออก และตะวันตก จากนั้นทำการตรวจนับแมลงหลังใช้สาร 3, 5, 7, 10, 15, 30 และ 60 วัน จากนั้นรวบรวมข้อมูลนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IRRISTAT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

เวลาและสถานที่

การทดลองที่ 1 โรงเรียนกลุ่มงานวิจัยการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ระหว่างเดือนเมษายน - มิถุนายน 2563

การทดลองที่ 2 โรงเรียนกลุ่มงานวิจัยการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ระหว่างเดือนเมษายน - มิถุนายน 2564

การทดลองที่ 3 โรงเรียนกลุ่มงานวิจัยการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ระหว่างเดือนสิงหาคม - กันยายน 2564

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การฉีดสารเข้าต้นเพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไข่แมลง (ปี 2563)

จำนวนเพลี้ยไข่แมลง (ตารางที่ 1)

ก่อนใช้สารทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธีมีจำนวนเพลี้ยไข่แมลงไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3.19 - 3.59 ตัว/ยอด ดังนั้นจึงวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนเพลี้ยไข่แมลงหลังการใช้สารด้วยวิธี Analysis of Variance



หลังใช้สารทดลอง 3 วัน พบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 3.17 และ 3.20 ตัว/ยอด ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้มจำนวน 3.69 ตัว/ยอด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ที่พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 3.38, 3.45, 3.41 และ 3.59 ตัว/ยอด ตามลำดับ

หลังใช้สารทดลอง 5 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้มจำนวน 4.12 ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยที่สุดเฉลี่ย 2.30 ตัว/ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้นที่พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 2.88, 2.34, 2.91, 2.62 และ 3.12 ตัว/ยอด ตามลำดับ

หลังใช้สารทดลอง 7 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้มจำนวน 4.21ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.41 ตัว/ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้นที่พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 0.78 และ 0.68 ตัว/ยอด ตามลำดับ ทั้งนี้กรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้นที่พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 1.42 และ 2.13 ตัว/ยอด ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ยมากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้สารชนิดอื่น ๆ

หลังใช้สารทดลอง 10 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้มจำนวน 4.50 ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.89 ตัว/ยอด



ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และ กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ที่พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 1.12, 0.90, 1.15 และ 0.93 ตัว/ยอด ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 2.41 ตัว/ยอด มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้สารชนิดอื่น ๆ

หลังใช้สารทดลอง 15 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้ม น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้ม จำนวน 4.50 ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้สมน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.73 ตัว/ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และ กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ที่พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 0.89, 0.82, 1.09 และ 0.87 ตัว/ยอด ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 2.59 ตัว/ยอด มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้สารชนิดอื่น ๆ

หลังใช้สารทดลอง 30 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้ม น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้ม จำนวน 5.30 ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 0.84 และ 1.02 ตัว/ยอด ตามลำดับ ไม่แตกต่างทางสถิติจาก กรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ที่พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 1.20 และ 1.15 ตัว/ยอด ตามลำดับ แต่กรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้สมน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น สำหรับกรรมวิธีใช้ สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 2.82 ตัว/ยอด ซึ่งมากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้สารชนิดอื่น ๆ

หลังใช้สารทดลอง 60 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้ม น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้ม จำนวน 6.83 ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น พบจำนวนเพลี้ย ไร้



แจ้ส้มเฉลี่ย 1.18, 1.27 และ 1.39 ตัว/ยอด ตามลำดับ น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากกรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ต้น ที่พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 2.10 ตัว/ยอด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ที่พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 1.55 ตัว/ยอด สำหรับกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 3.07 ตัว/ยอด ซึ่งมากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้สารชนิดอื่น ๆ

การทดลองที่ 2 การฉีดสารเข้าต้นเพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (ปี 2564)

จำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (ตารางที่ 2)

