



เล่มที่ ๔

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลงานวิจัย ประจำปี ๒๕๖๓

Plant Protection Research and Development office
เอกสารวิชาการเลขที่ ๑/๒๕๖๔



กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์





รายงาน
ผลงานวิจัยประจำปี 2563
เล่ม 4

เอกสารวิชาการลำดับที่ 1/2564

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

คำนำ

“รายงานผลงานวิจัย ประจำปี 2563” เป็นเอกสารวิชาการที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จัดทำต่อเนื่องติดต่อกัน 17 ปี จากผลงานวิจัยของนักวิจัย กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช กลุ่มวิจัยการกักกันพืช และกลุ่มบริหารศัตรูพืช ที่ดำเนินงานด้วยงบประมาณ ภายใต้แผนงานวิจัยและพัฒนา กรมวิชาการเกษตร ปี 2559 - 2564 ประกอบด้วยแผนงานวิจัย 2 แผนงาน ได้แก่ 1.แผนงานวิจัยมาตรการสุขอนามัยพืช ประกอบด้วย 1 ชุดโครงการวิจัย (4 โครงการวิจัย) ได้แก่ 1) โครงการวิจัยมาตรการสุขอนามัยพืช ในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร 2) โครงการวิจัยการศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า 3) โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดศัตรูพืชกักกันของพืชส่งออก 4) โครงการวิจัยการศึกษาศาสนาภาพศัตรูพืชกักกันในประเทศไทย 2. แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์ ประกอบด้วย 1 ชุดโครงการวิจัย (4 โครงการวิจัย) ได้แก่ 1) โครงการวิจัยต้นแบบการผลิตชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ 2) โครงการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ 3) โครงการวิจัยการผสมผสานเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมศัตรูพืช 4) โครงการวิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร แผนงานวิจัยเดี่ยว จำนวน 8 แผน (โครงการวิจัยเดี่ยว) 1) แผนงานวิจัยการพัฒนาระบบการจัดการศัตรูพืชที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช 2) แผนงานวิจัยเทคนิคเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช 3) แผนงานวิจัยการบริหารศัตรูพืชแบบบูรณาการ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ 4) แผนงานวิจัยและพัฒนากาใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นคำแนะนำในการผลิตพืชบริโภคภายในประเทศและส่งออก 5) แผนงานวิจัยอนุกรมวิธานชีววิทยาและการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย 6) แผนงานวิจัยการศึกษาและการจัดการพืชต่างถิ่นที่รุกรานนิเวศเกษตร 7) แผนงานวิจัยชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vectors) ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย 8) แผนงานวิจัยและพัฒนากาตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล เพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

สำหรับแผนงานวิจัยอื่น ๆ ได้แก่ อ้อย ปาล์ม น้ำมัน ข้าวโพดฝักสด ถั่วลิสง มะม่วง ชมิมันชัน กาแฟ มะคาเดเมีย มันฝรั่ง พริก ขิง มะเขือเทศ การลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทดสอบและพัฒนากาใช้เครื่องจักรกลการเกษตร เกษตรอินทรีย์ ไม้ดอกไม้ประดับ ผลผลิตพืชเศรษฐกิจภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง การผลิตพืชภาคกลางและภาคตะวันตก การผลิตพืชภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน กล้วย อโวคาโด ส้มเปลือกอ่อน เป็นการรวมการดำเนินงานจาก 32 แผนงานวิจัย 22 โครงการวิจัยเดี่ยว 24 โครงการวิจัย รวมทั้งสิ้น 46 โครงการวิจัย 58 กิจกรรม ที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชต้องรับผิดชอบในฐานะหัวหน้าการทดลอง รวมจำนวนการทดลองทั้งสิ้น 278 การทดลอง เป็นการทดลองร่วม 53 การทดลอง

การจัดทำรายงานผลงานวิจัยเล่มนี้ เสร็จสมบูรณ์ เพราะนักวิจัยจากกลุ่มวิจัย ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช มุ่งหวังจะเผยแพร่ผลงานด้านอารักขาพืชที่ตนได้วิจัยด้วยความพากเพียร และมุ่งมั่น ให้ผู้สนใจ ได้นำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ ทั้งการอ้างอิง การประยุกต์ เพื่อขยายผล ตลอดจนการต่อยอดผลงานวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จึงขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านไว้ในโอกาสนี้

(นายศรุต สุทธิอารมณ)

ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สิงหาคม 2564

สารบัญ

รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2563 เล่มที่ 1.....	1-737
รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2563 เล่มที่ 2.....	738-1458
รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2563 เล่มที่ 3.....	1459-2194
รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2563 เล่มที่ 4.....	2195-2995

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อย

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อย

กิจกรรมที่

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3. ศึกษาช่วงระยะเวลาการใช้สารเพื่อกำจัดวัชพืช..... 1
Glyphosate และ Glufosinate-ammonium ในอ้อยเพื่อควบคุม
วัชพืชอย่างมีประสิทธิภาพ
01-02-63-04-00-00-03-63
- ❖ อุษณีย์ จินดากุล และคณะ
- 4. ศึกษาประสิทธิภาพสารของกำจัดวัชพืช..... 16
ประเภทพ่นหลังออกในอ้อย^๑
01-02-63-04-00-00-04-63
- ❖ เทอดพงษ์ มหาวงศ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปาล์มน้ำมัน (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปาล์มน้ำมัน

กิจกรรมที่ 4. ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชในปาล์มน้ำมันพื้นที่ปลูกใหม่

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 4.1 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชใน..... 26
ปาล์มน้ำมันพื้นที่ปลูกใหม่เขตภาคเหนือ
01-118-60-01-04-00-01-63
- ❖ จริญญา ปิ่นสุภา และคณะ
- 4.2 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชในปาล์มน้ำมัน..... 40
เขตพื้นที่ดินเปรี้ยว
01-118-60-01-04-00-02-63
- ❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย และคณะ

- 4.3 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชในปาล์มน้ำมัน..... 56
เขตพื้นที่ลุ่มน้ำปากพนัง
01-118-60-01-04-00-03-63
- ❖ ยุรวรรณ อนันตมณี และคณะ
- 4.4 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชในปาล์มน้ำมัน..... 69
เขตพื้นที่พรุ
01-118-60-01-04-00-04-63
- ❖ เทอดพงษ์ มหาวงศ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตข้าวโพดฝักสด (โครงการวิจัยเดี่ยว)

กิจกรรมที่ 3. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการอารักขาคข้าวโพดฝักสด

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3.2 ศึกษาการแพร่ระบาดของโรคไวรัสข้าวโพดหวาน.....
ในแหล่งปลูกที่สำคัญ
01-13-59-02-03-00-04-60
- ❖ สิทธิศักดิ์ แสนไพศาล
- 3.3 การป้องกันกำจัดเชื้อรา *Peronosclerospora sorghi*..... 84
สาเหตุโรคราน้ำค้างในข้าวโพดหวานในพื้นที่ปลูกข้าวโพดที่สำคัญ
01-13-59-02-03-00-05-60
- ❖ พิระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ
- 3.6 การศึกษาประสิทธิภาพของสารกำจัดวัชพืชแบบผสม..... 102
(tank mixture) ในข้าวโพดหวาน
01-13-59-02-03-00-06-63
- ❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาถั่วลิสงเพื่อเสริมสร้างระบบการผลิตที่ยั่งยืน และความมั่นคง
ทางอาหาร

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตถั่วลิสง

กิจกรรมที่ 3. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตถั่วลิสงเฉพาะพื้นที่

กิจกรรมย่อยที่ -

- 3.9 ผลของสารกำจัดวัชพืชต่อการควบคุมวัชพืชในถั่วลิสง..... 115
การทดลอง 01-17-59-01-03-00-09-63
- ❖ เทอดพงษ์ มหาวงศ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตมะม่วงเพื่อเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ
โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตมะม่วงเพื่อเพิ่มศักยภาพการแข่งขันใน
ตลาดส่งออก

กิจกรรมที่ 3.

กิจกรรมย่อยที่ -

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

❖ อูราพร หนูนารถ และคณะ

แผนงานวิจัยย่อย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่สำคัญ
ทางเศรษฐกิจ

โครงการวิจัย วิจัยการพัฒนาระบบการจัดการศัตรูพืชที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
(03-29-60-01)

กิจกรรมที่ 1. การศึกษาความต้านทานและการจัดการความต้านทานศัตรูพืชในพืช
บริโภคและพืชอาหารสัตว์

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 1.2 การจัดการสลับใช้สารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆ..... 124
ในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟพริกในพริก
03-29-60-01-01-00-15-63

❖ สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ

➤ 1.4 การจัดการสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 135
หนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* (Hubber) ในพื้นที่
ปลูกมะเขือเทศที่สำคัญ
03-29-60-01-01-00-10-62

❖ อีราทัย บุญญะประภา และคณะ

➤ 1.6 การเปลี่ยนแปลงความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง..... 148
spinetoram ในหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. ในพืช
ตระกูลกะหล่ำ
03-29-60-01-01-00-16-63

❖ สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ

- 1.7 ความต้านทานและการจัดการสารกำจัดไรในไร..... 155
สองจุด *Tetranychus urticae* Koch ในสตรอว์เบอร์รี
03-29-60-01-01-00-11-62
- ❖ ณพชกรกร ธไภษัชย์ และคณะ
- 1.8 สถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืช..... 2886
ของวัชพืชในแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญและการจัดการ
03-29-60-01-01-00-07-61
- ❖ สิริชัย สาธุวิจารณ์ และคณะ
- 1.10 พื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดของหญ้าข้าวนก..... 179
ที่มีกลไกความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชแบบ multiple
resistance ในนาข้าวและการควบคุม
03-29-60-01-01-00-06-60
- ❖ ปรัชญา เอกฐิน และคณะ
- 1.13 การจัดการสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 214
เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* Hood ในมะนาว
03-29-60-01-01-00-09-61
- ❖ สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ
- 1.14 ความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงในเพลี้ยไฟพริก..... 233
Scirtothrips dorsalis Hood ที่ทำลายมะม่วง
03-29-60-01-01-00-11-62
- ❖ สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ
- 1.15 การจัดการสารฆ่าแมลงแบบหมุนเวียน..... 250
ตามกลุ่มกลไกการออกฤทธิ์เพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟในมะม่วง
03-29-60-01-01-00-12-62
- ❖ ศรีจันทร์ ศรีจันทร์ และคณะ
- 1.16 ความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงในเพลี้ยไฟฝ้าย..... 267
Thrips palmi Karny ที่ทำลายเมล่อน
03-29-60-01-01-00-13-62
- ❖ สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ

- 1.17 สถานการณ์หญ้าตีนกา (*Eleusine indica*) 280
ต้านทานสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Aryloxyphenoxy-propionate ใน
แหล่งปลูกผักและการจัดการ
03-29-60-01-00-14-62

❖ จริญญา ปิ่นสุภา และคณะ

กิจกรรมที่ 2. การศึกษาความต้านทานและการจัดการความต้านทานศัตรูพืชในไม้ดอกไม้ประดับ
กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.2 การจัดการสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 302
เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* Hood ในกุหลาบพวง
03-29-60-01-02-00-04-61

❖ ศรีจันทร์ ศรีจันทร์ และคณะ

- 2.4 การเปลี่ยนแปลงความเป็นพิษของสาข่า..... 325
แมลง spinetoram และ emamectin benzoate ในเพลี้ยไฟฝ้าย
Thrips palmi ที่ทำลายกล้วยไม้
03-29-60-01-02-00-05-62

❖ สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยเทคนิคเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (03-33-60-01)

กิจกรรมที่ 1. วิจัยและพัฒนาเทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- 1.3 พัฒนาเทคนิคการพ่นสารด้วยเครื่องพ่นสาร.....
แบบแรงลมขนาดใหญ่เพื่อป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชที่
สำคัญในแปลงอุ่นแบบสภาพไร่
03-33-60-01-01-00-03-61

❖ วรวิช สุดจริตธรรมจริยางกูร และคณะ

- 1.4 พัฒนาเทคนิคการพ่นสารด้วยคานหัวฉีด.....
เพื่อป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชที่สำคัญในแปลงอุ่นแบบ
สภาพร่องสวน
03-33-60-01-01-00-04-61

❖ วรวิช สุดจริตธรรมจริยางกูร และคณะ

➤ 1.6 เทคนิคการใช้ไส้เดือนฝอย..... 334

Steinemema carpospae Weiser ควบคุมด้วงหมัดผักใน
คะน้าด้วยระบบการให้น้ำแบบสปริงเกอร์

03-33-60-01-01-00-06-62

❖ สุภางคณา ธิรฐ และคณะ

➤ 1.7 เทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อควบคุม..... 348

หนอนกออ้อยด้วยระบบการให้น้ำแบบน้ำหยด

03-33-60-01-01-00-07-62

❖ สุภางคณา ธิรฐ และคณะ

➤ 1.8 การฉีดสารเข้าต้นเพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ 353

เพลี้ยไก่แจ้ และหนอนซอนใบส้มเขียวหวาน

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

❖ สุภางคณา ธิรฐ และคณะ

กิจกรรมที่ 2. การศึกษาผลของการใช้สารแบบผสม สารเสริมประสิทธิภาพและ คุณภาพน้ำที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 2.6 ศึกษาผลของสารเสริมประสิทธิภาพที่มีต่อประสิทธิภาพ..... 361

ในการป้องกันกำจัดและความคงทนของสารฆ่าแมลงที่ใช้ในการ
ป้องกันกำจัดหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.)

03-33-60-01-02-00-06-62

❖ นลินา ไชยสิงห์ และคณะ

➤ 2.7 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภท..... 370

พ่นก่อนวัชพืชงอก (pre-emergence herbicide) ผสมร่วมกับ
ประเภทพ่นหลังวัชพืชงอก (post-emergence herbicide) ใน
ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์[⊕]

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

❖ จริญญา ปิ่นสุภา และคณะ

➤ 2.8 การศึกษาคู่ผสมระหว่างสารกำจัดวัชพืชประเภท..... 380

ใช้ก่อนและหลังวัชพืชงอกในสับปะรด[⊕]

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

❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย และคณะ

➤ 2.9 ศึกษาช่วงเวลาการใช้สารกำจัดวัชพืชประเภท.....	393
พ่นหลังวัชพืชงอกในมันสำปะหลัง ❖	
03-33-60-01-02-00-11-63	
❖ ปรัชญา เอกภิน และคณะ	
➤ 2.10 ประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชกลุ่มสมระหว่าง.....	433
สารกำจัดวัชพืชประเภทใช้ก่อนวัชพืชงอกในอ้อยต่อ	
03-33-60-01-02-00-07-62	
❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย และคณะ	
➤ 2.11 การสังเคราะห์และทดสอบประสิทธิภาพ.....	
อนุภาคนาโนคอปเปอร์ในการควบคุม โรคใบจุดพริกที่เกิดจาก	
แบคทีเรีย <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	
03-33-60-01-02-00-08-62	
❖ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ และคณะ	
โครงการวิจัย วิจัยการบริหารศัตรูพืชแบบบูรณาการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต	
ของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ (03-34-60-01)	
กิจกรรมที่ 1. ป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสาน (IPC) เพื่อควบคุมศัตรูพืชที่สำคัญ	
กิจกรรมย่อยที่ -	
การทดลอง	➤ 1.5 การป้องกันกำจัดแมลงวันแตงแบบผสมผสานใน..... 447
	พืชตระกูลแตง
	03-34-60-01-01-00-05-62
	❖ สัญญาณี ศรีคชา และคณะ
กิจกรรมที่ 2. การบริหารศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM) ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ	
กิจกรรมย่อยที่ -	
การทดลอง	➤ 2.5 เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสาน..... 462
	ในถั่วฝักยาว
	03-34-60-01-02-00-05-62
	❖ นพพล สัตยาสัย และคณะ
	➤ 2.6 เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสาน..... 486
	ในมะเขือเปราะ
	03-34-60-01-02-00-06-62
	❖ สัญญาณี ศรีคชา และคณะ

- 2.7 การจัดการศัตรูพริกแบบผสมผสาน.....
03-34-60-01-02-00-07-62
 - ❖ วิภาดา ปลอดครบุรี และคณะ
- 2.11 การจัดการศัตรูหอมแดงแบบผสมผสาน..... 500
03-34-60-01-02-00-11-63
 - ❖ วิภาดา ปลอดครบุรี และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมเทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและภาพถ่ายทางอากาศ

โครงการวิจัย และพัฒนาเทคนิคการพ่นสารและประมวลผลภาพถ่ายเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัด และตรวจสอบการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชด้วยอากาศยานไร้คนขับ

กิจกรรมที่ 1. วิจัยและพัฒนาเทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.1 ประสิทธิภาพการพ่นด้วยอากาศยานไร้คนขับ..... 508
(Unmanned Aerial Vehicle (UAV)) ในการป้องกันกำจัดศัตรูคะน้า
03-60-63-01-01-00-01-63

❖ อนุสรณ์ พงษ์มี และคณะ

- 1.2 ประสิทธิภาพการพ่นด้วยอากาศยานไร้คนขับ..... 518
(Unmanned Aerial Vehicle (UAV)) ในการป้องกันกำจัดศัตรูหอมแบ่ง
03-60-63-01-01-00-02-63

❖ นลินา ไชยสิงห์ และคณะ

- 1.3 ประสิทธิภาพการพ่นด้วยอากาศยาน..... 524
ไร้คนขับ (Unmanned Aerial Vehicle (UAV)) ในการป้องกันกำจัดแมลงและไรศัตรูมันสำปะหลัง
03-60-63-01-01-00-03-63

❖ พฤทธิชาติ บุญวัฒน์ และคณะ

กิจกรรมที่ 2 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการประเมินสถานการณ์การระบาดและประเมินความเสียหายจากศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- 2.1 การศึกษาเทคนิคประมวลผลภาพถ่ายเพื่อ..... 532
ใช้ในการตรวจสอบการเข้าทำลายของไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง
03-60-63-01-02-00-01-63

❖ วีระชัย สมศรี และคณะ

- 2.2 การศึกษาลักษณะอาการการเข้าทำลายของ..... 543
หนอนหัวดำมะพร้าวและแมลงดำหนามมะพร้าวจากภาพถ่าย*
03-60-63-01-02-00-02-63

❖ พัชรวิรรณ จงจิตต์เมต และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มการผลิตกาแฟคุณภาพ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและ
วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว (01-58-59-03)

กิจกรรมที่ 3. วิจัยและพัฒนาการบริหารจัดการศัตรูพืชของกาแฟและวิทยาการหลัง
การเก็บเกี่ยว

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3.5 การจัดการวัชพืชในสวนกาแฟอะราบิกา 555
3.5.2 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นหลังวัชพืช
งอกในสวนกาแฟ
01-58-59-03-03-00-06-60

❖ จริญญา ปิ่นสุภา และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยการปรับปรุงพันธุ์และศึกษาเทคโนโลยีการผลิตมะคาเดเมีย (โครงการวิจัยเดี่ยว)
โครงการวิจัย วิจัยการปรับปรุงพันธุ์และศึกษาเทคโนโลยีการผลิตมะคาเดเมีย
(01-55-59-01)

กิจกรรมที่ 2. การศึกษาเทคโนโลยีการผลิตมะคาเดเมีย

- การทดลอง ➤ 2.5 การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ..... 602
และหนอนเจาะผลในมะคาเดเมีย*
01-55-59-01-02-00-06-62

❖ บุษบง มั่นมั่นคง และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตมันฝรั่ง (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตมันฝรั่ง (01-27-59-01)

กิจกรรมที่ 3. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชสำคัญของมันฝรั่ง

กิจกรรมย่อยที่ 3.1 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการแมลงศัตรูสำคัญของมันฝรั่ง

- การทดลอง ➤ 3.1.1 การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการ..... 612
ป้องกันกำจัดด้วงเจาะหัวมันฝรั่งในมันฝรั่ง^๕
03-05-59-02-01-00-29-61

❖ อุราพร หนูนารถ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาการผลิตพืชในระบบอินทรีย์

โครงการวิจัย วิจัยพัฒนาการป้องกันกำจัดศัตรูพืชในการผลิตพืชระบบเกษตรอินทรีย์ (03-03-59-02)

กิจกรรมที่ 2. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพืชต่อแมลงศัตรูพืชและแมลงศัตรู
ธรรมชาติจากแปลงปลูกพืชอินทรีย์ (2559-2563)

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.7 การศึกษาประชากรของแมลงและไรศัตรูแมลง..... 618
อินทรีย์ที่ปลูกในโรงเรือนตาข่ายและการศึกษาประสิทธิภาพ
ของสารสกัดจากพืชต่อแมลงและไรศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติใน
ห้องปฏิบัติการ
03-03-59-02-02-00-07-62

❖ อติติยา แก้วประดิษฐ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์
สู่เชิงพาณิชย์

โครงการวิจัย วิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร

กิจกรรมที่ 1.สำรวจและศึกษาศักยภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมแมลงไรและสัตว์
ศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.13 การคัดเลือกอนุภาคไวรัส เอ็น พี วี ที่มีศักยภาพ..... 2825
ในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก
03-05-59-01-01-00-13-61

❖ สุขลวัฒน์ ว่องไวลิขิต

- 1.14 การคัดแยกชนิด และทดสอบ..... 655
ประสิทธิภาพการก่อโรคในหนูของโปรโตซัวสกุล *Eimeria*
(Apicomplexa:Coccidia) จากหนูนาใหญ่ (ricefield rat:
Rattus argentiventer (Robinson and Kloss, 1916))
เพื่อนำมาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนู
03-05-59-01-01-00-14-61

❖ วิชาญ วรธนะไกววัล และคณะ

- 1.15 ชนิดและศักยภาพของบั่วตัวห้ำในการ..... 2838
ควบคุมเพลี้ยแป้ง.
03-05-59-01-01-00-15-62
- ❖ ประภัสสร เขยคำแหง และคณะ
- 1.16 การคัดเลือกสารสกัดจากพืชบางชนิดเพื่อ.....
ป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้ง (*Phenacoccus* sp.) และเพลี้ยอ่อนฝ้าย
(*Aphis gossypii* Glover) ในพืชฝัก
03-05-59-01-01-00-16-62
- ❖ ยุทธนา แสงโชติ และคณะ
- 1.17 ศักยภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. 679
และ *Beauveria* spp. ในการควบคุมมอดเจาะผลกาแพ
พันธุ์อะราบิก้า (*Hypothenemus hampei*)
03-05-59-01-01-00-17-62
- ❖ ภัทรทิวรา ศาตร์วงศ์ และคณะ
- 1.18 ศึกษาชนิดและประเมินศักยภาพ..... 2842
แมลงศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L.
ในแหล่งปลูกภาคกลาง
03-05-59-01-01-00-18-62
- ❖ วินิภา ชาลีคาร และคณะ
- 1.19 การศึกษาชนิดของแบคทีเรีย *Streptomyces* 698
ที่มีศักยภาพในการกำจัดหอยศัตรูพืช
03-05-59-01-01-00-19-62
- ❖ อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข และคณะ
- 1.20 การคัดเลือกชนิดและศักยภาพของ..... 713
ไส้เดือนฝอยในวงศ์ Rhabditidae ในการกำจัดหอยศัตรูพืช[⊕]
03-05-59-01-01-00-20-63
- ❖ อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข และคณะ
- 1.21 การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราเงินวงค์..... 727
Oscillatoriaceae ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหอยศัตรูพืช[⊕]
03-05-59-01-01-00-21-63
- ❖ ศุภกร วงษ์เรืองพิบูล และคณะ

กิจกรรมที่ 2. สำรองและศึกษาศักยภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.8 การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการ..... 738
ควบคุมเชื้อรา *F.oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริก
03-05-59-01-02-00-07-62
- ❖ มะโนรัตน์ สุตสงวน และคณะ
- 2.9 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย.....
ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดพริกที่เกิดจากแบคทีเรีย
Xanthomonas axonopodis pv. *Vesicatoria*
03-05-59-01-02-00-08-62
- ❖ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ และคณะ
- 2.10 การคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรีย..... 752
Bacillus spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคเน่าคอดิน
(damping-off) และโรคลำต้นเน่า (stem rot) สาเหตุจากเชื้อรา
P. aphanidermatum ในมะเขือเทศ
03-05-59-01-02-00-09-62
- ❖ บุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ
- 2.11 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพ..... 768
เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคราแป้ง (Powdery
mildew) พืชตระกูลแตง
03-05-59-01-02-00-10-62
- ❖ ทศนาพร ทศคร และคณะ
- 2.12 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มี..... 791
ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาว
03-05-59-01-02-00-11-62
- ❖ กาญจนา ศรีไม้

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

กิจกรรมที่ 1. การผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.6 วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงมวนเขียวคุดไข่..... 804
Cyrtorhinus lividipennis Reuter) เป็นปริมาณมาก และการนำไปใช้ควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* (Stål)
03-05-59-02-01-00-06-59
❖ ญัตติ ศิริมาจันทร์ และคณะ
- 1.8 การผลิตและการใช้ไรตัวห้ำ *Amblyseius* spp..... 2921
ควบคุมเพลี้ยไฟ
03-05-59-02-01-00-08-59
❖ อติติยา แก้วประดิษฐ์ และคณะ
- 1.23 การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงแตนเบียนดักด้..... 824
หนอนหัวดำมะพร้าว *Opisina arenosella* Walker
(Lepidoptera: Oecophoridae) ชนิดท้องถิ่นและนำเข้า
03-05-59-02-01-00-23-61
❖ ญัตติ ศิริมาจันทร์ และคณะ
- 1.25 การศึกษาวิธีการนำไปใช้ตัวงเต่า *Cryptolaemus*..... 848
montrouzieri Mulsant ควบคุมเพลี้ยแป้งในมันสำปะหลัง ⊕
03-05-59-02-01-00-25-61
❖ ญัตติ ศิริมาจันทร์ และคณะ
- 1.26 ศึกษาวิธีการผลิตขยายตัวงเต่าสตีธอรัส..... 863
Stethorus pauperculus (Weise)(Coleoptera:
Coccinellidae) และประสิทธิภาพในการควบคุมไรศัตรูพืช
03-05-59-02-01-00-26-61
❖ วีระชัย สมศรี และคณะ
- 1.35 ทดสอบผลของสารป้องกันกำจัดแมลงศัตรู..... 871
มะพร้าวต่อแมลงศัตรูธรรมชาติของหนอนหัวดำมะพร้าว
(*Opisina arenosella* Walker)
03-05-59-02-01-00-35-62
❖ ภัทรทิวา ศาตร์วงศ์ และคณะ
- 1.36 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis*..... 887
(*Xentari*) โดยใช้เครื่องพ่นสารชนิดต่าง ๆ ในการป้องกันกำจัดหนอน
กระทู้หอม *Spodoptera exigua* (Hübner) ในหอมแบ่ง
03-05-59-02-01-00-36-62
❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ

➤ 1.37 การผลิตและการใช้แมลงข้างปีกใส 2851

Chrysoperla carnea(stephens)ควบคุมเพลี้ยอ่อน *Aphis* sp.
ในสตรอเบอร์รี่

03-05-59-02-01-00-37-62

❖ ประภัสสร เขยคำแหง และคณะ

➤ 1.38 การผลิตขยายและการใช้มวนตาโต.....

Geocoris ochropterus Fieber เพื่อควบคุมเพลี้ยอ่อน

03-05-59-02-01-00-38-62

❖ ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ และคณะ

➤ 1.39 ผลของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อการมีชีวิตและ..... 895

ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema*
carpocapsae

03-05-59-02-01-00-39-63

❖ สุวิมล วงศ์พลัง และคณะ

➤ 1.40 ทดสอบประสิทธิภาพในการใช้แบคทีเรียบีที..... 908

ร่วมกับการใช้กับดักฟีโรโมนหนอนใยฝักในการควบคุมหนอนใยฝัก
ในคะน้า

03-05-59-02-01-00-40-63

❖ อนุสรณ์ พงษ์มี และคณะ

➤ 1.41 ศึกษากระบวนการทำแห้งเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม..... 914

ในรูปแบบเชื้อสดอัดเม็ด

03-05-59-02-01-00-41-63

❖ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และคณะ

➤ 1.44 การเพาะเลี้ยงหอยน้ำตัวห้ำสกุล *Clea* 928

เพื่อกำจัดหอยศัตรูพืช

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

❖ ดาราพร รินทะรักษ์ และคณะ

กิจกรรมที่ 2. การผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง

➤ 2.8 การพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* 944

และวิธีการใช้เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากแบคทีเรีย

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

❖ รุ่งนภา ทองเครื่อง และคณะ

➤ 2.9 การพัฒนากระบวนการผลิตสารชีวภัณฑ์..... 959

Bacillus subtilis ไอโซเลท 20W16 และ/หรือ 20W33 เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Colletorichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

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

❖ บุษราคัม อุทมศักดิ์ และคณะ

➤ 2.10 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* แบบผง..... 969

เพื่อควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *Cattleyae*

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

❖ กาญจนา ศรีไม้ และคณะ

➤ 2.11 การพัฒนารูปแบบการผลิตและการใช้สารออกฤทธิ์..... 983

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

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

❖ สุรีย์พร บัวอาจ และคณะ

➤ 2.12 ศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก..... 989

เห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* (Speg.) R.H. Petersen & Krisai ในการควบคุมโรครากเน่า และโคนเน่าของทุเรียนที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler

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

❖ สุรีย์พร บัวอาจ และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยต้นแบบการผลิตชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์

(03-05-62-04)

กิจกรรมที่ -

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง

➤ 1. ต้นแบบผลิตมวลเพาะขนาดอย่างเป็นระบบเพื่อ.....

การควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน

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

❖ สาทิพย์ มาลี และคณะ

- 2. ต้นแบบผลิตแมลงข้างปีกใส่อย่างเป็นระบบเพื่อ..... 2858
การควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน
03-05-62-04-00-00-02-62

❖ ประภัสสร เขยคำแหง และคณะ

- 3. ต้นแบบการผลิตแมลงทางหนีบขางแหวนและ..... 996
แมลงทางหนีบสีน้ำตาลเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน
03-05-62-04-00-00-03-62

❖ นันทนัช พินศรี และคณะ

- 4. ต้นแบบการผลิตขยายมวนพิฆาตเพื่อการควบคุม.....
แมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน
03-05-62-04-00-00-04-63

❖ สาทิพย์ มาลี และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยการผสมผสานเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมศัตรูพืช
(03-05-59-03)

กิจกรรมที่ -

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง

- 2. การสังเคราะห์เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดศัตรูพืช.....
โดยชีววิธีในปาล์มน้ำมัน
03-05-59-03-00-00-02-61

❖ ปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ

- 3. เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี..... 2863
ในกระเจี๊ยบเขียวแบบผสมผสาน
03-05-59-03-00-00-03-62

❖ ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ และคณะ

- 4. เทคโนโลยีการใช้เชื้อเห็ดเรืองแสงสิรินร์คมี..... 1021
Neonothopanus nambi (Speg.) R. H. Petersen & Krisai
ควบคุมโรครากปมในพริก^๑
03-05-59-03-00-00-04-62

❖ สุรีย์พร บัวอาจ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยการทดสอบเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชเพื่อการผลิตพืช
ปลอดภัยโดยเกษตรกรมีส่วนร่วม (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยการทดสอบเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชเพื่อการผลิตพืช
ปลอดภัยโดยเกษตรกรมีส่วนร่วม-

กิจกรรมที่ 4. การทดสอบการใช้ชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชเพื่อการผลิตพืชปลอดภัย
โดยเกษตรกรมีส่วนร่วมในพื้นที่ภาคกลาง

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 4.1 ทดสอบการใช้ชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมในการควบคุม..... 1028
ศัตรูพืชในการผลิตหอมแบ่งในจังหวัดราชบุรี
03-65-63-01-04-00-01-63

❖ อิศเรส เทียนทัต และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับที่มีศักยภาพในเชิงการตลาด

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาปทุมมาและกระเจียวเพื่อการค้า (01-22-59-01)

กิจกรรมที่ 1. การจัดการโรคเหี่ยวของปทุมมาและกระเจียวโดยวิธีผสมผสาน

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.2 การจัดการโรคเหี่ยวของปทุมมาและกระเจียว..... 1035
โดยวิธีผสมผสาน[⊕]
01-22-59-01-01-00-02-61

❖ บุรณี พัววงศ์แพทย์ และคณะ

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

โครงการวิจัย วิจัยการเพิ่มศักยภาพการผลิตน้อยหน้าคุณภาพ

กิจกรรมที่ 1. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้อยหน้า

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.6 ศึกษาประสิทธิภาพและวิธีการใช้สารป้องกันกำจัด..... 1044
โรคพืชที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคกิ่งแห้งของน้อยหน้า[⊕]
02-08-59-02-01-00-06-63

❖ พจนา ตระกูลสุรรัตน์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกล้วย

โครงการวิจัย วิจัยการปรับปรุงพันธุ์กล้วย

กิจกรรม 3. การปรับปรุงพันธุ์กล้วยน้ำว้าด้านทานโรคตายพลาย

กิจกรรมย่อย -

- การทดลอง ➤ 3.2 การคัดเลือกและเปรียบเทียบสายต้นกล้วยน้ำว้า.....
ด้านทานโรคตายพลาย
01-44-59-01-03-00-02-61

❖ อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยการรวบรวมและประเมินโรคและการจัดการการผลิตกล้วยหอมส่งออก
(โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยการรวบรวมและประเมินโรคและการจัดการการผลิตกล้วยหอมส่งออก
(01-177-61-01)

กิจกรรมที่ -

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1. การสำรวจและประเมินสถานการณ์การเกิดโรค.....
ของกล้วยหอมในประเทศไทย
01-177-61-01-00-00-01-61

❖ อภิรักษ์ สมฤทธิ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อใช้เป็นคำแนะนำในการผลิต
พืชบริโภคภายในประเทศและส่งออก (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อใช้เป็นคำแนะนำในการ
ผลิตพืชบริโภคภายในประเทศและส่งออก (03-32-60-01)

กิจกรรมที่ 1. ศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อเป็นคำแนะนำสำหรับ
พืชผักที่มีปัญหาการส่งออกไปสหภาพยุโรป

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.11 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดแมลง..... 1050
หมีขาวยาสูบ, *Bemisia tabaci* (Gennadius) ในมะเขือเปราะ
03-32-60-01-01-00-11-62

❖ สุชาดา สุพรศิลป์ และคณะ

- 1.12 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟฟริก..... 1069
Scirtothrips dorsalis Hood ในฟริก
03-32-60-01-01-00-12-62

❖ สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ

- 1.13 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1087
แมลงหมีขาวยาสูบ, *Bemisia tabaci* (Gennadius) ในกะเพรา
03-32-60-01-01-00-11-62

❖ อูราพร หนูนารถ และคณะ

- 1.14 ศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดวัชพืช..... 1096
ประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอกในผักชีฝรั่ง
03-32-60-01-01-00-11-62

❖ จริญญา ปิ่นสุภา และคณะ

- 1.15 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดหนอนเจาะผล..... 1111
มะเขือ *Leucinodas orbonalis* Guenee ในมะเขือเปราะ
03-32-60-01-01-00-13-63
- ❖ สุชาดา สุพรศิลป์ และคณะ
- 1.16 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืช..... 1115
ในข้าวโพดฝักอ่อนเพื่อการส่งออก
03-32-60-01-01-00-14-63
- ❖ เอกรัตน์ ธนุทอง และคณะ
- กิจกรรมที่ 2. ศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อเป็นคำแนะนำสำหรับพืชผัก
ไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับ และพืชไร่ สำหรับบริโภคภายในประเทศและการส่งออก
- กิจกรรมย่อยที่ -
- การทดลอง
- 2.29 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1133
ด้วงเต่าแตงแดงและหนอนแมลงวันชอนใบในแตงกวา
03-32-60-01-02-00-29-62
- ❖ สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ
- 2.30 ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการ..... 1149
ป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่นฝ้าย *Amrasca biguttula biguttula*
(Ishida) ในกระเจี๊ยบเขียวโดยวิธีรองกันหลุม
03-32-60-01-02-00-30-62
- ❖ สมรวย รวมชัยอภิกุล และคณะ
- 2.31 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก..... 1160
ในกวางตุ้ง
03-32-60-01-02-00-31-62
- ❖ พวงผกา อ่างมณี และคณะ
- 2.32 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภท..... 1171
ก่อนวัชพืชงอกในผักขึ้นฉ่าย
03-32-60-01-02-00-32-62
- ❖ อุษณีย์ จินตาทกุล และคณะ
- 2.33 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1191
โรคใบจุดสีม่วง (purple blotch) ของหอมหัวใหญ่ที่มีสาเหตุจาก
เชื้อรา *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri
03-32-60-01-02-00-33-62
- ❖ ธารทิพย์ ภาสบุตร และคณะ

- 2.34 การทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1207
โรคราสนิทของข้าวโพดหวานสาเหตุจากเชื้อรา *Puccinia polysora* Underw.
03-32-60-01-02-00-34-62
❖ พิระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ
- 2.35 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้ง..... 1219
Pseudococcus cryptus Hempel ในมังคุด
03-32-60-01-02-00-35-62
❖ ศรุต สุทธิอารมณ และคณะ
- 2.37 ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคใบไหม้มันฝรั่ง..... 1228
ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora infestans*
03-32-60-01-02-00-36-62
❖ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ
- 2.39 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรค..... 2874
ต้นเน่าแห้งของกล้วยไม้สาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc.
03-32-60-01-02-00-38-62
❖ สุณิรัตน์ สิมะเตือ และคณะ
- 2.40 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1236
โรคใบไหม้ของหน้าวัวที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*
03-32-60-01-02-00-39-62
❖ บุรณี พัววงษ์แพทย์ และคณะ
- 2.41 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคเน่าดำ..... 1248
ถั่วเขียวสาเหตุจากเชื้อรา *Macrophomina phaseolina*
03-32-60-01-02-00-40-62
❖ อมรรักษ์ าคิดใจเดียว และคณะ
- 2.42 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคราสนิม..... 1259
ของถั่วฝักยาวสาเหตุจากเชื้อ *Uromyces phaseoli* var. *vignae*
03-32-60-01-02-00-46-63
❖ นพพล สัตยาสัย และคณะ

- 2.43 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1269
เพลี้ยไฟฝ้ายในแตงกวา
03-32-60-01-02-00-47-63
❖ สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ
- 2.44 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1276
หนอนชอนใบ *Liriomyza* sp. ในมะเขือเทศ
03-32-60-01-02-00-48-63
❖ นลินา ไชยสิงห์ และคณะ
- 2.46 ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืช..... 1282
ในการป้องกันกำจัดโรคราแป้งองุ่นที่มีสาเหตุจากเชื้อรา
Erysiphe necator Ⓞ
03-32-60-01-02-00-49-63
❖ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ
- 2.47 ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1287
โรคราน้ำค้างขององุ่นสาเหตุจากเชื้อรา *Plasmopara viticola*
(Berk & Curt) Berl & de Toni Ⓞ
03-32-60-01-02-00-50-63
❖ สุรีย์พร บัวอาจ และคณะ
- 2.48 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1294
โรครากปมของฝรั่งที่มีสาเหตุจากไส้เดือนฝอยรากปม
03-32-60-01-02-00-51-63
❖ ธิติยา ขยาภักพัฒนา และคณะ
- 2.49 ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกัน..... 1310
กำจัดหนอนเจาะดอกมะลิในมะลิ
03-32-60-01-02-00-52-63
❖ สมรวย รวมชัยอภิกุล และคณะ
- 2.50 การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1317
โรคพืชบางชนิดในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *Phytophthora*
palmivora สาเหตุโรคเน่าดำในกล้วยไม้ Ⓞ
03-32-60-01-02-00-53-63
❖ บุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ

- 2.51 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคเน่าดำ.....
ของหน้าวัวสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica*
03-32-60-01-02-00-54-63
❖ สุณิรัตน์ สีมะเต็อ และคณะ
- 2.52 การศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภท..... 1324
ก่อนวัชพืชงอกในฝือก*
03-32-60-01-02-00-41-62
❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงษ์ชัย และคณะ
- 2.53 ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 1344
แมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) ในถั่วเหลือง
03-32-60-01-02-00-42-62
❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ
- 2.54 ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1362
หนอนแดงในชมพู
03-32-60-01-02-00-43-62
❖ กรกต ดำรักษ์ และคณะ
- 2.55 ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัด..... 1374
ไรศัตรูพืชในการป้องกันกำจัดไรแดงแอฟริกัน (*Eutetranychus africanus* (Tucker)) ในมะละกอ
03-32-60-01-02-00-44-62
❖ ณพชกร ธไภษัชย์ และคณะ
- 2.56 ประสิทธิภาพของสารเคมีชนิดเม็ดในการ..... 1386
ป้องกันกำจัดโรครากปมของปทุมมา
03-32-60-01-02-00-45-62
❖ ไตรเดช ช่ายทอง และคณะ
- 2.57 ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 1398
หนอนแมลงวันเจาะลำต้นในถั่วเหลือง
03-32-60-01-02-00-55-63
❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ
- 2.58 ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 1409
เพลี้ยไฟในถั่วเขียว
03-32-60-01-02-00-56-63
❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ

- 2.59 ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1418
หนอนแดงในฝรั่ง
03-32-60-01-02-00-57-63
❖ กรกต ดำรักษ์ และคณะ
- 2.60 การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 1422
หนอนซอนใบส้ม; *Phyllocnistis citrella* Stainton ในส้มโอ
03-32-60-01-02-00-58-63
❖ บุชบง มนัสมั่นคง และคณะ
- 2.61 ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 1425
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 การศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชของพืชนำเข้า..... 1433
และส่งออก*
03-04-59-01-01-00-01-59
❖ เกศสุดา สนศิริ และคณะ
- 1.2 การศึกษาชนิดของไรศัตรูพืชของพืชส่งออก..... 1459
และพืชนำเข้า*
03-04-59-01-01-00-02-59
❖ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง และคณะ
- 1.3 การศึกษาชนิดของโรคพืชของพืชส่งออก..... 1471
ได้แก่ กล้าย มะยงชิด ขนุน หล้าสนาม แก้วมังกร และสับปะรด
พืชนำเข้า ได้แก่ เมลอน มะนาว พริก มะเขือ ถั่วเหลือง และแตงกวา
03-04-59-01-01-00-03-59
❖ มะโนรัตน์ สุดสงวน และคณะ

- 1.4 การศึกษาชนิดของวัชพืชของพืชส่งออก..... 1517
ได้แก่ แก้วมะกร และสัปปะรด พืชนำเข้า ได้แก่ ถั่วเหลือง และ
แตงกวา*

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

❖ ธีชญชนก จงรักไทย และคณะ

กิจกรรมที่ 2. ศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.12 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของ..... 1526
ผลพลั้มนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล
03-04-59-01-02-00-12-62

❖ วัลัญญา มาลี และคณะ

- 2.13 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของ..... 1550
ผลท้อสนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล
03-04-59-01-02-00-13-62

❖ ขวลิต จิตนันท์ และคณะ

- 2.14 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของ..... 1584
เมล็ดพันธุ์ฝักชี้นำเข้าจากสาธารณรัฐอิตาลี
03-04-59-01-02-00-14-62

❖ ณีรัฐสุดา บรรเลงสุวรรณค์ และคณะ

- 2.16 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของ..... 1604
เมล็ดพันธุ์ทานตะวันนำเข้าจากสาธารณรัฐอาเจนตินา
03-04-59-01-02-00-16-62

❖ ณีรัฐสุดา บรรเลงสุวรรณค์ และคณะ

กิจกรรมที่ 3. การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าสินค้าเกษตร

- การทดลอง ➤ 3.3 การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้า.....
เมล็ดพันธุ์มะละกอกจากไต้หวัน
03-04-59-01-03-00-04-63

❖ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และคณะ

- 3.5 การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้า..... 1617
เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากสหรัฐอเมริกา
03-04-59-01-03-00-05-63

❖ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และคณะ

1631

➤ 3.6 การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้า.....

เมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากมาเลเซีย

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

❖ วาสนา ฤทธิ์ไธสง และคณะ

➤ 3.7 การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้า..... 1640

ผลทับทิมสดจากรัฐอิสราเอล

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

❖ อลงกต โพธิ์ดี และคณะ

กิจกรรมที่ 4. ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อการเปิดตลาดสินค้าเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 4.4 ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออก..... 1647

เมล็ดพันธุ์แตงโม

03-04-59-01-04-00-04-62

❖ คมศร แสงจินดา และคณะ

➤ 4.5 ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออก..... 1656

เมล็ดพันธุ์มะระ

03-04-59-01-04-00-05-62

❖ วาสนา ฤทธิ์ไธสง และคณะ

➤ 4.6 ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออกผลมะยงชิด..... 1672

03-04-59-01-04-00-06-62

❖ ณีภรณ์พร อุทัยมงคล

➤ 4.7 ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออก..... 1725

เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

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

❖ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และคณะ

➤ 4.8 ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออกผลขนุน.....

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

❖ วรัญญา มาลี และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยการศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า (03-04-59-02)

กิจกรรมที่ 1. ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชและส่วนของพืชนำเข้าเพื่อขยายพันธุ์

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง
- 1.2 ชนิดศัตรูพืชที่ชุกกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์แดงโม..... 1741
นำเข้าจาก ซิลี และ ฟิปปินส์*
03-04-59-02-01-00-02-59
 - ❖ วันเพ็ญ ศรีชาติ และคณะ
 - 1.3 ชนิดศัตรูพืชที่ชุกกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์เมลอน..... 1756
นำเข้าจากซิลี และ เนเธอร์แลนด์*
03-04-59-02-01-00-03-59
 - ❖ วันเพ็ญ ศรีชาติ และคณะ
 - 1.10 ชนิดศัตรูพืชที่ชุกกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี..... 1769
นำเข้าจากนิวซีแลนด์ และญี่ปุ่น
03-04-59-02-01-00-12-63
 - ❖ โสภา มีอำนาจ และคณะ
 - 1.11 ชนิดศัตรูพืชที่ชุกกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ผักชี..... 1785
นำเข้าจากอิตาลี และสหรัฐอเมริกา
03-04-59-02-01-00-13-63
 - ❖ วานิช คำพานิช และคณะ
 - 1.12 ชนิดศัตรูพืชที่ชุกกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์คะน้า..... 1797
นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน และประเทศนิวซีแลนด์
03-04-59-02-01-00-14-63
 - ❖ พรรณิภา เปชัยศรี และคณะ
 - 1.13 ชนิดศัตรูพืชที่ชุกกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์..... 1806
ผักกาดกวาดต้งนำเข้าจากประเทศนิวซีแลนด์ และสาธารณรัฐ
ประชาชนจีน
03-04-59-02-01-00-10-62
 - ❖ จันทรพิศ เดชหามาตย์ และคณะ
 - 1.14 การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในเมล็ดพันธุ์.....
มะเขือเทศนำเข้า
03-04-59-02-01-00-11-62
 - ❖ วาสนา รุ่งสว่าง และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดศัตรูพืชกักกันของพืชส่งออก (03-04-59-03)

กิจกรรมที่ 1. วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยวิธีการอบไอน้ำเพื่อการส่งออก

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.5 วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน..... 1819
สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera latifrons* (Hendel) ใน
ส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวาเพื่อการส่งออก
03-04-59-03-01-00-05-62
❖ พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์ และคณะ
- 1.6 วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน..... 1856
สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลมะนาวแป้นพิจิตร 1 เพื่อการส่งออก ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อ
การตายของไข่แมลงวันทองในผลมะนาวที่ผ่านการอบไอน้ำ
(เปรียบเทียบระหว่างมะนาวแป้น กับมะนาวพิจิตร1) ^๑
03-04-59-03-01-00-06-62
❖ สลักจิต พานคำ และคณะ
- 1.7 วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน..... 1878
เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามเพื่อการส่งออก ^๑
03-04-59-03-01-00-07-62
❖ ชัยณรงค์ สนศิริ และคณะ
- 1.8 วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน..... 1921
สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์เพื่อการส่งออก
03-04-59-03-01-00-08-62
❖ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ และคณะ
- 1.9 วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน..... 1942
สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลแก้วมังกรเนื้อแดงเพื่อการส่งออก
03-04-59-03-01-00-09-62
❖ ปวีณา บุษาทิยาน และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยการศึกษาศาสนภาพศัตรูพืชที่ชุกักกันในประเทศไทย (03-04-59-04)

กิจกรรมที่ 1. การศึกษาศัตรูพืชในประเทศเพื่อการค้าระหว่างประเทศ

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 11. ศัตรูสาสนภาพเชื้อไวรัส *Sri Lankan Cassava*..... 1961
Mosaic Virus ในประเทศไทย^๑
03-04-59-04-01-00-11-61
❖ ภูวนารถ มณีโชติ และคณะ
- 12. การศึกษาศาสนภาพของรา *Bipolaris zeicola* 1984
(G.L. Stout) Shoemaker สาเหตุโรค Northern Corn Leaf Spot ไปประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-12-62
❖ ชนินทร ดวงสอด และคณะ
- 13. การศึกษาศาสนภาพของเชื้อแบคทีเรีย..... 1997
Burkholderia glumae สาเหตุโรค Bacterial Panicle Blight ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-13-62
❖ ณีภูริมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ
- 14. การศึกษาศาสนภาพแบคทีเรีย..... 2003
Pseudomonas syringae pv. *tomato* สาเหตุโรค Bacterial speck ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-14-62
❖ ชลธิชา รักใคร่ และคณะ
- 15. การศึกษาศาสนภาพเชื้อไวรัส.....
Maize Dwarf Mosaic Virus ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-15-62
❖ สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ
- 16. การศึกษาศาสนภาพของเชื้อไวรัส.....
Pepper Mild Mottle Virus ของพริก
03-04-59-04-01-00-16-62
❖ เยาวภา ตันติวานิช และคณะ

- 17. การศึกษาสถานภาพของเชื้อไวรัส.....
African Cassava Mosaic Virus (ACMV) ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-17-62
❖ กาญจนา วาระวิชนี และคณะ
- 18. การศึกษาสถานภาพของแบคทีเรีย *Xylella fastidiosa*..... 2011
ของงุ่นในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-18-62
❖ อิตาวรรณ ชมเดช และคณะ
- 19. การศึกษาสถานภาพด้วงฟูเรอโรส..... 2021
Pantomorus cervinus (Boheman) ของพืชตระกูลส้มใน
ประเทศไทย^๑
03-04-59-04-01-00-19-62
❖ ดนัย ชัยเรือนแก้ว และคณะ
- 20. การศึกษาสถานภาพเพลี้ยหอย..... 2029
Aspidiotus nerii Bouché ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-20-62
❖ ดนัย ชัยเรือนแก้ว และคณะ
- 21. การศึกษาสถานภาพวัชพืช *Chenopodium album* L..... 2038
ของพืชผักในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-21-62
❖ ชุตินา อ้อมกิ่ง และคณะ
- 22. การศึกษาสถานภาพของไส้เดือนฝอยรากปม..... 2046
Meloidogyne thailandica ในเชิงของประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-22-62
❖ อติยา ชยาภักพัฒนา และคณะ
- 23. การศึกษาสถานภาพแบคทีเรีย..... 2054
Pseudomonas fuscovaginae สาเหตุโรค brown sheath rot
ของข้าวในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-23-63
❖ ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล และคณะ

- 24. การศึกษาสถานภาพของเชื้อไวรัส Lettuce mosaic virus..
สาเหตุโรคใบต่างผักกาดหอมในประเทศไทย
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 ➤ 1.1.12 ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae)..... 2060
ในพืชผัก (วงศ์แตง กะหล่ำ พริก มะเขือ และถั่ว) ของประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-12-61

❖ เกศสุตา สนศิริ และคณะ

- 1.1.13 อนุกรมวิธานมวนสกุล *Nysius* 2078
(Hemiptera: Lygaeidae) ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-13-61

❖ จอมสุรางค์ ดวงอิสาร และคณะ

- 1.1.14 อนุกรมวิธานและการศึกษาชนิดของตั๊กแตน..... 2089
(Orthoptera) ในพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-14-61

❖ จารุวัฒน์ แตกกุล และคณะ

- 1.1.15 อนุกรมวิธานของผีเสื้อหนอนอร่าน..... 2129
วงศ์ Limacodidae ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-15-61

❖ อาทิตย์ รักกสิกร และคณะ

- 1.1.16 ชนิดของแมลงหิวขาในพืชผักสวนครัว..... 2195
เพื่อการส่งออกของประเทศไทย^๑
03-30-60-01-01-01-16-62

❖ สุนัดดา เขาวลิต และคณะ

- 1.1.17 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ด..... 2210
วงศ์ย่อย Diaspidinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae)
ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-17-62
❖ ชมัยพร บัวมาศ และคณะ
- 1.1.18 อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้งในราก 2218
วงศ์ Rhizoecidae (Hemiptera: Coccoidea) ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-18-62
❖ ชมัยพร บัวมาศ และคณะ
- 1.1.19 อนุกรมวิธานและความหลากหลายชนิดของ 2226
แตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวนวงศ์ Pentatomidae ศัตรูพืช
สำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย
03-30-60-01-01-19-62
❖ จารุวัฒน์ แตกกุล และคณะ
- 1.1.20 อนุกรมวิธานของแมลงช้างสีน้ำตาลวงศ์.....
Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแข็ง วงศ์ Coniopterygidae
ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-20-62
❖ อาทิตย์ รักกสิกร และคณะ
- 1.1.21 อนุกรมวิธานไรขา วงศ์ Tarsonemidae 2239
ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-21-62
❖ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง และคณะ
- 1.1.22 การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง..... 2257
ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
03-30-60-01-01-22-62
❖ พัชรวิพรรณ จงจิตเมตต์ และคณะ
- 1.1.23 อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัยของ..... 2268
แมลงวันหนอนขนอนใบในวงศ์ Agromyzidae (Order : Diptera)
ในพืชผัก
03-30-60-01-01-23-62
❖ ยุวรินทร์ บุญทบ และคณะ

- 1.1.24 อนุกรมวิธานแมงมุม วงศ์ Oxyopidae..... 2277
03-30-60-01-01-01-24-63

❖ วิลมวรรณ โชติวงศ์ และคณะ

**กิจกรรมย่อยที่ 1.2 สำนวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและ
จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช**

- การทดลอง ➤ 1.2.11 ศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา..... 2284
Colletotrichum spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก
03-30-60-01-01-02-11-61

❖ ธารทิพย์ ภาสบุตร และคณะ

- 1.2.12 การตรวจวินิจฉัยและจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุโรค.....
ของชวนชม (*Adenium obesum*)
03-30-60-01-01-02-12-62

❖ เยาวภา ตันติวานิช และคณะ

- 1.2.13 อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของ..... 2301
เชื้อรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช[⊕]
03-30-60-01-01-02-13-63

❖ ชนินทร ดวงสอด และคณะ

- 1.2.14 อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของราสนิม..... 2319
วงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืช[⊕]
03-30-60-01-01-02-14-63

❖ ชนินทร ดวงสอด และคณะ

- 1.2.15 จัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอย..... 2331
สกุล Radopholus ทางชีวโมเลกุล
03-30-60-01-01-02-15-63

❖ ธิติยา ชยาภักพัฒนา และคณะ

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

❖ เยาวภา ตันติวานิช และคณะ

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

กิจกรรมย่อยที่ 2.1 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืช

- การทดลอง ➤ 2.1.8 ศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด..... 2341
Bactrocera umbrosa (Fabricius)
03-30-60-01-02-01-08-62
❖ กรกต ดำรัักษ์ และคณะ
- 2.1.9 ศึกษาชนิด ชีววิทยา และการแพร่กระจาย..... 2363
เชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella*
03-30-60-01-02-01-09-62
❖ อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข และคณะ
- 2.1.10 สันฐานวิทยาและชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนตัว. *Aphis*..... 2371
craccivora Koch (Hemiptera: Aphididae) ในประเทศไทย
03-30-60-01-02-01-10-63
❖ เกศสุตา สนศิริ และคณะ
- กิจกรรมย่อยที่ 2.2 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของโรคพืช**
- การทดลอง ➤ 2.2.6 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา..... 2380
Neoscytalidium dimidiatum Crous & Slippers and
Gruyter[⊕]
03-30-60-01-02-02-06-61
❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
- 2.2.7 การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและชีวโมเลกุล..... 2411
ของเชื้อ *Pepper vein yellows virus (PeVYV)* ที่เข้าทำลายพริก
ในประเทศไทย
03-30-60-01-02-02-07-62
❖ ภูวนารถ มณีโชติ และคณะ
- 2.2.8 การจำแนกชนิดเชื้อ *Crinivirus* ของพืชตระกูลแตง..... 2425
ในประเทศไทย
03-30-60-01-02-02-08-62
❖ ภูวนารถ มณีโชติ และคณะ
- กิจกรรมย่อยที่ 2.3 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืช**
- การทดลอง ➤ 2.3.5 ชีววิทยาของเทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia*..... 2436
(G. Don) Excell.)
03-30-60-01-02-03-05-63
❖ ธัญชนก จงรักไทย และคณะ

กิจกรรมที่ 3. การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

กิจกรรมย่อยที่ -

- 3.9 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา..... 2444
Trichoderma asperellum *T. harzianum* และ *T. viride*
03-30-60-01-03-00-09-60
- ❖ ชนิทร ดวงสอาด และคณะ
- 3.11 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนก..... 2483
ชนิดเพี้ยไฟอ้นตับย้อย Tubulifera (Thysanoptera:
Tubulifera) ในประเทศไทย
03-30-60-01-03-00-11-61
- ❖ อิทธิพล บรรณาการ และคณะ
- 3.12 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา..... 2504
Chaetomium cupreum และ *Ch. globosum*
03-30-60-01-03-00-12-61
- ❖ ชนิทร ดวงสอาด และคณะ
- 3.13 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกแมงมุม..... 2937
วงศ์ Salticidae
03-30-60-01-03-00-13-61
- ❖ วิมลวรรณ โชติวงศ์ และคณะ
- 3.14 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Curvularia* 2538
สาเหตุโรคพืช
03-30-60-01-03-00-14-62
- ❖ มะโนรัตน์ สุดสงวน และคณะ
- 3.15 การศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini..... 2566
(Diptera: Tephritidae) ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
03-30-60-01-03-00-15-62
- ❖ ยวรินทร์ บุญทบ และคณะ
- 3.16 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด และชนิดของ..... 2577
เพี้ยไฟวงศ์ Thripidae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบใน
หน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย
03-30-60-01-03-00-16-63
- ❖ อิทธิพล บรรณาการ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยการศึกษาและการจัดการพืชต่างถิ่นที่รุกรานในนิเวศเกษตร
(โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยการศึกษาและการจัดการพืชต่างถิ่นที่รุกรานในนิเวศเกษตร (03-27-60-01)

กิจกรรมที่ -

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 6. การจัดการวัชพืชประเภทใบกว้าง..... 2587
หญ้ายางงนุช (*Euphorbia graminea* Jacq.) หญ้าอดหนอน
(*Spigelia anthelmia* L.) และเอื้องชมพู (*Persicaria capitata*
(Buch.- Ham. ex D.Don) ⊕
03-27-60-01-00-00-06-62
❖ ธีญชนก จงรักไทย และคณะ
- 7. การจัดการกรกระจุก (*Cyperus entrianus* Boeckl.)..... 2615
03-27-60-01-00-00-07-62
❖ เอกรัตน์ ธนุทอง และคณะ
- 8. ชีววิทยาและการจัดการมะเขือหนาม 2637
(*Solanum sisymbriifolium* Lam.) ⊕
03-27-60-01-00-00-08-62
❖ อัญศยา พรมา และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vector) ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญกับพืช
เศรษฐกิจในประเทศไทย (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vector) ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญกับ
พืชเศรษฐกิจในประเทศไทย (03-47-61-01)

กิจกรรมที่ -

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1. ชีวชนิด (biotype) ของแมลงหริ้วขาวยาสูบ..... 2659
Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera:Aleyrobiae) ที่เป็น
พาหะของโรคใบหงิกเหลืองในพริก (Pepper Yellow Leafcurl
Virus) ในภาคตะวันตกของประเทศไทย ⊕
03-47-61-01-00-00-01-61
❖ สุนัดดา เชาวลิต และคณะ

- 2. ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) 2681
ที่เป็นพาหะของเชื้อ *Polerovirus* สาเหตุโรคเส้นใบเหลืองในพริก
และ ใบเหลืองแตงกวา
03-47-61-01-00-00-02-61

❖ เกศสุตา สนศิริ และคณะ

- 4. ชนิดของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *Diaphorina citri* 2703
(Hemiptera: Psyllidae) และการเป็นพาหะนำโรคกรีนนิง
(Huanglongbin) (Citrus greening disease) ของพืชตระกูลส้ม
ในประเทศไทย*
03-47-61-01-00-00-04-61

❖ จอมสุรางค์ ดวงธิดา และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล
โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและ
ชีวโมเลกุลเพื่อนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร (03-31-60-01)

กิจกรรมที่ 1. การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อนำเข้าสินค้าเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.4 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* 2733
ในข้าวด้วยเทคนิค Real time PCR
03-31-60-01-01-00-04-62

❖ ทิพวรรณ กันหาญาติ และคณะ

- 1.5 พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย..... 2740
Ralstonia solanacearum species complex สาเหตุโรคเหี่ยว
ของกล้วย*
03-31-60-01-01-00-05-62

❖ ทิพวรรณ กันหาญาติ และคณะ

- 1.6 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย..... 2746
Pseudomonas fuscovaginae ในข้าวด้วยเทคนิค LAMP
(Loop-Mediated Isothermal Amplification)
03-31-60-01-01-00-06-63

❖ ณิชฎิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ

กิจกรรมที่ 2. การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อ
การป้องกันกำจัด และการส่งออก

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.6 การตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum* 2753
ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction *
03-31-60-01-02-00-06-61
- ❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
- 2.9 ผลិតชุดตรวจสอบ GLIFT Kit
(Gold Labeling IgG Flow Test) จากแอนติบอดีของโปรตีน
ลูกผสม SecA ต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย
03-31-60-01-02-00-09-61
- ❖ กาญจนา วาระวิษณี และคณะ
- 2.10 การพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซ่า.....
ของพืชตระกูลส้ม
03-31-60-01-02-00-10-61
- ❖ แสนชัย คำหล้า และคณะ
- 2.11 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบแมลงวันแดง 2773
Zeugodacus cucurbitae (Coquillet) (Diptera: Tephritidae)
ด้วยไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง*
03-31-60-01-02-00-11-61
- ❖ ยุวรินทร์ บุญทบ และคณะ
- 2.12 การผลิตโปรตีนและแอนติบอดีที่จำเพาะ.....
ต่อ immunodominant Membrane protein (Imp) ของเชื้อไฟ
โตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย
ในประเทศไทย
03-31-60-01-02-00-12-62
- ❖ กาญจนา วาระวิษณี และคณะ
- 2.13 การตรวจสอบแบคทีเรีย..... 2792
Xanthomonas campestris pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ด
ด้วยเทคนิค Real-time PCR
03-31-60-01-02-00-13-62
- ❖ รุ่งนภา ทองเคิ่ง และคณะ
- 2.14 การตรวจไส้เดือนฝอยรากปม..... 2803
Meloidogyne enterolobii ด้วยเทคนิคแลมป์
03-31-60-01-02-00-14-6
- ❖ ไตรเดช ช่างทอง และคณะ

➤ 2.15 การพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง..... 2985

Bactrocera correcta (Diptera: Tephritidae) เพื่อการนำเข้า
และส่งออกด้วยไฟร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง

03-31-60-01-02-00-15-62

❖ ยูวรินทร์ บุญทบ และคณะ

➤ 2.16 การทดสอบเทคนิค multiplex PCR 2816

ในการตรวจไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* และ
M. Enterolobii

03-31-60-01-02-00-16-63

❖ ไตรเดช ข่ายทอง และคณะ

➤ 2.17 การผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip.....

เพื่อตรวจสอบไวรัส Leek yellow stripe virus (LYSV)

03-31-60-01-02-00-17-63

❖ สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ

หมายเหตุ

⊕ ชื่อการทดลองที่นักวิจัยแจ้งไม่ตรงกับชื่อการทดลองจากกองแผนงาน

ชนิดของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทย
Species of Whitefly in backyard garden for export in Thailand

สุนัดดา เขาวลิต อธิธิพล บรรณาการ เกศสุดา สนศิริ
สิทธิศิริโรตม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

แมลงหวี่ขาวเป็นหนึ่งในแมลงศัตรูพืชที่ได้รับการแจ้งเตือนจากสหภาพยุโรป ว่ามีการปนเปื้อนไปกับผักสดที่ส่งไปยังสหภาพยุโรปเสมอ ทั้งยังเป็นจัดเป็นศัตรูพืชสำคัญทางเศรษฐกิจสร้างความเสียหายให้ประเทศไทยและเกษตรกรและผู้ส่งออกพืชผักสวนครัวของไทยได้เป็นอย่างมาก การศึกษาค้นคว้าทำให้ทราบชนิด และเขตการแพร่กระจายของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัว เพื่อแก้ไขปัญหาค้นคว้าการปนเปื้อนไปกับพืชส่งออก และการจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชผักของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวทั่วทุกภาคของประเทศไทย รวมทั้งใช้ตัวอย่างเดิมที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2563 จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาระยะดักแด้แมลงหวี่ขาว สามารถจำแนกได้ 2 ชนิด ได้แก่ 1) แมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) 2) แมลงหวี่ขาวไยเกลียว *Aleurodicus dispersus* Russell ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาค้นคว้านี้ เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อเตรียมจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย

คำสำคัญ : แมลงหวี่ขาว พืชผักสวนครัว ส่งออก

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-16-62

คำนำ

แมลงหรีขาว (whitefly) เป็นแมลงศัตรูพืชขนาดเล็กที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในอันดับ Hemiptera อันดับย่อย Sternorrhyncha วงศ์ Aleyrodidae ทั่วโลกมีการรายงาน ชนิดของแมลงหรีขาวที่จำแนกไว้แล้วจำนวน 166 สกุล 1,556 ชนิด (Martin, 2007) พบแพร่กระจาย ทั่วโลกและพบได้มากในประเทศเขตร้อนและกึ่งร้อน สำหรับประเทศไทย Mound and Halsey (1978) ได้รายงานชนิดแมลงหรีขาวที่เป็นศัตรูพืชมีไม่น้อยกว่า 50 ชนิด Hutachareon *et al.* (2007) รวบรวม รายชื่อแมลงหรีขาวที่พบในประเทศไทยมีจำนวน 93 ชนิด สมชัย (2550) รายงานชนิดแมลงหรีขาว ศัตรูพืชในประเทศไทยไว้ 9 ชนิด โดยทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพืชแล้วถ่ายมูล เหนียวที่เป็นน้ำหวานออกมาตามส่วนต่าง ๆ ของพืชที่อาศัย ซึ่งมูลเหนียวนี้เป็นอาหารของรา ทำให้ ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง แมลงหรีขาวชนิดที่เป็นศัตรูพืชสำคัญได้แก่ แมลงหรีขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) มีการระบาดรุนแรงและแพร่กระจายอย่างรวดเร็วไปทั่วโลก (De Barro, 1995) อาศัยอยู่กับพืชหลายชนิด (polyphagous) เช่น พืชวงศ์มะเขือ พืชวงศ์ถั่ว พืชวงศ์ แดง กระเพรา โหระพา แมงลัก ผักชีฝรั่ง ฝ้าย มันสำปะหลัง และพืชสวนประดับอีกจำนวนมาก (Byrne *et al.*, 1990) วรรณิการ์และคณะ (2554) รายงานว่าแมลงหรีขาวยาสูบเป็นศัตรูสำคัญของผักชีฝรั่ง (*Eryngium foetidum* L.) สุนัดตาและคณะ (2556) รายงานว่าแมลงหรีขาวยาสูบเป็นศัตรูสำคัญของ กะเพรา โหระพา ผักชีฝรั่ง กุหลาบ มะเขือเปราะ ยาสูบ มันฝรั่ง ฝ้าย และพืชตระกูลถั่ว แมลงหรีขาวไย เกลียว *Aleurodicus disperses* Russell พบมีพืชอาหารมากกว่า 43 ชนิด และได้รายงานในพืชผัก สวนครัว ได้แก่ พืชวงศ์แตง วงศ์ถั่ว กระเจี๊ยบ ชะพลู ตำลึง แตงกวาถั่วฝักยาว ถั่วพู พริก มะเขือ มะเขือ ม่วง CPC (2007) รายงาน ว่าแมลงหรีขาวไยเกลียว เป็นศัตรูสำคัญของ กระเจี๊ยบ ถั่วลิสง พืชตระกูล กะหล่ำ ถั่วมะแฮะ พริกหยวก พืชวงศ์แตง พืชตระกูลถั่ว และพืชวงศ์ แมี่ยมอาหารขาดแคลนแมลงหรี ขาวยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ แมลงหรีขาวยาสูบ มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในทวีปแอฟริกา ยุโรป และอเมริกา ซึ่งคาดว่าเกิดจากการติดไปกับสินค้าเกษตร (Cock, 1986) แมลงหรีขาวสามารถ ขยายพันธุ์ได้ 11-15 รุ่นต่อปีภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (Avidov, 1956) และเพศเมียหนึ่งตัว สามารถวางไข่ได้ 100-300 ฟอง ตลอดวงจรชีวิตจะอยู่ได้ประมาณ 3-6 สัปดาห์ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ แมลงหรีขาวสามารถเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว (Azab *et al.*, 1971; Bethke *et al.*, 1991) ปัญหาการระบาดของแมลงหรีขาวยาสูบจึงมีรายงานอย่างต่อเนื่อง

แมลงหรีขาวนอกจากเป็นแมลงศัตรูพืชแล้วยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ หลายชนิด เช่น *Begomovirus Geminivirus Carlavirus Nepovirus Potyvirus* และ *Closterovirus* (Byrne *et al.*, 1990) แมลงหรีขาวยาสูบนี้มีความซับซ้อนทางพันธุกรรมสูง (species complex) ดังจะ เห็นได้จากในยุคแรกมีการจำแนกแมลงหรีขาวยาสูบ ออกเป็น 18 ชนิดด้วยกัน โดยใช้ความเพียง แตกต่างของรูปร่างลักษณะของดักแด้ที่สำรวจได้จากพืชอาหารต่างชนิดกัน ซึ่งการจำแนกในลักษณะ ดังกล่าวมีข้อจำกัดอยู่มากเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับการ ปรับตัวของแมลงหรีขาวให้มีความเฉพาะเจาะจงกับพืชอาหารหรือสภาพแวดล้อม (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) แสดงให้เห็นว่าแมลงหวี่ขาวชนิดนี้ยากที่จะใช้เพียง ลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนกในระดับ species และ biotype ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงหวี่ขาวมีผลต่อความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ต่างกันด้วย (Bedford *et al.*, 1992, 1994) ตัวอย่างเช่นพบว่าแมลงหวี่ขาวยาสูบเป็นพาหะของเชื้อไวรัสใบหด (tobacco leaf curl virus) ซึ่งเป็นโรคสำคัญของยาสูบเป็นศัตรูพืชของแมลงหวี่ขาว (สิริวัฒน์, 2526; Ohno, 1992; ปิยรัตน์และคณะ, 2542; สมศักดิ์และคณะ, 2554)

การศึกษานุกรมวิธานและชีววิทยาของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออก จะทำให้ประเทศไทยมีฐานข้อมูลแมลงหวี่ขาวศัตรูพืชผักสวนครัว ซึ่งเป็นข้อมูลประกอบในการปรับปรุงกระบวนการผลิตสินค้าให้ได้คุณภาพตามมาตรฐานปราศจากการปนเปื้อนของแมลงศัตรูพืช เป็นที่ยอมรับของสหภาพยุโรปและประเทศคู่ค้าอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นการเตรียมความพร้อมในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย เพื่อนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการนำเข้าและส่งออกผลผลิตทางการเกษตร รองรับการเปิดเสรีทางการค้าระหว่างประเทศสมาชิกประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (AEC) ที่จะเกิดขึ้นในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) ตัวอย่างแมลงหวี่ขาว ที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชผักสวนครัว ทั่วทุกภาคของประเทศไทย
- 2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดองแมลงซึ่งบรรจุแอลกอฮอล์ 80% ปากคีบ พู่กัน กล้องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถังรักษาความเย็น และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
- 3) อุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ potassium hydroxide 10 %, alcohol 70-95 %, acetic acid glacial, 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) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของแมลงหวี่ขาววิธีปฏิบัติการทดลอง

วิธีการ

- 1) กำหนดพื้นที่การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหวี่ขาวจากแหล่งปลูกพืชผักสวนครัว (5 กลุ่ม 16 ชนิด ได้แก่ กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หระ พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกชี้หนู มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขึ้น มะระจีน มะระขี้นก และผักชีฝรั่ง) รวมถึงพืชผัก

สวนครัวชนิดอื่นที่มีศักยภาพในการส่งออก ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยแบ่งขอบเขตการสำรวจตามภูมิภาคของประเทศไทย ดังนี้

ปีที่ 1 เก็บรวบรวมตัวอย่าง จากภาคเหนือและภาคกลาง

ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน พะเยา แพร่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ลำพูน อุตรดิตถ์

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

ปีที่ 2 เก็บรวบรวมตัวอย่าง จากภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ตราด ปราจีนบุรี ระยอง สระแก้ว

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด ขอนแก่น นครพนม นครราชสีมา สกลนคร สุรินทร์ ศรีสะเกษ หนองคาย อุตรธานี อุบลราชธานี

ปีที่ 3 เก็บรวบรวมตัวอย่าง จากภาคใต้และภาคตะตง

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดกระบี่ ชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ภูเก็ต ธารนง สงขลา สุราษฎร์ธานี

ภาคตะตง ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ราชบุรี

2) เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหิวข้าว ระยะตัวอ่อน ดักด้ หรือตัวเต็มวัยจากใบพืช นำตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้พร้อมพืชอาศัยห่อกระดาษแล้วนำไปใส่ถุงพลาสติก กล่องพลาสติก หรือถุงสีน้ำตาลเพื่อรักษาความชื้นของพืช หากตัวอย่างแมลงหิวข้าวที่รวบรวมได้อยู่ในระยะตัวอ่อน ต้องนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นดักด้ บันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่ พักัก ภูมิศาสตร์ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง

3) นำตัวอย่างดักด้และตัวเต็มวัยแมลงหิวข้าวที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจลักษณะภายนอก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพแมลงหิวข้าวแต่ละระยะ

4) นำตัวอย่างดักด้ที่สำรวจได้ บางส่วนมาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Martin (1987) โดยตัดชิ้นส่วนของพืชเฉพาะที่มีดักด้ติดอยู่ แช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ที่ 24 ชั่วโมง หรือแช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 20 นาที จะช่วยให้แยกดักด้ออกจากพืชอาศัยได้ง่าย โดยไม่ทำให้ตัวอย่างเสียหาย (ขั้นตอนนี้ระวังไม่ให้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เดือดเพราะจะทำให้ผนังลำตัวของดักด้ฉีกขาดได้) ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมกรดกลูเซิลอะซิติก แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วดูดกรดกลูเซิลอะซิติกออก เติมสารละลายคลอโรล-ฟีนอล (chloral-phenol) แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาทีเช่นกัน แล้วดูดสารผสมนี้ออก วิธีนี้นอกจากจะช่วยกำจัดคราบไขมันที่หุ้มดักด้แล้ว ยังช่วยในการย้อมสีทำให้ตัวอย่างติดสีได้ดีขึ้น การย้อมสีแมลงหิวข้าวปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

- ดักด้ที่มีสีเข้มหรือสีดำ ให้ล้างตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ 95% แล้วย้ายตัวอย่างลงในสารละลายที่เป็นส่วนผสมของแอมโมเนีย (Ammonia) กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ในอัตราส่วน 80: 20 โดยปริมาตร แช่ทิ้งไว้ 2- 3 นาที สารละลายนี้จะช่วยทำให้ตัวอย่างที่มีสีเข้มใสขึ้น

- ดักแต่ที่มีสีจางหรือสีซีด ให้ล้างตัวอย่างด้วยกรดกลีเซอริก ย้ายตัวอย่างลงในสารละลายแอซิกฟลูออโรซินสเทน ใช้เพียง 2-3 หยดเพื่อย้อมสีตัวอย่าง แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที ดูดสารละลายหรือสีออกมา ล้างด้วยกรดกลีเซอริก และแช่ในกรดกลีเซอริก ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วดูดสารละลายนี้ออก เติมโคลฟอยหรือไซลีน แช่ทิ้งไว้ 2-3 นาที เม้าท์ตัวอย่างบนแผ่นสไลด์ แล้วนำไปอบให้แห้งใช้เวลา 5 สัปดาห์

5) นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งแล้วมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดได้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound ตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของแมลงหริวตามแนวทางการวินิจฉัยของ Martin (1987) Martin และคณะ (2007) Mound และคณะ (1978) ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกชนิดได้แก่ ขนและหนาม (setae & spine) ขอบลำตัว (margin) อวัยวะที่ใช้ในการขับไซ เช่น ช่องเปิดชนิดต่างๆ (pores) vesiform orifice lingula และ operculum เป็นต้น

6) บันทึกรายละเอียดของแมลงหริวชนิดต่างๆที่สำรวจพบ และข้อมูลอื่นที่สำคัญ ถ่ายภาพได้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์แมลงหริวแต่ละตัวได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เม้าท์ (mount) สไลด์

7) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา โดยนำตัวอย่างแมลงหริวพร้อมตัวอย่างพืชที่มีดักแต่เกาะอยู่และสไลด์ถาวรที่ทำเสร็จแล้ว เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

- การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลชนิดของแมลงหริว ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิด
2. ข้อมูลพืชอาหาร
3. ข้อมูลเขตการแพร่กระจาย

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถานที่

- แหล่งปลูกพืชทั้งพื้นที่เกษตรและพื้นที่ป่า โดยเน้นพื้นที่เกษตรซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของผีเสื้อกลางคืนในวงศ์ย่อยนี้ ได้แก่ ข้าวโพด อ้อย ข้าว ทั่วทุกภาคของประเทศไทย

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปี 2562

ได้ตัวอย่างแมลงหริวในพืชผักสวนครัวในภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดจังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ น่าน พะเยาแพร่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ลำพูน อุตรดิตถ์ นครปฐม นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท พิจิตร เพชรบูรณ์ สุโขทัย อ่างทอง และอุทัยธานี

จำนวน 406 ตัวอย่าง และสามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) จำนวน 371 ตัวอย่าง และ *Aleurodicus disperses* Russell, 1965 จำนวน 35 ตัวอย่าง ปี 2563

เก็บตัวอย่างแมลงหริ่ขาวในพืชผักสวนครัว (พริก โหระพา มะเขือ ผักชีฝรั่ง) ในภาคตะวันออก และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำตัวอย่างแมลงหริ่ขาวมาทำสไลด์ ได้ 317 สไลด์ (ตารางที่ 1) จำแนกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ *Bemisia tabaci* ในพริก กะเพรา โหระพา มะเขือ ผักแพว และผักชีฝรั่ง จำนวน 211 ตัวอย่าง และ *Aleurodicus disperses* ในพริก มะเขือ จำนวน 106 ตัวอย่าง

แมลงหริ่ขาวยาสูบ

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

ชื่ออื่น -

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889)

(Hemiptera: Aleyrodidae: Aleyrodinae)

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.]
- Cortesiania 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

ลักษณะดักแด้นบนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 1 ก-ข) ลำตัวเรียวกลม ส่วนหัวโค้งมน ส่วนท้องเรียวกกลม ขอบของลำตัวหยักเป็นคลื่นเล็กน้อย abdominal tracheal pore กว้างแบ่งขอบและส่วนลำตัวออกชัดเจน โดยปกติปล้องท้องจะปรากฏเห็นชัดเพียง 7 ปล้อง vasiform orifice มีรูปร่างค่อนข้างเป็นรูปสามเหลี่ยมเรียวยาวด้านข้างตรง ขนที่ caudal ยาวหนา และยาวกว่า vesiform orifice ขนที่ dorsum ยาวและปลายขนแหลม พบขนที่บริเวณนี้ 7 คู่ ส่วนด้านท้ายของดักแด้นจะพบลักษณะเป็นร่องเล็กๆ (caudal furrow) มีขนาดใกล้เคียงกับ vasiform orifice

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (ภาพที่ 2 ก-ง) วางไข่ด้านล่างของใบไม้เป็นฟองเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มไม่แน่นนอน ไข่มีรูปร่างยาวเรียวก มีขนาดเล็กกว่า 0.2 มิลลิเมตร และมีก้านสั้นๆ ยึดไข่ให้ติดกับผิวใบ หลังจากนั้นไข่จะเริ่มเปลี่ยนสีจากสีขาวเป็นสีน้ำตาล ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนภายใน 6-7 วัน ตัวอ่อนระยะนี้เรียกว่า “Crawler” เมื่อฟักออกมาจะเคลื่อนไหวเพียงเล็กน้อยเพื่อหาบริเวณที่เป็นแหล่งอาหาร และเมื่อหยุดนิ่งจะใช้ปากที่มีลักษณะคล้ายเข็ม (needle-like form) ดูดน้ำเลี้ยงจากพืช จากนั้นตัวอ่อนจะลอกคราบครั้งแรกเข้าสู่ระยะที่ 2 ขายังพัฒนาไม่เต็มที่ ลอกคราบครั้งที่ 2 เพื่อเข้าสู่ระยะที่ 3 ตัวอ่อนจะมีขนาด 0.4-0.8 มิลลิเมตร ลอกคราบครั้งที่ 3 ตัวอ่อนจะมีลักษณะแบนราบติดกับผิวใบ สีเหลืองอมเขียวใส สามารถมองเห็นส่วนต่างๆ ที่อยู่ภายในได้ รวมระยะเป็นตัวอ่อนประมาณ 9 วัน หลังจากลอกคราบครั้งที่ 4 ตัวอ่อนจะมีลักษณะตัวนูนสีเหลืองเข้มขึ้น เรียกว่าระยะก่อนเข้าดักแด้น สังเกตความแตกต่างของระยะก่อนเข้าดักแด้นกับระยะเข้าดักแด้นโดยระยะเข้าดักแด้นจะมีตาธรรมาสีแดง เรียกว่า “red-eyed nymph” ปรากฏให้เห็นชัดเจนและตัวจะนูนมากขึ้น ระยะตัวเต็มวัย ตัวยาวประมาณ 1

มิลลิเมตร ปีกปกคลุมด้วยผงสีขาว เพศเมียสามารถวางไข่ได้มากกว่า 100 ฟองและมีอายุเฉลี่ย 6.11 วัน ส่วนเพศผู้มีอายุเฉลี่ย 3.35 วัน

ความสำคัญและพืชอาหาร

พบอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืช ได้แก่ กะเพรา โหระพา ผักชีฝรั่ง กุหลาบ มะเขือเปราะ ยาสูบ มันฝรั่ง ฝ้าย และพืชตระกูลถั่ว จากรายงานพบว่าแมลงหมีขาวชนิดนี้มีพืชอาหารมากกว่า 150 ชนิด อยู่ใน 63 วงศ์ (Mound & Halsey.1978) จัดเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีพืชอาหารมากชนิดหนึ่ง โดยทั่วไปแมลงชนิดนี้นอกจากจะสร้างความเสียหายโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืชแล้ว ยังเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสเข้าสู่พืชมากกว่า 100 ชนิด เช่น โรค Cassava mosaic (CMD) และโรค Cassava Mosaic Geminiviruses (CMGs) ที่เกิดจากพืชได้รับเชื้อไวรัส เป็นต้น

เขตการแพร่กระจาย

ประเทศไทย (พบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย) และจากรายงานของ Mound & Halsey (1978) พบว่า แมลงหมีขาวชนิดนี้มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในหลายประเทศ เช่น แคนาดา เม็กซิโก คิวบา สเปน โมร็อกโก อียิปต์ ไชปรัส อิสราเอล จอร์แดน ซาอุดีอาระเบีย อิหร่าน รัสเซีย และญี่ปุ่น แคนาดา อเมริกาเหนือ - แคนาดา ไอเวอรี กานา คาเมรูน ซูดาน เอเดน คองโก เคนยา แทนซาเนีย ยูกันดา และแองโกลา แคนาดา มาดากัสการ์ เมอร์ริเชียส แคนาดา โอเรียนตอล - ปากีสถาน อินเดีย จีน ไต้หวัน พม่า ศรีลังกา และไทย แคนาดา ออสโตร-โอเรียนตอล - มาเลเซีย สิงคโปร์ เกาะสุมาตรา อินโดนีเซีย นิวกีนิ และฟิลิปปินส์ แคนาดา ออสเตรเลีย - ออสเตรเลีย แคนาดา แปซิฟิก - ฟิจิ แคนาดา นีอาร์กติก - สหรัฐอเมริกา แคนาดา นีโอโทรปิคอล - จาไมกา บาบาดอส เปอโตริโก บราซิล และอาเจนตินา

แมลงหมีขาวไยเกลียว (Spiralling Whitefly)

ชื่ออื่น แมลงหมีขาวเกลียว

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Aleurodicus dispersus* Russell

(Hemiptera: Aleyrodidae: Aleurodicinae)

ชื่อพ้อง -

รูปร่างลักษณะ

ลักษณะบนแผ่นสไลด์ (ภาพที่ 1 ค-ง) ดักแต่ลักษณะโค้งมนเป็นรูปไข่ พบรูประกอบจำนวน 5 คู่ มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยพบที่ส่วนหัว 1 คู่ และส่วนท้องระหว่างปล้องท้องที่ 3 ถึงปล้องท้องที่ 6 จำนวน 4 คู่ และพบรูธรรมดาหลายขนาดกระจายอยู่ทั่วลำตัว บริเวณขอบลำตัวพบขนแข็งขนาดเล็ก รอบลำตัว 12 คู่ รูเปิดที่ vasiform orifice มีรูปร่างคล้ายหัวใจโดยมีเส้นขนาดใหญ่มองเห็นได้ชัดเจน ที่ส่วนปลายลำตัวพบขนแข็ง 4 เส้น ที่ฝ่าปิด จะมีขนขนาดเล็ก 2 เส้น

ลักษณะที่พบในธรรมชาติ (ภาพที่ 2 จ-ฉ) แมลงหมีขาวไยเกลียววางไข่เป็นรูปร่างกลมบนใบหรือใต้ใบพืช ลักษณะเป็นวงเกลียว มีเส้นใยสีขาวปกคลุม แต่ละวงมีไข่ประมาณ 14-26 ฟอง ระยะไข่

ใช้เวลา 7-10 วัน ระยะตัวอ่อนมี 4 วัย ตัวอ่อนวัย 1- 2 ใช้เวลา 6-9 วัน ระยะนี้เริ่มมีเส้นใยสีขาวปกคลุมแต่ไม่มาก ตัวอ่อนวัย 3 มีขนาดใหญ่ขึ้นเริ่มสร้างเส้นใยสีขาวปกคลุมตัวมากขึ้นแต่ยังสามารถมองเห็นส่วนต่างๆ ของตัวอ่อน ระยะนี้ใช้เวลา 5-13 วัน ลอกคราบครั้งที่ 3 เพื่อเข้าสู่ระยะที่ 4 ใช้เวลา 5-16 วัน หลังจากลอกคราบครั้งสุดท้าย ตัวอ่อนจะมีลักษณะตัวนูนขึ้น ระยะที่ 3-4 จะมีเส้นใยสีขาวคล้ายเส้นด้ายลักษณะเป็นมันวาวปกคลุมจนไม่สามารถมองเห็นส่วนต่างๆ ของลำตัวได้ ดักแต่มีความยาว 0.91 มิลลิเมตร กว้าง 0.69 มิลลิเมตร ตัวเต็มวัย มีขนาดลำตัวยาว 2 มิลลิเมตร สีเหลืองอ่อน ปีก 2 คู่ ปกคลุมด้วยผงสีขาวคล้ายผงแป้ง

ความสำคัญและพืชอาศัย

พบอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช ชนิดพืชที่แมลงหริ่งขาวใยเกลียวเข้าทำลาย ได้แก่ โกโก้ กล้าย กระเจี๊ยบ กระถ่อน กระตังงา ชี่เหล็ก คริสมาศขาว คริสมาศ ชะพลู ชมพู่ น้ำดอกไม้ ตดหมูตดหมา ตำลึง ถั่วฝักยาว ถั่วพู น้ำมันราชสีห์ น้อยหน่า บัว ปาล์ม ผักแพรว ฝรั่ง พริก พุดตาน พุทรา มะเขือ มะเขือม่วง ะขามเทศ มันสำปะหลัง มะละกอ ะลิ เมเปิ้ล ยางพารา สิวาวดี ละหุ่ง วัชพืช สตรังค์ หูปลาช่อน องุ่น แอปเปิ้ล อะโวคาโด และอ้อย Mound & Halsey (1978) รายงานพบว่าแมลงหริ่งขาวชนิดนี้มีพืชอาหารมากกว่า 100 ชนิด ในพืช 27 ตระกูล

เขตการแพร่กระจาย

กาญจนบุรี เชียงราย ตาก นครนายก นครราชสีมา ปทุมธานี เพชรบุรี แพร่ ราชบุรี สมุทรสงคราม อุตรดิตถ์ และจากรายงานของ Mound & Halsey (1978) พบว่ามีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในหลายประเทศ เช่น แลบบูมิภาคพาลาเลอคาติค - มาคาโลนีเซีย แลบบูมิภาคเอธิโอเปีย - ไนจีเรีย โตโก (ในทวีปแอฟริกาทางทิศตะวันตก) ภูมิภาคตะวันออก (เอเชีย) - อินเดีย เกาะมัลดีฟ ศรีลังกา ไทย : ทางทิศใต้ - ตะวันออก แปซิฟิก เขตทรอปิค และ อเมริกาใต้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาชนิดของแมลงหริ่งขาวในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทยจากตัวอย่างแมลงหริ่งขาวในภาคเหนือและภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ น่าน พะเยา แพร่ แม่ฮ่องสอน ลำปาง ลำพูน อุตรดิตถ์ นครปฐม นนทบุรี พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี สิงห์บุรี ชัยนาท พิษณุโลก เพชรบูรณ์ สุโขทัย อ่างทอง และอุทัยธานี จำนวน 406 ตัวอย่าง และสามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) จำนวน 371 ตัวอย่าง และ *Aleurodicus disperses* Russell, 1965 จำนวน 35 ตัวอย่าง และตัวอย่างแมลงหริ่งขาวในพืชผักสวนครัว (พริก โหระพา มะเขือ ผักชีฝรั่ง) ในภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ นำตัวอย่างแมลงหริ่งขาวมาทำสไลด์ ได้ 317 สไลด์ (ตารางที่ 1) จำแนกได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ *Bemisia tabaci* ในพริก กะเพรา โหระพา มะเขือ ผักแพว และผักชีฝรั่ง จำนวน 211 ตัวอย่าง และ *Aleurodicus disperses* ในพริก มะเขือ จำนวน 106 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาค้นคว้า เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อเตรียมจัดทำฐานข้อมูลแมลงศัตรูพืชของประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐกฤต พิทักษ์. 2544. เทคโนโลยีทางเลือกสำหรับ ไอ พี เอ็ม. หน้า 241-255. ใน การประชุมสัมมนาทางวิชาการการป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูอ้อยโดยวิธีผสมผสานครั้งที่ 4. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- ณัฐกฤต พิทักษ์ 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. ข่าวสารสมาคมนักวิจัยอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย. 8(3)2-3
- อรนุช กองกาญจนะ และ วิชรา 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 boumieri* 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