ก่อนใช้สารทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธีมีจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 12.35 – 14.25 ตัว/ยอด ดังนั้นจึงวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มหลังการใช้สารด้วยวิธี Analysis of Variance

หลังใช้สารทดลอง 3 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้ม จำนวน 14.75 ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยที่สุดเฉลี่ย 5.40 ตัว/ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้นที่พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 8.30, 6.05, 7.95, 8.35 และ 9.25 ตัว/ยอด ตามลำดับ

หลังใช้สารทดลอง 5 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้ม จำนวน 17.80ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยที่สุดเฉลี่ย 2.05 ตัว/ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้นที่พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 6.30, 2.80, 3.55, 4.85 และ 6.75 ตัว/ยอด ตามลำดับ

หลังใช้สารทดลอง 7 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้ม จำนวน 24.00 ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.65



ตัว/ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้นที่พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 2.55, 1.30, 2.05, 7.10 และ 9.30 ตัว/ยอด ตามลำดับ

หลังใช้สารทดลอง 10 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้ม จำนวน 18.40 ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยที่สุดเฉลี่ย 1.60 ตัว/ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และ กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ที่พบจำนวนเพลี้ย ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 3.45, 1.95, 2.55 และ 2.95 ตัว/ยอด ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 7.45 ตัว/ยอด มากกว่าและแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้สารชนิดอื่น ๆ

หลังใช้สารทดลอง 15 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้ม จำนวน 20.75 ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยที่สุดเฉลี่ย 2.05 ตัว/ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และ กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ที่พบจำนวนเพลี้ย ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 3.75, 2.25, 3.80 และ 3.55 ตัว/ยอด ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น พบจำนวนเพลี้ย ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 7.40 ตัว/ยอด มากกว่าและแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้สารชนิดอื่น ๆ

หลังใช้สารทดลอง 30 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ยไก่แจ้ส้ม จำนวน 38.10 ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น พบจำนวนเพลี้ยไก่แจ้สมน้อยที่สุดเฉลี่ย 2.20 ตัว/ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และ กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ที่พบจำนวนเพลี้ย ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 5.75, 2.90, 4.50 และ 3.65 ตัว/ยอด ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีใช้สาร abamectin



1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ตัน พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 14.10 ตัว/ยอด มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้สารชนิดอื่น ๆ

หลังใช้สารทดลอง 60 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบจำนวนเพลี้ยไร้ไก่แจ้ส้ม น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบเพลี้ยไร้ไก่แจ้ส้ม จำนวน 31.25 ตัว/ยอด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ตัน พบจำนวนเพลี้ยไร้ไก่แจ้สมน้อยที่สุดเฉลี่ย 5.90 ตัว/ยอด ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ตัน, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ตัน, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ตัน และ กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ตัน ที่พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 10.40, 6.60, 9.80 และ 6.30 ตัว/ยอด ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ตัน พบจำนวนเพลี้ย ไร้ไก่แจ้ส้มเฉลี่ย 16.60 ตัว/ยอด มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่มีการใช้สารชนิดอื่น ๆ

ซึ่งผลการทดลองทั้งสองการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Ichinose *et al.*, 2010 ที่ทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดเพลี้ยไร้ไก่แจ้ส้มโดยการฉีดสารเข้าสู่ลำต้นโดยทำการทดสอบใน ต้นส้มแมนดารินที่โตเต็มที่ ซึ่งผลการทดลองพบว่าเพลี้ยไร้ไก่แจ้สมีจำนวนลดลง 50% ภายใน 45 วัน หลังจากใช้สาร imidacloprid, thiamethoxam และ clothianidin ฉีดเข้าต้น

สำหรับในแมลงศัตรูประเภทปากดูดชนิดอื่นในส้ม Paula *et al.*, 2018 ได้ทำการทดสอบ ประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดเพลี้ยหอยเกล็ดหิมะ (*Unaspis citri* Comstock) ในส้มวาเลนเซีย โดยทำการฉีดสาร imidacloprid เข้าสู่ลำต้นส้มเปรียบเทียบกับสารพ่นสาร chlorpyrifos บนลำต้น ผลการทดลองพบว่า ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธีการฉีดสาร imidacloprid เข้าสู่ลำ ต้นส้ม และกรรมวิธีการพ่นสาร chlorpyrifos โดยหลังจากใช้สาร 45 และ 90 วัน ทั้งสองกรรมวิธี สามารถลดจำนวนประชากรเพลี้ยหอยเกล็ดหิมะได้

การทดลองที่ 3 การฉีดสารเข้าต้นเพื่อป้องกันกำจัดหนอนม้วนใบส้ม (ปี 2564)

จำนวนหนอนม้วนใบส้ม (ตารางที่ 3)

ก่อนใช้สารทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธีมีจำนวนหนอนม้วนใบส้มไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมี ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.48 – 1.70 ตัว/กิ่ง ดังนั้นจึงวิเคราะห์ข้อมูลจำนวนหนอนม้วนใบส้มหลังการใช้ สารด้วยวิธี Analysis of Variance

หลังใช้สารทดลอง 3 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้สารมีจำนวนหนอนม้วนใบส้มไม่แตกต่างกัน ทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.42 – 1.63 ตัว/กิ่ง

หลังใช้สารทดลอง 7 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้สารมีจำนวนหนอนม้วนใบส้มไม่แตกต่างกัน ทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.30 – 1.82 ตัว/กิ่ง

หลังใช้สารทดลอง 14 วัน พบว่ากรรมวิธีที่มีการใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ตัน, กรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ตัน และ



กรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น พบจำนวนหนอนม้วนใบส้มเฉลี่ย 1.26, 0.56 และ 0.91 ตัว/กิ่ง ตามลำดับ น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบหนอนม้วนใบส้มจำนวน 2.28 ตัว/กิ่ง แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลง imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น ที่พบจำนวนหนอนม้วนใบส้มเฉลี่ย 1.33, 1.53 และ 1.47 ตัว/กิ่ง ตามลำดับ

หลังใช้สารทดลอง 21 วัน พบว่ามีเพียงกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลง emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และ abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น พบจำนวนหนอนม้วนใบส้ม 0.14 และ 0.30 ตัว/กิ่ง ซึ่งน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบหนอนม้วนใบส้ม จำนวน 2.56 ตัว/กิ่ง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC พบจำนวนหนอนม้วนใบส้มน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.14 ตัว/กิ่ง ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC แต่น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธี imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น ที่พบจำนวนหนอนม้วนใบส้มเฉลี่ย 1.96, 2.23, 2.04 และ 2.61 ตัว/กิ่ง ตามลำดับ

หลังใช้สารทดลอง 30 วัน พบว่ามีเพียงกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลง emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และ abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น พบจำนวนหนอนม้วนใบส้ม 0.10 และ 0.31 ตัว/กิ่ง ซึ่งน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลงที่พบหนอนม้วนใบส้ม จำนวน 1.92 ตัว/กิ่ง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรรมวิธีที่มีการใช้สารกำจัดแมลงพบว่ากรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC พบจำนวนหนอนม้วนใบส้มน้อยที่สุดเฉลี่ย 0.10 ตัว/กิ่ง ไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีใช้สาร abamectin 1.8% EC แต่น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธี imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น ที่พบจำนวนหนอนม้วนใบส้มเฉลี่ย 1.72, 1.70, 1.55 และ 1.84 ตัว/กิ่ง ตามลำดับ

ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกันกับผลการทดลองของ พิเชฐและคณะ, 2564 ที่ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการฉีดสาร abamectin และ emamectin benzoate เข้าลำต้นมะพร้าว น้ำหอมเพื่อป้องกันกำจัดหนอนหัวดำมะพร้าว (*Opisina arenosella* Walker) ผลการทดลองพบว่าการฉีดสาร abamectin 1.8% EC อัตรา 15 มล./ต้น และสาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 5 มล./ต้น มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนหัวดำมะพร้าวได้อย่างน้อย 90 วัน การวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยวิธี LC/MS/MS ในเนื้อ น้ำมะพร้าว และเปลือกไม่พบสารตกค้าง