ภาพที่ 1 แมลงหรีวขาวในพืชผักสวนครัว ก. ดักแด้ *B. tabaci* บนใบพืช ข. ดักแด้ *B. tabaci* หลังจากทำสไลด์ถาวร ค. ดักแด้ *A. dispersus* บนใบพืช ง. ดักแด้ *A. dispersus* หลังจากทำสไลด์ถาวร



ภาพที่ 2 แมลงหี่ขาวในพืชผักสวนครัว ก-ข) แมลงหี่ขาว *B. tabaci* ก) ในพริก

ข) ในกะเพรา ค) ในโหระพา ง) ในมะเขือ จ-ง) แมลงหี่ขาว *A. disperses* ในพริก

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของแมลงหี่ขาวในพืชผักสวนครัว ในภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
ของประเทศไทย

Species	Host plant	Distribution		Coordinates	No. specimen
<i>A. dispersus</i>	พริกชี้หนู	Chanthaburi	Laem Sing	13.111950, 102.220919	4
<i>A. dispersus</i>	มะเขือยาว	Chanthaburi	Khao Soi Dao	13.115663, 102.219383	5
<i>A. dispersus</i>	มะเขือพวง	Chanthaburi	Khao Soi Dao	13.100759, 102.250895	5
<i>A. dispersus</i>	พริกชี้หนู	Chanthaburi	Khao Khitchakut	12.764615, 102.102678	7
<i>A. dispersus</i>	กะเพรา	Chanthaburi	Khao Khitchakut	12.764615, 102.102678	2
<i>A. dispersus</i>	มะระจีน	Chachoengsao	Phanom Sarakham	13.769407, 101.474683	7
<i>A. dispersus</i>	มะเขือเปราะ	Chachoengsao	Phanom Sarakham	13.769407, 101.474683	5
<i>A. dispersus</i>	พริกชี้หนู	Chachoengsao	Phanom Sarakham	13.769793, 101.465285	5
<i>A. dispersus</i>	มะระขี้นก	Chachoengsao	Phanom Sarakham	13.754964, 101.505657	5
<i>A. dispersus</i>	มะเขือเปราะ	Chachoengsao	Plaeng Yao	13.574047, 101.308237	3
<i>A. dispersus</i>	มะเขือเปราะ	Chachoengsao	Sanam Chai Khet	13.759106, 101.698001	3
<i>A. dispersus</i>	มะเขือเปราะ	Chon Buri	Phanat Nikhom	13.488642, 101.276152	5
<i>A. dispersus</i>	มะเขือเปราะ	Chon Buri	Phanat Nikhom	13.490875, 101.275079	5
<i>A. dispersus</i>	มะเขือเปราะ	Chon Buri	Ban Bueng	13.314603, 101.262014	5
<i>A. dispersus</i>	มะเขือเปราะ	Chon Buri	Ban Bueng	13.332466, 101.247151	5
<i>A. dispersus</i>	มะเขือเปราะ	Nakhon Ratchasima	Sikhio	14.913189, 101.837617	5
<i>A. dispersus</i>	มะเขือเปราะ	Nakhon Ratchasima	Sikhio	14.914091, 101.837670	5
<i>A. dispersus</i>	พริกชี้หนู	Nakhon Ratchasima	Nong Bun Mak	14.733239, 102.389302	5
<i>A. dispersus</i>	พริกชี้หนู	Nakhon Ratchasima	Nong Bun Mak	14.732430, 102.390954	5
<i>A. dispersus</i>	พริกชี้หนู	Nakhon Ratchasima	Wang Nam Khiao	14.510403, 101.931831	5
<i>A. dispersus</i>	พริกชี้หนู	Khon Kaen	Nam Phong	16.692210, 102.810318	5
<i>A. dispersus</i>	พริกชี้หนู	Nong Khai	Mueang	17.880674, 102.769040	5
<i>B. tabaci</i>	มะเขือ	Chanthaburi	Laem Sing	13.114881, 102.217576	5
<i>B. tabaci</i>	มะเขือ	Chanthaburi	Laem Sing	13.111022, 102.219289	5
<i>B. tabaci</i>	มะระขี้นก	Chanthaburi	Khao Soi Dao	13.115257, 102.218660	5
<i>B. tabaci</i>	โหระพา	Chanthaburi	Khao Soi Dao	13.115257, 102.218660	2
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Chanthaburi	Khao Soi Dao	13.102243, 102.249660	2
<i>B. tabaci</i>	มะระจีน	Chanthaburi	Khao Soi Dao	13.100759, 102.250894	5
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Chanthaburi	Mueang	12.784986, 102.101455	7
<i>B. tabaci</i>	มะเขือยาว	Chanthaburi	Khao Khitchakut	12.766250, 102.103499	2
<i>B. tabaci</i>	โหระพา	Chanthaburi	Khlong	12.570965, 102.265419	4
<i>B. Tabaci</i>	พริกชี้หนู	Chachoengsao	Phanom Sarakham	13.769793, 101.465285	5
<i>B. tabaci</i>	มะระขี้นก	Chachoengsao	Phanom Sarakham	13.752776, 101.504509	5
<i>B. tabaci</i>	กะเพรา	Chachoengsao	Phanom Sarakham	13.755152, 101.506429	5

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของแมลงหวี่ขาวในพืชผักสวนครัว ในภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (ต่อ)

Species	Host plant	Distribution		Coordinates	No. specimen
<i>B. tabaci</i>	มะเขือเปราะ	Chachoengsao	Phanom Sarakham	13.758154, 101.508821	6
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Chachoengsao	Plaeng Yao	13.660210, 101.156336	3
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Chachoengsao	Sanam Chai Khet	13.758216, 101.699068	5
<i>B. tabaci</i>	กะเพรา	Chachoengsao	Sanam Chai Khet	13.747964, 101.694137	5
<i>B. tabaci</i>	โหระพา	Chachoengsao	Sanam Chai Khet	13.747964, 101.694137	5
<i>B. tabaci</i>	มะเขือเปราะ	Chon Buri	Phanat Nikhom	13.465354, 101.170049	5
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Chon Buri	Phanat Nikhom	13.460011, 101.198873	4
<i>B. tabaci</i>	มะระขี้นก	Chon Buri	Ban Bueng	13.313517, 101.262357	5
<i>B. tabaci</i>	มะเขือเปราะ	Chon Buri	Si Racha	13.160126, 100.922199	5
<i>B. tabaci</i>	มะเขือเปราะ	Rayong	Ban Chang	12.739953, 101.088036	5
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Ta Phraya	Sa Kaeo	14.093726, 102.695353	5
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Ta Phraya	Sa Kaeo	14.135712, 102.854502	5
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Nakhon Ratchasima	Sikhio	14.905933, 101.831215	5
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Nakhon Ratchasima	Sikhio	14.913189, 101.837616	3
<i>B. tabaci</i>	ผักชีฝรั่ง	Nakhon Ratchasima	Pak Chong	14.534375, 101.373952	5
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Nakhon Ratchasima	Pak Chong	14.532090, 101.368566	5
<i>B. tabaci</i>	มะเขือยาว	Nakhon Ratchasima	Pak Chong	14.527111, 101.364588	4
<i>B. tabaci</i>	กะเพรา	Nakhon Ratchasima	Pak Chong	14.515892, 101.375408	7
<i>B. tabaci</i>	กะเพรา	Nakhon Ratchasima	Pak Chong	14.507323, 101.379667	8
<i>B. tabaci</i>	มะเขือพวง	Nakhon Ratchasima	Pak Chong	14.518268, 101.375805	5
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Nakhon Ratchasima	Soeng Sang	14.328618, 102.444562	5
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Nakhon Ratchasima	Nong Bun Mak	14.735242, 102.385214	2
<i>B. tabaci</i>	กะเพรา	Nakhon Ratchasima	Wang Nam Khiao	14.509851, 101.931934	2
<i>B. tabaci</i>	ผักชีฝรั่ง	Khon Kaen	Mueang	16.447863, 102.801857	3
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Khon Kaen	Mueang	16.438633, 102.843225	8
<i>B. tabaci</i>	มะระขี้นก	Khon Kaen	Mueang	16.113368, 102.728378	4
<i>B. tabaci</i>	กะเพรา	Khon Kaen	Ban Phai	16.115993, 102.738464	2
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Khon Kaen	Nam Phong	16.692210, 102.810318	3
<i>B. tabaci</i>	กระเพรา	Khon Kaen	Nam Phong	16.692210, 102.810319	5
<i>B. tabaci</i>	กระเพรา	Khon Kaen	Nam Phong	16.696136, 102.811208	5
<i>B. tabaci</i>	มะระจีน	Khon Kaen	Nam Phong	16.701747, 102.805962	5
<i>B. tabaci</i>	มะเขือพวง	Nong Khai	Mueang	17.793125, 102.748665	5
<i>B. tabaci</i>	กะเพรา	Nong Khai	Mueang	17.878765, 102.771325	5
<i>B. tabaci</i>	พริกชี้หนู	Chanthaburi	Laem Sing	13.111950, 102.220919	5

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 เชาวลิต
อาทิตย์ รักกลีกร สิทธิศิโรตม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Diaspidinae ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2563 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ของเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Diaspidinae ที่มีอยู่ในประเทศไทย ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ได้แก่ มะนาว ลิ้นจี่ มะม่วง ทูเรียน มะกรูด ส้มโอ และกุหลาบ ในพื้นที่เขตภาคกลางได้แก่จังหวัด สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร และอุบลราชธานี เขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง และภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ด จำนวน 320 ตัวอย่าง พบว่าเป็นเพลี้ยหอยในวงศ์ย่อย Diaspidinae จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ 1. *Aulacaspis tubercularis* (Newstead) 2. *Aulacaspis vitis* (Green) 3. *Aulacaspis rosae* (Bouche) 4. *Parlatoria ziziphi* (Locau) 5. *Parlatoria* sp. 6. *Unaspis* sp. การศึกษานี้ยังไม่สิ้นสุดจะต้องดำเนินการต่อไปในปี 2564

คำหลัก : เพลี้ยหอยเกล็ด อนุกรมวิธาน วงศ์ย่อย Diaspidinae

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-17-62

คำนำ

เพลี้ยหอยเกล็ด (armored scale) จัดอยู่ในวงศ์ (family) Diaspididae สามารถแบ่งออกได้หลายวงศ์ย่อย (subfamily) รวมทั้งวงศ์ย่อย Diaspidinae ทั่วโลกมีรายงานจำนวนชนิดมากถึง 2,413 ชนิด คิดเป็น 1 ใน 3 ของจำนวนชนิดแมลงในวงศ์ใหญ่ (superfamily) Coccoidea (Ben-Dov *et.al*, 2014) ซึ่งแมลงกลุ่มนี้จัดเป็นแมลงปากดูด ที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชได้หลายชนิด ทั้งพืชสวน และพืชไร่ โดยดูต้นน้ำเลี้ยงจากส่วนต่าง 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 ชลิดา, 2543) และรายงานไว้เพียง 3 ชนิด ซึ่งเป็นข้อมูลที่ไม่ได้มีการปรับปรุงมากกว่า 10 ปี และในปัจจุบันสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้แมลงศัตรูพืชหลายชนิดมีความสามารถในการปรับตัว และสร้างความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจเป็นจำนวนมาก

นอกจากนี้เพลี้ยหอยเกล็ดส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก สามารถติดไปกับส่วนต่างๆ ของพืชที่ใช้ในการส่งออกได้ ไม่ว่าจะเป็น ผล ใบ ส่วนต่างๆ ที่ใช้ในการขยายพันธุ์ หรือใช้เพื่อการรับประทาน เป็นต้น ซึ่งจะพบว่าความเสียหายจากเพลี้ยหอยเกล็ดนั้นสามารถส่งผลกระทบต่อทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต และยังกระทบต่อมาตรการสุขอนามัยในการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรไปยังประเทศคู่ค้าต่างๆ ดังนั้นการศึกษาด้านอนุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ดเพื่อให้ทราบชนิด พืชอาหาร เขตกระจาย จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช
2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล้องพลาสติก ถังพลาสติก ของกระดาศใส่ตัวอย่างแมลง และถังรักษาความเย็น
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ (alcohol) 50-100% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10%, กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) กรดกลacial acetic acid (glacial acetic acid) ไซลีน (xylene) กรดคาร์บอลิก (carbolic acid) แอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) เอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) โคล์ฟออย (clove oil) และ แคนาดาบัลซั่ม (Canada balsam) เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล้องใส่สไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร

4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope, compound microscope กล้องถ่ายภาพ และเครื่องระบุพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS)

5. อุปกรณ์วัดภาพ ได้แก่ ปากกา rotting และกระดาษไขเขียนแบบ

6. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยหอยเกล็ดวงศ์ Diaspididae

วิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดโดยสำรวจแหล่งปลูกพืชที่สำคัญตามภูมิภาคต่างๆ ดังต่อไปนี้

ปีที่ 1 ภาคกลาง: ลพบุรี สระบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ฉะเชิงเทรา สำรวพืชที่สำคัญ เช่น มันสำปะหลัง ถั่วฝักยาว มะม่วง ลิ้นจี่ มะพร้าว เป็นต้น

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ: นครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี มุกดาหาร หนองคาย สุรินทร์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี สำรวพืชที่สำคัญ เช่น มัน

สำปะหลัง อ้อย มะพร้าว ปาล์ม มะม่วง ถั่วฝักยาว น้อยหน่า เป็นต้น

ปีที่ 2 ภาคตะวันออก: จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด สำรวพืชที่สำคัญเช่น มันสำปะหลัง มังคุด ทุเรียน เงาะ ลองกอง มะพร้าว เป็นต้น

ภาคเหนือ: เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน ลำปาง แพร่ น่าน พืชปลูก โดย สำรวพืชที่สำคัญ เช่น ลำไย ลิ้นจี่ มะม่วง ถั่วฝักยาว พืชตระกูลส้ม เป็นต้น

ปีที่ 3 ภาคตะวันตก: ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สำรวพืชที่สำคัญ เช่น มันสำปะหลัง อ้อย มะพร้าว ถั่วฝักยาว มะละกอ เป็นต้น

ภาคใต้: ชุมพร นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี สำรวพืชที่สำคัญ เช่น มะพร้าว ปาล์ม มังคุด ทุเรียน เงาะ ลองกอง เป็นต้น

เมื่อสำรวจพบตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ด ตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยหอยอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์(GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุด จะเก็บให้ได้ตัวอย่างมากที่สุด เพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการและจัดทำสไลด์ถาวรในการจำแนกชนิดต่อไป

2. นำตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดที่เก็บรวบรวมได้ มาตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ถ่ายภาพ บันทึกรายละเอียด เช่น ขนาด รูปร่างลักษณะและสีของเพลี้ยหอยก่อนทำสไลด์ถาวร บันทึกข้อมูลหมายเลข (LOT. number) ตัวอย่างในแต่ละครั้งที่ทำการสำรวจอย่างละเอียดโดยจะแยกเป็นชนิดศัตรูพืช พืชอาศัย และสถานที่ แล้วดองในแอลกอฮอล์ 70%

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

4. วิธีการทำสไลด์ถาวร

4.1 ใช้เข็มเย็บเปิดเกราะที่ปกคลุมลำตัวของเพี้ยหอยเกล็ดดอก เจาะบริเวณกลาง ส่วนท้องของตัวอย่างเพี้ยหอย

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

4.3 นำตัวอย่างเพี้ยหอยเกล็ดย้ายลงในน้ำกลั่น กดเบา ๆ บนลำตัวด้วยเข็มตัดปลาย โคน เพื่อให้ไข่ ตัวอ่อน และของเหลวที่อยู่ในลำตัวหลุดออกมาทางรอยที่เจาะไว้ ถ้ายังมีก้อนไขมัน ตกค้างอยู่ให้นำไปแช่ในแอลกอฮอล์ 95% ประมาณ 2 – 3 นาที

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

4.5 ย้อมสีตัวอย่างโดยแช่ในน้ำยาย้อมสี ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟุซซิน (acid fuchsin) กรดเกลือ (hydrochloric acid) และน้ำกลั่น แช่ทิ้งไว้อย่างน้อย 30 นาที ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง

4.6 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

4.7 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 100 % แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

4.8 ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

4.9 นำตัวอย่างเพี้ยหอยเกล็ดวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟออยส่วนที่ เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (Canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงามไม่บิด เบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

4.10 นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอย่างน้อย 3 เดือน ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง

5. ตรวจสอบจำแนกชนิดเพี้ยหอยเกล็ดบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Williams and Watson (1988) Rosen (1990) Gill (1997) และ Miller and Davidson (2005) รวมทั้งเปรียบเทียบกับ ตัวอย่างสไลด์เพี้ยหอยเกล็ดที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรและวาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเพี้ยหอยแต่ละชนิด และจัดทำ แนวทางวินิจฉัยชนิดเพี้ยหอยเกล็ดวงศ์ย่อย Diaspidinae ซึ่งจะนำตัวอย่างสไลด์ที่ได้ จำนวน 20 ตัวอย่างต่อ LOT. number มาเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ ขนาดความยาวของ ลำตัว ลักษณะของส่วนหัวและอก ส่วนของ pygidium ในวงศ์ย่อยนี้จะมี 1-barred duct และบริเวณ ปลายส่วนของ pygidium จะมี lobe จำนวน 3 คู่ ซึ่งในแต่ละชนิดจะมีรูปทรงที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังต้องศึกษาลักษณะการเรียงตัวและจำนวนของ microduct ทั้งชนิดแบบสั้น และแบบยาว เพื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิด ในบางชนิดจำเป็นต้องยืมตัวอย่าง (voucher specimens) จาก พิพิธภัณฑ์หรือหน่วยงานอื่นๆจากต่างประเทศเพื่อเปรียบเทียบโดยเฉพาะ หลังจากนั้นจึงนำข้อมูล ต่างๆที่ได้รวบรวมจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดของเพี้ยหอยเกล็ดในวงศ์ย่อยนี้ โดยในแนวทางวินิจฉัย

จะมีทั้งข้อมูลสัณฐานวิทยาที่ใช้จำแนกเพลี้ยหอยเกล็ดในวงศ์ย่อยนี้จนถึงระดับชนิด และยังมีข้อมูลการแพร่กระจาย พืชอาศัย และแมลงศัตรูธรรมชาติที่พบจากการสำรวจ

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

7. จัดเก็บตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดในกล่องสำหรับสไลด์ถาวรและนำไปเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล และจัดทำบาร์โค้ด (bar code) ของตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดแต่ละสไลด์เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2561 ถึง เดือนกันยายน 2563

สถานที่ 1. แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในเขตภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Diaspidinae จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ได้แก่ ได้แก่ มะนาว ลิ้นจี่ มะม่วง ทุเรียน มะกรูด ส้มโอ และกุหลาบ ในพื้นที่เขตภาคกลาง ได้แก่ จังหวัด สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัด นครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร และอุบลราชธานี เขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง และภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยหอยเกล็ดจำนวน 320 ตัวอย่าง พบว่า เป็นเพลี้ยหอยในวงศ์ย่อย Diaspidinae และสามารถจำแนกได้ 6 ชนิด ได้แก่ 1. *Aulacaspis tubercularis* (Newstead) 2. *Aulacaspis vitis* (Green) 3. *Aulacaspis rosae* (Bouche') 4. *Parlatoria ziziphi* (Locau) 5. *Parlatoria* sp. 6. *Unaspis* sp.

ลักษณะทั่วไปของเพลี้ยหอยเกล็ดทั้ง 6 ชนิดมีดังนี้ (Figure 1)

1. *Aulacaspis tubercularis* (Newstead) (Figure 1A) เป็นเพลี้ยหอยเกล็ดที่มีลักษณะของแผ่นปกคลุมค่อนข้างกลม เป็นสีขาวขุ่น มีคราบเก่าอยู่บริเวณด้านบนบนขอบกึ่งกลางของแผ่นปกคลุมมีสีดำหรือสีน้ำตาล

2. *Aulacaspis vitis* (Green) (Figure 1B) เป็นเพลี้ยหอยเกล็ดที่มีลักษณะของแผ่นปกคลุมค่อนข้างกลม เป็นสีเขียวขุ่น มีคราบเก่าอยู่บริเวณด้านบนขอบกึ่งกลางของแผ่นปกคลุมมีสีดำหรือสีน้ำตาล

3. *Aulacaspis rosae* (Bouche') (Figure 1C) เป็นเพลี้ยหอยเกล็ดที่มีลักษณะของแผ่นปกคลุมค่อนข้างกลม เป็นสีเขียวขุ่น มีคราบเก่าอยู่บริเวณด้านบนขอบกึ่งกลางของแผ่นปกคลุมมีสีดำหรือสีน้ำตาล

4. *Parlatoria ziziphi* (Locau) (Figure 1D) เป็นเพลี้ยหอยเกล็ดที่มีลักษณะของแผ่นปกคลุมสีดำเข้มรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้า

5. *Parlatoria* sp. เป็นเพลี้ยหอยเกล็ดที่มีลักษณะของแผ่นปกคลุมสีน้ำตาลเข้มรูปทรงคล้ายวงกลมหรือบางครั้งเป็นวงรี

6. *Unaspis* sp. เป็นเพลี้ยหอยเกล็ดที่มีลักษณะของแผ่นปกคลุมสีน้ำตาลอ่อนรูปทรงคล้ายวงรีหรือรูปไข่

การศึกษานี้จะต้องดำเนินต่อไปในปี 2564 โดยสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่าง จากแหล่งปลูกพืชอื่นๆ ทั้ง ผัก ไม้ดอกไม้ประดับ พืชไร่ และไม้ผลในภาคตะวันตกและภาคใต้ และจัดทำแนวทางวินิจฉัย พร้อมบันทึกรายละเอียดของเพลี้ยหอยเกล็ดแต่ละชนิด และจัดเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษานุกรมวิธานของเพลี้ยหอยเกล็ด วงศ์ย่อย Diaspidinae ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2563 พบว่า เป็นเพลี้ยหอยเกล็ด ในวงศ์ย่อย Diaspidinae และสามารถจำแนกได้จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ 1. *Aulacaspis tubercularis* (Newstead) 2. *Aulacaspis vitis* (Green) 3. *Aulacaspis rosae* (Bouche') 4. *Parlatoria ziziphi* (Locau) 5. *Parlatoria* sp. 6. *Unaspis* sp. ซึ่งการเก็บรวบรวมตัวอย่าง จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ได้แก่ มะนาว ลิ้นจี่ มะม่วง ทูเรียน มะกรูด ส้มโอ และกุหลาบ ในพื้นที่เขตภาคกลางได้แก่จังหวัด สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร และอุบลราชธานี เขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง และภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด การศึกษานี้ยังไม่สิ้นสุดจะต้องดำเนินการต่อไปในปี 2564

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ และลูกจ้างกลุ่มงานนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเก็บและเตรียมตัวอย่างทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

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

Ben-Dov, Y., Miller, D.R. & 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 2014.

Miller, D.R. and Davidson, J.A. 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.

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.

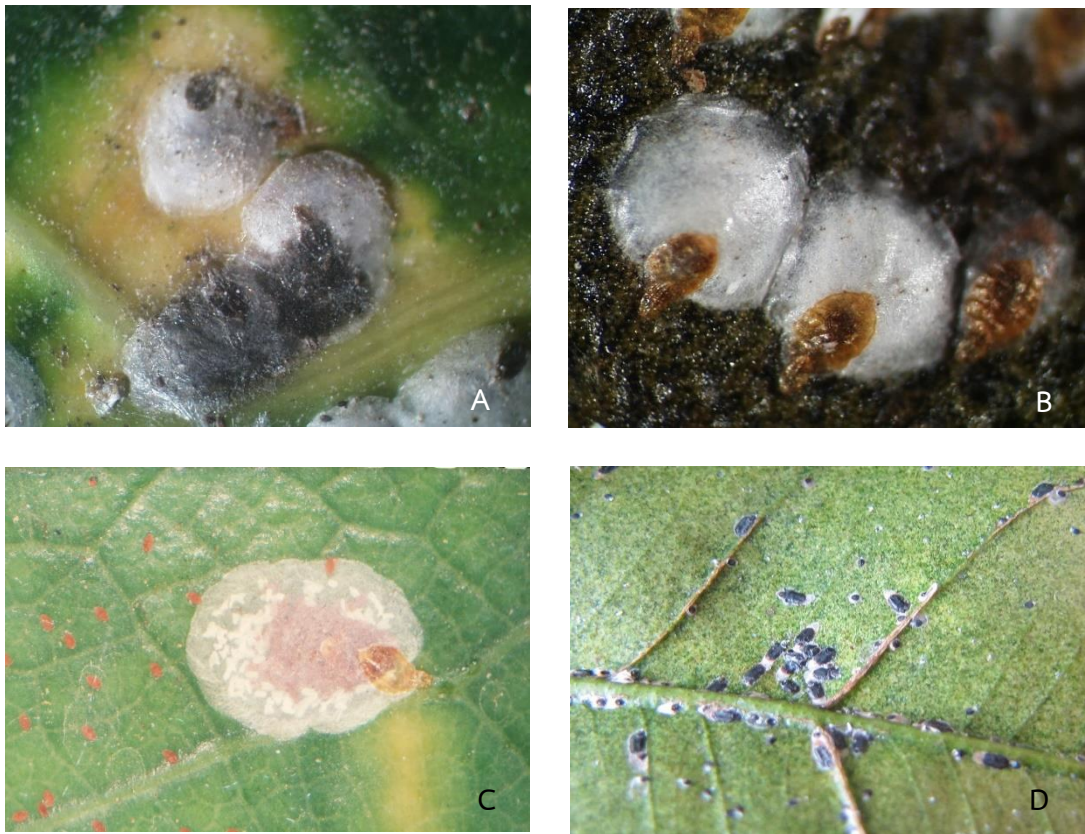


Figure 1 Four species of Diaspidinae; (A) *Aulacaspis tubercularis* (Newstead), (B) *Aulacaspis rosae* (Bouche') (C) *Aulacaspis vitis* (Green), (D) *Parlatoria ziziphi* (Locau)

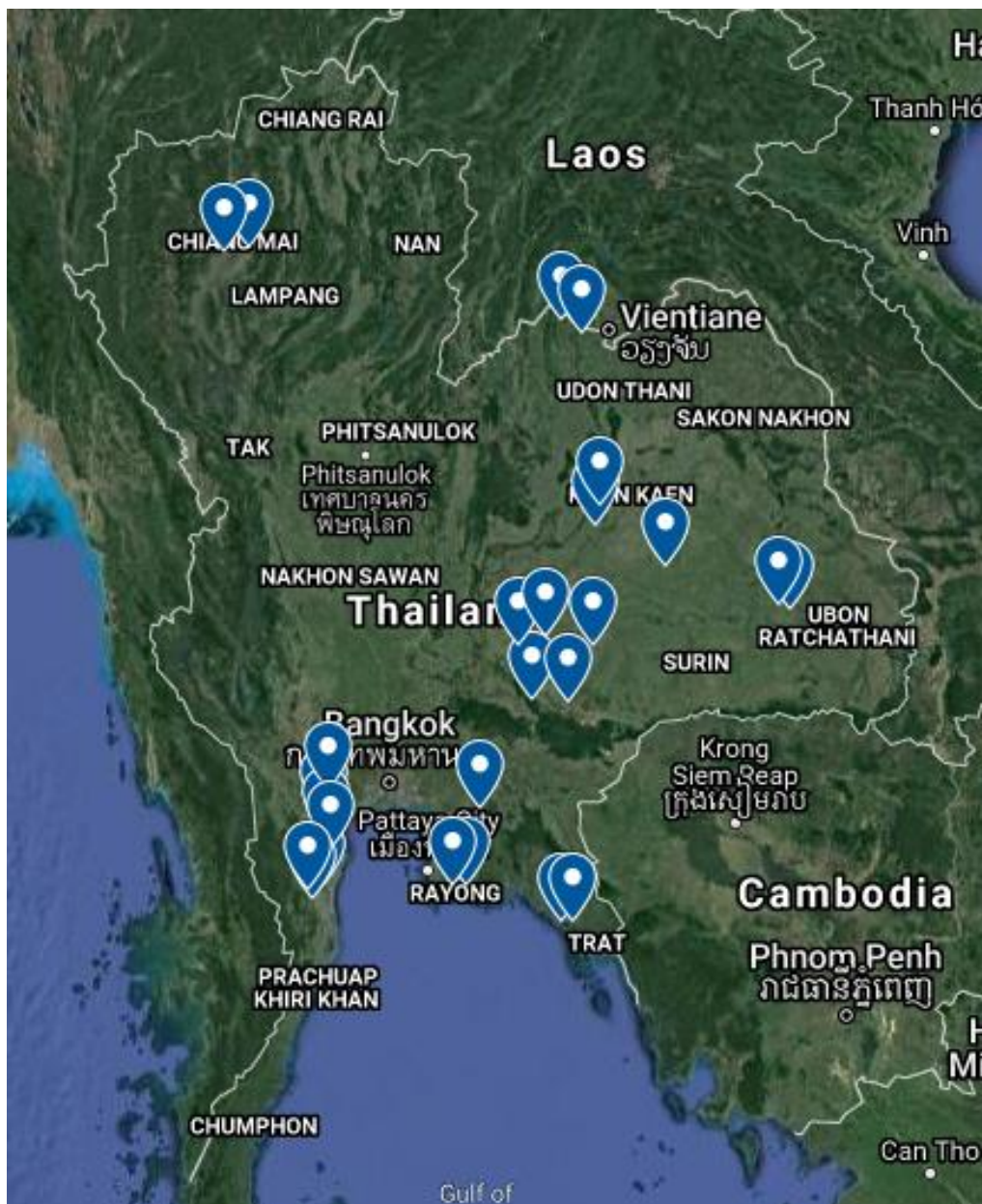


Figure 2 Survey plots of Diapsidinae in some part of Thailand

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

ชัยพร บัวมาศ ยุวรินทร์ บุญทบ จารุวัฒน์ แตกกุล สุนัดดา
เขาวลิต สิทธิศิริโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2563 เพื่อทราบชนิด พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae ที่มีอยู่ในประเทศไทย ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทั้งไม้ผล พืชผักสวนครัว มัดอกและไม้ประดับ ในพื้นที่เขตภาคกลางได้แก่ จังหวัด สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม ขอนแก่น อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร และอุบลราชธานี เขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง และภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพลี้ยแป้งใน จำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่า เป็นเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ 1. *Rhizoecus americanus* (Williams) 2. *Rhizoecus saintpanliae* Williams และ 3. *Rhizoecus* sp. การศึกษานี้ยังไม่สิ้นสุด จะต้องดำเนินการต่อไปในปี 2564

คำหลัก : เพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-18-62

คำนำ

เพลี้ยแป้งในราก พบอาศัยอยู่ในบริเวณรากพืช มีอยู่หลายวงศ์ด้วยกัน ไม่ว่าจะเป็น วงศ์ Pseudococcidae และ Potuidae แต่วงศ์ที่พบมากที่สุดได้แก่ Rhizoecidae ทั่วโลก มีรายงานไว้จำนวน 244 ชนิด 18 สกุล ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบจำนวน 41 ชนิด 6 สกุล (Ben-Dov., *et. al.*, 2014) ซึ่งพบว่า มีเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae เป็นเพลี้ยแป้งรากที่อาศัยอยู่ในดิน (hypogaeal mealybug) โดยอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณรากของพืชอาศัย และมีพืชอาศัยหลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มพืชเศรษฐกิจ ทั้งไม้ผล ไม้ยืนต้น และไม้ดอกไม้ประดับ (Hambleton, 1976) และสามารถสร้างความเสียหายให้แก่รากของพืชได้ หากมีการระบาด ทำให้รากไม่สามารถหาอาหารได้ พืชไม่สามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ หรือชะงักการเจริญเติบโตโดยไม่ทราบสาเหตุ และทำให้มีลักษณะผิดปกติต่างๆ เช่น ใบเหลือง ยอดแห้ง และยืนต้นตาย เพลี้ยแป้งในราก วงศ์นี้มีข้อมูลน้อยค่อนข้างน้อยมากโดยเฉพาะในประเทศไทย

เพลี้ยแป้งในราก มีขนาดค่อนข้างเล็กเมื่อเทียบกับเพลี้ยแป้งในรากชนิดอื่นๆ สามารถติดไปกับส่วนรากของพืชที่ใช้ในการขยายพันธุ์ ซึ่งจะพบว่าความเสียหายจากเพลี้ยแป้งในรากนั้นสามารถส่งผลกระทบต่อทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของพืชโดยที่เกษตรกรไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริง และยังกระทบต่อมาตรการสุขอนามัยในการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรไปยังประเทศคู่ค้าต่างๆ โดยเฉพาะการส่งหัวพันธุ์ ราก และต้นพืช ของไม้ดอกไม้ประดับ ดังนั้นการศึกษาด้านอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในราก เพื่อให้ทราบชนิด พืชอาหาร เขตกระจาย และข้อมูลด้านชีววิทยาบางประการ จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการหาวิธีการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช
2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล้องพลาสติก ถุงพลาสติก ของกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง และถังรักษาความเย็น
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ (alcohol) 50-100% โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10%, กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) กรดกลacial acetic acid (glacial acetic acid) ไซลีน (xylene) กรดคาร์บอริก (carbolic acid) แอซิดฟุชซิน (acid fuchsin) เอ็น-บิวทิลแอลกอฮอล์ (N-butyl alcohol) 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 และกระดาษไขเขียนแบบ
6. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae

วิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยแป้งในราก โดยสำรวจแหล่งปลูกพืชที่สำคัญตามภูมิภาคต่างๆ ดังต่อไปนี้

- ปีที่ 1 ภาคกลาง: ลพบุรี สระบุรี สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ฉะเชิงเทรา สำรวจพืชที่สำคัญ เช่น มะม่วง ฝรั่ง ข่า ขวนชม เป็นต้น
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ: นครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี มุกดาหาร หนองคาย สุรินทร์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี) สำรวจพืชที่สำคัญ เช่น มะม่วง มะม่วง น้อยหน่า ฝรั่ง ข่า ขวนชม เป็นต้น
- ปีที่ 2 ภาคตะวันออก: จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด สำรวจพืชที่สำคัญเช่น มังคุด ทุเรียน เงาะ ลองกอง ฝรั่ง ข่า ขวนชม เป็นต้น
ภาคเหนือ: เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน ลำปาง แพร่ น่าน พิชณุโลก โดยสำรวจพืชที่สำคัญ เช่น ลำไย ลิ้นจี่ มะม่วง ฝรั่ง ข่า ขวนชม ปทุมมา เป็นต้น
- ปีที่ 3 ภาคตะวันตก: ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สำรวจพืชที่สำคัญ เช่น มะม่วง มังคุด ทุเรียน ฝรั่ง ข่า ขวนชม เป็นต้น
ภาคใต้: ชุมพร นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี สำรวจพืชที่สำคัญ เช่น มะม่วง มังคุด ทุเรียน ฝรั่ง ข่า ขวนชม เป็นต้น

เมื่อพบตัวอย่างเพลี้ยแป้งในราก ตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่ ใส่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์แล้วใส่ในถุงพลาสติก และใช้วิธีการสังเกตอาการต่างๆ เช่น ใบร่วง ยอดแห้ง ยืนต้นตายโดยไม่ทราบสาเหตุ และทำการขุดบริเวณราก นอกจากนี้จะใช้วิธีการขุดดินบริเวณรากรอบๆ ต้น นำไปแยกแมลงโดยใช้ Berlese funnel เพื่อช่วยในการแยกแมลง บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์(GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างชนิดและส่วนของพืชที่ถูกทำลาย รวมทั้งชื่อผู้เก็บ สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุด จะเก็บให้ได้ตัวอย่างมากที่สุด เพื่อนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการและจัดทำสไลด์ถาวรในการจำแนกชนิดต่อไป

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

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

4. วิธีการทำสไลด์ถาวร

4.1 ใช้เข็มเขี่ยเจาะบริเวณกลางส่วนท้องของตัวอย่างเพลี้ยแป้งในราก

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

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

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

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

4.6 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 95% แช่ทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน

4.7 ย้ายลงในแอลกอฮอล์ 100 % แช่ทิ้งไว้ 10 นาที

4.8 ย้ายลงในโคล์ฟออย (clove oil) แช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

4.9 นำตัวอย่างเพื่อย้อมสีในรากวางบนแผ่นสไลด์แก้ว ใช้กระดาษกรองซับโคล์ฟออยส่วนที่เกินออก หยดแคนาดาบัลซัม (Canada balsam) 1 หยดบนตัวอย่างแมลงจัดรูปร่าง ให้สวยงาม ไม่บิดเบี้ยวหรือทับซ้อนกัน ปิดทับด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

4.10 นำไปอบให้แห้ง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอย่างน้อย 3 เดือน ขึ้นอยู่กับตัวอย่าง

5. ตรวจสอบจำแนกชนิดเพื่อย้อมสีในรากบนแผ่นสไลด์ถาวร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Williams and Watson (1988) และ Miller and Davidson (2005) รวมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างสไลด์เพื่อย้อมสีในรากที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรและวาดรูปแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกเพื่อย้อมสีในรากแต่ละชนิด และจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดเพื่อย้อมสีในราก วงศ์ Rhizoecidae ซึ่งจะนำตัวอย่างสไลด์ที่ได้ มาเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ ขนาดความยาวของลำตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ที่มีกำลังขยายสูง ตรวจสอบดูลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก ได้แก่ หนวด (antennae) ขน (setae) รู (pores) ท่อ (tubular ducts) กลุ่มอวัยวะที่ผลิตเส้นแบ่งด้านข้างลำตัว (cerarii) ช่องเปิดที่มีลักษณะคล้ายรอยแตกตามขวางของลำตัว (ostioles) และวงแหวนที่ล้อมรอบช่องเปิดของอวัยวะขับถ่าย (anal ring) เพื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละชนิด ในบางชนิดจำเป็นต้องย้อมตัวอย่าง (voucher specimens) จากพิพิธภัณฑ์หรือหน่วยงานอื่นๆจากต่างประเทศเพื่อเปรียบเทียบโดยเฉพาะ หลังจากนั้นจึงนำข้อมูลต่างๆที่ได้รวบรวมจัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิดของเพื่อย้อมสีในรากเกล็ดในวงศ์ย่อยนี้ โดยในแนวทางวินิจฉัยจะมีทั้งข้อมูลสัณฐานวิทยาที่ใช้จำแนกเพื่อย้อมสีในรากในรากจนถึงระดับชนิด และยังมีข้อมูลการแพร่กระจาย พืชอาศัย และแมลงศัตรูธรรมชาติที่พบจากการสำรวจ

6. การบันทึกรายละเอียดบนแผ่นสไลด์ที่อบแห้งแล้วโดยวางแผ่นสไลด์หันด้านหัวของเพื่อย้อมสีในรากเข้าหาตัว ด้านขวาเขียนรายละเอียดเกี่ยวกับพืชอาหาร วัน เดือน ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บ

ตัวอย่าง ด้านซ้ายมือเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ เพศ วันเดือนปี ที่ทำสไลด์และชื่อผู้จำแนก ควรลงรายละเอียดดังกล่าวเป็นภาษาอังกฤษ

7. จัดเก็บตัวอย่างเพื่อย้ายแบ่งในรากในกล่องใส่สไลด์ถาวรและนำเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามหลักสากล และจัดทำบาร์โค้ด (bar code) ของตัวอย่างเพื่อย้ายแบ่งในรากแต่สไลด์เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการอ้างอิงทางวิทยาศาสตร์ต่อไป

เวลาสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2561 ถึง เดือนกันยายน 2563

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

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพื่อย้ายแบ่งในรากเกสต์ วงศ์ Rhizoecidae จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในพื้นที่เขตภาคกลางได้แก่จังหวัด สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัดนครราชสีมา มหาสารคาม ขอนแก่น อุดรธานีหนองคาย มุกดาหาร สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร และอุบลราชธานี เขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และลำปาง และภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด จากแปลงปลูกไม้ผลต่าง ๆ เช่น ทุเรียน มังคุด มะม่วง น้อยหน่า เป็นต้น พืชผักสวนครัว เช่น ชিং ข่า เป็นต้น ไม้ดอกและไม้ประดับ เช่น ปทุมมา ชวนชม ลั่นมังกกร เป็นต้น นำตัวอย่างที่รวบรวมได้มาทำสไลด์ถาวรและตรวจจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จากการตรวจจำแนกชนิดตัวอย่างเพื่อย้ายแบ่งในราก จำนวน 150 ตัวอย่าง พบว่า เป็นเพื่อย้ายแบ่งในรากใน วงศ์ Rhizoecidae จำนวน 60 ตัวอย่าง และสามารถจำแนกได้ 3 ชนิด ได้แก่ 1. *Rhizoecus americanus* (Williams) 2. *Rhizoecus saintpanliae* Williams และ 3. *Rhizoecus* sp. ซึ่งพบในหัวปทุมมา รากลั่นมังกกรแคระ รากงาช้าง และรากชวนชม นอกจากนี้ยังได้ตัวอย่างเพื่อย้ายแบ่งที่พบในรากของต้นผักบุ้ง จ. มหาสารคาม จำนวน 20 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทำสไลด์เพื่อตรวจสอบชนิดพบว่า เป็นเพื่อย้ายแบ่งสับปะรดสีชมพู *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ เพื่อย้ายแบ่ง *Formicococcus* sp. ที่พบในรากต้นมะม่วง จ. เชียงใหม่ จำนวน 70 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเพื่อย้ายแบ่งที่อาศัยในราก ที่อยู่ในวงศ์ Pseudococcidae

เนื่องจากเพื่อย้ายแบ่งในราก เมื่อสำรวจพบตัวอย่างต้องนำมาทำสไลด์เพื่อจำแนกตัวอย่างก่อนระบุลักษณะของวงศ์ ประกอบกับเพื่อย้ายแบ่งในราก วงศ์ Rhizoecidae มีขนาดเล็ก และจากตัวอย่างที่พบมีจำนวนประชากรค่อนข้างน้อย ประมาณ 1-5 ตัวต่อจุดที่พบ ทำให้รวมรวบตัวอย่างได้น้อยกว่ากว่าเพื่อย้ายแบ่งในวงศ์ Pseudococcidae และส่วนใหญ่พืชที่มีเพื่อย้ายแบ่งในรากอาศัยอยู่ หากมีปริมาณ

ไม่มาก จะไม่มีลักษณะอาการบ่งชี้ถึงความผิดปกติ จนกว่าจะมีการระบาดที่หนาแน่นทำให้การเก็บตัวอย่างมีความยากลำบากต้องใช้การสุ่ม และเก็บตัวอย่างดินปริมาณรากเพื่อนำไปแยกแมลงโดยใช้ Berlese funnel เพื่อช่วยในการแยกแมลงจากชั้นดิน ซึ่งพบว่าตัวอย่างดินจากแปลงไม้ผลที่ทำการการสุ่ม ไม่พบตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากน้อย การศึกษานี้จะต้องดำเนินต่อไปในปี 2564 โดยสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่าง จากแหล่งปลูกพืชอื่นๆ ทั้ง ผัก ไม้ดอกไม้ประดับ พืชไร่ และไม้ผลในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และจัดทำแนวทางวินิจฉัย พร้อมบันทึกรายละเอียดของเพลี้ยแป้งในรากแต่ละชนิด และจัดเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษานุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2563 พบว่าเป็นเพลี้ยแป้งในราก วงศ์ Rhizoecidae และสามารถจำแนกได้จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ 1. *Rhizoecus americanus* (Williams) 2. *Rhizoecus saintpanliae* Williams และ 3. *Rhizoecus* sp. ซึ่งการเก็บรวบรวมตัวอย่าง จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในพื้นที่เขตภาคกลางได้แก่ จังหวัด สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี ลพบุรี สระบุรี เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด นครราชสีมา มหาสารคาม ขอนแก่น อุดรธานี หนองคาย มุกดาหาร สุรินทร์ ศรีสะเกษ ยโสธร และ อุบลราชธานี เขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ และลำปาง และภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัด จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ตราด จากแปลงปลูกไม้ผลต่าง ๆ เช่น ทูเรียน มังคุด มะม่วง น้อยหน่า เป็นต้น พืชผักสวนครัว เช่น ขิง ข่า เป็นต้น ไม้ดอกและไม้ประดับ เช่น ปทุมมา ชวนชม ลั่นทม เป็นต้น และ ตัวอย่างเพลี้ยแป้งในรากบางชนิดยังอยู่ในขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยร่วมกับผู้เชี่ยวชาญในต่างประเทศ ซึ่งการศึกษานี้ยังไม่สิ้นสุดจะต้องดำเนินการต่อไปในปี 2564

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ข้าราชการ และลูกจ้างกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ในการเก็บและเตรียมตัวอย่างทั้งในภาคสนามและห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

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

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.