อีกทั้งยังเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับผลการทดลองของ Huang *et. al.*, 2016. ที่ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ ด้วยการฉีดสารเข้าต้นในการป้องกันกำจัดหนอนร่าน (*Latoia lepida* Cramer) ในต้นหอมหมื่นลี้ (*Osmanthus fragrans*) ที่พบว่าหลังทำการฉีดสารเข้าสู่ลำต้น สาร emamectin benzoate และ emamectin benzoate + clothianidin มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนร่าน โดยสามารถดูดซึมเข้าสู่ลำต้นได้อย่างรวดเร็ว และมีระยะเวลาในการควบคุมหนอนร่านได้ยาวนานกว่าสารกำจัดแมลงชนิดอื่น ๆ สำหรับสาร emamectin benzoate เป็นสารที่ใช้ป้องกันกำจัดด้วงจำพวกเจาะเปลือกและลำต้นที่เป็นศัตรูป่าไม้ โดยเฉพาะแมลงทับ; *Agilus planipennis* Fairmaire ที่ทำลายพืชตระกูลสน (Ash tree; *Fraxinus* spp.) ซึ่งในการใช้วิธี Trunk injection ด้วยสาร emamectin benzoate จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโดยยาวนานมากกว่า 1 ปี (Smitey *et. al.*, 2010.)

โดยผลการทดลองทั้ง 3 การทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกันกับการทดลองของ VanWoerkom *et. al.*, 2014 ที่ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดโรคแมลงศัตรูสำคัญชนิดต่าง ๆ ในแอปเปิ้ล (Semi-dwarf Empire apple; *Malus domestica* Borkhausen) ด้วยวิธีฉีดสารเข้าสู่ลำต้น โดยสารกำจัดแมลงที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ imidacloprid (Ima-jet™), Chlorantraniliprole (XCL-r8™), and emamectin benzoate (TREE-age™) ผลการทดลองพบว่า สาร imidacloprid มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูจำพวกปากดูด เช่น เพลี้ยอ่อน (Aphididae), เพลี้ยจักจั่นมันฝรั่ง (Potato leafhopper; *Empoasca fabae* Harris) สำหรับสาร emamectin benzoate มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดหนอนม้วนใบ (Oblique banded leaf roller; *Choristoneura rosaceana* Harris), และเพลี้ยจักจั่นมันฝรั่ง ส่วนสาร Chlorantraniliprole มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดหนอนม้วนใบ และ Oriental fruit moth; *Grapholita molesta* (Busck)

อย่างไรก็ตามผลการทดลองในครั้งนี้เป็นเพียงผลการทดสอบในสภาพโรงเรือนเท่านั้น เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส COVID 19 ทำให้ผู้วิจัยประสบปัญหาไม่สามารถเดินทางออกไปดำเนินการทดลองในสภาพไร่ได้ ดังนั้นจึงควรมีการทำการทดลองซ้ำในสภาพไร่เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองอีกครั้งหนึ่ง

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงด้วยการฉีดสารเข้าต้นในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูที่สำคัญในส้มเขียวหวานนั้น ได้ทดสอบกับแมลง 2 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไก่อแจ้ส้ม (*D. citri* Kuawayama) และหนอนม้วนใบส้ม (*A. micaceana* Walker) โดยการทดลองประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงด้วยการฉีดสารเข้าต้นในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไก่อแจ้ส้ม ทำการทดลอง 2 การทดลอง ระหว่างเดือนเมษายน – มิถุนายน 2563 และ เมษายน – มิถุนายน 2564 ผลการทดลองทั้งสองการทดลองให้ผลที่สอดคล้องกันคือ พบว่าสาร thiamethoxam 25% WG อัตรา 4 กรัม/ต้น



มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไก่อัจฉริยะได้ดีที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร clothianidin 16% SG อัตรา 4 กรัม/ต้น, กรรมวิธีใช้สาร dinotefuran 10% SL อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น และกรรมวิธีใช้สาร emamectin benzoate 1.92% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ยกเว้นกรรมวิธีฉีดสารเข้าต้น abamectin 1.8% EC อัตรา 4 มิลลิลิตร/ต้น ซึ่งมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไก่อัจฉริยะต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารกำจัดแมลงชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามทุกกรรมวิธีที่ฉีดสารเข้าต้นมีจำนวนเพลี้ยไก่อัจฉริยะน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร สำหรับการทดลองประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงด้วยการฉีดสารเข้าต้นในการป้องกันกำจัดหนอนมันวันใบส้มทำการทดลองระหว่างเดือนสิงหาคม – กันยายน 2564 ผลการทดลองพบว่าพบว่ามีเพียงกรรมวิธีฉีดสารเข้าต้นด้วย emamectin benzoate 1.92% EC และ abamectin 1.8% EC ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนมันวันใบส้ม โดยพบจำนวนหนอนมันวันใบส้มน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้สาร imidacloprid 35% SC, clothianidin 16% SG, dinotefuran 10% SL, thiamethoxam 25% WG และกรรมวิธีไม่ใช้สารกำจัดแมลง ตลอดจนการทดลองไม่พบอาการเป็นพิษ (phytotoxicity) ด้วยการฉีดสารเข้าต้นในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูที่สำคัญในส้มเขียวหวาน

ปัญหาและอุปสรรค

เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส COVID 19 ทำให้ผู้วิจัยประสบปัญหาไม่สามารถเดินทางออกไปดำเนินการทดลองในสภาพไร่ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองในสภาพโรงเรือน โดยได้ดำเนินการทดลอง ณ โรงเรือนกลุ่มงานวิจัยการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช นอกจากนี้ในช่วงการทดลองนั้นยังไม่พบการระบาดของเพลี้ยไฟและหนอนซอนใบส้ม ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่วางแผนในการทดลองประสิทธิภาพสารแต่พบการระบาดของหนอนมันวันใบส้ม จึงดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของสารในหนอนมันวันใบส้มแทน

เอกสารอ้างอิง

- พิเชฐ เขาวนวัฒมนวงศ์ พงษ์ธิชาติ ปุญพัฒน์ โท นลินา ไชยสิงห์ สุชาดา สุพรศิลป์ วรวิษ สุดจริตธรรมจริยางกูร
 ชนิดา ทองแซม และ วีระสิงห์ แสงวรรณ. 2563. การฉีดสาร Abamectin และ Emamectin
 เข้าลำต้นเพื่อป้องกันกำจัดหนอนหัวดำมะพร้าว (*Opisina arenosella* Walker) ในมะพร้าว
 น้ำหอม.ว. วิชาการเกษตร 38 (2). 170-181
- Huang J., J. Zhang, Y. Li, J. Li and X. H. Shi . 2016, Evaluation of the effectiveness of
 insecticide trunk injections for control of *Latoia lepida* (Cramer) in the sweet
 olive tree *Osmanthus fragrans*. PeerJ 4:e2480
- Ichinose K., K. Miyazi, K. Matsuhira, K. Yasuda, Y. Sadoyama, D. H. Tuan and D. V. Bang.
 2010. Unreliable pesticide control of the vector psyllid *Diaphorina citri*