Figure 1 *Rhizoecus americanus* (Williams)



Figure 2 *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell)

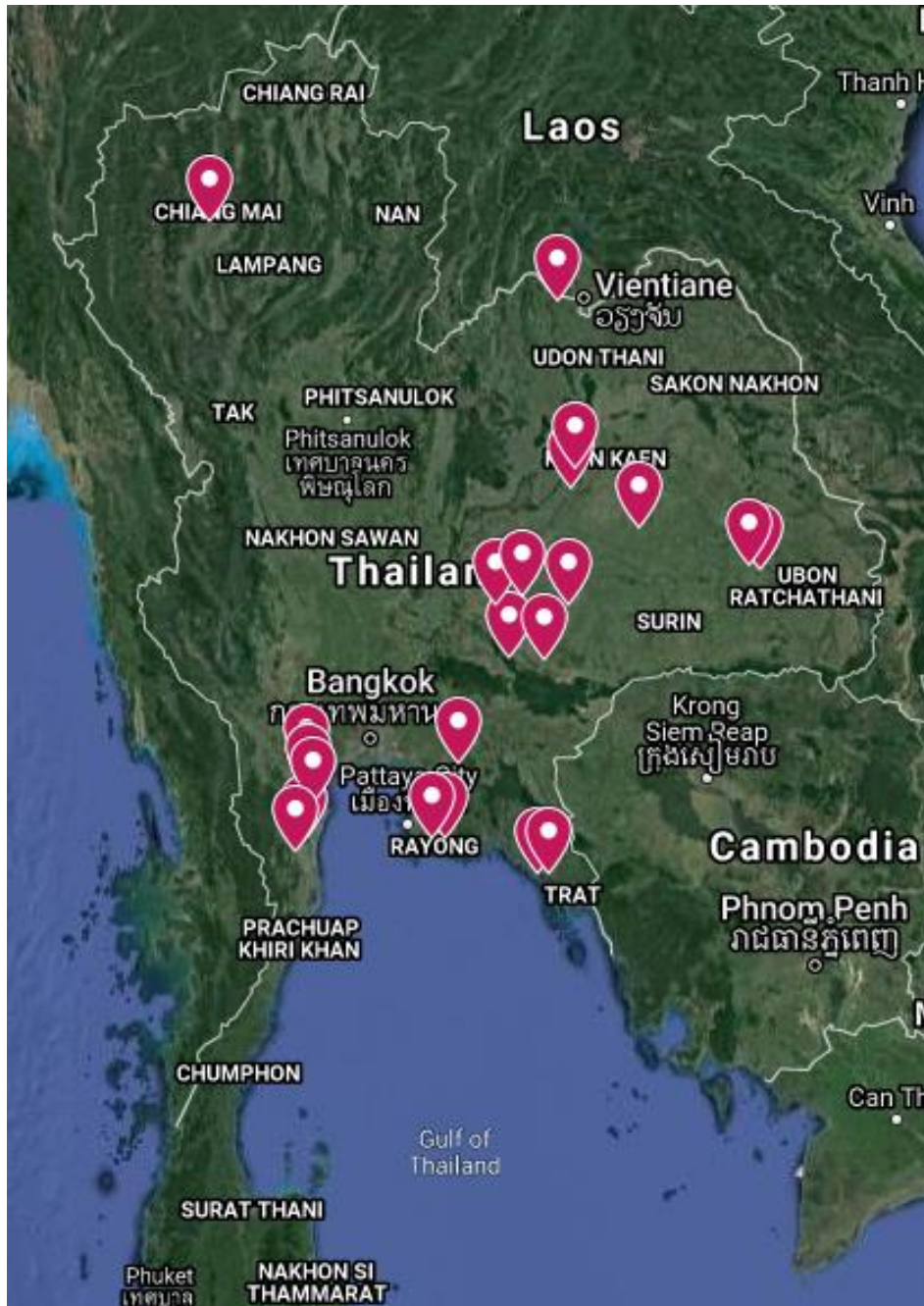


Figure 3 Survey plots of root mealybug in some part of Thailand

อนุกรมวิธานและความหลากหลายชนิดของแตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวนวงศ์
 Pentatomidae ศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย
 Taxonomic Study and Species Richness of Egg Parasitoids Attacking True
 Bugs (Pentatomidae) Economically Important Pests of Thailand

จารุวัฒน์ แตกกุล ยวรินทร์ บุญทบ สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ
 อธิธิพล บรรณาการ เกศสุดา สนศิริ อาทิตย์ รักกลีกร
 จอมสุรางค์ ดวงธิดาร สิริศิริโรตม แก้วสวัสดิ์
 กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ปัจจุบันมีรายงานการระบาดของอย่างรุนแรงของมวนชนิดหนึ่ง ชื่อว่า Brown Marmorated Stink Bug (BMSB), *Halyomorpha halys* (Stål) วงศ์ Pentatomidae ระบาดในทวีปอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้รวมถึงยุโรป ปัจจุบันเป็นศัตรูพืชเฝ้าระวังที่สำคัญของประเทศไทย อย่างไรก็ตามหากมีการระบาดของมวนชนิดนี้ประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลของศัตรูธรรมชาติของมวนศัตรูพืชในวงศ์นี้ การศึกษาครั้งนี้ นอกจากเป็นการเตรียมรับมือภัยพิบัติทางธรรมชาติที่อาจเกิดขึ้นยังเป็นการศึกษาชนิดของศัตรูธรรมชาติ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานอ้างอิงเพื่อผลิตขยายเป็นชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ของประเทศอีกด้วย จากการศึกษาตัวอย่างแตนเบียนไข่มวนที่มีอยู่ในพิพิธภัณฑ์แมลง พบว่ามีทั้งสิ้น 1 วงศ์ ได้แก่ Platygastriidae (Platygastroidea; Hymenoptera) จำนวน 50 ตัวอย่าง ได้แก่สกุล *Trissolcus* และสกุล *Telenomus* ซึ่งเป็นแตนเบียนไข่สกุลที่สำคัญในแมลงกลุ่มมวน นอกจากนี้ได้ดำเนินการวางกับดักผ้ามุ้ง (Malaise Trap) ในแหล่งที่มีการปลูกไม้ผลและแหล่งปลูกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่เคยมีการระบาดของมวนในเขตพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หลังจากวางกับดักดำเนินการเก็บตัวอย่างจากกับดักสัปดาห์ละ 1 ครั้งจำนวน 3 สัปดาห์ นอกจากนี้วางกับดักแบบถ้วยสีเหลือง Yellow Pan Trap (YPT) หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บได้ศึกษาลักษณะด้านอนุกรมวิธานและวินิจฉัยชนิด ได้ตัวอย่างแตนเบียนไข่มวนวงศ์ย่อย Telenominae และ Scelioninae (Platygastriidae, Hymenoptera) จำนวน

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-19-62

200 ตัวอย่าง ดำเนินการจัดหมวดหมู่เบื้องต้นพบแตนเบียนไข่ม้วน 10 สกุล 3 ชนิด ได้แก่ *Trissolcus basalis* (Wollaston), *Trissolcus japonicus* (Ashmead), *Trissolcus thyantae* Ashmead, *Gryon* sp., *Telenomus* sp., *Idris* sp. *Calliscelio* sp., *Scelio* sp., *Psix* sp., *Phanuromyia* sp., *Trichoteleia* sp. และ *Macroteleia* sp.

คำหลัก: แแตนเบียนไข่ม้วน, วงศ์ Platygastriidae, สกุล *Trissolcus*, การควบคุมโดยชีววิธี, ความหลากหลายทางชีวภาพ

คำนำ

แมลงศัตรูพืชในกลุ่มมวน (Pentatomidae) เป็นแมลงกลุ่มหนึ่งที่คนส่วนใหญ่มองข้ามถึงแม้ว่ามีความสำคัญทางการเกษตรและเคยมีการระบาดทำความเสียหายในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด อาทิการระบาดของแมงแกงหรือมวนลำไยในเขตภาคเหนือ ซึ่งในทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย มีความสามารถเข้าทำลายได้ทั้งลำไยและลิ้นจี่ การระบาดพบประจำทุกปีในช่วงที่ลำไยและลิ้นจี่ออกดอกติดผล (กองกัญและสัตววิทยา, 2542) การระบาดของมวนเขียวข้าวซึ่งนอกจากข้าวแล้วยังเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของงั่วเหลืองและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอีกหลายชนิด ในถั่วเหลืองทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากทุกส่วนของพืช ทำให้ลำต้นเป็นจุดสีดำฝักอ่อนที่ถูกทำลายลีบและร่วงหล่นส่วนฝักแก่ที่ยังไม่แห้งเมล็ดจะเป็นจุดสีดำ เมล็ดไม่เจริญเติบโตและฝักลีบ 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* ในประเทศสหรัฐอเมริกามวนชนิดนี้ถูกสำรวจพบครั้งแรกประมาณ กลางทศวรรษ 1990 ในรัฐเพนซิลเวเนีย ในปัจจุบัน BMSB ระบาดอย่างรุนแรงในประเทศอเมริกา พบว่าระบาดหนักถึง 38 รัฐและรวมถึงกรุง

วอชิงตัน ดี ซี (Leskey *et al.*, 2012) และยังพบว่าเป็นศัตรูต่างถิ่นรุกรานในประเทศ สหพันธรัฐสวิส (Wermelinger *et al.*, 2008) และแคนาดา (Fogain & Graff 2011) แมลงชนิดนี้เข้าทำลายผลิตผลทางการเกษตรได้ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ตัวเมียวางไข่ได้ประมาณ 28 ฟองต่อกลุ่มไข่โดยวางไข่อยู่ในใบพืช ทั้งนี้ปริมาณการวางไข่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ไข่ใช้เวลาฟัก 3 – 4 วัน ตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยมีทั้งสิ้น 5 ระยะ ในเขตร้อนชื้นแถบทวีปเอเชียมวน BMSB มี 1 ชั่วโมงอายุในช่วงระยะเวลา 1 ปี อย่างไรก็ตามในเขตร้อน (sub-tropical) มวนชนิดนี้สามารถขยายพันธุ์ได้ถึง 2 ชั่วโมงอายุ (Fujiie, 1985) และยังมีรายงานว่าสามารถขยายพันธุ์ได้สูงถึง 5 – 6 ชั่วโมงอายุทางตอนใต้ของประเทศจีน (Hoffmann, 1931) ศัตรูธรรมชาติของ BMSB มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด

ทั้งนี้ยังไม่พบการระบาดของรุนแรงของ 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 ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาอย่างจริงจังเกี่ยวกับมวนศัตรูพืช BMSB และศัตรูธรรมชาติในประเทศไทย

Hymenoptera เป็นอันดับของแมลงในกลุ่ม ผีเสื้อ ต่อ แตน และ มด จัดว่าเป็นแมลงกลุ่มที่มีความสำคัญมากที่สุดในกลุ่มที่มีประโยชน์ ความหลากหลายชนิดของแมลงในกลุ่มนี้มีมากกว่า 115,000 ชนิด (LaSalle & Gauld, 1993) จากการศึกษาถึงสายวิวัฒนาการ (phylogenetic position) พบว่า Hymenoptera มีความสัมพันธ์มากที่สุด กับกลุ่มแมลงที่มีการเจริญเติบโตแบบสมบูรณ์ complete methamorphosis หรือ holometabola (Sharkey, 2007; Savard *et al.*, 2006) อันดับ Hymenoptera แบ่งเป็น 2 กลุ่มหลักได้แก่ กลุ่มกินพืช หรือที่เรียกว่ากลุ่มparaphyletic 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 Ga uld, 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 แต่ยังมีแตนเบียนไข่อีกหลายชนิดที่อยู่ในธรรมชาติที่ยังไม่มีการค้นพบและศึกษา 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 วงศ์ย่อย และมีความหลากหลายชนิดดังต่อไปนี้ 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. กักตักแมลง Yellow pan trap, Malaise trap, Slam trap รวมทั้งสวิงจับแมลง
2. ethanol ความเข้มข้น 95% เพื่อใช้ในการจัดเก็บตัวอย่างสดของแมลง

3. กระจกคุณภาพสูง (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
- ภาคตะวันออกและภาคกลางได้แก่จังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด ลพบุรี นครสวรรค์ อุทัยธานี สิงห์บุรี อยุธยา ชัยนาท สุพรรณบุรี ในพืชสวนเศรษฐกิจอื่นๆ เช่นเงาะ ลองกอง ทุเรียน รวมถึงไม้ดอกไม้ประดับ และพืชผัก จำนวน 15 แปลง
- ภาคใต้ได้แก่จังหวัด ชุมพร ระนอง พังงา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ตรัง สงขลา จำนวน 10 แปลงในไม้ผล เช่น มังคุด ทุเรียน ลองกอง มะพร้าว
- ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่จังหวัด 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 สวิงโอบแมลง Yellow Pan Traps (YPT), Malaise trap และ Slam trap. การใช้ YPT จะทำการเก็บแมลงทุกวันโดยทิ้งระยะเวลา 24 ชั่วโมงโดยวางกับดักเวลา 08:00 นาฬิกา และทำการเก็บแมลงในช่วงเช้าวันถัดไป ระหว่างเวลา 09:00 – 10:00 นาฬิกา และวางกับดัก Malaise trap และ Slam trap สามารถเว้น

ระยะเวลา 5-10 วัน นำแมลงออกจากกับดักโดยใช้ ตาข่ายความละเอียดพิเศษ (fine-mesh aquarium net) สำหรับการเก็บตัวอย่างในแต่ละจุดทำการบันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์(GPS) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตลอดถึงเทคนิคที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง รวมถึงบันทึกลักษณะทางชีววิทยานิเวศวิทยาเบื้องต้นของมวลศัตรูพืชที่แตนเบียนไข่เข้าทำลาย ตัวอย่างจะถูกเก็บในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% หลังจากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอเพื่อเตรียมทำตัวอย่างแห้ง หรือรอไว้เพื่องานวิจัยทางด้านสกัด ดี เอ็น เอ ต่อไป

การจัดจำแนกโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

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

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการทดลอง

ลักษณะและคำศัพท์ทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการทดลอง: 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. ลักษณะทางสัณฐานวิทยานอกจากนี้อ้างอิงจาก Masner (1980) และ Mikó *et al.* (2007).

การลงทะเบียนและระบบฐานข้อมูลแตนเบียนไข่ในประเทศไทย

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 รูปแบบการเขียนตีพิมพ์

ผลงานวิจัย (taxonomic description) ดำเนินการตามแบบมาตรฐานของ Pyle *et al.* (2008) และ Johnson *et al.* (2008) ตัวอย่างแมลงทั้งหมดจะถูกเก็บรวบรวม พร้อมทั้ง ลงบันทึกเขตการแพร่กระจาย แหล่งที่เก็บ แมลงอาศัย ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

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

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

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

เก็บรักษาตัวอย่างแมลงทั้งตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ณ พิพิธภัณฑ์แมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

เวลาและสถานที่สถานที่

เก็บรวบรวมตัวอย่างแตนเบียนไขของมวนวงศ์ Pentatomidae ในพื้นที่ที่มีการระบาดหรือเคยมีการระบาดของมวนกลุ่มนี้ รวมถึงพื้นที่ป่าหรือพื้นที่ใกล้เคียงแหล่งเกษตรกรรม โดยมีแผนการดำเนินการดังนี้

- ปี 2562 ดำเนินการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ภาคเหนือ จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน เป็นต้น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่จังหวัด นครราชสีมา อุตรดิตถ์ สกลนคร กาฬสินธุ์ ขอนแก่น หนองบัวลำภู ยโสธร 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

การตรวจวินิจฉัยจัดหมวดหมู่ของแตนเบียนไขของมวนวงศ์ Pentatomidae ดำเนินการ ณ พิพิธภัณฑ์แมลงและห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

หมายเหตุ: ทุกขั้นตอนในการดำเนินการ วิธีการทำการทดลองเหมือนกันในแต่ละปี

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ศึกษาตัวอย่างแตนเบียนไข่มวนที่มีอยู่ในพิพิธภัณฑ์แมลง พบว่ามีทั้งสิ้น 1 วงศ์ ได้แก่ Platygastriidae (Platygastroidea; Hymenoptera) จำนวน 50 ตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นสกุล *Trissolcus* และสกุล *Telenomus* ซึ่งเป็นแตนเบียนไข่มวนที่สำคัญในแมลงกลุ่มมวน นอกจากนี้ได้ดำเนินการวางกับดักผ้ามุ้ง (Malaise Trap) ในแหล่งที่มีการปลูกไม้ผลและแหล่งปลูกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญที่เคยมีการระบาดของมวน ในเขตพื้นที่ภาคกลางได้แก่จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ราชบุรี ปราณบุรี นครนายก และนครสวรรค์ ดำเนินการเก็บตัวอย่างจากกับดักสัปดาห์ละ 1 ครั้งจำนวน 3 สัปดาห์ ได้ตัวอย่างแตนเบียนไข่มวน วงศ์ย่อย Telenominae และ Scelioninae (Platygastriidae, Hymenoptera) นอกจากนี้วางกับดักแบบถ้วยสีเหลือง Yellow Pan Trap (YPT) หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เก็บได้ศึกษาลักษณะด้านอนุกรมวิธานและวินิจฉัยชนิด ได้ตัวอย่างแตนเบียนไข่มวน วงศ์ย่อย Telenominae และ Scelioninae (Platygastriidae, Hymenoptera) จำนวน 200 ตัวอย่าง ดำเนินการจัดหมวดหมู่เบื้องต้นพบแตนเบียนไข่มวน 10 สกุล 3 ชนิด ได้แก่ *Trissolcus basalis* (Wollaston), *Trissolcus japonicus* (Ashmead), *Trissolcus thyantae* Ashmead, *Gryon* sp., *Telenomus* sp., *Idris* sp., *Calliscelio* sp., *Scelio* sp., *Psix* sp., *Phanuromyia* sp., *Trichoteleia* sp. และ *Macroteleia* sp. (Figure 3 – 8) ดำเนินการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญของแตนเบียนไข่มวน โดยเฉพาะในสกุล *Trissolcus* (Figures 1 – 2) และดำเนินการวัดขนาดถ่ายภาพตามกระบวนการศึกษาด้านอนุกรมวิธานแมลง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการทดลองในปัจจุบันพบแตนเบียนไข่มวนทั้งสิ้น 10 สกุล 3 ชนิด ได้แก่ *Trissolcus basalis* (Wollaston), *Trissolcus japonicus* (Ashmead), *Trissolcus thyantae* Ashmead, *Gryon* sp., *Telenomus* sp., *Idris* sp., *Calliscelio* sp., *Scelio* sp., *Psix* sp., *Phanuromyia* sp., *Trichoteleia* sp. และ *Macroteleia* sp. ซึ่งผลจากการทดลองสามารถนำมาพัฒนาต่อยอดได้หลังจากทราบชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ของแตนเบียนไข่มวนที่ถูกต้อง เพราะฉะนั้นเห็นได้ว่าการทราบชื่อชนิดที่ถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์สามารถพัฒนาต่อยอดและใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากการทดลองเมื่อได้ชนิดของแตนเบียนไข่มวนที่เข้าทำลายแมลงในกลุ่มมวนวงศ์ Pentatomidae ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะถูกเก็บเป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้เป็นประโยชน์ในอนาคต เช่นการศึกษาประสิทธิภาพการเข้าทำลายเหยื่อ ผลิตขยายเป็นชีวภัณฑ์ใหม่ ได้ตัวอย่างแตนเบียนไข่มวนในพิพิธภัณฑ์แมลงทั้งตัวอย่างสดและ

ตัวอย่างหนึ่ง ซึ่งนอกจากใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงสำหรับการเทียบหาชื่อวิทยาศาสตร์ ทั้งนี้ตัวอย่างสดที่ได้สามารถใช้ประกอบในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแตนเบียนไข่ โดยใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลในอนาคต ตัวอย่างแตนเบียนไข่ในสกุลที่ยังไม่วินิจฉัยจำแนกชนิด จะถูกเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง เพื่อนักอนุกรมวิธานทั่วทุกมุมโลก ที่วิจัยในสกุลนั้นๆ ยืมตัวอย่างเพื่อการศึกษาวิจัยในอนาคต ในกรณีที่มีการระบาดของมวนศัตรูพืช ข้อมูลเหล่านี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี ทั้งการพัฒนาแตนเบียนไข่สายพันธุ์ท้องถิ่นหรือการนำเข้าจากต่างประเทศ ได้ฐานข้อมูลสากลที่สมบูรณ์ ทั้งนี้อาจได้แมลงชนิดใหม่ศัตรูธรรมชาติที่เข้าทำลายมวนในวงศ์ Pentatomidae ถ่ายทอดองค์ความรู้ที่ได้สู่นักชีววิทยา งานทางด้าน การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีสามารถนำฐานข้อมูลดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต

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: Proctotrupeoidea). *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.
- 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: Labroidei: 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 กรมวิชาการเกษตร. 145 หน้า

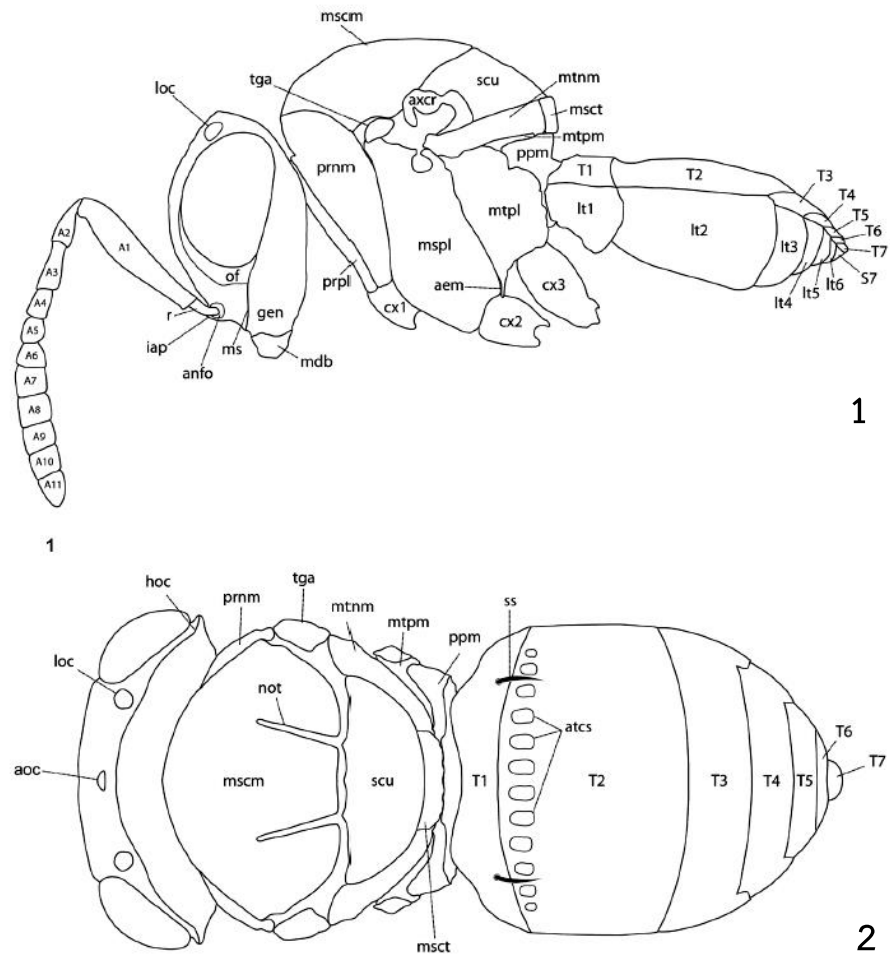


Figure 1. Morphological characters of *Trissolcus* sp.; 1, Dorsal habitus; 2, Lateral habitus

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

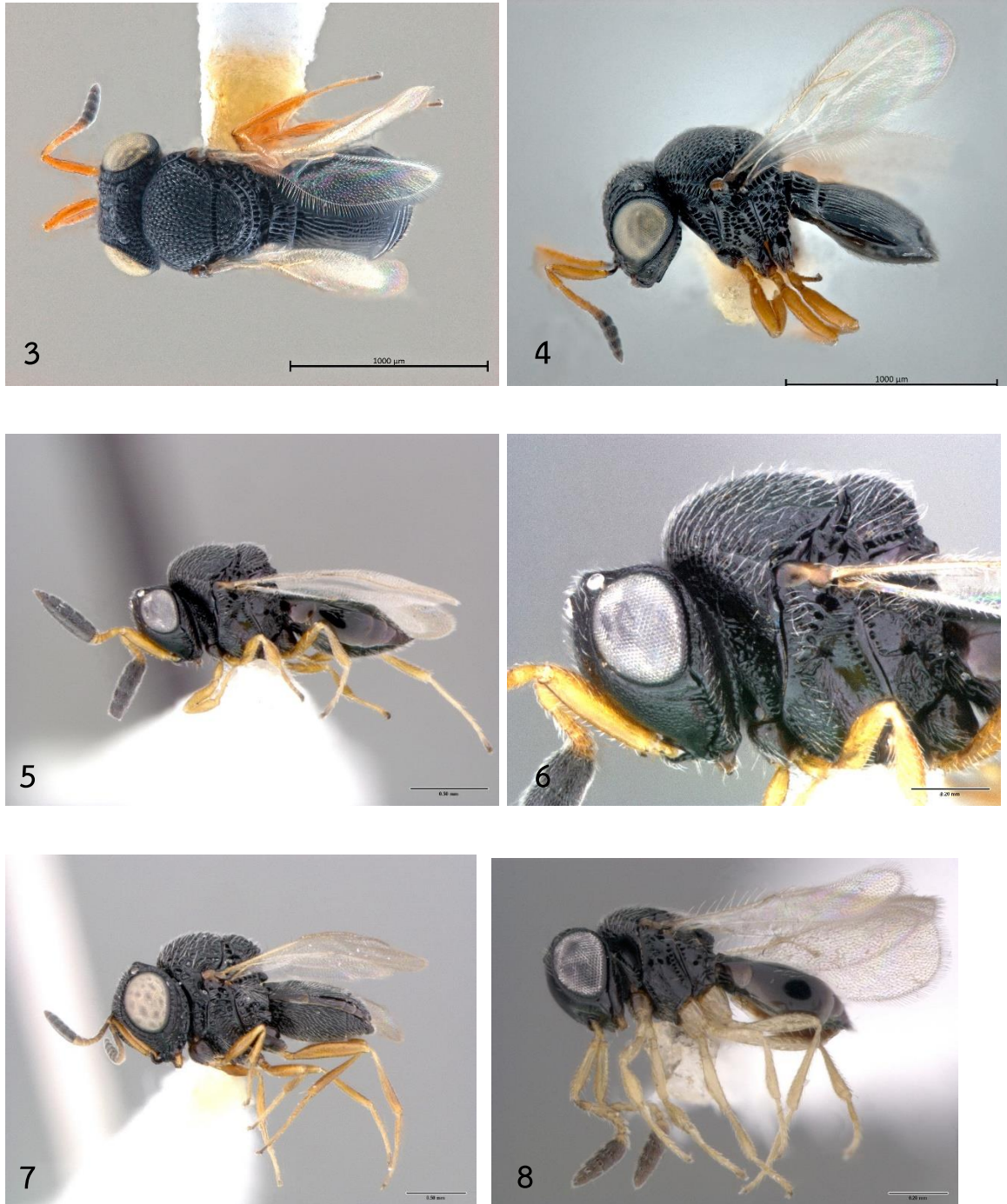


Figure 3–8 Identification process to genera level; 3, *Psix* sp. dorsal view; 4, *Psix* sp. lateral view; 5, *Trissolcus* sp. lateral view; 6, *Trissolcus* sp. lateral mesosoma; 7, *Gryon* sp. lateral view; 8, *Telenomus* lateral view

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

พลอยชมพู กรวิภาสเรือง^{1/} พิเชฐ เขาวนัวัฒนวงศ์^{2/}
วิมลวรรณ โชติวงศ์^{1/} อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล^{1/} อทิตยา แก้วประดิษฐ์^{1/}
^{1/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/}ผู้เชี่ยวชาญด้านศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการสำรวจไรขาวในพื้นที่ 30 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพฯ นครนายก ปทุมธานี นครปฐม ราชบุรี ชลบุรี ระยอง สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ชัยนาท กำแพงเพชร พิจิตร เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน น่าน อุตรธานี อุบลราชธานีหนองคาย อ่างทอง นครศรีธรรมราช สกลนคร สุรินทร์ ชัยภูมิ ระนอง ชุมพร สุราษฎร์ธานี สตูล พัทลุง ภูเก็ต สงขลา และปัตตานี พบไร 8 ชนิด 2 วงศ์ เป็นไรศัตรูพืช 7 ชนิด ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ได้แก่ไรขาวพริก *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) พบเข้าทำลายใบอ่อนพริก มันฝรั่ง มะเขือยาว *Polyphagotarsonemus* sp. พบเข้าทำลายบนใบพริก ไม่พบตัวผู้ในการจำแนกจึงจำแนกได้ในระดับสกุล ไรขาวภายในข้าวผลมะพร้าวพบจำนวน 3 ชนิดคือ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, *Steneotarsonemus* sp. และ *Nasutitarsonemus* sp. โดยพบว่าไรขาวบนผลมะพร้าว *Steneotarsonemus furcatus* De Leon เป็นชนิดที่มีความสำคัญ พบบ่อยและแสดงอาการเข้าทำลายชัดเจน ทำให้เกิดเป็นแผลแข็งสีน้ำตาลบนผลมะพร้าว บางลูกบิดเบี้ยวและเล็กสืบ ในใบข้าวพบไร 1 ชนิดมีชื่อว่า *Steneotarsonemus spinki* สำหรับไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) พบภายในข้าวผลมะพร้าว โดยพบร่วมกับไร *S. furcatus* และไม่สามารถจำแนกได้ 1 ชนิดพบบนข้าวผลมะพร้าว สับปะรด และพริก เนื่องจากเป็นตัวอ่อน

คำหลัก: ไรศัตรูพืช ไรขาว ไรขาวพริก

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-21-62

คำนำ

ไรขา (tarsonemid mite) อยู่ในวงศ์ Tarsonemidae มีถิ่นอาศัยอยู่กว้างขวาง เช่น กินเชื้อรา กินสาหร่าย กินพืช เป็นตัวห้ำของไรชนิดอื่น เป็นตัวเบียนในแมลง แบบพึ่งพาอาศัยกันกับแมลง และเป็นศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ไรขาเป็นไรที่มีขนาดเล็กกรองลงมาจากรีซ่า มีสีขาใส แผ่นหลังนูน รูปรี กลม หรือลำตัวยาว ขึ้นอยู่กับชนิดของไร โดยมากแล้วตัวผู้จะมีขนาดเล็กกว่าตัวเมีย อย่างไม่เห็นได้ชัด ไรขามีรายงานทั่วโลก 529 ชนิด 40 สกุล (Lin and Zhang, 2002) ไรขาในวงศ์ Tarsonemidae เป็นไร พบเข้าทำลายพืชทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพไร่ เช่น ไรขา *Polyphagotarsonemus latus* Banks มีรายงานแพร่กระจายทั่วโลกถึง 124 ประเทศ บนพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากถึง 34 ชนิด เช่น ส้ม มะนาว มะม่วง องุ่น กาแฟ เป็นต้น (CABI, 2018) นอกจากนี้มีรายงานพบไรขา *Steneotarsonemus spinki* Smiley เป็นศัตรูที่สำคัญในข้าว *Tarsonemus myceliophagus* เป็นไรขาที่พบเข้าทำลายเห็ดหลายชนิด (Cho, 2013) *Phytonemus pallidus* เป็นศัตรูที่สำคัญในสตรอเบอรี่ และไม้ดอกหลายชนิดในโรงเรือน (Zhang, 2003) ชนิดที่มีความสำคัญเข้าทำลายพืชไปทั่วโลก เช่น *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) เข้าทำลายพริก ถั่ว ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เต้า มะเขือเทศ แตงกวา และพืชอื่น ๆ อีกมากมาย ในหลาย ๆ ประเทศ เช่น ประเทศบราซิล ออสเตรเลีย อินเดีย ญี่ปุ่น เกาหลี (Lin and Zhang., 2002; Venzon et al, 2008) *Tarsonemus setifer* Ewing เป็นไรขาที่มีเขตการแพร่กระจายไปในหลาย ๆ ทวีปเช่น ในทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ บนพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น ทับทิม สตรอเบอรี่ ท้อ องุ่น กุหลาบ ไม้ blackberry dewberry raspberry และพืชอื่นอีกหลายชนิด *Tarsonemus smithi* Ewing มีรายงานพบในแอปเปิล ส้ม ท้อ พลัม มะเขือเทศ และไม้ดอกพวกเบญจมาศ โดยมีรายงานพบในประเทศโปรตุเกส เวอจีเนีย และสหรัฐอเมริกา (Jepson et al., 1975) *Phytonemus pallidus* (Zimmerman) เป็นไรศัตรูที่สำคัญในสตรอเบอรี่ในยุโรปและอเมริกาเหนือ (Fountain et al., 2010), *Steneotarsonemus concavuscutum* Lofego and Gondim เป็นไรขาที่รายงานการเข้าทำลายในข้าวผลมะพร้าวขนาดเล็กที่ประเทศบราซิล (Lofego and Gondim, 2006) ในประเทศจีนมีรายงานการพบไรขาทั้งหมด 93 ชนิด 15 สกุล (Lin and Zhang, 1999) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบไรขาอยู่ 7 ชนิด 4 สกุล ในขณะที่ทั่วโลกมีรายงานการพบมากถึง 529 ชนิด (Lin and Zhang, 2002) ได้แก่ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Baker, 1975) ไรชนิดนี้พบดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณใบอ่อน หรือยอดที่แตกใหม่ และทำให้ใบหงิก ขอบใบม้วนลง ยอดอ่อนแตกเป็นฝอย ก้านใบยืดออก ใบเรียวเล็ก ทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต และมีรายงานเข้าทำลายพืชปลูกได้หลายชนิด เช่น ส้มโอ ชา พริก ฝ้าย ปอกระเจา บวบ ถั่วเขียว โหระพา มันฝรั่ง มะม่วง และไม้ดอกหลายชนิด เช่น เยอบีร่า เบญจมาศ ไชคลาเมน (วัฒนาและคณะ, 2543) *Steneotarsonemus spinki* Smiley และ *Steneotarsonemus oryzae* พบในนาข้าว (พิเชษฐและคณะ, 2548; Wongsiri, 1991; Charanasri et al., 1977; Kongchuensin et al., 2005), *Tarsonemus cryptocephalus* (Ewing) พบในกล้วยไม้ (วัฒนาและคณะ 2526), *Tarsonemus weitei* Banks พบในองุ่น ส่วนอีก 2 ชนิดคือ

Hemitarsonemus sp. และ *Tarsonemus* sp. พบในลันจี้ และองุ่น ตามลำดับ (วัฒนาและมานิตา, 2533; วัฒนาและคณะ, 2535; พิเชฐและคณะ, 2548)

เนื่องจากไรขาเป็นไรที่มีขนาดเล็กมากการใช้กล้องจุลทรรศน์ในการจำแนกชนิด ในอดีตเทคโนโลยีของกล้องยังไม่ทันสมัย ไม่สามารถที่จะส่องดูลักษณะที่สำคัญของไรขาได้ และข้อจำกัดของกล้องและคู่มือการจำแนกชนิดของไรขาไม่สมบูรณ์และละเอียดมากพอ ปัจจุบันด้วยเทคโนโลยีอันทันสมัยของกล้องจุลทรรศน์ ทำให้มีคู่มือการจำแนกชนิดไรขานี้ได้อย่างละเอียด และซับซ้อนมากกว่าคู่มือเดิม ใช้ตรวจสอบและจำแนกชนิดของไรขาจากต่างประเทศที่ติดมากับส้มแมนดาริน ประเทศอเมริกา ทางด้านตรวจศัตรูพืชแหลมฉบบังพบมีชื่อว่า *Dendroptus* sp. ยังไม่สามารถจำแนกได้ถึงระดับชนิด เนื่องจากไม่พบไรตัวผู้ในตัวอย่างที่ส่งมาจำแนก แต่ไรขานี้เป็นสกุลที่ไม่มีรายงานการพบในประเทศไทยมาก่อน ดังนั้นไรขาชนิดนี้จึงอาจเป็นไรศัตรูพืชชนิดใหม่ก็ได้ จากข้อมูลตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2550 พบว่ามีไรศัตรูพืชกักกันที่เป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติอยู่ทั้งหมด 32 ชนิด เป็นไรแดงวงศ์ Tetranychidae ทั้งหมด 25 ชนิด ไรสีขาวงศ์ Eriophyidae 3 ชนิด ไรศัตรูในโรงเก็บวงศ์ Acaridae 4 ชนิด โดยไม่มีไรขาที่เป็นศัตรูพืชที่สำคัญประกาศในพระราชบัญญัตินี้เลย ดังนั้นการสำรวจไรขาในครั้งนี้ จะได้ข้อมูลที่ถูกต้องและทันสมัยเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานแจ้งให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทราบ ใช้ประกาศเพิ่มเติมถึงชนิดของไรขาที่เป็นศัตรูที่สำคัญที่ยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทย เพื่อประโยชน์ในการต่อรองเจรจาทางการค้าและเป็นการป้องกันไม่ให้มีไรขาชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจากต่างประเทศ ติดเข้ามาทำความเสียหายให้กับประเทศได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่มีอยู่แล้ว

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างไร: ได้แก่ ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ ถุงกระดาษ ปากกาเขียนแก้ว กล้องพลาสติกรักษาความเย็นขนาด 68 ควอทซ์ แวนชยาย (กำลังขยาย 20x)
2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน: ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ (stereo microscope), โคมไฟ ฟูกันเบอร์ 0 เข็มเขี่ยปลายแหลม และปลายงอ สำลีสู้บ/เครื่องอุ่นสไลด์ ตั้งอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส แป้นหมุนสำหรับฝนิกขอบสไลด์ น้ำยาฝนิกขอบสไลด์
3. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการตรวจจำแนกชนิดของไร: ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ติดอุปกรณ์วาดภาพ (camera lucida) คู่มือการจำแนกชนิด (key) สำหรับใช้จำแนกชนิดของไรศัตรูพืช
4. อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ กระดาษ ดินสอ ยางลบ ปากกา Rotring หมึกดำ กระดาษลอกลาย กระดาษเขียนแบบ

อุปกรณ์การวิจัยที่ต้องการเพิ่มเติม

1. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเก็บตัวอย่างไร ได้แก่ ถุงกระดาษ ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ
2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะชนิดของไรศัตรูพืช ได้แก่ แผ่น slide, coverglass, กล้องใส่สไลด์, สารเคมี สำหรับใช้เตรียมน้ำยาเมาท์สไลด์ สำลี น้ำยาสำหรับฝึนิกขอบสไลด์แผ่นพลาสติกเจาะรู จานแก้ว

วิธีการ

1. การเก็บและรักษาตัวอย่างไรขาว

1.1 สำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างไรในวงศ์ Tarsonemidae โดยทำการสำรวจบนใบพืชทั้งใต้ใบและบนใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติโดยเฉพาะบริเวณยอดอ่อน ผลอ่อน และดอกของพืช ซึ่งมักจะพบไรขาวเข้าทำลาย บนพืชปลูกต่าง ๆ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยสำรวจบนพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 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) จากนั้นนำตัวอย่างแช่ลงในกระตักน้ำแข็งก่อนนำกลับมาหยั่งห้องปฏิบัติการ

1.3 การทำสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereomicroscope หยด Hoyer's solution ลงบนสไลด์ 1 หยด ใช้ฟู่กันเช็ดตัวโรงบนหยดน้ำยาจัดตัวอย่างไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้ชัดเจน โดยจัดทำทางของไรขาวให้อยู่ในท่าคว่ำ และท่าตะแคงข้าง เพื่อตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ที่ใช้ในการจำแนก จากนั้นปิดสไลด์ด้วย coverglass ใช้ปากกาเขียนแก้ววงกลมล้อมรอบตัวไรทันทีหลังจากทำสไลด์เรียบร้อยแล้ว เพื่อสะดวกในการหาตัวไรได้ง่ายขึ้น นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ฝึนิกขอบ coverglass ด้วยน้ำยาทาเล็บ และปิดป้ายบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับ สถานที่เก็บ วันที่ ชื่อผู้เก็บ และพืชอาศัยที่ด้านขวามือของแผ่นสไลด์

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

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

เวลาและสถานที่

พื้นที่ปลูกผัก และไม้ผลทั่วประเทศ

กรุงเทพฯ นครนายก ปทุมธานี นครปฐม ราชบุรี ชลบุรี ระยอง สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ชัยนาท กำแพงเพชร พิจิตร เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน น่าน อุตรธานี อุบลราชธานี หนองคาย อำนาจเจริญ

นครศรีธรรมราช สกลนคร สุรินทร์ ชัยภูมิ ระนอง ชุมพร สุราษฎร์ธานี สตูล พัทลุง ภูเก็ต สงขลา และ ปัตตานี

กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจไรขาวในพื้นที่ 30 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพฯ นครนายก ปทุมธานี นครปฐม ราชบุรี ชลบุรี ระยอง สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ชัยนาท กำแพงเพชร พิจิตร เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน น่าน อุตรธานี อุบลราชธานี หนองคาย อำนาจเจริญ นครศรีธรรมราช สกลนคร สุรินทร์ ชัยภูมิ ระนอง ชุมพร สุราษฎร์ธานี สตูล พัทลุง ภูเก็ต สงขลา และปัตตานี พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 8 ชนิด เป็นไรศัตรูพืช 7 ชนิด ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ไรขาวศัตรูพืชที่พบได้แก่ *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) และ *Polyphagotarsonemus* sp. ทำให้ยอดใบพริกหึงม้วนงอ ลำตัวของไรมีสีขาวใส ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่า ตัวผู้ผอมเล็กกว่าดูแข็งแรง (Figure 2) ไรขาวที่พบบนมะพร้าวพบ 3 ชนิด ได้แก่ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon, *Steneotarsonemus* sp. และ *Nasutitarsonemus* sp. จากการสำรวจไรขาว *Steneotarsonemus furcatus* De Leon เป็นชนิดที่มีความสำคัญจะพบมากกว่าไรขาวชนิดอื่นที่พบบนในข้าวผลมะพร้าว โดยตัวอ่อนไรจะมีสีขาวย ตัวแก่มีสีขาวยอมน้ำตาล (Figure 1) ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ ตัวผู้มีขนาดเล็ก เคลื่อนไหวว่องไว ทำให้เกิดแผลนูนแข็งสีน้ำตาล ปลายแผลเรียบเป็นเส้นตรง บางลูกอาจแสดงอาการผลบิดเบี้ยว ซึ่งแตกต่างกว่าอาการที่พบบนผลมะพร้าวที่เกิดจากอาการเข้าทำลายของไรสีขามะพร้าว ที่ปลายแผลจะมีลักษณะปลายแผลแหลม ผลเล็กลีบ อีกชนิดคือ *Steneotarsonemus* sp. นอกจากจะพบในมะพร้าวแล้วยังพบในมะเขือยาว สับปะรด และมันฝรั่ง เนื่องจากไม่พบเพศผู้ในการจำแนก จึงจำแนกได้เพียงระดับสกุล ชนิดสุดท้ายที่พบได้แก่ไรขาวข้าว *Steneotarsonemus spinki* Smiley ซึ่งไรชนิดนี้เป็นไรที่มีความสำคัญในข้าว ทำให้กาบใบข้าวเป็นสีน้ำตาลไหม้ คล้ายอาการของโรค สำหรับไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) โดยพบภายในข้าวผลมะพร้าวพบร่วมด้วยกับไร *S. furcatus* และไม่สามารถจำแนกได้ 1 ชนิด พบบนข้าวผลมะพร้าว สับปะรด และพริก เนื่องจากเป็นตัวอ่อน (Table 1 และ 2)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจไรขาวในพื้นที่ 30 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพฯ นครนายก ปทุมธานี นครปฐม ราชบุรี ชลบุรี ระยอง สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ชัยนาท กำแพงเพชร พิจิตร เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน น่าน อุตรธานี อุบลราชธานี หนองคาย อำนาจเจริญ นครศรีธรรมราช สกลนคร สุรินทร์ ชัยภูมิ ระนอง ชุมพร สุราษฎร์ธานี สตูล พัทลุง ภูเก็ต สงขลา และปัตตานี พบไร 8 ชนิด 2 วงศ์ เป็นไรศัตรูพืช 7 ชนิด

ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ได้แก่ไรขาวพริก *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) พบเข้าทำลายใบอ่อนพริก มัณฑัง มะเขือยาว ไรขาวภายในข้าวผลมะพร้าวจำนวน 3 ชนิดคือ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon *Steneotarsonemus* sp. และ *Nasutitarsonemus* sp. ในใบข้าวพบไร 1 ชนิด มีชื่อว่า *Steneotarsonemus spinki* สำหรับไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) พบภายในข้าวผลมะพร้าว พบรวมด้วยกับไร *S. Furcatus*

เอกสารอ้างอิง

- พิเชษฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ 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 และมานิตา คงชื่นสิน. 2533. อนุกรมวิธานไรศัตรูส้มโอในประเทศไทย. หน้า 260-273. ใน รายงานผลงานวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2533. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร, กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- วัฒนา จารณศรี มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และฉัตรชัย ศฤงฆไพบุลย์. 2535. การศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนมะม่วงในประเทศไทย. หน้า 201-233. ใน รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2535. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร, กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- วัฒนา จารณศรี มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และพิเชษฐ เชาวน์วัฒนวงศ์. 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. Universtiy of California Press, Berkeley and Los Angeles, California. England. 614 p.
- Kongchuisin, 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.
- 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.