- (Hemiptera: Psyllidae) for the reduction of microorganism disease transmission. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 45. 466–472.
- Paula, A. L., G. O. Laura., C. M. Marco, M. J. Silvia and R. Víctor. 2018. Imidacloprid injections effectiveness for control of snow scale of citrus trunk. 39. 15-20.
- Smitey, D.R, J..J. Docola and D.L. Cox. 2010. Multiple year Protection of Ash Trees from Emerald Ash Borer with a Single Trunk Injection of Emamectin benzoate and Single year Protection with an imidacloprid Basal Drench. *Arboriculture and Urban Forestry*.36(5): 206-211.
- VanWoerkom, A. H., S. G. Acimović, G. W. Sundin, B. M. Cregg, D. Mota-Sanchez, C. Vandervoort, and J. C. Wise. 2014. Trunk injection: An alternative technique for pesticide delivery in apples. *Crop Protection*. 65: 173-185.



ตารางที่ 1 จำนวนเพลี้ยไก่อัจฉิมจากการทดลองฉีดสารเข้าต้นส้มเขียวหวานในสภาพโรงเรือนระหว่างเดือนเมษายน – มิถุนายน 2563

| กรรมวิธี | อัตราการใช้ (กรัม หรือ มล./ต้น) | ก่อนใช้สาร | จำนวนเพลี้ยไก่อัจฉิม (ตัว/ยอด) | | | | | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|------------|--------------------------------|--------|----------|--------|--------|---------|---------|
| | | | หลังใช้สาร | | | | | | |
| | | | 3 วัน | 5 วัน | 7 วัน | 10 วัน | 15 วัน | 30 วัน | 60 วัน |
| 1. imidacloprid 35% SC | 4 มล. | 3.45 | 3.38 ab | 2.88 a | 0.78 abc | 1.12 a | 0.89 a | 1.20 ab | 1.55 ab |
| 2. clothianidin 16% SG | 4 กรัม | 3.19 | 3.20 a | 2.34 a | 0.68 ab | 0.90 a | 0.82 a | 1.02 a | 1.27 a |
| 3. dinotefuran 10% SL | 4 มล. | 3.32 | 3.45 ab | 2.91 a | 1.42 c | 1.15 a | 1.09 a | 1.72 b | 2.10 b |
| 4. emamectin benzoate 1.92% EC | 4 มล. | 3.48 | 3.41 ab | 2.62 a | 1.39 bc | 0.93 a | 0.87 a | 1.15 ab | 1.39 a |
| 5. thiamethoxam 25% WG | 4 กรัม | 3.59 | 3.17 a | 2.30 a | 0.41 a | 0.89 a | 0.73 a | 0.84 a | 1.18 a |
| 6. abamectin 1.8% EC | 4 มล. | 3.41 | 3.59 ab | 3.12 a | 2.13 d | 2.41 b | 2.59 b | 2.82 c | 3.07 c |
| 7. ไม่ใช้สาร | - | 3.55 | 3.69 b | 4.12 b | 4.21 e | 4.50 c | 4.82 c | 5.30 d | 6.83 d |
| CV% | | 12.3 | 7.8 | 17.6 | 29.2 | 26.1 | 22.8 | 19.9 | 17.6 |

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ตารางที่ 2 จำนวนเพลี้ยไก่อัจฉิมจากการทดลองฉีดสารเข้าต้นส้มเขียวหวานในสภาพโรงเรือนระหว่างเดือนเมษายน – มิถุนายน 2564