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
					Lat (N)	Long (E)
<i>Polyphagotarsonemus latus</i> (Banks)	Broad mite	chili	Ban Dung District, Udon Thani Province	Leaf curl	17°38.588'	103°06.464'
			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'
			Mueang District, Nakhon nayok Province		14°11.130'	101°09.875'
			Khuan Niang District, Songkhla Province		07°09.584'	100°20.076'
			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)

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
					Lat (N)	Long (E)
<i>Polyphagotarsonemus latus</i> (Banks)	Broad mite	chili	Rong Chang Sub-district, Mueang District, Phichit Province	Leaf curl	'16°26.117	'100°17.101
			Bang Kaeo Sub-district, La-un District, Ranong Province		'10°11.750	'098°43.794
			Chak Thong Building, Lat Yao, Chatuchak, 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°674'98
		potato	Ban Luang Sub-district, Chom Thong District, Chiang Mai Province		18°44.463	'98°55.022
		eggplant	Lam Hoei Sub-district, Don Tum District, Nakhon Phathom Province		13°57.467'	100°02.754'

Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand.(Continued)

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
					Lat (N)	Long (E)
<i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon	-	coconut	Lumpum Sub-district, Mueang District, Phatthalung Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	07°41.739'	100°08.634'
			Laem Son Sub-district, La-ngu District, Satun Province		06°54.707'	099°41.706'
			Pak nam Sub-district, La-ngu District, Satun Province		06°52.774'	099°41.527'
			Khon Klan Sub-district, Thung Wa District, Satun Province		06°58.892'	099°40.770'
			Tung bu Lang Sub-district, Thung Wa District, Satun Province		06°59.548'	099°40.584'
			Tung bu Lang Sub-district, Thung Wa District, Satun Province		07°01.831'	099°40.477'
			Chumpon Sub-district, Sathing Phra District, Songkla Province		07°36.007'	100°24.096'
			Thungkha Sub-district, Mueang District, Chumphon Province		10°25.651'	099°09.258'
			Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Provinc		13°28.20'	100°04.50'

Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand.(Continued)

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
					Lat (N)	Long (E)
<i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon	-	coconut	Pangpuay Sub-district, Damnoen Saduak District, Ratcha Buri Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	-	-
			Takian Tia Sub-district, Bang Lamung District, Chon Buri Province		13°00.681'	100°58.512'
			Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province		13°61.187'	100°12.244'
			Tung bu Lang Sub-district, Thung Wa District, Satun Province		07°01.864'	099°40.467'
			Nong Sam Wang Sub-district, Nong Suea District, Pathum Thani Province		14°13.800'	100°85.943'
			Mae Lan Sub-district, Mae Lan District, Pattani Province		07°48.709'	07°37.027'
			Bang Luang Sub-district, Sappaya District, Chainat Province		15°15.371'	100°18.397'

Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand.(Continued)

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
					Lat (N)	Long (E)
<i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon	-	coconut	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'
			Jompluak Sub-district, Bang Khonthi District, Samut Songkhram Province		13°28.50'	99°58.28'
			Wat Kaeo Sub-district, Bang Phae District, Ratchaburi Province		13°38.621'	99°55.164'
			Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province		13°28.20'	100°4.50'
			Chumpon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province		13°37.100'	100°07.452'
			Chumpon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province		07°36.159'	100°23.789'
			Chumpon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province		07°36.071'	100°22.881'
			Chumpon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province		07°36.007'	100°24.096'
			Ban Phaeo Sub-district Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province		13°62.477'	100°11.274'
			Mai Khao Sub-district, Thalang District, Phuket Province		08°04.303'	098°20.590'

Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand.(Continued)

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS			
					Lat (N)	Long (E)		
<i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon	-	coconut	Chak Don Sub-district, Klaeng District, Rayong Province	Scanty squarely brown patches of damaged	12°41.898'	101°38.068'		
			Wat Kaew Sub-district, Bang Phae District, Ratchaburi Province	tissue on the fruit surface	13°38.589	099°55.238		
			Koh Phangan Sub-district, Koh Phangan District, Suratthani Province		09°43.250'	099°59.291'		
			Koh Phangan Sub-district, Koh Phangan District, Suratthani Province		09°42.966'	099°59.641'		
					09°43.811'	099°59.119'		
					09°43.089'	100°00.443'		
					09°44.390'	100°00.223'		
					09°44.845'	099°58.915'		
					Chong Kham Sub-district, Mueang District, Mae Hong Son Province		19°29.726'	97°97.142'
					Lak Song Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province		13°38.298'	100°07.138'

Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand.(Continued)

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
					Lat (N)	Long (E)
<i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon	-	coconut	Wang Nam Khiao Sub-district, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	13°50.874'	100°01.328'
			Don Khoi Sub-district, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province		14°00.259'	100°02.629'
			Tawang Sub-district, Bua Chet District, Surin Province		4°00.259'	00°02.624
			Khok Mo Sub-district, Mueang District, Ratchaburi Province		14°38.569'	104°00.741'
			Jompluak Sub-district, Bang Khonthi District, Samut Songkhram Province		13°33.693'	099°50.520'
			Wa Ta Baek Sub-district, Thep Sathit District, Chaiyaphum Province		3°21.316'	99°56.704'
			Klong Noi Sub-district, Pak Phanang District, Nakhon Si Thammarat Province		13°28.50'	99°58.28'
					15°23.106'	101°25.886'
					08°22.384'	100°06.146'

Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand.(Continued)

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
					Lat (N)	Long (E)
<i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon	-	coconut	Chumpon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	07°36.159'	100°23.789'
			Phikunthong Sub-district, Mueang District, Ratchaburi Province		07°36.071'	100°22.881'
					07°36.007'	100°24.096'
		eggplant	Wiang Sa District, Nan Province	Discoloration on the inside of the leaf sheath	13°35.216'	099°53.065'
<i>Steneotarsonemus</i> sp.		potato	Nong Kwai Sub-district, Hang Dong District, Chiang Mai Province		18°74.620'	'98°91.672'
<i>Steneotarsonemus spinki</i> Smiley		rice	Nong Khon Sub-district, Mueang District, Ubon Ratchathani Province	Discoloration on the inside of the leaf sheath	13°49.297'	100°36.049'
Tarsonemidae		chili	Jumpon Sub-district, Phon Phisai District, Nong Khai Province		18°03.415'	103°06.242'
			Huai Rai Sub-district, Mueang District, Amnat Charoen Province		15°82.622'	104°67.498'
		coconut	Chom Pluak Sub-district, Bang Khonthi District, Samut Songkhram Province		13°28.50'	99°58.28'

Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand.(Continued)

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
					Lat (N)	Long (E)
Tarsonemidae		coconut	Mae Lan Sub-district, Mae Lan District, Pattani Province	Discoloration on the inside of the leaf sheath	07°48.709'	07°37.027'
			Takhian Tia Sub-district, Bang Lamung District, Chonburi Province		13°00.190'	100°59.575'
			Bang Phra Sub-district, Sriracha District, Chonburi Province		13°14.352'	100°59.292'
			Chumpon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province		07°36.007'	100°24.096'
			Kanthulei Sub-district, Thachana District, Surat Thani Province		09°40.235'	099°05.100'
			Pho Phitak Sub-district, Sappaya District, Chainat Province		15°04.451'	100°17.286'
			Chak Don Sub-district, Klaeng District, Rayong Province		12°41.898'	101°38.068'
		pineapple	Cha-am District, Phetchaburi Province	12°47.555'	099°55.603'	

Table 1 Host plants and symptoms of Tarsonemid mites in Thailand.(Continued)

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
					Lat (N)	Long (E)
<i>Polyphagotarsonemus</i> sp.		chili	Tha Khunram Sub-district, Mueang District, Kamphaeng Phet Province		16°27.015'	099°27.313'
<i>Nasutitarsonemus</i> sp.		coconut	Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province		13°28.20'	100°4.50'

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	-	-
<i>Amblyseius largoensis</i> (Muma)	<i>furcatus</i> De Leon	Saduak District, Ratcha Buri Province		

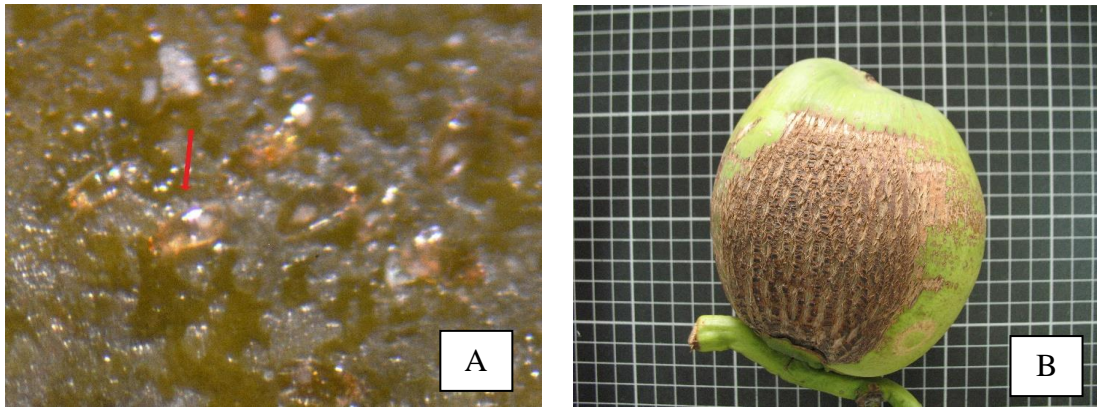


Figure 1 A. ไรขาวมะพร้าว *Steneotarsonemus furcatus* De Leon เพศเมีย
B. อาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไร

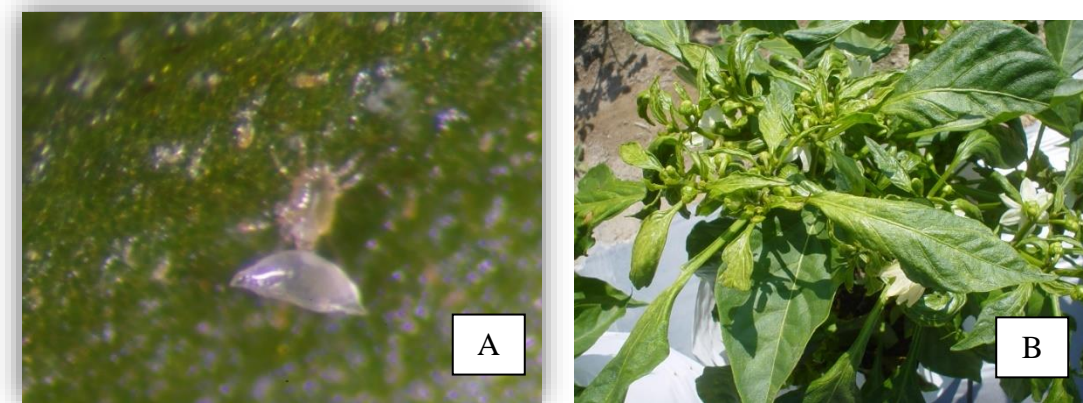


Figure 2 A. ไรขาวพริก เพศผู้ด้านบน และเพศเมีย *Polyphagotarsonemus latus* (Banks)
B. อาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไรในพริก

การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
 Identification of Entomopathogenic Nematodes in Eastern Thailand

พัชรวิพรรณ จงจิตเมตต์ สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต สาทิพย์ มาลี
 กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การจัดจำแนกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินในพื้นที่ 7 จังหวัด ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว จันทบุรี ชลบุรี ระยอง และตราด ได้ตัวอย่างดินรวมจำนวน 76 ตัวอย่าง โดยสุ่มเลือกสภาพพื้นที่ดินในป่าที่ยังไม่เคยมีการบุกรุกที่คาดว่าจะมีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จากนั้นขุดดินลึกประมาณ 15-20 เซนติเมตร เก็บดินจำนวน 2 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก มัดปากถุง และนำกลับมาทำการคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2562 ผลการคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยหนอนกินรังผึ้ง ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จากตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง ในพื้นที่ตำบลบ้านฉาง อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน PC52 ตำแหน่งพิกัดที่ x,y : 12.7520240, 101.0836820 ดินมีลักษณะนิ่ม 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 ดินมีลักษณะนิ่ม ร่วน สีดำ อุณหภูมิดิน 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) 4.89 ค่าการนำไฟฟ้าของดิน (EC (ds m⁻¹)) 0.06 ค่าอินทรีย์วัตถุในดิน (OM (%)) 0.94 และในพื้นที่ตำบลบ้านแหลมกลัด อำเภอเมืองตราด จังหวัดตราด จำนวน 1 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดิน PC64 ตำแหน่งพิกัดที่ x,y : 12.1139200, 102.7034070 ดินมีลักษณะนิ่ม ร่วน สีดำ อุณหภูมิดิน 27 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่คัดแยกได้เลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณอย่างต่อเนื่องด้วยหนอนกินรังผึ้ง แบ่งเก็บรักษาในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และเก็บในชั้นฟองน้ำสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปจัดจำแนกชนิดตามวิธีการในขั้นตอนต่อไป

คำหลัก: ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หนอนกินรังผึ้ง

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-22-62

คำนำ

การควบคุมกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี เป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมี โดยเน้นความปลอดภัยของเกษตรกร ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม ซึ่งเป็นสิ่งที่ทุกคนตระหนักถึงตลอดเวลา และงานวิจัยเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เป็นงานอีกด้านหนึ่งที่มีการศึกษาและพัฒนา ศักยภาพ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในทางการเกษตร ซึ่งเป็นที่ยอมรับและนำไปใช้กันอย่างกว้างขวางในประเทศต่างๆ ทั่วโลก ลักษณะเด่นในการเลือกใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง คือการมีชีวิตอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสภาพแวดล้อมเพื่อรอเข้าทำลายแมลง และความจำเพาะเจาะจงในการเลือกทำลายแมลงศัตรูพืชเป็นลักษณะที่บ่งชี้ได้ว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีความสามารถแตกต่างจากการใช้จุลินทรีย์อื่นๆ ดังนั้นการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดใหม่ๆ เพื่อนำมาพัฒนาศักยภาพและนำไปใช้ประโยชน์ จึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

สำหรับการใช้ประโยชน์จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในต่างประเทศประสบความสำเร็จและมีการมีพัฒนากระบวนการศึกษาและค้นคว้ากันมาตั้งแต่แรกเริ่มเมื่อปี ค.ศ. 1923 และพัฒนากันมาอย่างต่อเนื่องโดยนักวิจัยประเทศต่างๆ ทั่วโลก ตั้งแต่การค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดใหม่ๆ จนถึงการผลิตขยายและนำไส้เดือนฝอยไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ การใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในต่างประเทศเป็นที่ยอมรับจากเกษตรกรเป็นอย่างมาก มีบริษัทเอกชนหลายบริษัทที่ผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำหน่ายในรูปแบบชีวภัณฑ์ เช่น บริษัท Andermatt Biocontrol AG, สวิตเซอร์แลนด์; CropKing Inc, สหรัฐอเมริกา; Natural Insect Control, แคนาดา; E-nema, เยอรมันนี; Ecowin Co.Ltd., เกาหลีใต้ สำหรับในประเทศไทยเคยมีบริษัทเอกชนได้แก่ บริษัท แอพลายเค็ม และบริษัทยูนิซีตส์ ผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและจำหน่ายให้แก่เกษตรกรในช่วงปี 2539-2550 แต่ปัจจุบันทั้งสองบริษัทได้เลิกผลิตแล้ว เนื่องจากขาดการส่งเสริมและเผยแพร่สู่เกษตรกรอย่างต่อเนื่อง

สำหรับพืชเศรษฐกิจหลายชนิดที่ประสบปัญหาจากแมลงศัตรูพืช จนทำให้ผลผลิตเสียหายสามารถควบคุมและกำจัดได้โดยการใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *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 (วัชรและคณะ, 2529; 2537) และทดสอบกับด้วงหมัดผัก ด้วงงวงมันเทศ (วัชรและคณะ, 2534ก; ข)

เมื่อมองในแง่ของการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพแล้ว ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพสูงมาก โดยสิ่งมีชีวิตอยู่ประมาณร้อยละ 7 เมื่อเทียบสัดส่วนกับจำนวนประชากรสิ่งมีชีวิตในโลกซึ่งมีประมาณ 5 ล้านชนิด ทั้งนี้ เนื่องด้วยประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น สภาพทางภูมิศาสตร์ที่มี

ความหลากหลายในแต่ละพื้นที่ล้วนเป็นปัจจัยที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของสิ่งมีชีวิต ประเทศไทยมีภูมิประเทศเป็นที่ราบลุ่มแม่น้ำ ที่ราบลอนคลื่น มีแถบชายฝั่งทะเล และภูเขาที่มีความสูงหลากหลายตั้งแต่เนินเขาจนถึงภูเขาที่สูงชันถึง 2,400 เมตรจากระดับน้ำทะเล ทำให้ที่ผ่านมาสามารถสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้จากพื้นที่ต่างๆ ได้แก่ *Steinernema siamkayai* Stock, Somsook and reid พบที่สวนมะขาม อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ และ *Steinernema minutum* Maneesakorn, An, 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* สำรวจพบได้ที่จังหวัดกาญจนบุรีด้วย นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabditis* สำรวจพบได้อีกในพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศ ได้แก่ *Heterorhabditis indica* พบที่จังหวัดขอนแก่น กระบี่ กาญจนบุรี สุราษฎร์ธานี และยังมีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอีกหลาย isolate จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ซึ่งอาจเป็นชนิดเดียวกับที่ทราบชนิดแล้ว หรืออาจเป็นชนิดใหม่ ที่ค้นพบได้ครั้งแรกในประเทศไทย แต่ยังไม่ได้ทำการจำแนกชนิด ทั้งนี้ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมีความหลากหลายทางด้านภูมิศาสตร์คือมีทั้งภูเขาสูงและมีชายฝั่งทะเล สันนิษฐานว่าอาจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้

สำหรับงานวิจัยนี้เมื่อได้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดใหม่แล้ว จะดำเนินการตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการนานาชาติ และจะเป็นผลงานวิจัยพื้นฐานที่สามารถนำไปพัฒนาศักยภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และพัฒนาต่อยอดสู่ขบวนการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณผลิตในรูปของชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดใหม่ๆ เพื่อเป้าหมายเป็นที่ยอมรับและมีผลงานที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง เผยแพร่สู่สาธารณชนทั้งในประเทศและต่างประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่องมือ GPS
- เครื่องตรวจสอบลักษณะดิน
- เครื่องตรวจสอบความเป็นกรด-ด่าง
- เครื่องวัดอุณหภูมิดิน
- เครื่องมือเก็บตัวอย่างดิน คือ เสียม พลั่วมือ จอบเล็ก ขอนตักดิน ถุงมือผ้า ปากกา Marker
- ถุงพลาสติก แก้วพลาสติก กล่องพลาสติก อลูมิเนียมฟอยล์ หนังกาย
- ขวดเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture flask)

วิธีการ

ทำการสำรวจไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 7 จังหวัด ประกอบด้วยจังหวัดชลบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และสระแก้ว ทำการจับพิกัด

ตำแหน่งพื้นที่ของตัวอย่างดินด้วยเครื่องมือ GPS บันทึกลักษณะดิน ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิดิน แต่ละจุดเก็บตัวอย่างดินจากนั้นคัดแยกใส่เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินตัวอย่าง เก็บรวบรวมใส่เดือนฝอยศัตรูแมลงและเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณ

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างดินในแต่ละจุดโดยใช้พลั่วมือขุดดินลึกลงไป 15-20 เซนติเมตร จากผิวน้ำดิน ในแต่ละพื้นที่เก็บดิน 5 จุด โดยให้แต่ละจุดห่างกัน 1 เมตรจากจุดกลาง จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างดินจุดละ 400 กรัม รวมเป็นปริมาณ 2 กิโลกรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกมัดปากถุงเพื่อรักษาความชื้น และเก็บรักษาดินตัวอย่างในที่เย็น 15-20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปคัดแยกใส่เดือนฝอยศัตรูแมลงออกจากดินตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

2. นำดินจำนวน 2 กิโลกรัมที่ได้จากแต่ละจุดเก็บตัวอย่างมาคลุกเคล้าให้เข้ากัน และแบ่งใส่แก้วพลาสติกทรงสูงขนาดสูง 16 เซนติเมตร กล่องละ 150 กรัม จากนั้นปล่อยให้หนอนกินรังผึ้งวัย 5 ลงไปแก้วละ 10 ตัว ปิดฝาแก้วพลาสติกด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ให้สนิท นำแก้วทดสอบเก็บที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดจึงนำออกมาตรวจผลการทดสอบ

3. เมื่อพบหนอนกินรังผึ้งตาย ทำการเก็บรวบรวมหนอนที่ตายออกจากดิน และทำความสะอาดผิวลำตัวภายนอกของหนอนด้วยสารละลายฟอร์มาลิน 0.1% อย่างน้อย 3 ครั้ง จากนั้นทำการดักล่อใส่เดือนฝอยศัตรูแมลงตามวิธีการของ White (1927) โดยนำหนอนที่ตายและทำความสะอาดแล้ววางบนผ้ากรองปูบนจานแก้วในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดมิดชิด เติมน้ำลงไปในกล่องจำนวน 20 มิลลิลิตร ก่อนจะนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-12 วัน จึงพบใส่เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงเคลื่อนตัวออกจากซากหนอนลงมาอยู่ในน้ำ ทำการเก็บใส่เดือนฝอยโดยเทออกจากกล่องแล้วกรองล้างเศษซากหนอนออก จากนั้นเก็บรักษาใส่เดือนฝอยในขวดพลาสติกเก็บรักษาต้นเชื้อ (culture flask) และเก็บในชั้นฟองน้ำสังเคราะห์ ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกพิกัดตำแหน่ง GPS พื้นที่จุดที่เก็บตัวอย่าง
- บันทึกลักษณะดินตัวอย่าง ค่าความเป็นกรดต่างของดิน อุณหภูมิ

เวลาและสถานที่

- ระยะเวลาดำเนินการ ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 ถึงกันยายน 2563
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ
- พื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว จันทบุรี ชลบุรี ระยอง และตราด

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการสำรวจเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในพื้นที่ภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้ตัวอย่างดินจำนวน 76 ตัวอย่าง จากพื้นที่ 7 จังหวัด ทางภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว จันทบุรี ชลบุรี ระยอง และตราด ผลการคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยหนอนกินรังผึ้ง ตรวจพบหนอนถูกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าทำลายจำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่ง 2 ตัวอย่าง คือ PC52 และ PC53 พบที่ตำบลบ้านฉาง อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง โดยตำแหน่งพิกัดที่ตรวจพบ คือ พิกัด $x,y : 12.7520240, 101.0836820$ และ $x,y : 12.7519270, 101.0836850$ โดยดินตัวอย่าง PC52 มีลักษณะนิ่ม ร่วน สีดำ และ PC53 ดินมีลักษณะนิ่ม ร่วน และอีก 1 ตัวอย่าง คือ PC64 พบที่ตำบลบ้านแหลมกลัด อำเภอเมืองตราด จังหวัดตราด ตำแหน่งพิกัดที่ $x,y : 12.1139200, 102.7034070$ ดินมีลักษณะนิ่ม ร่วน สีดำเช่นกัน จากนั้นทำการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงให้ได้เป็นปริมาณมากและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เดือนละ 1 ครั้ง เพื่อรอนำไปทดสอบในขั้นตอนการวิเคราะห์จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทางชีวโมเลกุลต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ตัวอย่างดินรวมจำนวน 76 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จากตัวอย่างดิน 3 ตัวอย่าง โดย 2 ตัวอย่างพบในพื้นที่ตำบลบ้านฉาง อำเภอบ้านฉาง จังหวัดระยอง สภาพดินมีลักษณะนิ่ม ร่วน สีดำ และตัวอย่างดิน PC53 สภาพดินมีลักษณะนิ่ม ร่วน สีดำเช่นกัน ส่วนอีก 1 ตัวอย่าง คือ ดิน PC64 พบในพื้นที่ตำบลบ้านแหลมกลัด อำเภอเมืองตราด จังหวัดตราด สภาพดินมีลักษณะนิ่ม ร่วน สีดำ ทำการเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณอย่างต่อเนื่องด้วยหนอนกินรังผึ้ง แบ่งเก็บรักษาในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ และเก็บในชั้นฟองน้ำสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปจัดจำแนกชนิดตามวิธีการในขั้นตอนต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนายรัชชัย ประดับวงศ์ นักวิชาการเกษตร ที่ช่วยปฏิบัติงานการทดลองครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- วัชร สมสุข อัจฉรา ตันติโชค และอุทัย เกตุนุติ. 2529. ไส้เดือนฝอยควบคุมหนอนกินได้ผิวเปลือกไม้ สกฤกลางสาร. *ว.กสิ.สัตว์*. 8: 115-119.
- วัชร สมสุข วินัย รัชตปกรณชัย และพิมลพร นันทะ. 2534ก. การใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ควบคุมด้วงหมัดผักในผักกาดหัว. *ว.กสิ.สัตว์*. 13: 183-188.

- วัชรีย์ สมสุข สุธน สุวรรณบุตร และพิมลพร นันทะ. 2534ข. ศึกษาการใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ในการควบคุมด้วงงวงมันเทศในสภาพธรรมชาติ. *รายงานผลวิจัยประจำปี 2534*. กองกัญและสัตววิทยา. 10 หน้า.
- วัชรีย์ สมสุข พิมลพร นันทะ และเอนก บุตรรักษ์. 2537. การควบคุมหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* ในดาวเรืองด้วยไส้เดือนฝอย. *ผลงานแผ่นภาพในการประชุมสัมมนาทางวิชาการ แผลงและสัตวศาสตร์พืช ครั้งที่ 9*. กองกัญและสัตววิทยา 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.
- 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.
- 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.

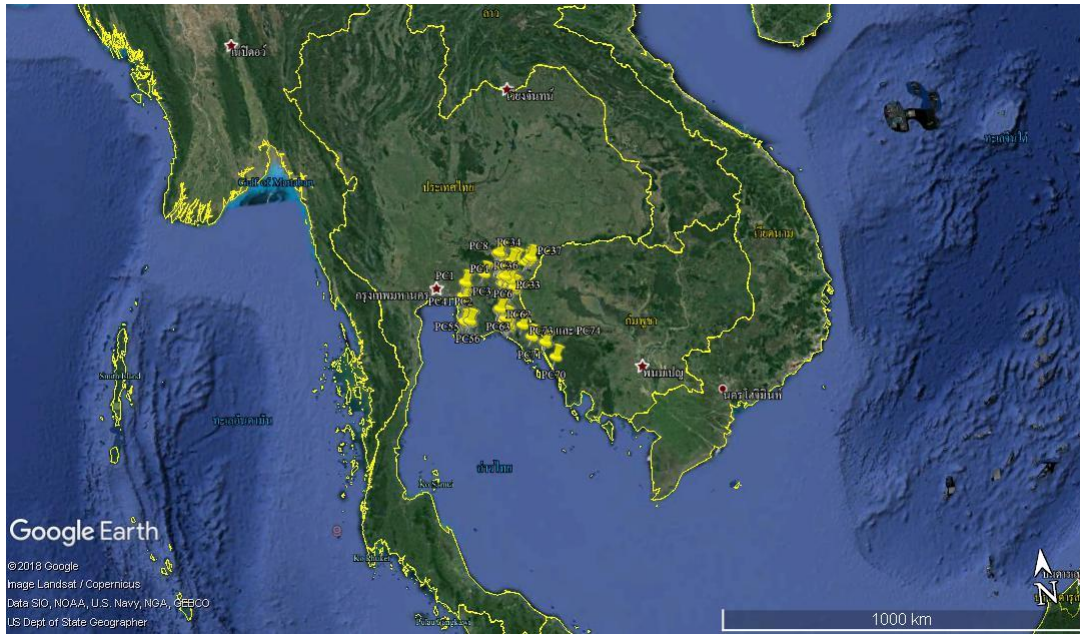


Figure 1 Map showing the sampling sites of collected 76 soil samples in Thailand



Figure 2 Map showing the sampling sites of collected 76 soil samples in eastern Thailand



Figure 3 Soil samples found the entomopathogenic nematodes



Figure 4 The cadavers of wax moth after infected by different entomopathogenic nematodes samples

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ข้อมูลพิกัดตำแหน่งเก็บตัวอย่างดินเพื่อคัดแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ตั้งแต่เดือนมีนาคม ถึงเดือนกรกฎาคม 2562

ตัวอย่าง ดิน	พิกัด		ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
	x (N)	y (E)			
PC1	13.6110700	101.0688940	ท่าพลับ	บ้านโพธิ์	ฉะเชิงเทรา
PC2	13.5846430	101.0748060	คลองบ้านโพธิ์	บ้านโพธิ์	ฉะเชิงเทรา
PC3	13.7564900	101.5127220	เขาหินซ้อน	พนมสารคาม	ฉะเชิงเทรา
PC4	13.6799280	101.8574820	วังท่าช้าง	กบินทร์บุรี	ปราจีนบุรี
PC5	13.5005890	101.8894200	พระเพลิง	เขาฉกรรจ์	สระแก้ว
PC6	13.6480000	101.9741200	หนองวา	เขาฉกรรจ์	สระแก้ว
PC7	14.1565380	101.8706750	นาดี	นาดี	ปราจีนบุรี
PC8	14.1773190	101.8990540	บุพราหม	นาดี	ปราจีนบุรี
PC9	14.1627560	101.8989810	ทุ่งโพธิ์	นาดี	ปราจีนบุรี
PC10	14.1426520	101.9137040	ทุ่งโพธิ์	นาดี	ปราจีนบุรี
PC11	14.1320250	101.9217510	ทุ่งโพธิ์	นาดี	ปราจีนบุรี
PC12	13.8704600	101.8585400	วังตะเคียน	กบินทร์บุรี	ปราจีนบุรี
PC13	13.8909550	101.8448990	วังตะเคียน	กบินทร์บุรี	ปราจีนบุรี
PC14	13.8913090	101.8470590	วังตะเคียน	กบินทร์บุรี	ปราจีนบุรี
PC15	13.9008650	101.8501910	วังตะเคียน	กบินทร์บุรี	ปราจีนบุรี
PC16	13.9102270	101.8529670	วังตะเคียน	กบินทร์บุรี	ปราจีนบุรี
PC17	13.9078470	101.8621240	วังตะเคียน	กบินทร์บุรี	ปราจีนบุรี
PC18	13.8905220	101.8717920	วังตะเคียน	กบินทร์บุรี	ปราจีนบุรี
PC19	12.6801470	101.8120120	ช้างคลาน	นายายอาม	จันทบุรี
PC20	12.6800980	101.8115300	ช้างคลาน	นายายอาม	จันทบุรี
PC21	12.6837490	101.8299570	กระแจะ	นายายอาม	จันทบุรี
PC22	12.6798640	101.8420440	กระแจะ	นายายอาม	จันทบุรี
PC23	12.5889730	101.8832000	สนามชัย	นายายอาม	จันทบุรี
PC24	12.6238530	101.8921260	สนามชัย	นายายอาม	จันทบุรี

ตัวอย่าง ดิน	พิกัด		ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
	x (N)	y (E)			
PC25	12.5402390	101.9456360	คลองขุด	ท่าใหม่	จันทบุรี
PC26	12.5659150	101.9311110	คลองขุด	ท่าใหม่	จันทบุรี
PC27	12.5498830	101.9254220	คลองขุด	ท่าใหม่	จันทบุรี
PC28	12.5727560	101.8903960	คลองขุด	ท่าใหม่	จันทบุรี
PC29	13.3270130	102.1561100	วังทอง	วังสมบурณ	สระแก้ว
PC30	13.3439920	102.1487720	วังทอง	วังสมบурณ	สระแก้ว
PC31	13.3829640	102.1312260	วังทอง	วังสมบурณ	สระแก้ว
PC32	13.3975110	102.1263040	วังทอง	วังสมบурณ	สระแก้ว
PC33	13.5679890	102.0674790	ท่าแร่ใน	วังน้ำเย็น	สระแก้ว
PC34	139.607400	102.1485800	ท่าแยก	เมือง	สระแก้ว
PC35	13.9689390	102.2485800	ท่าแยก	เมือง	สระแก้ว
PC36	13.9422990	102.5485040	แซร์ออ	วัฒนานคร	สระแก้ว
PC37	13.9937480	102.6013050	ทัพราช	ตาพระยา	สระแก้ว
PC38	13.8932740	102.4776920	ช่องกุ่ม	วัฒนานคร	สระแก้ว
PC39	12.5387340	101.9281540	คลองขุด	ท่าใหม่	จันทบุรี
PC40	12.5635520	101.9114250	คลองขุด	ท่าใหม่	จันทบุรี
PC41	13.322601	100.993027	หนองคางคก	เมือง	ชลบุรี
PC42	13.280185	101.004001	หนองคางคก	เมือง	ชลบุรี
PC43	13.2805040	101.0044940	หนองคางคก	เมือง	ชลบุรี
PC44	13.280011	101.004327	หนองคางคก	เมือง	ชลบุรี
PC45	13.260465	101.0058780	บางพระ	ศรีราชา	ชลบุรี
PC46	13.2626640	101.0210460	บางพระ	ศรีราชา	ชลบุรี
PC47	13.2629090	101.0213650	บางพระ	ศรีราชา	ชลบุรี
PC48	13.258044	101.023369	บางพระ	ศรีราชา	ชลบุรี
PC49	12.7651070	100.9505690	นาจอมเทียน	สัตหีบ	ชลบุรี
PC50	12.748109	100.945708	บางสะพาน	สัตหีบ	ชลบุรี

ตัวอย่าง ดิน	พิกัด		ตำบล	อำเภอ	จังหวัด
	x (N)	y (E)			
PC51	12.7481160	100.9312700	บางสะเหร่	สัตหีบ	ชลบุรี
PC52	12.7520240	101.0836820	บ้านฉาง	บ้านฉาง	ระยอง
PC53	12.7519270	101.0836850	บ้านฉาง	บ้านฉาง	ระยอง
PC54	12.7518960	101.0839506	บ้านฉาง	บ้านฉาง	ระยอง
PC55	12.76.12230	101.0774830	บ้านฉาง	บ้านฉาง	ระยอง
PC56	12.7613000	101.0777130	บ้านฉาง	บ้านฉาง	ระยอง
PC57	12.9098320	101.7753620	น้ำเป็น	เขาชะเมา	ระยอง
PC58	12.9098640	101.7752270	น้ำเป็น	เขาชะเมา	ระยอง
PC59	12.9099640	101.7750740	น้ำเป็น	เขาชะเมา	ระยอง
PC60	12.9307230	101.7803380	น้ำเป็น	เขาชะเมา	ระยอง
PC61	12.9307240	101.7800590	น้ำเป็น	เขาชะเมา	ระยอง
PC62	12.9538790	101.7840750	พวา	แก่งหางแมว	จันทบุรี
PC63	12.9536800	101.7839540	พวา	แก่งหางแมว	จันทบุรี
PC64	12.1139200	102.7034070	แหลมกลัด	เมืองตราด	ตราด
PC65	12.1139200	102.7034070	แหลมกลัด	เมืองตราด	ตราด
PC66	12.1059620	102.70554430	แหลมกลัด	เมืองตราด	ตราด
PC67	12.1067130	102.7047320	แหลมกลัด	เมืองตราด	ตราด
PC68	12.1028530	102.7121840	แหลมกลัด	เมืองตราด	ตราด
PC69	12.1028530	102.7121840	แหลมกลัด	เมืองตราด	ตราด
PC70	11.7675120	102.8959420	คลองใหญ่	คลองใหญ่	ตราด
PC71	12.2640480	102.4199040	วังกระแจะ	เมืองตราด	ตราด
PC72	12.2265417	102.408556	วังกระแจะ	เมืองตราด	ตราด
PC73	12.5448580	102.2412870	ตลอกนong	ขลุง	จันทบุรี
PC74	12.5448580	102.2412870	ตลอกนong	ขลุง	จันทบุรี
PC75	12.7373200	101.8781360	นายายอาม	นายายอาม	ระยอง
PC76	12.7372780	101.8783310	นายายอาม	นายายอาม	ระยอง

อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัยของแมลงวันหนอนชอนใบในวงศ์

Agromyzidae (Order : Diptera) ในพืชผัก

Taxonomy, Distribution and Host Plants of Leafminer Flies in Family

Agromyzidae (Order: Diptera) in Vegetable Crops

ยุวรินทร์ บุญทบ สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ

เกศสุดา สนสิริ ลิทธิสิโรตม แก้วสวัสดิ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบที่ได้จากการสำรวจพืชผักชนิดต่าง ๆ ดังนี้ ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น ศรีสะเกษ เพชรบูรณ์ และยโสธร โดยทำการสำรวจในพืช มะเขือเทศ ต้นหอม กระเทียม มะเขือ คื่นช่าย แตงไทย กวางตุ้ง และถั่วฝักยาว สำรวจในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงใต้ ในจังหวัดปราจีน และสระแก้ว โดยสำรวจในแตงโม แตงกวา และผักซีฝรั่ง ภาคกลาง สำรวจในจังหวัดเพชรบุรี ทำการสำรวจ ข้าวโพด มะเขือเทศ และถั่วฝักยาว และจากภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ทำการสำรวจ หอมใหญ่ หอมแบ่ง และแตงกวา จำแนกชนิดจากหลักฐานภายนอก จำนวน 100 ตัวอย่าง และทำสไลด์อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เพื่อยืนยันชนิด จำนวน 100 สไลด์ พบแมลงวันหนอนชอนใบจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Liriomyza chinensis* (Kato), *L. sativae* (Blanchard), *L. brassicae* (Riley) และ *L. trifolii* (Burgess)

คำหลัก: อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัย แมลงวันหนอนชอนใบ Agromyzidae

รหัสการทดลอง 03-30-60--01-01-01-23-62

คำนำ

แมลงวันหนอนซอนใบในอดีตจัดเป็นแมลงศัตรูพืชชนิดรอง (minor pests) แต่ปัจจุบันพบว่าแมลงวันหนอนซอนใบได้เพิ่มจำนวนประชากรอย่างรวดเร็ว เกิดความต้านทานยาฆ่าแมลงในการเพาะปลูกพืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด (Parrella *et al.*, 1984) และพบว่าแมลงวันหนอนซอนใบเริ่มเป็นแมลงศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดปัญหาใหญ่ขึ้นทั่วโลก และจากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่ามนุษย์เป็นตัวกลางสำคัญที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของแมลงวันหนอนซอนใบจากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่ง (Minkenber, 1988) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันนี้มีการค้าขายกันอย่างเสรีทั่วโลก และในประเทศไทยนั้นมีการส่งออกผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทยไปสู่ประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในพืชผักนั้น จากการตรวจสอบพบว่าแมลงวันหนอนซอนใบเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตร เนื่องจากแมลงวันหนอนซอนใบสามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากให้กับพืชหลากหลายชนิด แต่จะพบมากในพืชในวงศ์ (Family) Cucurbitaceae ซึ่งได้แก่ พืช ตระกูลแตงชนิดต่างๆ (Spencer, 1973) พืชตระกูลถั่ว ในวงศ์ (Family) Leguminosae เช่น ถั่วชนิดต่างๆ ในวงศ์ Solanaceae เช่น พืชตระกูลมะเขือ และในวงศ์ Cruciferaceae เช่น กะหล่ำปลี ผักกวางตุ้ง (Stegmaier, 1966) และจากการแพร่กระจายตัวอย่างรวดเร็วของแมลงวันหนอนซอนใบรวมทั้งความหลากหลายของพืชอาหารนั้น ทำให้แมลงวันหนอนซอนใบสามารถเข้าทำความเสียหาย ส่งผลให้ผลผลิตลดลงและพืชอาจตายได้ในที่สุด ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเร่งทำการศึกษานุกรมวิธานของแมลงวันหนอนซอนใบที่เข้าทำลายพืชผักสวนครัว โดยเฉพาะพืชผักที่มีความสำคัญต่อการส่งออก เพราะข้อมูลชนิด การแพร่กระจาย รวมทั้งพืชอาหารของแมลงวันหนอนซอนใบนั้น จะสามารถนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญที่จะสนับสนุนการศึกษาค้นคว้าวิจัยด้านอื่นๆ เช่นการแพร่ระบาด และการแปรผันประชากร เป็นต้น ซึ่งความรู้ทางด้านต่างๆ เหล่านี้จะเป็นฐานข้อมูลในการวางยุทธศาสตร์และยุทธวิธีในการบริหารจัดการแมลงวันหนอนซอนใบอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนซอนใบในแปลงเพาะปลูกพืชต่างๆ ทั่วประเทศ และจากการที่แมลงวันหนอนซอนใบนั้นมีการเข้าทำลายพืชอาหารแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องพยายามเก็บรวบรวมตัวอย่างของ ตัวอ่อนจากพืช ให้ได้มีความหลากหลายที่สุด โดยจะเก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ในแต่ละปีจะออกเก็บตัวอย่าง ภาคต่างๆ ดังนี้ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคใต้และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) โดยเลือกจังหวัดที่เป็นตัวแทนของพื้นที่ทำการเกษตรของภูมิภาคนั้นๆ ดังนี้

- ภาคเหนือ: จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และน่าน
- ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ: จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น อุดรธานี อุบลราชธานี

หนองคาย และมหาสารคาม

- ภาคตะวันตก: จังหวัดกาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และตาก
- ภาคตะวันออก: จังหวัดจันทบุรี และระยอง
- ภาคใต้: จังหวัดสุราษฎร์ธานี ชุมพร ระนอง ตรัง พัทลุง สงขลา นครศรีธรรมราช กระบี่ พังงา และภูเก็ต
- ภาคกลาง: จังหวัดกรุงเทพมหานคร นครปฐม สมุทรสงคราม สมุทรสาคร ราชบุรี และเพชรบุรี

ซึ่งคาดว่าภายใน 3 ปีจะสามารถเก็บตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยจะมีการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแปลงพืชผักสวนครัว เช่น แตงกวา ฟักทอง ถั่วฝักยาว บวบ ฟักและอื่นๆจากนั้นใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องพลาสติก เพื่อให้ระบายอากาศได้ดี บันทึกวันที่ เดือน พ.ศ. และสถานที่เก็บ และนำกลับมาเลี้ยงย้งห้องปฏิบัติการจนเป็นตัวเต็มวัย

2. เตรียมตัวอย่างตัวเต็มวัย เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ โดยใช้ตัวอย่างตัวเต็มวัยที่อบแห้ง หรืออาจฆ่าด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ หรือเก็บแมลงใส่หลอดแก้ว แช่ในช่องน้ำแข็ง 4 - 5 ชั่วโมง วิธีนี้จะทำให้สีไม่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อได้ตัวอย่างแล้วใช้เข็มขนาดเล็ก (micropin) แหวงด้านบนส่วนนอกแล้วจึงเสียบ micropin กับโคมหรือคอกขนาดเล็กที่มีเข็มปักแมลงเสียบอยู่ โดยมีป้ายเล็ก ๆ กับโดยบอก สถานที่ วันเดือนปี ผู้เก็บอีกชิ้นเป็นชื่อพืชที่เก็บมา รวมทั้งมีป้ายบันทึกแยกชื่อพืชอาหารที่เก็บมา และชื่อแมลงที่จำแนกได้อีก 1 ป้าย

3. นำตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบมาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope โดยใช้ตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิดที่นำมาศึกษาจำนวน 20 ตัวอย่างแต่หากเป็นชนิดที่หายากนั้น จำนวนที่ใช้ในการศึกษาขึ้นอยู่กับปริมาณของตัวอย่างที่เก็บรวบรวมตัวอย่าง แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด และสี เป็นต้น โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารเพื่อประกอบเป็นแนวทางการวินิจฉัยการจำแนกชนิดแมลง จาก 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 และ Lim G.S, S.S. Sastroutomo, W.H. Loke.1999. Workshop on leafminers of vegetables in Southeast Asia. CABI-SEARC ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

4. บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาโดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

5. แมลงวันหนอนชอนใบบางชนิดที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงกันมาก และยากในการตรวจวินิจฉัยชนิดนั้น จะต้องมีการทำสไลด์ถาวรของอวัยวะเพศ (genitalia) ซึ่งได้แก่ aedeagus ในเพศผู้ และอวัยวะวางไข่ในเพศเมีย เพื่อวัดขนาดและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

- ตัดส่วนท้องของแมลงวันหนอนชอนใบแช่ในน้ำยาโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) 10% ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 คืน เพื่อให้ผนังส่วนท้องและไขมันที่ไม่ต้องการย่อยสลาย
 - นำชิ้นส่วนออกจากน้ำยา แช่ในน้ำกลั่น เชื้อเอาไขมันและส่วนที่ไม่ใช่อวัยวะเพศออก โดยใช้เข็มแหลมเชื้อเอาเฉพาะอวัยวะเพศออกมาจากส่วนของท้อง และแช่ในแอลกอฮอล์ (alcohol) 75% และ 95% ตามลำดับ นานครั้งละ 5 นาที เพื่อเป็นการดึงน้ำที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อให้ออกไปจนหมด เนื่องจากหากดึงน้ำออกไม่หมดจะทำให้อวัยวะเพศที่อยู่ในสไลด์หดตัวเมื่อนำไปอบภายใต้อุณหภูมิสูง 40 - 45°C เกิดความเสียหาย ไม่สามารถเก็บรักษาสไลด์ไว้ได้เป็นเวลานาน
 - นำส่วนของอวัยวะเพศแช่ในกรดซิตริก (citric acid) ประมาณ 3 นาที
 - เชื้ออวัยวะเพศมาวางบนสไลด์ที่หยดน้ำยาที่จะทำสไลด์ คือ canada balsam แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์
 - นำไปอบให้แห้งเป็นระยะเวลา 2 - 6 สัปดาห์ ในตู้อบอุณหภูมิ 40 - 45°C จึงนำออกมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเพื่อเก็บไว้เป็นหลักฐานอ้างอิง
 - บันทึกรายละเอียดของแผ่นสไลด์ เช่น ชนิดแมลงวันหนอนชอนใบ วัน/เดือน/ปี ที่ทำสไลด์ และชื่อผู้ทำสไลด์
6. จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของแมลงวันหนอนชอนใบที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ
7. จัดเก็บตัวอย่างที่ได้จากศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง (แมลงวันหนอนชอนใบทุกชนิดที่รายงานไว้ต้องเก็บรักษาตัวอย่างจริงไว้เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบที่ได้จากการสำรวจพืชผักชนิดต่าง ๆ ดังนี้

1. พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่
 - จังหวัดขอนแก่น ทำการสำรวจ แปลงมะเขือเทศ จำนวน 1 แปลง
 - จังหวัดศรีสะเกษ ทำการสำรวจ แปลงต้นหอม กระเทียม มะเขือ คื่นห่า มะเขือเทศ แตงไทย กวางตุ้ง และถั่วฝักยาว จำนวน 17 แปลง
 - จังหวัดเพชรบูรณ์ ทำการสำรวจ แปลงหอมแบ่ง จำนวน 1 แปลง
 - จังหวัดยโสธร ทำการสำรวจ หอม กระเทียม และกวางตุ้ง จำนวน 5 แปลง
 - จังหวัดอุบลราชธานี ทำการสำรวจ แปลงมะเขือเทศ และถั่วฝักยาว จำนวน 2 แปลง
2. พื้นที่ภาคตะวันออก
 - จังหวัดปราจีนบุรี ทำการสำรวจ แตงโม จำนวน 1 แปลง
 - จังหวัดสระแก้ว ทำการสำรวจ แตงกวา และผักซีฝรั่ง จำนวน 1 แปลง

3. ภาคกลาง

- จังหวัดกรุงเทพมหานคร นครปฐม สุพรรณบุรี และ เพชรบุรี ทำการสำรวจ แดงกวาง ข้าวโพด มะเขือเทศ และถั่วฝักยาว จำนวน 4 แปลง

4. ภาคตะวันตก

- กาญจนบุรี ทำการสำรวจ หอมใหญ่ หอมแบ่ง และแดงกวาง จำนวน 3 แปลง (Figure 1 และ Table 1)

นำใบพืชผักที่มีพบการเข้าทำลายของแมลงวันหนอนชอนใบมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยเพื่อใช้ในการจำแนกชนิด จำนวน 100 ตัวอย่าง และทำสไลด์อวัยวะสืบพันธุ์เพื่อยืนยันชนิด จำนวน 100 สไลด์ พบแมลงวันหนอนชอนใบ *Liriomyza chinensis* (Kato) และ *L. sativae* (Blanchard) ซึ่งเคยสำรวจพบเมื่อปีการทดลองที่แล้ว นอกจากนี้สามารถจำแนกแมลงวันหนอนชอนใบเพิ่มเติมได้อีก 2 ชนิด ได้แก่ *L. brassicae* (Riley) (Figures 2-3) และ *L. trifolii* (Burgess, 1880) (Figures 4-5)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจ เก็บตัวอย่าง แมลงวันหนอนชอนใบจากแปลงพืชผักชนิดต่าง ๆ ในเขตพื้นที่ภาค ตะวันออก ตะวันออกเฉียงเหนือภาคกลาง และภาคตะวันตก พบแมลงวันหนอนชอนใบเข้าทำลาย พืชผักหลากหลายชนิด นำใบพืชที่พบแมลงวันหนอนชอนใบเข้าทำลายมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้ตัวเต็มวัยและจำแนกแมลงวันหนอนชอนใบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก และอวัยวะสืบพันธุ์ พบแมลงวันหนอนชอนใบเพิ่มเติมจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *L. chinensis* (Kato) และ *L. sativae* (Blanchard)

คำขอบคุณ

ข้าราชการ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมาบริการ ของกลุ่มงาน อนุกรมวิธานแมลงในการช่วยเหลือเก็บตัวอย่างแมลงวันหนอนชอนใบ จึงทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จ และลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- 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.
- Parrella MP, Jones VP, Youngman RR, Lebeck LM. 1985. Effect of leaf mining and leaf stippling of *Liriomyza* spp. on photosynthetic rates of chrysanthemum. *Annals of the Entomological Society of America* 78: 90-93.

Spencer KA. 1973. Agromyzidae (Diptera) of economic importance. The Hague. Natherland. 418 p.

Stegmaier CE. 1966. Host plants and parasites of *Liriomyza trifolii* in Florida (Diptera: Agromyzidae). Florida Entomologist 49: 75-80.



Figure 1 Examples of vegetable from which leaf miner were collected in Thailand

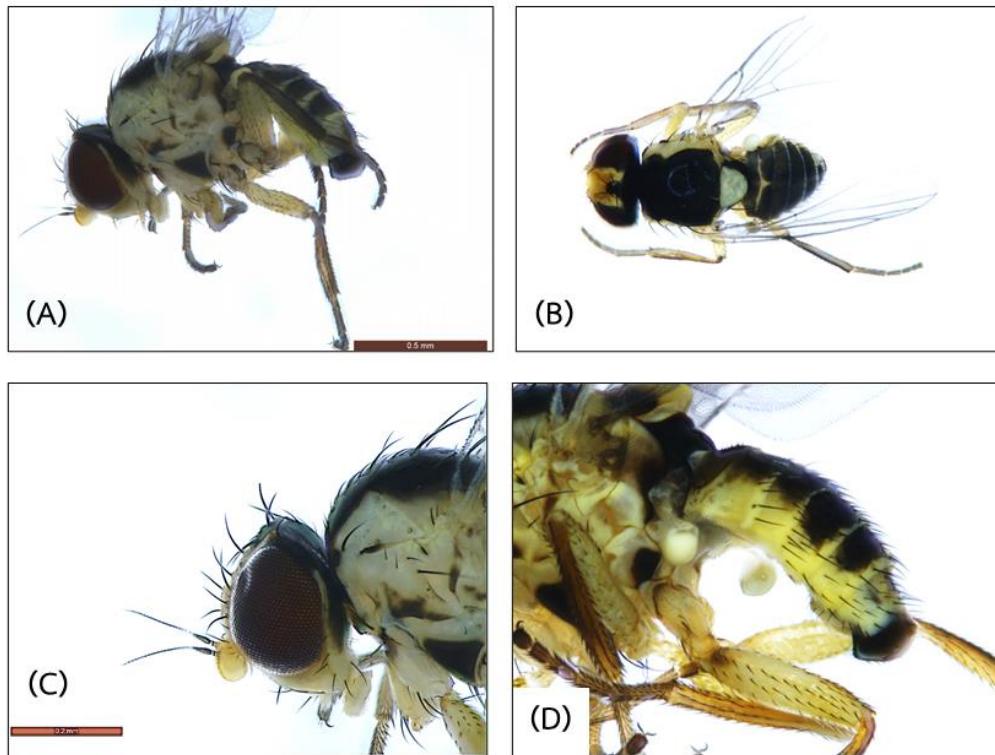


Figure 2 The important characteristics of *Liriomyza brassicae* (Riley)

(A) Head

(B) Thorax

(C) Pronotum

(D) Abdomen

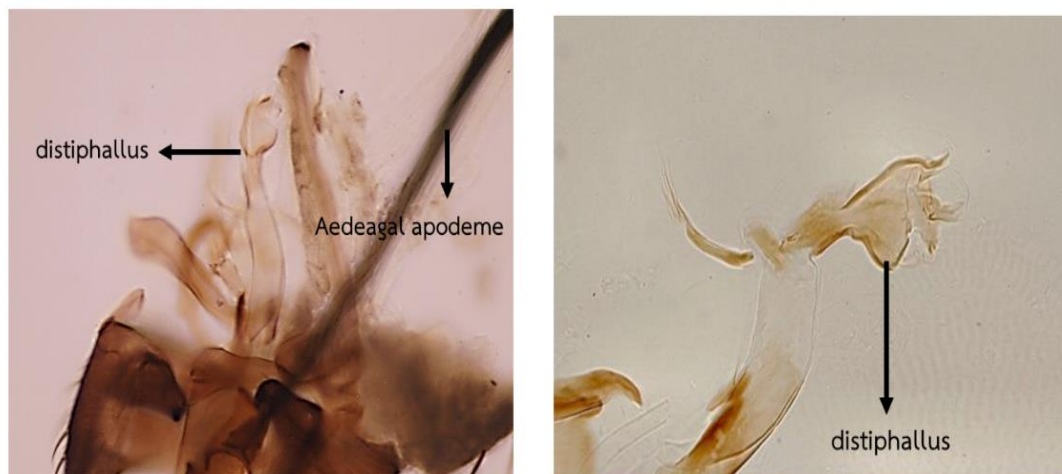


Figure 3 Male genitalia of *Liriomyza brassicae* (Riley) (lateral view)

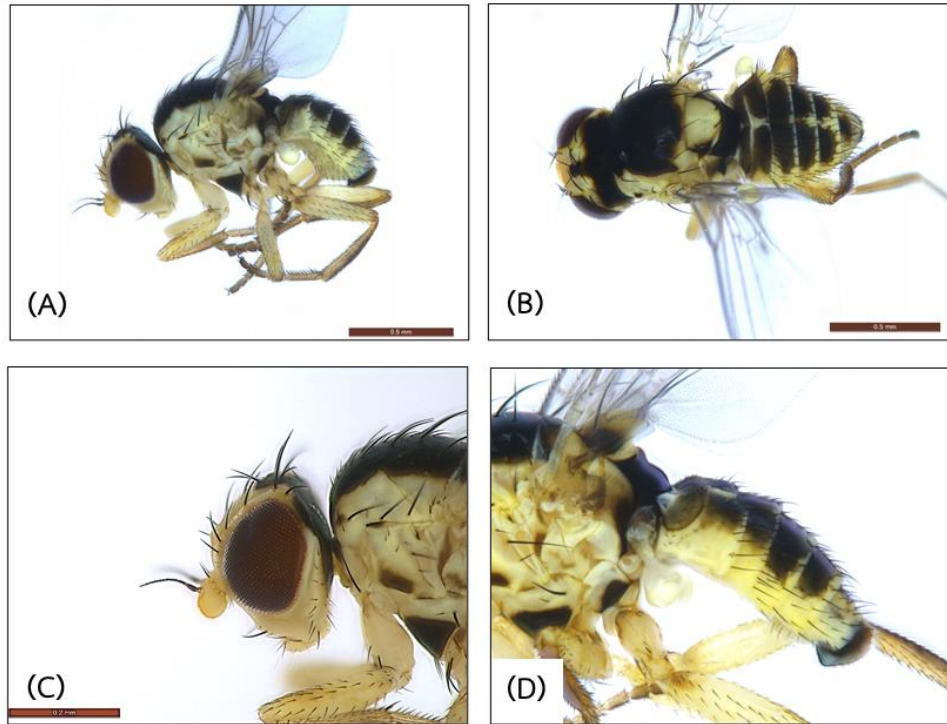


Figure 4 The important characteristics of *Liriomyza trifolii* (Burgess, 1880)

(A) Head

(B) Thorax

(C) Pronotum

(D) Abdomen

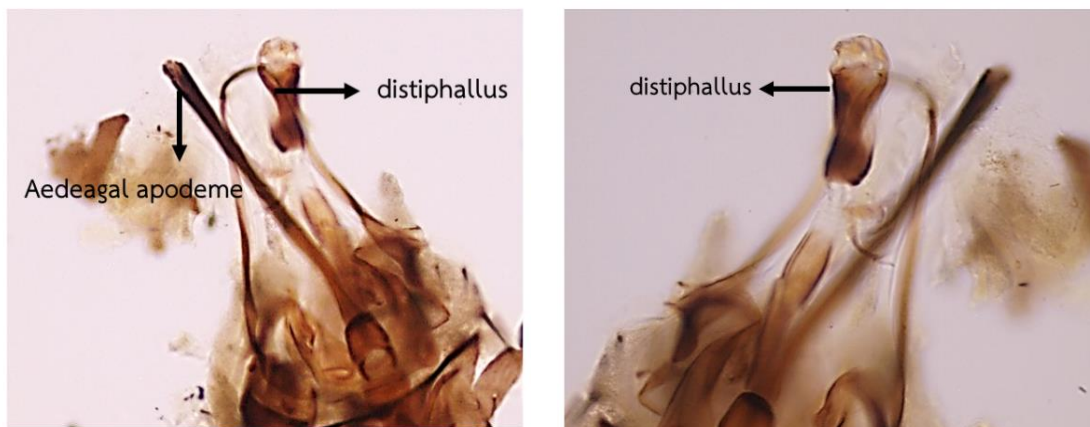


Figure 5 Male genitalia of *Liriomyza trifolii* (lateral view)

Table 1 Fruit collection data showing date, latitude, longitude, host plants, scientific name of host plants, family and location.

รหัส	วันที่เก็บ	N	E	พืชอาศัย	ชื่อวิทยาศาสตร์	วงศ์	สถานที่เก็บตัวอย่าง
1	24.06.2019	13°57'00.0"	99°56'52.9"	ถั่วฝักยาว	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	ต.ทุ่งขวาง อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม
2	23.11.2019	14°32'51.4"	100°11'07.6"	มะเขือเทศ	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	ต.ดอนมะสังข์ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี
3	02.12.2019	14°58'03.6"	104°12'29.1"	ต้นหอม	<i>Alliumcepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Alliaceae	ต.บุสง อ.วังหิน จ.ศรีสะเกษ
4	02.12.2019	14°58'03.6"	104°12'29.1"	ต้นหอม	<i>Alliumcepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Alliaceae	ต.บุสง อ.วังหิน จ.ศรีสะเกษ
5	03.12.2019	15°14'05.5"	104°31'10.0"	ต้นหอม	<i>Alliumcepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Alliaceae	ต.อีป่าด อ.กันทรารมย์ จ.ศรีสะเกษ
6	03.12.2019	15°12'25.4"	104°08'47.9"	แตงไทย	<i>Cucumis melo</i>	Cucurbitaceae	ต.ขาม อ.อุทุมพรพิสัย จ.ศรีสะเกษ
7	03.12.2019	15°14'30.6"	104°24'01.8"	คะน้า	<i>Brassica alboglabra</i>	Cruciferae	ต.ยางชุมน้อย อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ
8	03.12.2019	15°09'00.1"	104°13'00.0"	กระเทียม	<i>Allium sativum</i> L.	Alliaceae	ต.ตาเกษ อ.อุทุมพรพิสัย จ.ศรีสะเกษ
9	03.12.2019	15°13'13.4"	104°31'58.5"	ต้นหอม	<i>Alliumcepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Alliaceae	ต.เมืองน้อย อ.กันทรารมย์ จ.ศรีสะเกษ
10	03.12.2019	15°13'50.1"	104°24'44.5"	ต้นหอม	<i>Alliumcepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Alliaceae	ต.บึงบอน อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ
11	03.12.2019	15°14'13.2"	104°24'53.3"	ต้นหอม	<i>Alliumcepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Alliaceae	ต.บึงบอน อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ
12	03.12.2019	15°09'00.1"	104°13'00.0"	ต้นหอม	<i>Alliumcepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Alliaceae	ต.ตาเกษ อ.อุทุมพรพิสัย จ.ศรีสะเกษ
13	03.12.2019	15°09'47.6"	104°35'05.2"	ต้นหอม	<i>Alliumcepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Alliaceae	ต.ละทาย อ.กันทรารมย์ จ.ศรีสะเกษ
14	03.12.2019	15°15'12.9"	104°25'29.0"	ต้นหอม	<i>Alliumcepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Alliaceae	ต.บึงบอน อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ
15	03.12.2019	15°14'30.6"	104°24'01.8"	มะเขือ	<i>Solanum melongena</i>	Solanaceae	ต.ยางชุมน้อย อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ
16	03.12.2019	15°14'30.6"	104°24'01.8"	มะเขือเทศ	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	ต.ยางชุมน้อย อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ
17	03.12.2019	14°51'55.0"	104°11'12.4"	ถั่วฝักยาว	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	ต.สำโรงตาเจ็น อ.อุซันต์ จ.ศรีสะเกษ
18	03.12.2019	15°06'26.4"	104°19'54.6"	ถั่วฝักยาว	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	ต.เมืองใต้ อ.เมือง จ.ศรีสะเกษ
19	03.12.2019	15°14'30.6"	104°24'01.8"	ถั่วฝักยาว	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	ต.ยางชุมน้อย อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ
20	03.12.2019	15°05'58.5"	104°27'28.7"	ถั่วฝักยาว	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	ต.หนองแก้ว อ.เมือง จ.ศรีสะเกษ
21	03.12.2019	15°13'13.4"	104°31'58.5"	กวางตุ้ง	<i>Brassica Chinensis</i> Linn.	Cruciferae	ต.เมืองน้อย อ.กันทรารมย์ จ.ศรีสะเกษ
22	03.12.2019	15°21'40.6"	104°23'07.8"	ต้นหอม	<i>Alliumcepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Alliaceae	ต.ฟ้าห่วน อ.ค้อวัง จ.ยโสธร
23	04.12.2019	16°16'23.3"	104°30'53.0"	กระเทียม	<i>Allium sativum</i> L.	Alliaceae	ต.กุดแห่ อ.เลิงนกทา จ.ยโสธร
24	04.12.2019	16°16'23.3"	104°30'53.0"	กวางตุ้ง	<i>Brassica Chinensis</i> Linn.	Cruciferae	ต.กุดแห่ อ.เลิงนกทา จ.ยโสธร
25	04.12.2019	16°16'23.3"	104°30'53.0"	ต้นหอม	<i>Alliumcepa</i> var. <i>aggregatum</i>	Alliaceae	ต.กุดแห่ อ.เลิงนกทา จ.ยโสธร
26	07.12.2019	12°41'9"	99°53'39"	ถั่วฝักยาว	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี
27	18.12.2019	12°43'27.5"	99°53'35.6"	ข้าวโพด	<i>Zea mays</i> L.	Poaceae	ต.สามพระยา อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี
28	18.12.2019	12°43'27.5"	99°53'35.6"	แตงกวา	<i>Sucumis sativus</i> Linn	Cucurbitaceae	ต.สามพระยา อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี
29	03.01.2020	16°3'56"	105°21'40.45"	ถั่วฝักยาว	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	ต.เขมราฐ อ.เขมราฐ จ.อุบลราชธานี
30	03.01.2020	16°3'56"	105°21'40.45"	มะเขือเทศ	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	ต.เขมราฐ อ.เขมราฐ จ.อุบลราชธานี
31	14.02.2020	16°35'52"	102°6'48"	มะเขือเทศ	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	อ.ขุมนแพ จ.ขอนแก่น
32	14.02.2020	16°36'53"	101°9'34"	หอมแบ่ง	<i>Allium ascalonicum</i> L.	Amaryllidaceae	อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์
33	21.02.2020	14°0'34"	99°38'32"	หอมใหญ่	<i>Allium cepa</i> L.	Amaryllidaceae	อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี
34	02.03.2020	14°2'46"	99°42'55"	หอมแบ่ง	<i>Allium ascalonicum</i> L.	Amaryllidaceae	อ.พนมทวน จ.กาญจนบุรี
35	02.03.2020	14°4'47"	99°44'46"	แตงกวา	<i>Sucumis sativus</i> Linn	Cucurbitaceae	อ.พนมทวน จ.กาญจนบุรี
36	09.03.2020	13°26'53"	102°8'8"	แตงกวา	<i>Sucumis sativus</i> Linn	Cucurbitaceae	อ.วังน้ำเย็น จ.สระแก้ว
37	09.03.2020	13°29'29"	102°10'51"	ผักชีฝรั่ง	<i>Eryngium foetidum</i> L.	Apiaceae	อ.วังน้ำเย็น จ.สระแก้ว

อนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Oxyopidae

Taxonomic study on Spider Fauna in Family Oxyopidae

วิมลวรรณ โชติวงศ์ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง อทิตติยา แก้วประดิษฐ์

ณพชกร ธไภษัชย์ วีระชัย สมศรี

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมวงศ์ Oxyopidae ของประเทศไทยบนพื้นที่ 10 จังหวัดได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น อุตรธานี กาฬสินธุ์ ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และตรัง เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2562 สิ้นสุดกันยายน 2564 สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมตาหกเหลี่ยมได้ 40 ตัวอย่าง ได้ข้อมูลรายละเอียดของแมงมุมตาหกเหลี่ยมที่รวบรวมได้จากหญ้าข้างทาง พื้นที่การเกษตร และพื้นที่ป่าธรรมชาติ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) จากนั้นนำตัวอย่างมาศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ระยะห่างการจัดเรียงตัวของตา ลักษณะของส่วนหัวและอก ลักษณะรูปร่าง และลวดลายบนส่วนหลัง ความยาวของขา ขน และหนามบนขา ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ผลจากการศึกษาพบแมงมุมตาหกเหลี่ยมทั้งหมด 4 สกุล 5 ชนิดได้แก่ *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) *Oxyopes javanus* Thorell, 1887 *Peucetia viridans* (Hentz, 1832) *Hamataliwa* sp. และ *Hamadruas* sp.

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-24-63

คำนำ

แมงมุมตาหกเหลี่ยม (lynx spider) เป็นแมงมุมที่อยู่ในวงศ์ Oxyopidae พบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1870 ลักษณะเด่นของแมงมุมวงศ์นี้คือมีลักษณะการจัดเรียงตาเป็นรูป 6 เหลี่ยม โดยตากกลางคู่หน้ามีขนาดเล็กอยู่ด้านหน้า และ 6 ตาที่เหลือจะเรียงเป็นรูป 6 เหลี่ยม ขายาว ผอม

มีหนามยาวทั่วไป หากินกลางวันและกลางคืน เป็นแมงมุมที่มีสายตาดำมาก สามารถตะครุบจับเหยื่อได้รวดเร็ว และมักจะกระโดดไกล 2-3 เซนติเมตร หรือมากกว่า เพื่อจับแมลงที่บิน ปัจจุบันจำแนกได้ 9 สกุล 456 ชนิด และพบในประเทศไทยเพียง 3 ชนิด (Platnick, 2013) การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมงมุมตาหกเหลี่ยมได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เช่น ทางตะวันออกของรัฐเท็กซัส ได้ศึกษาประสิทธิภาพของแมงมุมตาหกเหลี่ยม *Peucetia viridans* (Hentz) ในฝ้าย และ 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) เป็นตัวห้ำที่มีความสำคัญและมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงวันผลไม้ในสวนมะม่วง และพบมากบนวัชพืชชริมท้องร่อง (วิภาดาและคณะ, 2551) นอกจากนี้ยังพบอาศัยหากินตามพืชเศรษฐกิจต่างๆ เช่น นาข้าวและบริเวณคันทนา พืชไร่ พืชสวน ไม้ดอกไม้ประดับต่างๆ บริเวณที่พบมากที่สุดคือ วัชพืชที่ไร่ร่มเงาไม้ผล โดยเฉพาะหญ้าขน หญ้าไทร (วิภาดาและอัมพร, 2544)

วิมลวรรณและคณะ, 2556 ได้ศึกษาอัตราการกินแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis*) (Hendel) ของแมงมุมตาหกเหลี่ยม: *O. lineatipes* (C. L. Koch, 1847) ในห้องปฏิบัติการและพบว่าแมงมุมตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวเต็มวัยเพศผู้มีอัตราการกินสูงสุดเฉลี่ย 7.78 7.67 และ 6.53 ตัวต่อวันที่ระดับความหนาแน่นของแมลงวันผลไม้ 17 16 และ 16 ตัวต่อแมงมุม 1 ตัว ตามลำดับ ดังนั้นการศึกษานุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Oxyopidae จึงนับว่ามีความสำคัญที่ควรจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงจำนวนชนิดที่พบในประเทศไทย ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นพื้นฐานของการบริหารศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีจุดมุ่งหมายในการลดใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อความปลอดภัย ประหยัดและไม่เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ประกอบกับปัจจุบันไม่มีผู้ที่ศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของแมงมุมทางการเกษตรในประเทศไทย และการศึกษานุกรมวิธานของแมงมุมในวงศ์ Oxyopidae ในประเทศไทยยังทำน้อยมาก สมควรศึกษานุกรมวิธานของแมงมุมวงศ์นี้เพื่อทราบจำนวนชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์ เขตการแพร่กระจาย พืชอาศัย เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อเป็นแหล่งสืบค้นและเปรียบเทียบตัวอย่างต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง หลอดแก้วทดลอง ขวดดองตัวอย่างแมงมุม กล่องพลาสติกใส กระดาษทิชชู ปากคีบ พู่กัน ถูพลาสติก

2. อุปกรณ์ในการจำแนกชนิด ได้แก่ จานแก้ว petridish silica-gel สำหรับ column chromatography กล้องจุลทรรศน์ (stereomicroscope) หลอดทดลองขนาดเล็ก ดินสอ ปากกา rotig เบอร์ 1, 2, 3 เอกสารด้านอนุกรมวิธานแมงมุมที่เกี่ยวข้อง สารเคมี ได้แก่ alcohol 95%, proteinase K, 10% KOH, chloroform, ethyl acetate

3. อุปกรณ์ในการเขียนผลงานวิจัยและเผยแพร่ ได้แก่ อุปกรณ์ในการถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์ติดตั้งด้วยกล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ วัสดุสำนักงาน

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมงมุม

การศึกษารังนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมงมุมวงศ์ Oxyopidae จากพื้นที่การเกษตร และพื้นที่ป่าธรรมชาติ เก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วของประเทศไทย ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ โดยใช้วิธีการการมองหา (visual search) จับโดยตรง (hand picking) และการใช้สวิงโฉบ (sweep net) จะทำให้ทราบรายละเอียดต่างๆ เกี่ยวกับแมงมุมแต่ละชนิดที่อาศัยหากินในสถานที่แตกต่างกัน เมื่อหาแมงมุมได้แล้ว ใช้หลอดพลาสติกให้ปากหลอดจ่อใกล้ๆ ตัวแมงมุม และใช้ฝ่าหลอดช่วยให้แมงมุมเข้าไปในหลอด

การเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมจะเก็บเฉพาะตัวเต็มวัยเท่านั้น ถ้าจับได้ตัวอ่อนจะต้องนำมาเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัยก่อน จึงจะสามารถนำมาจำแนกชนิดได้ นำตัวอย่างที่ได้มาทำให้สลบและฆ่าด้วย chloroform และ ethyl acetate เก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75% และนำไปเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม ซึ่งแต่ละหลอดบันทึกชื่อแมงมุมวันที่จับ สถานที่จับ ชื่อผู้เก็บ และค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) โดยใช้ปากกาออกแรงและใช้หมึก indian ink บันทึกลงในป้ายกระดาษขาวแผ่นเล็กๆ แล้วใส่ลงในหลอดแก้วที่ตองแมงมุม

ส่วนลูกไซท์ที่เก็บได้นำมาใส่ไว้ในกล่องพลาสติกในห้องปฏิบัติการจนกระทั่งตัวอ่อนฟักออกมา จากนั้นนำไปแยกเลี้ยงเดี่ยวโดยนำตัวอ่อน 1 ตัวต่อกล่องพลาสติก 1 กล่อง และให้แมลงหวี่เป็นอาหาร จนกระทั่งตัวอ่อนเจริญเป็นตัวเต็มวัยจึงนำมาเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75% เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

- วิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างออกจากขวด จากนั้นใช้พู่กัน forceps และ needles ยึดขาแมงมุมให้กางออกและเหยียดตรง จากนั้นนำตัวอย่างมาวางไว้ในจาน petridish ที่มีทรายวิทยาศาสตร์สีขาวที่แช่ด้วยแอลกอฮอล์ 95% นำไปตั้งไว้ใต้กล้อง Olympus SZH-ILLD stereomicroscope สำหรับ epigynum (อวัยวะเพศเมีย) จะใช้ needles เจาะรอบๆ epigynum จากนั้นจึงดึงออกมา แล้วนำไปแช่ใน proteinase K ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ต้องการออกไป แล้วจึงนำไปล้างในน้ำสะอาด เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจึงนำไปใส่ในสไลด์หลุมแล้วปิดด้วย cover slip แล้วนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม ส่วน pedipalps (อวัยวะเพศผู้) จะถูกดึงออกทางด้านซ้าย จากนั้นจึงนำไปต้ม

ด้วย 10% KOH ที่อุณหภูมิ 60°C ประมาณ 5-10 นาที จนกระทั่ง pedipalp ขยายออก จึงนำไปศึกษาดูรายละเอียดได้กล้อง stereomicroscope เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจะนำ pedipalps (อวัยวะเพศผู้) ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กแล้วนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม

- การจำแนกชนิด

นำตัวอย่างแมงมุม epigynum (อวัยวะเพศเมีย) และ pedipalps (อวัยวะเพศผู้) มาเปรียบเทียบกับตำราต่างๆ 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 วัดความยาวของลำตัว ความยาวและความกว้างของ carapace (ส่วนหัวรวมกับส่วนอก) ความยาวและความกว้างของ abdomen (ส่วนท้อง) ความยาวของขาทั้งหมด femur, patella, tibia, metatarsus, tarsus ถ่ายรูป และบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน จากนั้นทำคู่มือการจัดจำแนกชนิด (key) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจำแนก เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ทำการศึกษาระหว่างเดือนตุลาคม 2562-กันยายน 2564 โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างในพื้นที่ 9 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิ อุตรธานี เพชรบุรี สุราษฎร์ธานี และตรัง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างแมงมุมกระโดดในพื้นที่ 9 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิ อุตรธานี เพชรบุรี สุราษฎร์ธานี และตรัง สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมตาหกเหลี่ยมได้ 40 ตัวอย่าง นำไปศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น การจัดเรียงตัวของตา ระยะห่างระหว่างตา เส้นขนที่ตา ลักษณะรูปร่าง และลวดลายบนส่วนหลัง ความยาวและความกว้างของส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง ความยาวของขา จำนวนขน และหนามที่ขา ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ผลจากการจำแนกพบแมงมุมกระโดด 4 สกุล 5 ชนิด ได้แก่ *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) จำนวน 20 ตัวอย่าง *Oxyopes javanus* Thorell, 1887 จำนวน 5 ตัวอย่าง *Peucetia viridans* (Hentz, 1832) จำนวน 10 ตัวอย่าง *Hamataliwa* sp. จำนวน 3 ตัวอย่าง และ *Hamadruas* sp. จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งสกุล *Hamadruas* เป็นสกุลที่ยังไม่มีตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์

เนื่องจากการปรับลดงบประมาณการดำเนินการวิจัยในปี 2563 จึงมีความจำเป็นต้องลดจำนวนสถานที่ดำเนินการ รวมถึงมีความจำเป็นต้องปรับลดจำนวนตัวอย่างแมงมุมตาม KPIs รวมทั้งปี จากเก็บรวบรวมแมงมุมได้ 60 ตัวอย่าง เป็นเก็บรวบรวมแมงมุมได้ 30 ตัวอย่าง เพื่อให้มีการสอดคล้องกับงบประมาณการวิจัยในปี 2563 อีกทั้งประสบปัญหาโรคระบาด Covid 19 ทำให้ไม่สามารถออกพื้นที่เพื่อเก็บตัวอย่างได้

ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดแมงมุดาหกลี้นมวงศ์ Oxyopidae ในประเทศไทย ได้แก่

1. มีตาทั้งหมด 8 ตา เรียงเป็นแถวสี่แถว คือตาแถวหน้า (anterior row) เรียงตัวแบบ recurved โดยตากกลางคู่หน้าจะมีขนาดเล็กที่สุด และตาแถวหลัง (posterior row) แถวละ 4 ตา เรียงตัวแบบ procurved โดยตา 6 ตาจะเรียงตัวเป็นรูป 6 เหลี่ยม (Figure 1)
2. clypeus (พื้นที่ระหว่างตาและเขี้ยว) ยาวมาก (Figure 2)
3. ขามีหนามจำนวนมาก

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างแมงมุมกระโดดในพื้นที่ 9 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิ อุดรธานี เพชรบุรี สุราษฎร์ธานี และตรัง สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุดาหกลี้นมได้ 40 ตัวอย่าง นำไปศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการพบแมงมุมกระโดด 4 สกุล 5 ชนิด ได้แก่ *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) จำนวน 20 ตัวอย่าง *Oxyopes javanus* Thorell, 1887 จำนวน 5 ตัวอย่าง *Peucetia viridans* (Hentz, 1832) จำนวน 10 ตัวอย่าง *Hamataliwa* sp. จำนวน 3 ตัวอย่าง และ *Hamadruas* sp. จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งสกุล *Hamadruas* เป็นสกุลที่ยังไม่มีตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุมที่ทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- วิภาดา วังศิลาบัตร และอัมพร วิโนทัย. 2544. การศึกษาอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และประสิทธิภาพการกินแมลงวันผลไม้ *Bactrocera correcta* (Saunders) ของแมงมุดาหกลี้นม *Oxyopes Lineatipes* (C. L. Koch) (Araneae: Oxyopidae). 23(4): 241-252.
- วิภาดา วังศิลาบัตร. 2551. การศึกษาชนิด ชีววิทยา และประสิทธิภาพการกินของแมงมุมตัวห้ำต่อแมลงวันผลไม้ในสวนมะม่วง. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 356-388.

วิมลวรรณ โชติวงศ์ วิภาดา วังศิลาบัตร เกரியงไกร จำเริญมา พิเชฐ เซาว์นวัฒนวงศ์ และวิภาดา ปลอดภัยบุรี. 2556. ศึกษาอัตราการกินแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis*) (Hendel) ของแมงมุมตาหกเหลี่ยม: *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch, 1847) ในห้องปฏิบัติการ. วารสารกีฏและสัตววิทยา. 31(1): 29-35.

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.

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>

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. 16(2): 355-359(5)

Song, D.X., Z. Mingsheng and C. Jun. 1999. The Spiders of China. Hebei Science and Technology Publishing House. p. 398-401.

Thorell, T. 1870. On European spiders. *Nov. Act. reg. Soc. sci. Upsaline* (3)7: 109-242.

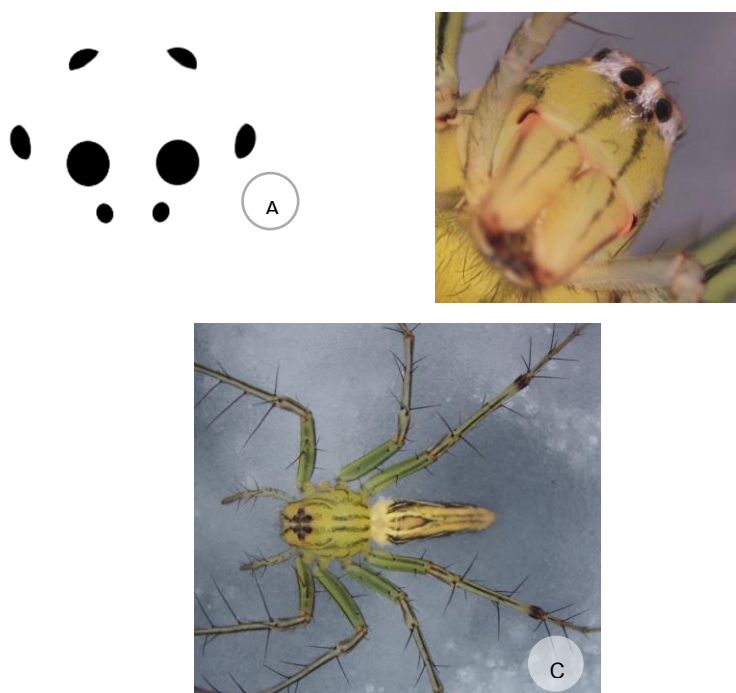


Figure 1 General morphology A. eyes arrangement B. clypeus C. spiny legs



Figure 2 *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch,



Figure 3 *Peucetia viridans* (Hentz, 1832)



Figure 4 *Hamadruas* sp.



Figure 5 *Hamataliwa* sp.

ศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp.

สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

Study on Species and Distribution of *Colletotrichum* spp.,

The Causal Agent of Chili Anthracnose Disease.

ธารทิพย์ ภาสบุตร อภิรัชต์ สมฤทธิ์

อมรรักษ์ คัดใจเดียว มะโนรัตน์ สุดสงวน

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Chili anthracnose disease is one of the major economic constraints to chili production which has been found in all cultivation sites. *Colletotrichum* spp. can destroy chili at any stage and disease symptoms occur both before and after harvest. Therefore, the species and distribution of *Colletotrichum* spp. causal agent of chili anthracnose by 133 isolates associated with anthracnose disease symptoms on chili fruit were collected from different geographical locations in Thailand during October 2017 to March 2019. *Colletotrichum* spp. isolates were studied based on morphology characteristics. In this study were three species that cause chili anthracnose disease; *Colletotrichum acutatum* which is the most species, followed by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* respectively. All isolates were grown on casein hydrolysis medium (CHM) then clear zone was assessed. *C. acutatum* displayed the greatest clear zone and the widest, followed by *C. gloeosporioides* and *C. capsici*, respectively. On casein from bovine milk medium (CBM), *C. acutatum* and *C. gloeosporioides* were found to create a clearer and wider clear zone but *C. capsici* that create the narrowest clear zone.

Keywords: *Colletotrichum* spp., Chili Anthracnose Disease

รหัสการทดลอง. 03-30-60-01-01-02-11-61

บทคัดย่อ

โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ของพริก เป็นโรคที่มีความสำคัญพบระบาดทำความเสียหายแก่ผลผลิตพริกของเกษตรกรในทุกแหล่งปลูก ราสาเหตุโรคสามารถเขาทำลายผลพริกได้ทุกระยะและอาการของโรคเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษานิตและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก โดยการเก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากพื้นที่ปลูกพริกทุกภาคของประเทศไทยระหว่างเดือน ตุลาคม 2560 ถึง เดือนกันยายน 2562 นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาและแยกเชื้อราสาเหตุโรคให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการเพื่อจำแนกชนิดรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งผลการศึกษานี้พบ *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก 3 ชนิด (สปีชีส์) คือ *Colletotrichum acutatum* ซึ่งจากการสำรวจเป็นชนิดที่พบมากที่สุด รองลงมาคือ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ การศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของรา *Colletotrichum* spp. โดยการเลี้ยงราบอาหาร Casein Hydrolysis Medium (CHM) พบว่ารา *Colletotrichum acutatum* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนที่สุด มีความกว้างของ clear zone กว้างที่สุด รองลงมาได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ บนอาหาร CBM พบ *Colletotrichum acutatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนและกว้างกว่า *Colletotrichum capsici* ที่สร้าง clear zone แคบที่สุด

คำหลัก : *Colletotrichum* spp. โรคแอนแทรคโนสพริก

คำนำ

พริก (*Capsicum* spp. ; Chili) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ที่นิยมปลูกมี 3 กลุ่ม คือ กลุ่มพริกใหญ่ (*Capsicum annuum* L.) เช่น พริกบางช้าง พริกมัน พริกหนุ่ม พริกเหลือง พริกขอส และพริกหวาน กลุ่มพริกขี้นหนูใหญ่ (*Capsicum annuum* L.) เช่น พริกจินดา พริกหัวเรือ พริกหัวสี่ทนต์ พริกยอดสนและพริกข่อ กลุ่มพริกขี้นหนูเล็ก (*Capsicum frutescens* L.) เช่น พริกขี้นหนูหอม พริกขี้นกและพริกกะเหรียง เป็นต้น (วิลาวัลย์, 2557) ในระบบการปลูกพริกของเกษตรกรในทุกแหล่งปลูก โรคที่สำคัญทำความเสียหายมากโรคหนึ่งคือ โรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) หรือ โรคกุ้งแห้ง ที่เกิดจากราในสกุล *Colletotrichum* ซึ่งเมื่อพบการระบาดของโรคจะส่งผลกระทบต่อทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ราสาเหตุโรคสามารถ เขาทำลายผลพริกได้ทุกระยะ และอาการของโรคเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต (นิรนาม, 2552) มีรายงานว่าราสกุล *Colletotrichum* มากกว่าหนึ่งสปีชีส์ (species) เช่น *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby *Colletotrichum acutatum* Simmonds และ *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes ที่เป็นสาเหตุของโรค

แอนแทรคโนสปริก (สุदारัตน์และเพชรรัตน์, 2552; รัตติยาและคณะ, 2553; Robert *et al.*, 2001; Than *et al.*, 2008; Chandra *et al.*, 2009) และรายงานว่ามียีสเชื้อราสามารถก่อให้เกิดโรคในพืชตระกูลถั่ว พืชผัก ธัญพืช วัชพืชและไม้ผลหลายชนิดเช่น มะม่วง มะละกอ ฝรั่ง ส้ม อะโวคาโด องุ่น เป็นต้น ลักษณะอาการในระยะแรกจะปรากฏเป็นจุดฉ่ำน้ำเล็กๆ แผลบุ๋มลึกลงไปเล็กน้อย ต่อมาแผลขยายขนาดออกไปในลักษณะวงรี หรือวงกลม เกิดเป็นวงดำซ้อนกันเป็นชั้นๆ บางครั้งจะพบเมือกเยิ้มสีส้มอ่อนที่บริเวณแผล ผลพริกที่เป็นโรคจะโค้งงอ บางผลเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองซีด ผลแห้งเหี่ยว ถ้าพริกเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคและหรือมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม อาการโรคจะขยายลุกลามสู่ต้นอื่นๆอย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายต่อผลพริกจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ ซึ่งมักพบการระบาดของโรคแอนแทรคโนสปริกรุนแรงในช่วงฤดูฝนที่มีสภาพอากาศร้อนชื้นฝนตกชุกหรือช่วงอุณหภูมิประมาณ 27 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์ไม่น้อยกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ การแพร่ระบาดของโรคเกิดจากโคนิเดียของราบนผลพริกที่เป็นโรคแพร่ติดไปกับลม น้ำฝน การให้น้ำพืชแบบสปริงเกอร์และแมลง เป็นต้น

ปัจจุบันระบบนิเวศน์เกษตรมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ ทั้งสภาพอากาศและชนิดของพันธุ์พืชที่ปลูก จึงอาจมีแนวโน้มทำให้ราสาเหตุโรคมักมีความผันแปรในหลายๆด้านรวมทั้งความสามารถในการทำให้เกิดโรค ซึ่งพบว่าปัจจุบันพบการเข้าทำลายผลพริกได้ทุกระยะ ดังนั้นการศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสปริก จึงมีความสำคัญที่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานและชนิดของราสาเหตุโรคบนพริกแต่ละสายพันธุ์ รวมทั้งแหล่งการแพร่ระบาดของโรค ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเป็นฐานข้อมูลสำคัญสำหรับการศึกษาค้นคว้าหาแนวทางในการป้องกันกำจัดโรครวมทั้งได้สายพันธุ์รา *Colletotrichum* spp. เก็บรักษาไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการเกษตรกรมวิชาการเกษตร เพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพริกเป็นโรคที่รวบรวมได้จากแปลงปลูก
2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างโรคพริก
3. อาหารเลี้ยงเชื้อรา
4. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง
5. วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ
6. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการบันทึกข้อมูลและบันทึกภาพ

วิธีการ

การเก็บรวบรวมตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส

เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการเป็นโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกพริกที่สำคัญโดยกำหนดพื้นที่หรือแหล่งปลูก

ภาคกลาง เช่น จังหวัดสุโขทัย สุพรรณบุรี เพชรบูรณ์ พิษณุโลก พิจิตร นครสวรรค์ นครปฐม ลพบุรี ภาคเหนือ เช่น จังหวัดเชียงราย แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน พะเยา อุตรดิตถ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดอุบลราชธานี นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น ร้อยเอ็ด นครพนม ศรีสะเกษ เลย

ภาคตะวันออกเช่น จังหวัดปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง ชลบุรี จันทบุรี ตราด ฉะเชิงเทรา

ภาคตะวันตก เช่น จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์

ภาคใต้ เช่น จังหวัดกระบี่ ชุมพร นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา

สุ่มเก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงโรค 5 แถวต่อแปลง สุ่มแบบแถวเว้นแถว นำตัวอย่างโรคที่ได้ ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เจาะระบายความชื้น นำตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นและแยกเชื้อที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช เก็บรักษาสายพันธุ์รา *Colletotrichum* spp. จากผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนสไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

การจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological identification)

ศึกษาจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง (Direct observation)

ตรวจดูลักษณะโคโคนิเดียของรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope และกล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope โดยใช้เข็มปลายแหลมย้ายโคโคนิเดียหรือโครงสร้างที่สร้างส่วนขยายพันธุ์ของรามาวางบนสไลด์ ถ้าไม่พบโคโคนิเดียของรบบนชิ้นส่วนพืช นำชิ้นส่วนพืชมาวางในกล่องที่ทำให้ชื้น (moist chamber) ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ 1-2 วัน ตรวจดูชิ้นส่วนพืชเมื่อพบการสร้างกลุ่มโคโคนิเดีย ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยย้ายกลุ่มโคโคนิเดียที่เจริญอยู่บนชิ้นส่วนพืชมาตรวจดูอีกครั้ง บันทึกลักษณะต่าง ๆ วัดขนาดส่วนต่าง ๆ ของราและถ่ายภาพ จากนั้นทำการแยกเชื้อแบบ single conidia โดยนำกลุ่มโคโคนิเดีย มาเจือจางในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไป streak บนอาหาร WA แล้วตัดปลายเส้นใยที่ออกมาจาก single conidia มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°C. เป็นเวลา 5-7 วัน ศึกษาลักษณะการเจริญของรบบนอาหาร

ศึกษาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค (Tissue transplanting)

ตัดตัวอย่างพืชที่เป็นโรคบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติ ฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนพืชโดยแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร Half Strength Potato Dextrose Agar (1/2 PDA) เก็บที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope ตัดปลายเส้นใย (hyphal tip) ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช วางลงบนอาหาร PDA เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกได้มาจำแนกระบุชื่อชนิด (สปีชีส์; species) โดยเปรียบเทียบลักษณะโคโคนิ การเจริญ สีของโคโคนิ รวมทั้งเปรียบเทียบลักษณะรูปร่าง สีและขนาดของโคโคนิเดีย ลักษณะรูปร่าง สีและขนาดของแอฟเพรสซอเรีย (appressoria) ที่ได้โดยวิธีการ

เลี้ยงราบนสไลด์ (slide culture) กับคู่มือของ Sutton (1980) Bailey and Jeger (1992) และเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้อง

ศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone ต่อชนิด (species) ของรา *Colletotrichum* spp.