| กรรมวิธี | อัตราการใช้ (กรัม หรือ มล./ ต้น) | ก่อนใช้สาร | จำนวนเพลี้ยไก่อัจฉิม (ตัว/ยอด) | | | | | | |
|--------------------------------|--|------------|--------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | | หลังใช้สาร | | | | | | |
| | | | 3 วัน | 5 วัน | 7 วัน | 10 วัน | 15 วัน | 30 วัน | 60 วัน |
| 1. imidacloprid 35% SC | 4 มล. | 12.75 | 8.30 a | 6.30 a | 2.55 a | 3.45 ab | 3.75 a | 5.75 ab | 10.40 a |
| 2. clothianidin 16% SG | 4 กรัม | 13.55 | 6.05 a | 2.80 a | 1.30 a | 1.95 a | 2.25 a | 2.90 a | 6.60 a |
| 3. dinotefuran 10% SL | 4 มล. | 13.25 | 7.95 a | 3.55 a | 2.05 a | 2.55 a | 3.80 a | 4.50 a | 9.80 a |
| 4. emamectin benzoate 1.92% EC | 4 มล. | 13.15 | 8.35 a | 4.85 a | 7.10 a | 2.95 ab | 3.55 a | 3.65 a | 6.30 a |
| 5. thiamethoxam 25% WG | 4 กรัม | 13.65 | 5.40 a | 2.05 a | 0.65 a | 1.60 a | 2.05 a | 2.20 a | 5.90 a |
| 6. abamectin 1.8% EC | 4 มล. | 12.35 | 9.25 a | 6.75 a | 9.30 a | 7.45 b | 7.40 b | 14.10 b | 16.60 b |
| 7. ไม่ใช้สาร | - | 14.25 | 14.75 b | 17.80 b | 24.00 b | 18.40 c | 20.75 c | 38.10 c | 31.25 c |
| CV% | | 33.5 | 42.9 | 56.8 | 54.2 | 53.5 | 20.0 | 59.4 | 23.6 |

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ตารางที่ 3 จำนวนหนอนม้วนใบส้มจากการทดลองฉีดสารเข้าต้นส้มเขียวหวานในสภาพโรงเรือนระหว่างเดือนสิงหาคม – กันยายน 2564

| กรรมวิธี | อัตราการใช้ (กรัมหรือมล./ต้น) | จำนวนหนอนม้วนใบส้ม (ตัว/กิ่ง) | | | | | |
|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|------------|-------|---------|--------|--------|
| | | ก่อนใช้สาร | หลังใช้สาร | | | | |
| | | | 3 วัน | 7 วัน | 14 วัน | 21 วัน | 30 วัน |
| 1. imidacloprid 35% SC | 4 มล. | 1.52 | 1.48 | 1.40 | 1.33 ab | 1.96 b | 1.72 b |
| 2. clothianidin 16% SG | 4 กรัม | 1.70 | 1.53 | 1.76 | 1.53 ab | 2.23 b | 1.70 b |
| 3. dinotefuran 10% SL | 4 มล. | 1.68 | 1.66 | 1.59 | 1.26 a | 2.04 b | 1.55 b |
| 4. emamectin benzoate 1.92% EC | 4 มล. | 1.65 | 1.42 | 1.35 | 0.56 a | 0.14 a | 0.10 a |
| 5. thiamethoxam 25% WG | 4 กรัม | 1.48 | 1.55 | 1.67 | 1.47 ab | 2.61 b | 1.84 b |
| 6. abamectin 1.8% EC | 4 มล. | 1.51 | 1.43 | 1.30 | 0.91 a | 0.30 a | 0.31 a |
| 7. ไม่ใช้สาร | - | 1.57 | 1.63 | 1.82 | 2.28 b | 2.56 b | 1.92 b |
| | CV% | 17.96 | 25.57 | 28.39 | 45.05 | 26.28 | 29.39 |

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ผู้รวบรวมและแก้ไข

| | |
|---------------|---------------|
| นางสาวภัทรพร | สรรพนุเคราะห์ |
| นางสาวดารารพร | รินทะรักษ์ |
| นางสาวอมรรชัญ | คิดใจเตียว |
| นางสาวกาญจณา | วาระวิชะณี |
| นางสาวอุษณีย์ | จินตากล |
| นายเอกรัตน์ | ธนูทอง |
| นางวรัญญา | มาลี |
| นางศรีจันรรจ์ | ศรีจันทรา |
| นางสาววิภาดา | ปลอดครบุรี |

ผู้สอบทาน

| | |
|----------------|---------|
| นางสาวณัฐวรรณ | ชนะโชติ |
| นางสาวจิราภรณ์ | สินทร |