การสร้าง clear zone ของรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM)

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เมื่อมีอายุ 5 วัน ย้ายเชื้อมาทดสอบบนอาหาร CHM ที่มีความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสลับกับความมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดของ clear zone ศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของรา *Colletotrichum* spp. แต่ละไอโซเลต

การสร้าง clear zone ของรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร Casein from bovine milk medium (CBM)

นำเชื้อรา *Colletotrichum* มาเลี้ยงบนอาหาร CBM ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสลับกับความมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดของ clear zone ศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของรา *Colletotrichum* spp. แต่ละไอโซเลต

การบันทึกข้อมูล

- รายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจเช่น ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง พันธุ์พริก เป็นต้น
- ลักษณะทางสัณฐาน เช่น ลักษณะการเจริญของโคโลนี สีของโคโลนี ลักษณะรูปร่าง ขนาด และสีของโคนินเดีย รูปร่างของแอฟเพรสซอเรีย
- ขนาดของ clear zone บนอาหาร CHM และ CBM

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2560 สิ้นสุด เดือน กันยายน พ.ศ. 2563

สถานที่ทำการทดลอง แปลงปลูกพริกของเกษตรกร

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บรวบรวมตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส

เก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากพื้นที่ที่มีการปลูกพริกของประเทศไทย เดือน ตุลาคม 2560 ถึง เดือนกันยายน 2562 ได้ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจำนวน 113 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นพริกในกลุ่ม *Capsicum annuum* ได้แก่ พริกชี้หูผลใหญ่พันธุ์จินดาฮอตเตอร์ ซุปเปอร์ฮอต หัวเรือ หัวสี่ทอน ยอดสน พริกในกลุ่ม *Capsicum frutescens* หรือพริกชี้หนู

ผลเล็กได้แก่ พริกกะเหรียง พริกขี้หนู พริกขาวชัยบุรี (พริกขาวซี) และพริกในกลุ่ม *Capsicum chinense* หรือพริกผลใหญ่ได้แก่ พริกหนุ่มเขียว พริกย่ำ พริกหยวก เป็นต้น (Table 1)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของรา *Colletotrichum* spp. เพื่อจำแนกชนิด

นำตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสมาศึกษาลักษณะอาการของโรค ลักษณะทางสัณฐานของราที่เจริญอยู่บนผิวพืช ทำการแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากผลพริกที่เป็นโรค ศึกษาลักษณะโคโลนี ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหาร ลักษณะทางสัณฐานของราตามเอกสารและวิธีการของ Sutton (1980) วิรัชและคณะ (2528) รัตยาและคณะ (2553) และ วรานันท์ (2554) แบ่งกลุ่มรา *Colletotrichum* spp. ตามลักษณะรูปร่างของโคนิเดีย (conidia) เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโคนิเดียรูปร่างทรงกระบอก รูปร่างรูปทรงกรวย หรือรูปร่างตรง และ กลุ่มโคนิเดียรูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์เสี้ยว ซึ่งแต่ละชนิดมีลักษณะของโคโลนีที่มีความหลากหลายแตกต่างกัน ความเร็วในการเจริญของเส้นใย สี การสร้างโคนิเดียบนอาหาร PDA ก็มีความหลากหลาย ผลการจำแนกชนิด (species) รา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานจำแนกได้ 3 ชนิดคือ *Colletotrichum acutatum* ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุด รองลงมาคือ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ โดยราทั้ง 3 ชนิดพบแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย

Colletotrichum acutatum J.H. Simmonds (1968).

ลักษณะอาการของโรค การศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่พบการเกิดโรคกับผลพริกทั้งผลที่ยังอ่อนมีสีเขียว ผลพริกที่แก่จัดเริ่มเปลี่ยนสีและผลพริกที่สุกแก่เปลี่ยนสี ลักษณะแผลเริ่มแรกมีรูปร่างค่อนข้างกลม ลักษณะฉ่ำน้ำสีเข้ม แผลยุบตัวลงเป็นแอ่งลึกจากผิวผล เมื่อแผลมีการขยายขนาด ส่วนใหญ่แผลจะขยายไปตามความยาวของผล เป็นรูปรีและขยายใหญ่ขึ้นเป็นแผลรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่ผิวพืช (epidermis) บริเวณแผลมีลักษณะแตกหรือปริแตกเป็นริ้ว บนรอยแตกพบกลุ่มโคนิเดีย ลักษณะเป็นเมือกสีส้ม (orange , blight orange) อยู่บน acervulus จำนวนมากที่เกิดกระจายอยู่บนแผล และจากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการสร้าง setae

ลักษณะโคโลนีของราบนอาหาร PDA การศึกษาครั้งนี้พบลักษณะของโคโลนีที่มีความแตกต่างกันดังนี้

กลุ่มที่มีเส้นใยละเอียดคล้ายกำมะหยี่ สีขาวปนเทาหรือขาวอมส้ม เจริญฟูเหนืออาหารเล็กน้อย ด้านหลังของโคโลนี (reverse) ตรงกลางสีส้มอมชมพูหรือเทาอมชมพู ขอบสีขาวเทา สร้างกลุ่มโคนิเดียสีส้ม (blight orange, orange) เจริญซ้อนกันเป็นวง (concentric ring) ชัดเจน

กลุ่มที่มีเส้นใยละเอียดคล้ายกำมะหยี่ สีขาวอมส้ม เจริญฟูเหนืออาหารเล็กน้อย ด้านหลังของโคโลนี (reverse) ตรงกลางสีเทาอมส้ม ขอบสีขาวอมส้ม สร้างกลุ่มโคนิเดียสีส้ม (blight orange, orange) เจริญกระจายอยู่ไม่ซ้อนกันเป็นวง

กลุ่มที่มีเส้นใยเจริญฟูเหนืออาหารเล็กน้อย สีขาวอมส้ม ด้านหลังของโคโลนี ตรงกลางสีส้มอมชมพู ขอบสีขาวเทา กลุ่มโคนิเดียสีส้ม (blight orange, orange) เจริญซ้อนกันเป็นวงไม่ชัดเจน

กลุ่มที่มีเส้นใยฟู สีขาวเทา ด้านหลังของโคโลนี ตรงกลางสีเทาอมชมพูถึงเทาเข้ม ขอบขาว พบกลุ่มโคนิเดียเจริญฝัองอยู่ที่โคโลนี

กลุ่มที่เส้นใยเจริญฟูและหนาแน่น ด้านหลังของโคโลนี ตรงกลางมีสีเขียว ขอบสีชมพูอมส้ม จนถึงเทา สร้างกลุ่มโคนิเดียค่อนข้างน้อยสีอ่อน (pale salmon ถึง salmon orange) ใต้โคโลนี

ทุกไอโซเลตของ *C. acutatum* มีอัตราการเจริญของเส้นใยช้ากว่า *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* และไม่พบการสร้าง setae บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลักษณะรูปร่างของโคนิเดีย

โคนิเดียมีรูปร่างหลายลักษณะมีทั้งรูปกระสวย รูปรีปลายเรียวแหลมด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้าน รูปทรงกระบอกตรง รูปร่างคล้ายกระบอง บางโคนิเดียพบรอยคอดตรงกลาง เซลล์เดี่ยวใส ไม่มีสี (hyaline) ผนังเรียบ ขนาดของโคนิเดียอยู่ในช่วง 2.75-4.3 x 5.18-18.37 ไมโครเมตร ลักษณะรูปร่างของแอฟเพรสซอเรีย (appressoria) มีหลายลักษณะทั้งรูปร่างค่อนข้างกลม กลมรี รูปร่างคล้ายกระบองและรูปร่างไม่แน่นอน มีทั้งที่ผิวเรียบถึงเป็นลอน (lobe, clavate, long clavate, circular, cylindrical, irregular) สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม มีทั้งที่เกิดเดี่ยวๆและเกิดต่อกันเป็นลูกโซ่

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. and Sacc. (1884)

ลักษณะอาการของโรค การศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่จะพบการเกิดโรคนบนผลพริกที่เริ่มเปลี่ยนสีและผลที่สุกแก่ เริ่มแรกแผลมีลักษณะฉ่ำน้ำสีเข้ม แผลมีรูปร่างค่อนข้างกลมถึงยาวรี ยุบตัวลงเป็นแอ่งลึกจากผิวผล ขยายขนาดตามความยาวของผล ส่วนใหญ่บริเวณแผลจะพบจุดสีดำขนาดเล็กซึ่งคือกลุ่ม acervulus ฝัองอยู่ที่ผิวพืช เกิดเรียงซ้อนกันเป็นวงและพบกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นเมือกสีส้ม (orange, blight orange) เกิดขึ้นบน acervulus จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการสร้าง setae บนผิวพืช

ลักษณะโคโลนีของราบนอาหาร PDA การศึกษาครั้งนี้พบลักษณะของโคโลนีที่มีความหลากหลายแตกต่างกันดังนี้

กลุ่มที่เส้นใยมีสีขาวเทา เจริญฟูเหนืออาหาร ด้านหลังของโคโลนี ตรงกลางสีเทาถึงเทาเข้ม ขอบสีขาวเทา พบกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นเมือกสีส้ม (pale salmon, salmon, orange, blight orange) เกิดซ้อนกันเป็นวง

กลุ่มที่เส้นใยสีเทาเจริญฟูแน่นบนผิวหน้าอาหาร ด้านหลังของโคโลนี ตรงกลางสีเขียวถึงเทา ขอบสีขาวเทา กลุ่มโคนิเดียสีครีมถึงส้ม (pale salmon, salmon orange, blight orange) เจริญอยู่ที่โคโลนี

กลุ่มที่เส้นใยเจริญฟูแน่นบนผิวหน้าอาหาร ด้านหลังของโคโลนี ตรงกลางสีเขียวมะกอกหรือเทาเข้ม ขอบขาว พบกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นเมือกสีครีมถึงส้ม (pale peach, pale salmon) เกิดซ้อนกันเป็นวง

กลุ่มที่มีเส้นใยหยาบสีขาวเทาเจริญฟูเหนืออาหาร ด้านหลังของโคโลนี ตรงกลางสีเขียวถึงเทา ขอบสีขาวเทา พบกลุ่มโคนิเดียค่อนข้างน้อยสีอ่อน สีครีมถึงส้ม (pale salmon, salmon orange) เกิดกระจายไม่ซ้อนกันเป็นวง

ทุกไอโซเลตของ *C. gloeosporioides* มีอัตราการเจริญของเส้นใยเร็วกว่า *C. capsici* และ *C. Acutatum* บางไอโซเลตของ *C. gloeosporioides* พบการสร้าง teleomorph (sexual stage) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลักษณะรูปร่างของโคนิเดีย

ลักษณะรูปร่างของโคนิเดียส่วนใหญ่มีรูปร่างทรงกระบอกตรง ปลายด้านหนึ่งมีลักษณะมน ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งมีลักษณะฐานตัด เซลล์เดี่ยว ผนังเรียบ ใส ไม่มีสี ขนาดของโคนิเดียอยู่ในช่วง 2.44-4.45 × 8.35-19.41 ไมโครเมตร แอปเพรสซอเรีย (appressoria) มีรูปร่างหลายลักษณะมีทั้งรูปร่างค่อนข้างกลม กลมรี รูปร่างคล้ายกระบองและรูปร่างไม่แน่นอน มีทั้งที่ผิวเรียบถึงเป็นลอน สีนํ้าตาลอ่อนถึงสีนํ้าตาลเข้ม มีทั้งที่เกิดแบบเดี่ยวและเกิดหลายอันต่อกัน

Colletotrichum capsici (Syd. & P.Syd.) E.J.Butler & Bisby (1931)

ลักษณะอาการของโรค การศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่พบการเกิดโรคบนผลพริกที่แก่จัดหรือผลพริกที่สุกแก่เปลี่ยนสีแล้ว แผลมีลักษณะค่อนข้างกลม รูปรี่หรือรูปไข่ ขอบเรียบ แผลยุบตัวลึกลงจากผิวผล บางแผลตรงกลางมีสีเข้มขอบสีอ่อน มีจุดสีดำซึ่งเป็กลุ่มของ acervulus และ setae จำนวนมากเรียงเป็นวงซ้อนกัน มองเห็นได้ชัดเจน บน acervulus พบกลุ่มโคนิเดีย สีครีม สีส้มอมชมพูหรือสีส้มอ่อน setae สีดำยาวสูงกว่ากลุ่มโคนิเดีย

ลักษณะโคโลนีของราบนอาหาร PDA การศึกษาครั้งนี้พบลักษณะของโคโลนีที่มีความแตกต่างกัน ดังนี้

กลุ่มที่มีเส้นใยแน่น เจริญฟูเหนืออาหารเล็กน้อย ตรงกลางโคโลนีสีเทาถึงสีเทาดำ ขอบสีเทาปนขาว พบกลุ่มโคนิเดียเจริญซ้อนกันเป็นวง (concentric ring) กลุ่มโคนิเดียสีครีม สีส้มอ่อนจนถึงสีส้มเข้ม (buff, pale peach, peach, pale salmon, salmon, salmon orange)

กลุ่มที่มีเส้นใยหยาบ เจริญบางๆ บนอาหาร ตรงกลางโคโลนีสีเทาดำถึงสีดำ สีเขียวขี้ม้าถึงเทาดำ ขอบโคโลนีขาว ลักษณะกลุ่มโคนิเดียเป็นเมือกสีอ่อน (pale peach, pale salmon) เจริญแบบกระจายทั่วไม่ซ้อนกันเป็นวง

กลุ่มที่มีเส้นใยแน่น เจริญฟูเหนืออาหารเล็กน้อย ตรงกลางโคโลนีสีขาวปนเทาถึงสีเทาดำ พบพบกลุ่มโคนิเดียเกิดขึ้นน้อย กลุ่มโคนิเดียสีครีมหรือส้ม เกิดแบบกระจายไม่ซ้อนเป็นวง

ทุกไอโซเลตของ *C. capsici* มีอัตราการเจริญของเส้นใยเร็วกว่า *C. acutatum* และส่วนใหญ่เจริญช้ากว่า *C. gloeosporioides* บางไอโซเลตของ *C. capsici* พบการสร้าง setae บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลักษณะรูปร่างของโคนิเดีย โคนิเดียมีรูปร่างโค้งคล้ายเคียวหรือพระจันทร์เสี้ยว (falcate จนถึง fusiform) ปลายเรียวแหลมทั้งสองด้าน เซลล์เดี่ยว ใส ไม่มีสี ผนังเรียบ ขนาดของโคนิเดียอยู่ในช่วง

1.76-3.82 x 20.04-26.94 ไมโครเมตร แอปเพรสซอเรีย (appressoria) รูปร่างมีหลายลักษณะทั้ง เป็น มีทั้งรูปร่างค่อนข้างกลม กลมรี รูปไข่ รูปร่างคล้ายกระบองและรูปร่างไม่แน่นอน (clavate, long clavate, circular, cylindrical, ovoid, irregular) มีทั้งที่ผิวเรียบและเป็นลอน (lobe) สีนํ้าตาลอ่อน ถึงสีน้ำตาลเข้ม มีทั้งที่เกิดแบบเดี่ยวและเกิดหลายอันต่อกันเป็นลูกโซ่ การศึกษาครั้งนี้บางไอโซเลตพบ การสร้าง setae บนอาหารเลี้ยงเชื้อ setae ที่พบมีทั้งรูปร่างเรียวยาวปลายมน เรียวยาวปลายแหลม และโคนแคบปลายมน สีนํ้าตาลเข้ม ส่วนใหญ่มีผนังกัน

การศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone ต่อชนิด (species) ของรา *Colletotrichum* spp.

การสร้าง clear zone ของรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM) พบว่าราที่จำแนกเป็น *C. acutatum* มีการสร้างส่วนของ clear zone กว้างที่สุด มีช่วงระหว่าง 5.3 -13.5 มิลลิเมตร รา *C. gloeosporioides* มีการสร้างส่วนของ clear zone แคบกว่า *C. acutatum* ที่มีช่วงระหว่าง 1.2-6.6 มิลลิเมตร ส่วน *C. capsici* มีการสร้างส่วนของ clear zone แคบที่สุด มีช่วงระหว่าง 0.5-5.8 มิลลิเมตร

การสร้าง clear zone ของรา *Colletotrichum* spp. บนอาหาร Casein from bovine milk medium (CBM) พบว่าราที่จำแนกเป็น *C. acutatum* มีการสร้างส่วนของ clear zone กว้างที่สุด มีช่วงระหว่าง 5.6-14.5 มิลลิเมตร รา *C. gloeosporioides* มีการสร้างส่วนของ clear zone แคบกว่า *C. acutatum* มีช่วงระหว่าง 1.0-8.7 มิลลิเมตร ส่วน *C. capsici* มีการสร้าง ส่วนของ clear zone แคบที่สุด มีช่วงระหว่าง 0-4.7 มิลลิเมตร และบางไอโซเลตไม่พบการสร้าง clear zone

จากการสำรวจโรคแอนแทรคโนสพริกครั้งนี้ พบราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก 3 ชนิด ได้แก่ *C. acutatum* *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* โดย *C. acutatum* เป็นเชื้อที่พบมากที่สุด รองลงมาได้แก่ *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Than และคณะ (2008); รัตยาและคณะ (2553) ซึ่งได้รายงานไว้ว่ารา *Colletotrichum* 3 ชนิด (species) ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคแอนแทรคโนสพริกคือ *C. gloeosporioides*, *C. capsici* และ *C. acutatum* แต่จากการสำรวจของ ฉัตรนันทรีและคณะ (2550) รายงานว่าพบรา *Colletotrichum* 4 ชนิด ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก คือ *C. gloeosporioides*, *C. capsici*, *C. acutatum* และ *C. coccodes* โดย *C. gloeosporioides* พบมากที่สุดและ *C. capsici* พบรองลงมา กระจายอยู่ในเขตขอนแก่น ร้อยเอ็ด อ่างนาจเจริญ เพชรบูรณ์ พิษณุโลก และ สุโขทัย ส่วน *C. coccodes* พบจากแหล่งจังหวัดขอนแก่น อ่างนาจเจริญ และอุตรดิตถ์ ส่วน *C. acutatum* พบใน ตัวอย่างจากจังหวัดอุบลราชธานี สุโขทัย และพิษณุโลก

ลักษณะอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกที่พบ อาการเริ่มแรกเกิดจุดฉ่ำน้ำเล็กๆ ต่อมา แผลขยายขนาดออกไปในลักษณะเป็นวงรีหรือกลม ซึ่งจากการสำรวจส่วนใหญ่พบรา *C. acutatum* บนผลพริกทุกระยะ ทั้งผลที่ยังอ่อนมีสีเขียว ผลพริกที่เริ่มเปลี่ยนสีและผลพริกที่สุกแดง ซึ่งแสดงว่า *C. acutatum* มีการระบาดเพิ่มมากขึ้นและพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งจากรายงานของ

Robert et al. (2001) นั้นพบว่า *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* สามารถเข้าทำลายผลพริกได้ทุกระยะทั้งผลอ่อนและผลแก่ รวมทั้งแสดงอาการเหมือนกัน ส่วนรา *C. capsici* ส่วนใหญ่จะพบบนผลสุกที่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีแดง ผลพริกที่เป็นโรครุนแรงจะเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวหรือสีฟางข้าว ผลบิดเบี้ยว โค้งงอ มี acervulus และ setae เรียงซ้อนกันเป็นวง (Than et al., 2008) อัตราการเจริญของเส้นใยของราไอโซเลตต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า *C. gloeosporioides* มีอัตราการเจริญของเส้นใยเร็วที่สุด รองลงมาคือ *C. capsici* ส่วน *C. acutatum* มีอัตราการเจริญของเส้นใยช้าที่สุด ซึ่งแสดงความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากราในสกุล *Colletotrichum* เป็นราที่มีความผันแปรสูง ส่งผลให้ลักษณะทางสัณฐานของรา เช่น ลักษณะโคโลนี ลักษณะรูปร่างของโคนิเดียของรา *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* ที่ได้จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์มีความคล้ายคลึงกันมาก รวมทั้งลักษณะรูปร่างของแอฟเพรสซอเรีย ก็มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค slide culture ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ รัตติยาและคณะ (2553) และ Than et al. (2008b) ดังนั้นจึงควรศึกษาลักษณะทางสัณฐานร่วมกับการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาระดับโมเลกุลมาช่วยในการแยกความแตกต่างระหว่างชนิดของรา *Colletotrichum* spp. เพื่อช่วยให้การตรวจสอบและจำแนกชนิดมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาตรวจสอบการเจริญแบบแฝงของราสาเหตุโรคในสวนต่างๆของพริกต่อไป

การศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของรา *Colletotrichum* spp. โดยเลี้ยงรา *Colletotrichum* spp. ที่จัดจำแนกไว้บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM) พบว่ารา *Colletotrichum acutatum* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนที่สุด มีความกว้างของ clear zone มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ ส่วนบนอาหาร CBM พบว่า *Colletotrichum acutatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนที่สุด ส่วน *Colletotrichum capsici* สร้าง clear zone แคบที่สุดและบางไอโซเลตไม่สร้าง clear zone แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองที่พบว่าเมื่อนำรา *Colletotrichum* spp. มาเลี้ยงบนอาหาร CHM ราแต่ละกลุ่มชนิดสามารถสร้าง clear zone ให้เห็นความแตกต่างได้ค่อนข้างชัดเจน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเมื่อนำมาประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถนำมาสนับสนุนการจำแนกกลุ่มรา *Colletotrichum* spp. ทั้ง 3 กลุ่มชนิด ในเบื้องต้นได้ทางหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของวรานันท์และคณะ (2553)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก ระหว่างเดือน ตุลาคม 2560 ถึง เดือนกันยายน 2562 โดยการเก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากพื้นที่ปลูกพริกทุกภาคของประเทศไทย มาจำแนกชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานของรา ผลการศึกษาครั้งนี้ จำแนกชนิดรา *Colletotrichum* spp. ที่เป็นสาเหตุหลักของโรคแอนแทรคโนสพริกได้ 3 ชนิด คือ *Colletotrichum acutatum* ซึ่งเป็นชนิดที่พบมาก

ที่สุด ซึ่งจากเดิมพบไม่มากนักและพบแพร่กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย รองลงมาได้แก่รา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของรา *Colletotrichum* spp. โดยเลี้ยงรา *Colletotrichum* spp. ที่จัดจำแนกไว้บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM) พบว่ารา *Colletotrichum acutatum* สร้าง clear zone ได้ชัดเจนที่สุด มีความกว้างของ clear zone มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *Colletotrichum* และ *Colletotrichum capsici* ตามลำดับ เห็นความแตกต่างได้ชัดเจน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเมื่อนำมาประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถนำมาช่วยในการจัดจำแนกกลุ่มรา *Colletotrichum* spp. ทั้ง 3 กลุ่มชนิด ในเบื้องต้นได้ทางหนึ่ง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้ร่วมงานทุกท่านและขอขอบคุณ คุณจุฬารัตน์ หน่อแก้ว คุณกุลปริยา มงคลนำ ที่มีส่วนช่วยในการทำงานจนงานนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- นิรนาม. 2552. *คู่มือโรคผัก* กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 154 หน้า.
- รัตยา พงศพิศุทธา วรานันท์ วิญญูรัตน์ โชติรส รอดเกตุ และเทพพนม แสงเพลิง. 2553. ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. ปีที่ 41 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) มกราคม-เมษายน. หน้า 318 -321.
- วรานันท์ วิญญูรัตน์ รัตยา พงศพิศุทธา และชัยณรงค์ รัตนกรिताกุล. 2553. การทดสอบ casein hydrolysis เพื่อจำแนก species ของ *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. ปีที่ 41 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) มกราคม-เมษายน. หน้า 299-302.
- วรานันท์ วิญญูรัตน์. 2554. *การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา Colletotrichum สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 136 หน้า.
- วิลาวัลย์ ไคร์ครวญ. 2557. *พริกของไทย...พริกใหญ่ พริกเล็ก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n17/v_3-apr/korkui.html. (23 กุมภาพันธ์ 2560).
- วิรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ และพัฒนา สนธิรัตน์. 2528. *Colletotrichum* spp. ในประเทศไทย. หน้า 128-140. ใน: *รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2528*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- สุดาร์ตน์ สุตพันธ์ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2552. การเก็บรวบรวมและจำแนกเชื้อราคอแลตโตตริคัม. ใน การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 วันที่ 24-26 พฤศจิกายน 2552 โรงแรมสุโขทัย แกรนด์ อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี.

- Bailey, J. A. and M. J Jeger. 1992. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Commonwealth Mycological Institute, Wallingford, UK: CAB International. 388 p.
- Chandra Nayaka, S., A.C. Udayashankar, S.R.Niranjana, H.S. Prakash and C.N. Mortensen. 2009. *Anthracoise disease of Chili Pepper*. Technical Bulletin. The Asian Seed Health Center (AsSHC), Department of Studies in Applied Botany & Biotechnology, University of Mysore, India. 15 p.
- Robert, P.D., K.L. Pernezny and T.A. Kucharek. 2001. *Anthracoise on Pepper in Florida*. U.S. Department of Agriculture, Cooperative Extension Service, University of Florida, Gainesville, FL 32611. (Online). Available. <https://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/PP/PP10400.pdf>. (23 February 2017).
- Simmonds, J.H. 1965. A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Science*. 22: 437-459.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. CMI. Kew Surrey, England. 695 p.
- Than, P.P., R. Jeewon, K.D. Hyde, S. Pongsupasamit, O. Mongkolporn and P.W.J. Taylor. 2008a. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathol* 57: 562-572.
- Than, P.P., Haryudian Prihastuti, Sitthisak Phoulivong, Paul V.J.Taylor and Kevin D. hyde. 2008. Chili Anthracnose Disease Caused by *Colletotrichum* species. *Journal of Zhejiang Univ. Sci. B*. 9(10): 764-778.

Table 1 Anthracnose disease specimens collected from this study. (2017-2018)

No.	Scientific name	Location	Lat. (N)	Long. (E)
1	<i>Capsicum annuum</i>	Long Khot Phrao Chiang Mai	19° 06' 18"	99° 10' 20"
2	<i>Capsicum annuum</i>	Long Khot Phrao Chiang Mai	19° 06' 18"	99° 10' 19"
3	<i>Capsicum annuum</i>	Mae Ho Phra Mae Taeng Chiang Mai	19° 6' 29"	99° 1' 48"
4	<i>Capsicum annuum</i>	Inthakhin Mae Taeng Chiang Mai	19° 9' 20"	98° 59' 01"
5	<i>Capsicum annuum</i>	Inthakhin Mae Taeng Chiang Mai	19° 9' 51"	98° 59' 99"
6	<i>Capsicum annuum</i>	Inthakhin Mae Taeng Chiang Mai	19° 9' 15"	98° 59' 83"
7	<i>Capsicum annuum</i>	Inthakhin Mae Taeng Chiang Mai	19° 9' 01"	98° 59' 59"
8	<i>Capsicum annuum</i>	Cho Lae Mae Taeng Chiang Mai	19° 6' 17"	99° 0' 84"
9	<i>Capsicum annuum</i>	Cho Lae Mae Taeng Chiang Mai	19° 6' 06"	99° 0' 42"
10	<i>Capsicum annuum</i>	Cho Lae Mae Taeng Chiang Mai	19° 7' 24"	99° 0' 8.78"
11	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Han San Sai Chiang Mai	18° 54' 54 "	99° 01' 45"
12	<i>Capsicum chinense</i>	Mae Faek Mai San Sai Chiang Mai	19° 8' 22"	99° 1' 28"
13	<i>Capsicum annuum</i>	Buak Khang Sankamphaeng Chiang Mai	18° 41' 59"	99° 05' 35 "
14	<i>Capsicum annuum</i>	Buak Khang Sankamphaeng Chiang Mai	18° 41' 47"	99° 05' 01 "
15	<i>Capsicum chinense</i>	Huai Yap Ban Thi Lamphun	19° 9' 01"	99° 4' 00"
16	<i>Capsicum chinense</i>	Huai Yap Ban Thi Lamphun	19° 9' 01"	99° 0' 04"
17	<i>Capsicum chinense</i>	Nong Muang Khai Phrae	19° 8' 42"	100° 09' 10"
18	<i>Capsicum chinense</i>	Mae Sai Rong Kwang Phrae	18° 23' 17"	100° 18' 45"
19	<i>Capsicum chinense</i>	Tanot Khiri Mat Sukhothai	16° 49' 31"	99° 48' 11"
20	<i>Capsicum chinense</i>	Kok Raet Kong Krailat Sukhothai	16° 59' 35"	100° 02' 09"
21	<i>Capsicum annuum</i>	Ong Klap Sawankhalok Sukhothai	17° 14' 10"	99° 46' 29"
22	<i>Capsicum chinense</i>	Sanam Khli Bang Krathum Phitsanulok	16° 32' 28"	100° 15' 35"
23	<i>Capsicum chinense</i>	Sanam Khli Bang Krathum Phitsanulok	16° 32' 18"	100° 16' 00"
24	<i>Capsicum chinense</i>	Sanam Khli Bang Krathum Phitsanulok	16° 32' 26"	100° 16' 01"
25	<i>Capsicum annuum</i>	Khaem Son Khao kho Phetchabun	16° 45' 40"	101° 01' 59"
26	<i>Capsicum annuum</i>	Khaem Son Khao kho Phetchabun	16° 45' 35"	101° 01' 51"
27	<i>Capsicum annuum</i>	Khaem Son Khao kho Phetchabun	16° 45' 26"	101° 01' 54"
28	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Mae Na Khao kho Phetchabun	16° 45' 22"	101° 01' 11"
29	<i>Capsicum frutescens</i>	Khao kho Phetchabun	16° 40' 13"	101° 00' 48"
30	<i>Capsicum frutescens</i>	Khao kho Phetchabun	16° 40' 13"	101° 00' 36"
31	<i>Capsicum frutescens</i>	Pak Duk Lom Sak Phetchabun	16° 42' 57"	101° 14' 57"
32	<i>Capsicum frutescens</i>	Nong Khwai Lom Sak Phetchabun	16° 45' 03"	101° 14' 48"
33	<i>Capsicum frutescens</i>	Lom Sak Lom Sak Phetchabun	16° 45' 50"	101° 15' 2"
34	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Ngu Lueam Muang Nakhon Pathom	13° 55' 00"	99° 56' 23"
35	<i>Capsicum annuum</i>	Thung Kraphang Hom Kam Paeng Saen Nakhon Pathom	13° 59' 45"	99° 58' 48"

Table 1 Anthracnose disease specimens collected from this study. (2017-2018) (continue)

No.	Scientific name	Location	Lat. (N)	Long. (E)
36	<i>Capsicum annuum</i>	Thung Khwang Kam Paeng Saen Nakhon Pathom	13° 59' 09"	99° 58' 25"
37	<i>Capsicum annuum</i>	Wang Nam Sap Si Prachan Suphan Buri	14° 36' 46"	100° 04' 49"
38	<i>Capsicum annuum</i>	Wang Nam Sap Si Prachan Suphan Buri	14° 39' 37"	100° 08' 36"
39	<i>Capsicum annuum</i>	Plai Na Si Prachan Suphan Buri	14° 36' 48"	100° 06' 00"
40	<i>Capsicum chinense</i>	Plai Na Si Prachan Suphan Buri	14° 36' 07"	100° 05' 47"
41	<i>Capsicum annuum</i>	Mot Daeng Si Prachan Suphan Buri	14° 33' 45"	100° 07' 50"
42	<i>Capsicum annuum</i>	Bang Ngam Si Prachan Suphan Buri	14° 36' 46"	100° 04' 49"
43	<i>Capsicum chinense</i>	Phlapphla Chai U Thong Suphan Buri	14° 30' 23"	99° 54' 23"
44	<i>Capsicum annuum</i>	Thung Khok Song Phi Nong Suphan Buri	14° 11' 17"	99° 55' 52"
45	<i>Capsicum chinense</i>	Nong Yang Suea Muak Lek Saraburi	14° 49' 38"	110° 20' 21"
46	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Yang Suea Muak Lek Saraburi	14° 48' 35"	101° 20' 50"
47	<i>Capsicum annuum</i>	Kham Sakaesaeng Nakhon Ratchasima	15° 23' 07"	102° 09' 24"
48	<i>Capsicum annuum</i>	Ban Yang Kaset Sombun Chaiyaphum	16° 18' 11"	101° 58' 28"
49	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Bua Yai Chaturat Chaiyaphum	15° 34' 16"	101° 52' 10"
50	<i>Capsicum annuum</i>	Thung Phra Khon San Chaiyaphum	16° 39' 11"	101° 45' 19"
51	<i>Capsicum annuum</i>	Thung Phra Khon San Chaiyaphum	16° 38' 28"	101° 49' 19"
52	<i>Capsicum annuum</i>	Non Udom Chum Phae Khon Kaen	16° 30' 19"	102° 13' 51"
53	<i>Capsicum annuum</i>	Non Udom Chum Phae Khon Kaen	16° 31' 13"	102° 12' 40"
54	<i>Capsicum annuum</i>	Kham Thao Mueang Nakhon Phanom	17° 16' 23"	104° 46' 08"
55	<i>Capsicum annuum</i>	Kham Thao Mueang Nakhon Phanom	17° 16' 37"	104° 46' 10"
56	<i>Capsicum annuum</i>	Kham Thao Mueang Nakhon Phanom	17° 16' 35"	104° 45' 58"
57	<i>Capsicum annuum</i>	Kham Thao Mueang Nakhon Phanom	17° 16' 27"	104° 46' 17"
58	<i>Capsicum annuum</i>	Phon Kha Tha Bo Nong Khai	17° 49' 15"	102° 37' 50"
59	<i>Capsicum annuum</i>	Phon Kha Tha Bo Nong Khai	17° 48' 39"	102° 38' 48"
60	<i>Capsicum annuum</i>	Phon Kha Tha Bo Nong Khai	17° 49' 37"	102° 37' 00"
61	<i>Capsicum annuum</i>	Phon Kha Tha Bo Nong Khai	17° 49' 32"	102° 37' 17"
62	<i>Capsicum annuum</i>	Phon Kha Tha Bo Nong Khai	17° 49' 37"	102° 37' 14"
63	<i>Capsicum annuum</i>	Nam Mong Tha Bo Nong Khai	17° 50' 04"	102° 35' 20"
64	<i>Capsicum annuum</i>	Kong Nang Tha Bo Nong Khai	17° 52' 25"	102° 35' 07"
65	<i>Capsicum chinense</i>	Khi Lek Mueang Ubon Ratchathani	15° 21' 47"	104° 47' 39"
66	<i>Capsicum chinense</i>	Khi Lek Mueang Ubon Ratchathani	15° 21' 48"	104° 47' 41"
67	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Lao Muang Samsip Ubon Ratchathani	15° 27' 03"	104° 40' 35"
61	<i>Capsicum annuum</i>	Phon Kha Tha Bo Nong Khai	17° 49' 32"	102° 37' 17"
62	<i>Capsicum annuum</i>	Phon Kha Tha Bo Nong Khai	17° 49' 37"	102° 37' 14"
63	<i>Capsicum annuum</i>	Nam Mong Tha Bo Nong Khai	17° 50' 04"	102° 35' 20"
64	<i>Capsicum annuum</i>	Kong Nang Tha Bo Nong Khai	17° 52' 25"	102° 35' 07"

Table 1 Anthracnose disease specimens collected from this study. (2017-2018) (continue)

No.	Scientific name	Location	Lat. (N)	Long. (E)
65	<i>Capsicum chinense</i>	Khi Lek Mueang Ubon Ratchathani	15° 21' 47"	104° 47' 39"
66	<i>Capsicum chinense</i>	Khi Lek Mueang Ubon Ratchathani	15° 21' 48"	104° 47' 41"
67	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Lao Muang Samsip Ubon Ratchathani	15° 27' 03"	104° 40' 35"
68	<i>Capsicum annuum</i>	Dong Bang Bueng Khong Long Bueng Kan	18° 03' 06"	104° 09' 26"
69	<i>Capsicum annuum</i>	Dong Bang Bueng Khong Long Bueng Kan	18°03' 02"	104° 09' 29"
70	<i>Capsicum frutescens</i>	Ruam Thai Phatthana Phop Phra Tak	16° 26' 17"	98° 49' 22"
71	<i>Capsicum frutescens</i>	Ruam Thai Phatthana Phop Phra Tak	16° 26' 15"	98° 49' 30"
72	<i>Capsicum annuum</i>	Khiri Rat Phop Phra Tak	16° 28' 49"	98° 49' 40"
73	<i>Capsicum annuum</i>	Khiri Rat Phop Phra Tak	16° 28' 42"	98° 49' 46"
74	<i>Capsicum frutescens</i>	Khiri Rat Phop Phra Tak	16° 30' 30"	98° 51' 13"
75	<i>Capsicum frutescens</i>	Khiri Rat Phop Phra Tak	16° 29' 21"	98° 50' 13"
76	<i>Capsicum annuum</i>	Khiri Rat Phop Phra Tak	16° 29' 8"	98° 45' 46"
77	<i>Capsicum chinense</i>	Khiri Rat Phop Phra Tak	16° 28' 33"	98° 50' 4"
78	<i>Capsicum annuum</i>	Wang Krachae Sai Yok Kanchanaburi	14° 11' 43"	99° 3' 29"
79	<i>Capsicum annuum</i>	Wang Krachae Sai Yok Kanchanaburi	14° 11' 58"	99° 3' 24"
80	<i>Capsicum annuum</i>	Wang Krachae Sai Yok Kanchanaburi	14° 11' 54"	99° 3' 36"
81	<i>Capsicum annuum</i>	Wang Krachae Sai Yok Kanchanaburi	14° 11' 43"	99° 3' 36"
82	<i>Capsicum annuum</i>	Wang Krachae Sai Yok Kanchanaburi	14° 11' 43"	99° 3' 36"
83	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Pet Si Sawat Kanchanaburi	14° 35' 57"	99° 6' 50"
84	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Pet Si Sawat Kanchanaburi	14° 35' 28"	99° 6' 60"
85	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Pet Si Sawat Kanchanaburi	14° 35' 39"	99° 6' 50"
86	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Pet Si Sawat Kanchanaburi	14° 35' 14"	99° 6' 58"
87	<i>Capsicum frutescens</i>	Nong Pet Si Sawat Kanchanaburi	14° 35' 57"	99° 6' 62"
88	<i>Capsicum frutescens</i>	Na Suan Si Sawat Kanchanaburi	14° 35' 47"	99° 6' 39"
89	<i>Capsicum annuum</i>	Mae Krabung Si Sawat Kanchanaburi	14° 27' 41"	99° 2' 14"
90	<i>Capsicum annuum</i>	Tha Kradan Si Sawat Kanchanaburi	14° 27' 35"	99° 07' 57"
91	<i>Capsicum annuum</i>	Tha Kradan Si Sawat Kanchanaburi	14° 26' 58"	99° 07' 26"
92	<i>Capsicum annuum</i>	Tha Kradan Si Sawat Kanchanaburi	14° 27' 16"	99° 07' 59"
93	<i>Capsicum annuum</i>	Thung Thong Tha Muang Kanchanaburi	14° 00' 32"	99° 39' 44"
94	<i>Capsicum annuum</i>	Thung Thong Tha Muang Kanchanaburi	14° 00' 26"	99° 39' 48"
95	<i>Capsicum annuum</i>	Ban Mai Tha Muang Kanchanaburi	13° 51' 44"	99° 34' 46"
96	<i>Capsicum annuum</i>	Ban Mai Tha Muang Kanchanaburi	13° 51' 39"	99° 34' 39"
97	<i>Capsicum annuum</i>	Ban Mai Tha Muang Kanchanaburi	13° 51' 44"	99° 34' 35"
98	<i>Capsicum annuum</i>	Ban Mai Tha Muang Kanchanaburi	13° 51' 39"	99° 34' 39"
99	<i>Capsicum annuum</i>	Ban Mai Tha Muang Kanchanaburi	13° 51' 40"	99° 34' 51"
100	<i>Capsicum annuum</i>	Khao Noi Tha Muang Kanchanaburi	13° 51' 55"	99° 34' 06"
101	<i>Capsicum annuum</i>	Khao Noi Tha Muang Kanchanaburi	13° 51' 44"	99° 34' 15"
102	<i>Capsicum annuum</i>	Khao Noi Tha Muang Kanchanaburi	13° 51' 57"	99° 34' 22"

Table 1 Anthracnose disease specimens collected from this study. (2017-2018) (continue)

No.	Scientific name	Location	Lat. (N)	Long. (E)
103	<i>Capsicum annuum</i>	Takhram En Tha Maka Kanchanaburi	13° 56' 48"	99° 45' 41"
104	<i>Capsicum annuum</i>	Dan Thap Tako Chom Bung Ratchaburi	13° 39' 18"	99° 26' 48"
105	<i>Capsicum annuum</i>	Dan Thap Tako Chom Bung Ratchaburi	13° 39' 18"	99° 27' 05"
106	<i>Capsicum annuum</i>	Dan Thap Tako Chom Bung Ratchaburi	13° 39' 08"	99° 27' 18"
107	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Ta Khong Pong Nam Ron Chanthaburi	13° 04' 17"	102° 23' 37"
108	<i>Capsicum annuum</i>	Nong Ta Khong Pong Nam Ron Chanthaburi	13° 04' 14"	102° 23' 41"
109	<i>Capsicum annuum</i>	Tha Phrik Mueang Trat Trat	12° 15' 00"	102° 34' 21"
110	<i>Capsicum annuum</i>	Tha Phrik Mueang Trat Trat	12° 15' 00"	102° 34' 12"
111	<i>Capsicum annuum</i>	Tha Phrik Mueang Trat Trat	12° 14' 56"	102° 35' 43"
112	<i>Capsicum frutescens</i>	Kho Hong Hat Yai Songkhla	6° 58' 37"	100° 27' 42"
113	<i>Capsicum frutescens</i>	Kho Hong Hat Yai Songkhla	6° 58' 45"	100° 28' 03"



Figure 1 Anthracnose symptoms on chilli fruits

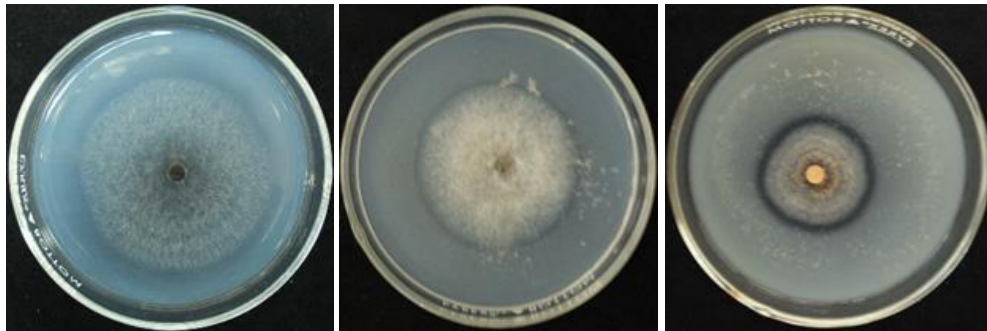


Figure 2 Clear zone was produced on casein hydrolysis medium,
C. gloeosporioides (A), *C. capsici* (B), *C. acutatum* (C)

อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของเชื้อรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช
Taxonomy and phylogeny of Cercosporoid fungi in Thailand

ชนินทร ดวงสอดา^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} สุณีรัตน์ สีมะเต็อ^{1/}
มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{3/}

^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

รายงานความก้าวหน้า

รวบรวมรายละเอียดการจัดจำแนกรา cercosporoid ในประเทศไทย ได้ข้อมูลการจัดจำแนกชนิดของรา cercosporoid 20 ชนิด และได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid ที่พบบนพืช มะละกอ ผักคอส กวางตุ้ง ถั่วฝักยาว ถั่วลิสง กระเจี๊ยบเขียว กล้วยไม้ และพริก ได้จำนวนรวม 15 ตัวอย่าง แยกเชื้อเชื้อราบริสุทธิ์ได้เชื้อราที่มีลักษณะพ้องกับเชื้อรากลุ่ม cercosporoid จำนวน 10 ไอโซเลต

คำหลัก : อนุกรมวิธาน วิวัฒนาการ cercosporoid

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-13-63

คำนำ

Cercosporoid เป็นกลุ่มของราที่จัดอยู่ใน order Capnodiales family Mycosphaerellaceae โดยราในกลุ่มนี้สามารถทำความเสียหายให้แก่พืชหลายชนิด ทั้งในกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ รวมถึงพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยลักษณะการเข้าทำลายที่พบได้โดยทั่วไปคือจะพบอาการใบจุด (leaf spot) และสามารถพบว่าทำให้เกิดแผล (necrotic lesion) บนดอกไม้ ผล และส่วนอื่นๆของพืช

การจำแนกราในกลุ่มนี้ค่อนข้างสับสนและมีปัญหา เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่าง genus ค่อนข้างน้อย ปัจจุบันลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของราจันัส *Cercospora* และ *Pseudocercospora* ได้แก่ การพบหรือไม่พบ ลักษณะของ scar ที่มีความหนา (thickening) บน conidiophore หลังจาก that conidia หลุดไป โดยลักษณะความแตกต่างของความหนาของ scar นี้ ใช้เป็นลักษณะในการจำแนกชนิดของราทั้งสอง genera โดย *Pseudocercospora* จะมี unthickened scars แต่มีราหลายชนิดที่ถูกจำแนกให้เป็น *Pseudocercospora* แม้จะมีลักษณะของ scar ที่หนา ทั้งนี้เพราะลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ค่อนข้างที่จะเข้าลักษณะของรา *Pseudocercospora* มากกว่าที่จะเป็นรา *Cercospora* เช่น *P. mississippiensis*, *P. madhuliensis* (Ruiz and Braun, 1989) และยังพบอีกว่าลักษณะ scar ของ *Pseudocercospora* มีความคล้ายคลึง (synapomorphy) กับรา *Parapithomyces clitoriae* (Alcorn, 1992)

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การจำแนกราในกลุ่ม cercosporoid โดยเฉพาะ *Pseudocercospora* และ *Cercospora* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน ประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่น ๆ เช่น ลักษณะสีของ conidia ทำให้การจำแนกชนิดค่อนข้างมีความสับสน อีกทั้งข้อจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ในการวินิจฉัยเช่น ความคมชัด ความเข้มแสง กล้องจุลทรรศน์ ยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการพิจารณาลักษณะความหนาของ scar ในระดับที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะศึกษาลักษณะความหนาของ scar ในแต่ละ genus เพื่อให้ได้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แม่นยำเพื่อการวินิจฉัย แต่ยังคงพบว่ารา *Cercospora* ในบางสปีชีส์ ถูกจัดเป็นกลุ่มสปีชีส์ที่อาจประกอบด้วยสมาชิกมากกว่า 1 สปีชีส์ แต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ยังไม่เพียงพอต่อการจำแนกความแตกต่าง รากลุ่มนี้จึงยังถูกจัดอยู่ใน สปีชีส์เดียวกันและจัดเป็น complex species เช่น *Cercospora apii* เป็นราที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงกับอุตสาหกรรมการผลิตพริกของบราซิล พบว่ามีราที่ถูกจำแนกเป็น *C. apii* มากกว่า 280 ไอโซเลท โดยทุกไอโซเลทมีความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ลักษณะความแตกต่างดังกล่าวไม่เพียงพอในการจำแนกราไอโซเลทนั้น ๆ ออกจาก *C. apii* (Crous and Braun, 2003; Nicoli *et al*, 2011) ลักษณะที่เกิดขึ้นนี้ อาจเกิดจากการที่ราและพืชอาศัยมีวิวัฒนาการร่วมกัน ทำให้ราเกิดมีวิวัฒนาการ หรือลักษณะทางของราที่สามารถวัดค่าหรือนำมาใช้ในการจำแนกยังไม่เพียงพอ จึงยังคงจัดอยู่ใน complex species

การจำแนกชนิดของราโดยใช้ลักษณะการขยายพันธุ์ของเชื้อ (teleomorph, anamorph) ตามวิธีการจำแนกชนิดตามแบบที่ปฏิบัติกันมานั้น ทำให้รา *Pseudocercospora*, *Cercospora* และราอื่น ๆ อีกหลายชนิด ถูกวินิจฉัย ให้มีความเชื่อมโยงกับรา *Mycosphaerella* โดยจัดเป็นระยะ teleomorph ของเชื้อราดังกล่าวข้างต้น การเชื่อมโยงของเชื้อรา *Mycosphaerella* กับเชื้อราในสกุลอื่น ๆ กว่า 40 genera เพื่อให้เข้าใจวิวัฒนาการของเชื้อรา หรือช่วยในการวินิจฉัยเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเฉพาะ complex species ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยบ่งชี้ หรือแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์และวิวัฒนาการ (phylogeny) ของราในหลายสกุลหรือสปีชีส์ ที่มีความใกล้เคียงกัน บนพืชอาศัยต่าง ๆ กัน หรือพืชอาศัยที่มีความใกล้เคียงกัน โดยนำข้อมูลจากหลาย ๆ ด้าน เช่น ข้อมูลชีวโมเลกุลจากหลายตำแหน่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย ลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่เก็บตัวอย่าง มาวิเคราะห์รวมกันอย่างเป็นระบบ (systematics study) ทำให้พบว่า ราที่จัดว่าเป็น *Mycosphaerella* ที่แท้จริงนั้น มีเพียงเชื้อรา *Ramularia* (Braun, 1998) เพียงชนิดเดียว อีกทั้งการศึกษาที่ใช้ลักษณะของข้อมูลทางพันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง แสดงให้เห็นว่ารา cercosporoid อื่นๆ ก็มีความจำเพาะในระดับ genus นั้น ๆ โดยไม่มีความเกี่ยวข้องใด ๆ กับ genus อื่น ๆ ในแง่ของลักษณะการสืบพันธุ์ของวงจรชีวิต ดังนั้นในการจำแนกชนิดของราแต่ละชนิดจะมีเพียง 1 ชื่อ ทั้งสองระยะของการสืบพันธุ์ โดยลักษณะของ teleomorph และ anamorph จะเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อการจำแนกชนิดของราชนิดนั้น ๆ ตามข้อกำหนดของการกำหนดชื่อตามหลักสากล (Article 59 of the International Code for Nomenclature of algae, fungi and plants (ICN) (Hawksworth, 2011; Norvell, 2011; Taylor, 2011)

ในประเทศไทยมีการศึกษารานในกลุ่ม cercosporoid มาแล้วในระดับหนึ่ง แต่การจัดจำแนกชนิดส่วนใหญ่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ถึงแม้ว่า การจัดจำแนกรา *Cercospora* จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ค่อนข้างเด่นชัด แต่ก็ยังพบว่ายังมีราในกลุ่มนี้ที่มีรายงานว่า เป็น complex species ที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนก หรือบางครั้งเราไม่สร้างโครงสร้างที่เพียงพอต่อการจัดจำแนก อีกทั้งด้วยเทคโนโลยีที่พัฒนาและนำมาช่วยในการศึกษาและเพื่อการจัดจำแนก ทำให้พบว่า การจำแนกชนิดของราโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรม สามารถจำแนกชนิดของราหลายชนิดที่มีปัญหาในการวินิจฉัย ซึ่งรวมถึงราในกลุ่ม cercosporoid ด้วย

ถึงแม้ว่า cercosporoid ส่วนใหญ่จะทำให้เกิดความเสียหายแก่พืช แต่ก็มีเชื้อราบางชนิดในกลุ่มของ cercosporoid ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ดังนั้นนอกจากนี้ การศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อราควบคู่กับพืชอาศัย ทำให้สามารถเข้าใจวิวัฒนาการระหว่างราและพืชอาศัย (phylogenetic relationship) ซึ่งสามารถนำไปสู่การคาดหมายหรือการทำนายการเกิดโรคในพืช (pattern of pathogenicity) อีกทั้งรา cercosporoid เป็นรากลุ่มใหญ่ที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดในประเทศไทย รวมถึงทั่วโลก ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของรา cercosporoid จึงมีความสำคัญ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษานอกจากจะทำให้

เข้าใจวิวัฒนาการรา cercosporoid แล้ว ยังสามารถประเมินการเข้าทำลายพืชอาศัยหรือโอกาสการเกิดโรคข้ามพืชอาศัย (host jump) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคาดการณ์การเกิดโรคได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชอีกทางหนึ่ง ซึ่งสามารถสนับสนุนการการค้าระหว่างประเทศในการนำเข้าและส่งออกสินค้าทางการเกษตร

ดังนั้นการศึกษาคั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืช

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 สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ไข่มืดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ปิกเกอร์ 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 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)

β -Tubulin 2 (TUB2)

T1: AACATGCGTGAGATTGTAAGT (O'Donnell and Cigelnik 1997)

Bt2b: ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC (Glass and Donaldson 1995)

6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>; Kears *et al.*, 2012)

วิธีการ

1. จัดทำข้อมูลสถานะการจัดจำแนกรา cercosporoid ที่รายงานพบในประเทศไทย

รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกรา cercosporoid ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มีการจัดจำแนกด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลของรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย จัดทำเป็นตารางเพื่อแสดงสถานะของการจัดจำแนกเพื่อใช้ประกอบการพิจารณา หรือประเมินความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิดของรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย และปรับปรุงข้อมูลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

2. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid จากพืชต่างๆ ได้แก่ พืชตระกูลกะหล่ำ เช่น คะน้า ผักกาด พืชตระกูลแตง กระจับปี่เขียว พืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วลิสง มะละกอ เบญจมาศ บานชื่น บัว ข้าวโพด ผักปลัง รวมถึงอาการใบจุดที่พบบนหญ้าเป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยจะเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรคและเก็บใบของพืชที่ปกติ ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของผลอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุมเนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียดของ

การเก็บตัวอย่าง วันที่ พิกัด สถานที่ ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตีพิมพ์คหกรรมศาสตร์ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

3. ศึกษา และจำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะอาการของโรค และเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรค และจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เมื่อพบราสร้างเส้นใยหรือ conidia นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อราวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืช (cross section) ให้บาง ๆ และนำมาตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

แยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

- แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมารดัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเพอร์คลอไรท์ 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 จากนั้นนำมารวางบนอาหาร 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 หากพบราเจริญขึ้นก่อนเวลา 10 วัน ให้ทำการคัดทิ้ง เนื่องจากราในกลุ่ม cercosporoid เจริญช้า ซึ่งจะใช้เวลาประมาณกว่า 10 วัน จึงจะพบ colony

ศึกษาลักษณะของรา

นำราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) ศึกษา และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย

conidia conidiophore และโครงสร้างอื่น ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่าง ๆ ของราที่วัดขนาดไว้

จำแนกชนิดรา cercosporoid สาเหตุโรคพืช

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา cercosporoid ที่ศึกษากับคู่มือของ Deighton (1967, 1974, 1976 และ 1979) Ellis (1971) Braun (1995) และ Crous and Braun (2003)

4. จำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สัปดาห์ที่ 1

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 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)

Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2)

FRPB2-5F: GAYGAYMGWGATCAYTTYGG (Lie *et al.*, 1990)

FRPB2-7cR: CCCATRGCTTGYTTRCCCAT (Lie *et al.*, 1990)

β -Tubulin 2 (TUB2)

T1: AACATGCGTGAGATTGTAAGT (O'Donnell and Cigelnik 1997)

Bt2b: ACCCTCAGTGATGACCCTTGGC (Glass and Donaldson 1995)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง ITS EF1- α LSU rpb2 และ TUB2 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 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท MacroGen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ 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 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 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)

5. บันทึกข้อมูลสถานะการจัดจำแนกรา cercosporoid ที่รายงานพบในประเทศไทย

ข้อมูลด้านชีวโมเลกุลของรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย จะถูกเก็บบันทึก และใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับ การตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง

6. การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑิ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564

แหล่งปลูกพืชต่าง ๆ ในประเทศไทย

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

รวบรวมรายละเอียดการจัดจำแนกรา cercosporoid ในประเทศไทย ได้ข้อมูลการจัดจำแนกชนิดของรา cercosporoid 20 ชนิด (Table 1) และได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid ที่พบบนพืช มะละกอ ผักคอส กวางตุ้ง ถั่วฝักยาว ถั่วลิสง กระเจี๊ยบเขียว กัลยไม้ และพริก ได้จำนวนรวม 15 ตัวอย่าง แยกเชื้อเชื้อราบริสุทธิ์ได้เชื้อราที่มีลักษณะพ้องกับเชื้อรากลุ่ม cercosporoid จำนวน 10 ไอโซเลท

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้ฐานข้อมูลการจัดจำแนกชนิดของรา cercosporoid ที่มีรายงานพบในประเทศไทย ที่ถูกต้องตามหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และเป็นปัจจุบัน จำนวน 20 ชนิด ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อสนับสนุนมาตรการการค้าระหว่างประเทศ โดยตัวอย่างที่ได้จะนำไปศึกษายืนยันการจำแนกชนิดด้วยข้อมูลอณูวิทยา และศึกษาวิวัฒนาการของรา cercosporoid และเชื้อราที่มีความใกล้เคียงกันต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณพี่ ๆ และน้อง ๆ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือ และความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ โคน. 2523. *Cercospora* สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 51 หน้า.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแพงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ โคน. 2537. *ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.
- 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 *Dasyospora* 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.
- 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 pp.
- 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 redispositions. *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., Porras-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.
- 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.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. 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.
- 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.
- 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.
- 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., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-22. In : M Innis, D Gelfand, J Shinsky, 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 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (cumulative data)

รายชื่อ	ชื่อพ้อง	Current name	พืชอาศัย	อาการ	ส่วนของพืช	แหล่ง	ปีที่รายงาน	การจัดจำแนก			เอกสารอ้างอิง
								Morphology	DNA	Phylogeny	
<i>Pseudocercospora dendrobii</i>	<i>Cercospora dendrobii</i>	<i>Pseudocercospora dendrobii</i>	กล้วยไม้	ปื้นเหลือง	ใบ	กาญจนบุรี	2561	✓	✓		ชนิทร และคณะ, 2561
<i>Pseudocercospora abelmoschi</i>	<i>Cercospora abelmoschi</i>	<i>Pseudocercospora abelmoschi</i>	กระเจี๊ยบเขียว	จุด	ใบ	สุราษฎร์ธานี	2561	✓	✓		ชนิทร และคณะ, 2561
	<i>Cercospora hibisci</i>										
	<i>Cercospora hibisci-manihotis</i>										
<i>Cercospora zinniae</i>	<i>Cercospora atrocincta</i>	<i>Cercospora zinniae</i>	บานชื่น	จุด	ใบ	นครศรีธรรมราช	2561	✓	✓		ชนิทร และคณะ, 2561
	<i>Cercosporina zinniae</i>				กลีบดอก						
<i>Cercospora apii</i>	<i>Cercospora penicillata</i> var. <i>apii</i>	<i>Cercospora apii</i>	ขึ้นฉ่าย	จุด ไหม้	ใบ		2549	✓			ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2549
	<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>										
<i>Cercospora arachidicola</i>	<i>Passalora arachidicola</i>	<i>Passalora arachidicola</i>	ถั่วลิสง	จุด	ใบ		2513	✓			เฉลิมชัย และคณะ, 2513
	<i>Cercospora arachidis</i> var. <i>macrospora</i>										
<i>Cercospora asparagi</i>	<i>Cercospora caulicola</i>	<i>Cercospora asparagi</i>	หน่อไม้ฝรั่ง	ไหม้	กิ่ง ก้าน		2554	✓			พรพิมล และคณะ, 2554
	<i>Cercosporina asparagicola</i>				ใบ						

Table 1 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (cumulative data) (Continued)

รายชื่อ	ชื่อพ้อง	Current name	พืชอาศัย	อาการ	ส่วนของพืชที่พบ	แหล่ง	ปีที่รายงาน	การจัดจำแนก			เอกสารอ้างอิง
								Morphology	DNA	Phylogeny	
<i>Cercospora batatus</i>	<i>Cercospora batatae</i> <i>Ramularia batatae</i> <i>Cercospora timorensis</i> <i>Cercospora ipomoeae-purpureae</i>	<i>Pseudocercospora timorensis</i>	มันเทศ	จุด	ใบ		2509	✓			Puckdeedindan, 1966
<i>Cercospora beticola</i>	<i>Cercosporina beticola</i> <i>Cercospora flagelliformis</i> <i>Cercospora longissima</i> <i>Cercospora flagelliformis</i> <i>Cercospora anthelmintica</i> <i>Cercospora spinaciae</i> <i>Cercospora chenopodiicola</i> <i>Cercosporina spinacicola</i> <i>Cercospora beticola</i> var. <i>poonensis</i>	<i>Cercospora beticola</i>	สวิสชาร์ด	จุด	ใบ		2554	✓			พรพิมล และคณะ, 2554
<i>Cercospora brassicicola</i>	<i>Cercospora brassicae-campestris</i> <i>Cercospora brassicae-juncea</i>	<i>Cercospora brassicicola</i>	ผักกาด เหี่ยวปลี	จุด	ใบ		2509	✓			Puckdeedindan, 1966
<i>Cercospora canescens</i>	<i>Cercosporiopsis canescens</i>	<i>Cercospora canescens</i>	ถั่วหรั่ง	จุดไหม้	ใบ		2536	✓			ชุตินันต์ และคณะ, 2536

Table 1 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (cumulative data) (Continued)

รายชื่อ	ชื่อพ้อง	Current name	พืชอาศัย	อาการ	ส่วนของพืชที่พบ	แหล่ง	ปีที่รายงาน	การจัดจำแนก			เอกสารอ้างอิง
								Morphology	DNA	Phylogeny	
<i>Cercospora canescens</i>	<i>Cercosporiopsis canescens</i> <i>Cercospora vignicaulis</i>	<i>Cercospora canescens</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>Cercospora capsici</i>	<i>Cercospora capsicola</i> <i>Cladosporium capsica</i> <i>Phaeoramularia capsicola</i> <i>Passalora capsicola</i> <i>Cercospora capsici</i>	<i>Phaeoramularia capsicola</i>	พริก	จุดตากบ	ใบ		2554	✓			พรพิมล และคณะ, 2554
			พริกชี้ฟ้า	จุด							อภิรัชต์ และคณะ, 2554
<i>Cercospora cassavae</i>	<i>Cercospora henningsii</i> <i>Cercospora manihotis</i> <i>Septogloeum manihotis</i> <i>Helminthosporium manihotis</i> <i>Cercospora cearae</i>	<i>Claroehilum henningsii</i>	มันสำปะหลัง	จุด	ใบ		2505	✓			Chandrasrikul, 1962
<i>Cercospora citri-grisea</i>	<i>Stenella citri-grisea</i> <i>Zasmidium citri-griseum</i>	<i>Zasmidium citri-griseum</i>	ส้มเขียวหวาน	กริสนิม	ใบ		2550	✓			วุฒิศักดิ์ และคณะ, 2550
			ส้มจุก ส้มจิน	ลาโนส							
			ส้มโชกุน	จุดน้ำหมาก							

Table 1 The list of plant diseases caused by cercosporoid fungi had been reported in Thailand. (cumulative data) (Continued)

รายชื่อ	ชื่อพ้อง	Current name	พืชอาศัย	อาการ	ส่วนของพืชที่พบ	แหล่ง	ปีที่ รายงาน	การจัดจำแนก			เอกสารอ้างอิง
								Morphology	DNA	Phylogeny	
<i>Cercospora</i>	<i>Cercospora cucurbitae</i>	<i>Cercospora</i>	มะระจีน	เน่า	ยอด ใบ		2528	✓			ปราณีต และคณะ,2528
<i>citrullina</i>	<i>Cercospora sechii</i>	<i>citrullina</i>	ตำลึง	จุด	ผล		2554	✓			พรพิมล และคณะ,2554
	<i>Cercospora momordicae</i>		แตงโม	จุด			2505				Chandrasrikul, 1962
	<i>Cercospora trichosanthis</i>										
	<i>Cercospora chardoniana</i>										
	<i>Cercospora momordicae</i>										
	<i>Cercospora momordicae</i>										
	<i>Cercospora luffae</i>										

อนุกรมวิธาน และวิวัฒนาการของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืช
Taxonomy and phylogeny of Pucciniaceae in Thailand

ชนินทร ดวงสอาด^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} สุณีรัตน์ สิมะเตือ^{1/}
มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{3/}

^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/} กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

รายงานความก้าวหน้า

รวบรวมรายละเอียดการจัดจำแนกราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ในประเทศไทย ได้ข้อมูลการจัดจำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae 20 ชนิด และได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมจำนวน 19 ตัวอย่าง ได้แก่ ราสนิม fig จำนวน 10 ตัวอย่าง ราสนิมข้าวโพด 1 ตัวอย่าง หนุ้า 7 ตัวอย่าง และราสนิมตะไคร้ 1 ตัวอย่าง

คำหลัก : อนุกรมวิธาน วิวัฒนาการ Pucciniaceae

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) โดยลักษณะนี้ยังพบว่าสามารถเกิดกับเชื้อราชนิดอื่นๆ ไม่เพียงแต่ราสนิมเท่านั้น

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-14-63

แต่เนื่องจากวิวัฒนาการของราสนิมเอง ร่วมกับความสัมพันธ์ที่พัฒนาร่วมกับพืชอาศัย (co-evolution) ทำให้ปัจจุบันมีรายงานการพบราสนิมบนพืชที่มีความใกล้ชิดกับพืชอาศัยดั้งเดิม ทำให้เกิดความสับสนและผิดพลาดในการจำแนกชนิดของราสนิมด้วยเพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพืชอาศัย เพื่อให้เข้าใจวิวัฒนาการระหว่างราสนิมและพืชอาศัย ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยบ่งชี้ หรือ แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์และวิวัฒนาการ (phylogeny) ของราสนิมในหลายสกุลที่มีความใกล้เคียงกัน บนพืชอาศัยต่าง ๆ กัน หรือพืชอาศัยที่มีความใกล้เคียงกัน โดยนำข้อมูลจากหลาย ๆ ด้านเช่น ข้อมูลชีวโมเลกุลจากหลายตำแหน่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย ลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่เก็บตัวอย่างหรือพบราสนิม มาวิเคราะห์รวมกันอย่างเป็นระบบ (systematics study)

นอกจากนี้การศึกษาวิวัฒนาการของราสนิมควบคู่กับพืชอาศัย ทำให้สามารถเข้าใจวิวัฒนาการระหว่างราสนิมและพืชอาศัย (phylogenetic relationship) ซึ่งสามารถนำไปสู่การคาดหมายหรือการทำนายการเกิดโรคในพืช (pattern of pathogenicity) อีกทั้งราสนิมในวงศ์ Pucciniaceae พบว่าเป็นราสนิมกลุ่มใหญ่ที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของราสนิมในวงศ์ Pucciniaceae จึงมีความสำคัญ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษานอกจากจะทำให้เข้าใจวิวัฒนาการของราสนิม ขอบเขตของพืชอาศัยแล้ว ยังสามารถประเมินการเข้าทำลายพืชอาศัยหรือการข้ามพืชอาศัย (host jump) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่สามารถใช้เป็นข้อมูลในการคาดการณ์การเกิดโรคได้ นอกจากนี้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลในการจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชอีกทางหนึ่ง

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 สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบบิดผ้าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดดูแรน กระจกตวง 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: TTACGTCCCTGCCCTTGTGA (de Hoog and Geriits 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: TCAGTATGTTATTTAAACGATGTAG (Vialle *et al.*, 2009)

CO3R1: TCCTCATCAGTAAACACTAATA (Vialle *et al.*, 2009)

6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012)

วิธีการ

1. จัดทำข้อมูลสถานะการจัดจำแนกราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่รายงานพบในประเทศไทย

รวบรวมข้อมูลการจัดจำแนกราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และที่มีการจัดจำแนกด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่มีรายงานพบในประเทศไทย จัดทำเป็นตารางเพื่อแสดงสถานะของการจัดจำแนกเพื่อใช้ประกอบการพิจารณา หรือประเมิน

ความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่มีรายงานพบในประเทศไทย และปรับปรุงข้อมูลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

2. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมวงศ์ Pucciniaceae

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมวงศ์ Pucciniaceae จากพืชต่างๆ ได้แก่ พืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง ถั่วฝักยาว ถั่วลิสง กาแฟ สัก สลิวดี ตะไคร้ เบญจมาศ โมก มะเดื่อฝรั่ง รวมถึงราสนิมที่พบบนหญ้า เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลที่เกิดจากราสนิมอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่น จะขึ้นปกคลุมสืบเนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาจำแนกชนิดและทำการสกัดดีเอ็นเอ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตีพิมพ์คกรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากราสนิม ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

3. ศึกษา และจำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของ teliospore urediniopore spermatia และลักษณะอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo และ Compound เพื่อบันทึกขนาด รูปร่างและบันทึกภาพ รวมถึงการบันทึกข้อมูลของพืชอาศัย จำแนกชนิดราสนิม สาเหตุโรคพืช โดยเปรียบเทียบลักษณะของราสนิมที่ศึกษา กับคู่มือหรือวรรณกรรมของ Aime (2006) Cummins and Hiratsuka (2003) Cline *et al.* (2013) Kolmer *et al.* (2001) Ono and Aime (2006) Swann *et al.* (2001)

4. จำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตัดชิ้นส่วนของราสนิมที่พบบนชิ้นส่วนของพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo ย้ายลงในหลอดสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดตามวิธีของ Dungsard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTGTGA (de Hoog and Gerits 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: TCAGTATGTTATTTAAACGATGTAG (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>, Kearse *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 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)

5. บันทึกข้อมูลสถานะการจัดจำแนกราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่รายงานพบในประเทศไทย

ข้อมูลด้านชีวโมเลกุลของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่มีรายงานพบในประเทศไทย จะถูกเก็บบันทึกและใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับ การตรวจสอบชนิดของศัตรูพืชเพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้อง

6. การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564

แหล่งปลูกพืชต่าง ๆ ในประเทศไทย

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

รวบรวมรายละเอียดการจัดจำแนกราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ในประเทศไทย ได้ข้อมูลการจัดจำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae 20 ชนิด และได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิม จำนวน 19 ตัวอย่าง ได้แก่ ราสนิม fig จำนวน 10 ตัวอย่าง ราสนิมข้าวโพด 1 ตัวอย่าง หนุ้า 7 ตัวอย่าง และ ราสนิมตะไคร้ 1 ตัวอย่าง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้ฐานข้อมูลการจัดจำแนกชนิดของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae ที่มีรายงานพบในประเทศไทย ที่ถูกต้องตามหลักฐานทางวิทยาศาสตร์และเป็นปัจจุบัน จำนวน 20 ชนิด ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อสนับสนุนมาตรการการการค้าระหว่างประเทศ โดยตัวอย่างที่ได้จะนำไปศึกษายืนยันการจำแนกชนิดด้วยข้อมูลอนุวิทยา และศึกษาวิวัฒนาการของราสนิมวงศ์ Pucciniaceae และเชื้อราที่มีความใกล้เคียงกันต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณพี่ ๆ และน้อง ๆ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือ และความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง อุดม เลียบวัน อรรถสิทธิ์ บุญธรรม ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ วันทนิย์ อู่วานิชย์ อนุรักษ์ พิทักษ์ วัลวิภา สุชาโต สมศักดิ์ ทองศรี และตุลย์ อินทร์มพรรย์. 2547. *เอกสารวิชาการอ้อย*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 147 หน้า.
- ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา โกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล และอดิศักดิ์ คำนวนศิลป์. 2547. *เอกสารวิชาการโรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด*. พิมพ์ ครั้งที่ 2. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 69 หน้า
- ธนากร จารุพัฒน์ วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล นิพนธ์ ทวีชัย และศศิณาภุ แสงวงศ์. 2526. *โรคอ้อยในประเทศไทย*. สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 180 หน้า.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. *ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.
- วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. *ราวิทยาเบื้องต้น*. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 351 หน้า.
- 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.

- 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. (Online). Available. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/nomen/Nomenclature.cfm>. (March 2013)
- 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.
- 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 pp.

- 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. Page 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.
- 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. In *Biodiversity of tropical microfungi*, ed. KD Hyde:47-56. Hong Kong: Hong Kong University Press. Number of 47-56 pp.
- 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. pp. 37-55. 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 The list of rust diseases caused by Pucciniaceae had been reported in Thailand. (cumulative data)

รายชื่อ	ชื่อพ้อง	Current name	พืชอาศัย	อาการ	ส่วนของพืชที่พบ	ปีที่รายงาน	การจัดจำแนก			เอกสารอ้างอิง
							Morphology	DNA	Phylogeny	
<i>Endophyllum</i>										
<i>kaembachii</i>	<i>Aecidium kaembachii</i>	<i>Endophyllum kaernbachii</i>	ผักบุ้ง	ราสนิม	ใบ	2529	✓	☐		พงษ์วิภา, 2529
<i>Puccinia hemerocallidis</i>	<i>Dicaeoma hemerocallidis</i>	<i>Puccinia hemerocallidis</i>	ดอกไม้เงิน	ราสนิม	ใบ	2549	✓	☐		ธารทิพย์ และคณะ, 2549
<i>Puccinia allii</i>	<i>Xyloma allii</i>	<i>Puccinia allii</i>	กุยช่าย	ราสนิม	ใบ ก้านดอก	2552	✓	☐		สุนีรัตน์ และคณะ, 2550
	<i>Dicaeoma allii</i>		หอมใหญ่			2549	✓	☐		ธารทิพย์ และคณะ, 2549
	<i>Puccinia alliorum</i>									
<i>Puccinia arachidis</i>	<i>Dicaeoma arachidis</i>	<i>Puccinia arachidis</i>	ถั่วลิสง	ราสนิม	ใบ	2550	✓			สุนีรัตน์ และคณะ, 2550
	<i>Bullaria arachidis</i>									
<i>Puccinia asparagi</i>	<i>Puccinia discoidearum</i> var. <i>asparagi</i>	<i>Puccinia asparagi</i>	หน่อไผ่ไร่	ราสนิม	ใบ ลำต้น	2529	✓			อุดมลักษณ์, 2529
	<i>Dicaeoma asparagi</i>							☐		
	<i>Persooniella asparagi</i>									
<i>Puccinia chrysanthemi</i>		<i>Puccinia chrysanthemi</i>	เบญจมาศ, เก๊กฮวย	ราสนิม	ใบ	2526	✓			ฉายแสง และคณะ, 2526;
						2531				ผ่องศรี, 2531
<i>Puccinia erianthi</i>		<i>Puccinia erianthi</i>	อ้อย	ราสนิม	ใบ	2519	✓			อนุสรณ์ และคณะ, 2519;
<i>Puccinia glumarum</i>	<i>Dicaeoma glumarum</i>	<i>Puccinia striiformis</i>	ข้าวสาลี	ราสนิม	ใบ	2509				พริพิมล และคณะ, 2557
	<i>Puccinia striiformis</i>						✓			Puckdeedindan, 1966
	<i>Puccinia lineatula</i>									
<i>Puccinia horiana</i>		<i>Puccinia horiana</i>	เบญจมาศ, เก๊กฮวย	ราสนิมขาว	ใบ	2558	✓			พงษ์วิภา และคณะ, 2558;
						2553				สุนีรัตน์ และคณะ, 2553;
						2550				ยุทธศักดิ์ และคณะ, 2550;
						2549				ธารทิพย์ และคณะ, 2549
<i>Puccinia kuehnii</i>	<i>Uromyces kuehnii</i>	<i>Puccinia kuehnii</i>	อ้อย	ราสนิม	ใบ	2526	✓			ธนาคร และคณะ, 2526;
	<i>Coemurus kuehnii</i>									
	<i>Coemurus kuehnii</i>									
	<i>Puccinia kuhni</i>									

Table 1 The list of rust diseases caused by Pucciniaceae had been reported in Thailand. (cumulative data) (Continued)

รายชื่อ	ชื่อพ้อง	Current name	พืชอาศัย	อาการ	ส่วนของพืชที่พบ	ปีที่รายงาน	การจัดจำแนก			เอกสารอ้างอิง
							Morphology	DNA	Phylogeny	
<i>Puccinia melanocephala</i>			อ้อย	ราสนิม	ใบ	2519	✓			อนุสรณ์ และคณะ, 2519;
						2557	✓			พรพิมล และคณะ, 2557
<i>Puccinia nakanishikii</i>	<i>Dicaeoma nakanishikii</i>	<i>Puccinia nakanishikii</i>	ตะไคร้	ราสนิม	ใบ	2550	✓			ยุพศักดิ์ และคณะ, 2550
						2549	✓			ธารทิพย์ และคณะ, 2549
<i>Puccinia philippinensis</i>		<i>Puccinia philippinensis</i>	กกสามเหลี่ยม	ราสนิม	ใบ	2550	✓			ธารทิพย์ และคณะ, 2550
			แห้วหมู	ราสนิม	ใบ	2550	✓			ยุพศักดิ์ และคณะ, 2550;
						2550	✓			ธารทิพย์ และคณะ, 2550;
						2550	✓			สุนรัตน์ และคณะ, 2550
				ราสนิม	ใบ	2550	✓			ธารทิพย์ และคณะ, 2550;
			กกทราย, กกขนาก			2550	✓			สุนรัตน์ และคณะ, 2550
<i>Puccinia polysora</i>	<i>Dicaeoma polysorum</i>	<i>Puccinia polysora</i>	ข้าวโพด		ใบ	2505	✓			Chandrasrikul, 1962;
				ราสนิม, ข้อ		2510	✓			อุดม และเมธา, 2510;
				ต่อเน่า		2552	✓			พีระวรรณ, 2552
						2550	✓			ศรีสุรางค์ และคณะ, 2550
<i>Puccinia pruni-spinosae</i>	<i>Puccinia prunorum</i>	<i>Tranzschelia pruni-spinosae</i>	ท้อ	ราสนิม	ใบ	2511	✓			Chandrasrikul, 1968
	<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>	<i>Puccinia purpurea</i>	ข้าวฟ่าง	ราสนิม	ใบ, ลำต้น	2511	✓			Chandrasrikul, 1968
						2549	✓			ธารทิพย์ และคณะ, 2549;
						2557	✓			พรพิมล และคณะ, 2557
<i>Puccinia recondita</i>	<i>Puccinia dispersa</i>	<i>Puccinia recondita</i>	ข้าวสาลี	ราสนิม	ใบ	2524	✓			เฉลิมลาภ และคณะ, 2524
<i>Puccinia recondita f.sp. tritici</i>		<i>Puccinia recondita f.sp. tritici</i>	ข้าวสาลี	ราสนิม	ใบ	2520	✓			ประพาส และคณะ, 2520
<i>Puccinia rubigo-vera f.sp. tritici</i>		<i>Puccinia rubigo-vera f.sp. tritici</i>	ข้าวสาลี	ราสนิม	ใบ	2509	✓			Puckdeedindan, 1966
<i>Puccinia rufipes</i>	<i>Dicaeoma rufipes</i>	<i>Puccinia rufipes</i>	หญ้าคา	ราสนิม	ใบ	2553	✓			ธารทิพย์ และคณะ, 2553

การจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล
 The Identification of the Genus *Radopholus* with the Molecular
 Technique.

ธิติยา ชยาภักพัฒนา^๑ ทิพวรรณ กันหาญาติ ^๑ ไตรเดช ข่ายทอง^๑
 อังคณา พวงเงินมาก^๑
^๑กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Radopholus nematodes represent one of the most damaging genera of the plant parasitic nematodes in worldwide that are an important pest to reduce of the quality and the quantity in agricultural production. And exporting ornamental plants of Thailand seriously affected by these nematodes. The identification of the Genus *Radopholus* was used the morphological and morphometrically characteristics; moreover, this study was classified burrowing nematode species by the molecular technique. This research began between October 2019–September 2020. Populations of 50 *Radopholus* nematodes from the ornamental plants were to identify molecular technique by the polymerase chain reaction (PCR) used to amplify an expansion region 28s of ribosomal DNA (rDNA) by 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'). Ten of good PCR product analysis of this rDNA based on sequence comparison of 28s, D2D3 expansion region of these populations. They were compared with the same DNA sequence of bases that existed in the BLASTN database confirmed the close molecular relationship between ten PCR products were *R.similis*. Morphological and morphometric characterizations were obtained 8 different female and 3 males *Radopholus* were comprised with PM 7/88 (1): *Radopholus similis* of EPPO bulletin were identified as *R. similis* that supporting an identification by a molecular technique.

Keywords : *Radopholus*, burrowing nematode, Identification

รหัสการทดลอง 03-32-60-01-02-00-15-63

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เป็นศัตรูพืชสำคัญที่ทำให้เกิดความสูญเสียในการผลิตพืชทั้งด้านคุณภาพและปริมาณของการผลิตพืชทั่วโลก และยังส่งผลต่อการส่งออกไม้ประดับของประเทศไทย เดิมการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุลนี้ใช้ลักษณะทางสัณฐาน และการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช การทดลองนี้มีการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุลร่วมด้วย ดำเนินการตั้งแต่ ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2563 โดยการเก็บจากไม้ประดับ และได้ประชากรของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จำนวน 50 ตัวอย่าง นำไปศึกษาการจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลซึ่งดำเนินการเพิ่มปริมาณ 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') ซึ่งได้เลือกตัวอย่าง PCR product ที่ดี 10 ตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำไปเทียบเคียงความเหมือนกันของลำดับเบสที่ได้กับที่มีอยู่ในกับฐานข้อมูล BLASTN จากการประมวลผลพบว่าเป็น *R. similis* ทุกตัวอย่าง และการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมีย 8 ตัวอย่าง และ เพศผู้ 3 ตัวอย่างโดยใช้แนวทางการจัดจำแนกของ EPPO PM 7/88 (1) : *Radopholus similis* ซึ่งใช้ลักษณะทางสัณฐาน และการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย พบว่าเป็นไส้เดือนฝอย *R. similis* ซึ่งสนับสนุนการการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

คำหลัก : ไส้เดือนฝอย *Radopholus* ไม้ประดับส่งออก การจัดจำแนกชนิด

คำนำ

ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ได้ทำความเสียหายต่อของการส่งออกของประเทศไทย เนื่องจากได้เกิดปัญหาการส่งออกพืชไปยังสหภาพยุโรป ถูกปฏิเสธการนำเข้าเนื่องจากมีการตรวจพบ *R. similis* ในพรรณไม้ น้ำ แม้ว่าไม่เคยมีรายงานความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอยสกุลนี้ต่อผลผลิตพืชในประเทศไทย แต่การเป็นศัตรูพืชกักกันทำให้ผู้ประสงค์ส่งออกพืชหลายชนิด อาทิ พืชตระกูล Citrus, Araceae, Marantaceae, Musaceae และ การส่งออก ต้นพันธุ์ กิ่งพันธุ์ และ พืชเพื่อปลูก (plant intend for planting) เป็นต้น ไปยังหลายประเทศ เช่น สหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา(บางรัฐ) ญี่ปุ่น และได้หวั่น ต้องได้รับการรับรองว่าปลอดภัยจากไส้เดือนฝอย *R. similis* และ *R. citrophilus* ในการตรวจรับรองไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในปี 2556 ถึง 2559 ที่ผ่านมามีพบว่าในพรรณไม้ น้ำ และไม้ประดับมีหลายชนิดที่ตรวจพบการปนเปื้อนของ *Radopholus* spp. ในพืชส่งออกหลายชนิด เช่น พืชสกุล *Acorus*, *Aglaonema*, *Anubias* และ *Lindernia* เป็นต้น (จิตยา และคณะ, 2559)

ดังนั้นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จึงบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจ และด้วยเหตุที่ว่าการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไส้เดือนฝอยสกุลนี้ยังมีน้อย จึงจำเป็นต้องศึกษาวิจัยการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือน

ฝอยสกุล *Radopholus* ทางชีวโมเลกุล ต่อยอดมาจากการศึกษาการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยา ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้จะทำให้เกิดข้อมูลที่สำคัญสำหรับผู้เกี่ยวข้องกับการส่งออกพืช และผู้ตรวจรับรองการปลดปล่อยจากศัตรูพืชโดยเฉพาะไส้เดือนฝอยศัตรูพืช และสำคัญที่สุดคือเป็นฐานข้อมูลอ้างอิงของประเทศไทย และเป็นมาตรฐานที่สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ประเทศผู้นำเข้าได้ และการจัดจำแนกชนิดทางชีวโมเลกุลนี้เป็นการเตรียมความพร้อมเพื่อรับมือกับมาตรฐานที่มีแนวโน้มที่จะต้องใช้เทคโนโลยีที่สูงขึ้นในการตรวจรับรองศัตรูพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดิน วัสดุปลูกและต้นพืช
2. อุปกรณ์การเก็บตัวอย่างในแปลง
3. ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*
4. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกำลังขยายสูง และอุปกรณ์ถ่ายภาพ
5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ยกตัวอย่างเช่น กรวยและตะแกรงแยกเชื้อ ถังมือ สไลด์ เครื่องอัลตราโซนิก อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ น้ำยาแดง หลอดเก็บตัวอย่าง ตู้ปลอดเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ ตู้เย็นเก็บตัวอย่างพืช อุปกรณ์เลี้ยงพืชอาศัยเชื้อ เป็นต้น
6. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ยกตัวอย่างเช่น ถังมือ เสื้อคลุม หมวก หลอด PCR ชั้นวางหลอด ไมโครปิเปต ไมโครปิเปตตีปอย่างควบคุมอุณหภูมิ เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง เครื่องเขย่าผสมสารละลาย เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง ตู้ดูดควันและสารพิษ เครื่องเพิ่มปริมาตร สารพันธุกรรม เครื่อง Gel electrophoresis เครื่องกำเนิดพลังงาน เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ตู้แช่แข็ง เป็นต้น และสารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอเช่น 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*) กวักมกรต และ พรรณไม้หน้า เป็นต้น เก็บตัวอย่างจากพืช อย่างน้อย 100 ตัวอย่าง แต่ละพืชจำนวนตัวอย่างแล้วความเหมาะสมและโอกาสอำนวย โดยตัวอย่างต้นพืชเก็บใส่ถุงพลาสติกรัดปากถุงให้แน่นนำกลับมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างดินปลูก หรือวัสดุปลูกเก็บบริเวณทรงพุ่มความลึกอยู่ในช่วงประมาณ 0-25 เซนติเมตร จำนวน 10 จุดต่อต้นคลุกเคล้ารวมกันแล้วเก็บตัวอย่าง 250 กรัมใส่ถุงพลาสติกรัดปากถุงให้แน่นนำกลับมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ

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) การจัดทำแนกสกุลไส้เดือนฝอยโดยเปรียบเทียบกับ คู่มือการจำแนกสกุลของไส้เดือนฝอย Plant-parasitic nematodes ; A pictorial key to genera (Mai et.al., 1996) 4. การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย

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 เชียไส้เดือนฝอย 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 นาที เพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่

ในเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 6 นาที ถ้าเตาไมโครเวฟเป็นชนิด 750 วัตต์ (สามารถปรับเวลาตามกำลังไฟของเตาไมโครเวฟให้ได้ 4,500 วัตต์-นาที ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม)

6.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในส่วน 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') และ เพิ่มปริมาณ DNA (Kaplan *et al.*, 2000; Subbotin *et al.*, 2006) โดยสารที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสปริมาตรรวม 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 °C 94 เวลา 1 นาที ปฏิกิริยา Denaturation อุณหภูมิ °C 94 เวลา 1 นาที ปฏิกิริยา Annealing อุณหภูมิ °C 55 เวลา 1 นาที ปฏิกิริยา Extension อุณหภูมิ °C 72 เวลา 1 นาที ปฏิกิริยา Final extension อุณหภูมิ °C 72 เวลา 5 นาที จำนวน 35 รอบ

6.3 การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเตรียม 1.5% ของอะกาโรส โดยชั่งอะกาโรส 1.5 กรัม ผสมกับ สารละลายบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มให้สารละลายใส ตั้งไว้ให้เย็น แล้วเทอะกาโรสลงในชุด gel box ที่ปรับสมดุลและวางหิวไว้แล้ว เมื่อเจลแข็งตัว จึงดึงหิวออก 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.พิจารณาจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จากทั้งสองวิธี โดยใช้ข้อมูลการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับผลการวิเคราะห์ลำดับเบส ในการพิจารณาจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*

เวลาและสถานที่

ระหว่าง ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2563

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการตรวจวินิจฉัยสกุลของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยมีลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนี้ เป็นไส้เดือนฝอยที่มี stylet มองเห็นได้ชัดเจน แข็งแรง และมี stylet basal knobs บริเวณส่วนหัวค่อนข้างกลม และมีโครงสร้างแข็งแรง 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 ขนาดเล็ก และบาง (Mai *et.al.*, 1996)

ผลการจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยเปรียบเทียบกับแนวทางการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ EPPO PM 7/88 (1) สามารถกล่าวได้ว่าไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมีย 8 ตัวและตัวผู้ 3 ตัว ตัวอย่างไส้เดือนฝอยน้อย เพราะส่วนใหญ่นำไปทำ PCR จากการศึกษาค่าที่ได้จากการวัดลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียง และอยู่ในช่วงเดียวกันทุกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอย *R. similis* ได้แก่ ความยาวของลำตัวของตัวอย่างที่ศึกษา (Body length) ความยาวของ Stylet ความยาวของแขนงของระบบสืบพันธุ์ส่วนหน้า (Female gonad anterior branch) และความยาวของแขนงของระบบสืบพันธุ์ส่วนหลัง (Female gonad posterior branch) ซึ่งมีความยาวค่อนข้างใกล้เคียงกัน แม้ว่าส่วนหน้าจะยาวกว่าเล็กน้อย เส้นผ่านของร่างกายบริเวณทวาร (Body diameter at the anus) ความยาวของส่วนปลายหัวถึงตำแหน่ง Excretory pore สัดส่วนของตำแหน่งของ Vulva ต่อความยาวลำตัว (Vulva %) และเปอร์เซ็นต์ ค่า De Man's ratios โดยเปรียบเทียบค่า a (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัว) ค่า b (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อความยาวของ oesophagus) c (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อความยาวหาง) สรุปได้ว่าไส้เดือนฝอยที่พบในการศึกษาครั้งนี้ เป็น *R. similis* (Table 1. และ Figure 1.)

ในส่วนการเพิ่มปริมาณ 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') แล้วเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) จากตัวอย่าง 50 ตัวอย่าง ผลที่ได้การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสแล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง UV-transilluminator แล้วถ่ายภาพ ซึ่งได้เลือก ตัวอย่างได้ PCR product ที่ดี 10 ตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส แล้วนำไปจะถูกนำไปเทียบเคียงความ

เหมือนกันของลำดับเบสที่ได้กับที่มีอยู่ในกับฐานข้อมูล BLASTN จากการประมวลผลพบว่าเป็น *R.similis* ทุกตัวอย่าง (Zheng, et al.,2000)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลพบว่า เป็นไส้เดือนฝอย *R. similis* เพียงชนิดเดียวยังไม่พบไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ชนิดอื่น ซึ่งเป็นผลดีต่อประเทศไทยที่พบเพียงชนิดเดียว

เอกสารอ้างอิง

- จิตติยา สารพัฒน์ ไตรเดช ข่ายทอง วีรภรณ์ แสงไสย และวานิช คำพานิช . 2559. สถานการณ์การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในพรมแดนไม้หน้าเพื่อการส่งออก. หน้า 41-53.ใน : *การประชุมวิชาการประจำปี 2559 วิจัยการอารักขาพืช และปัจจัยการผลิตเพื่อขับเคลื่อน เศรษฐกิจไทย* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 25-27 กรกฎาคม 2559 ณ ณ โรงแรม บางแสน 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. <https://archives.eppo.int/EPPOStandards/diagnostics.htm> (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. pp.277.
- 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

Ryss, A.Y. 2003. Taxonomy, evolution and phylogeny of the genus *Radopholus* (didelphic species) according to morphological data, with a key species (Nematoda: Tylenchida). *Zoo systematica Rossica*. 11: 243–256.

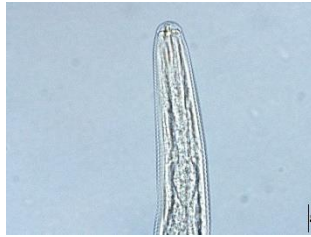
Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7 (1-2): 203-214.

Table 1. Morphometric characteristics of *R. similis* comparison between this study and PM 7/88 (1): *Radopholus similis* of EPPO Bulletin from mean± standard deviation of 8 different samples female and 3 different samples male (measurement in µm)

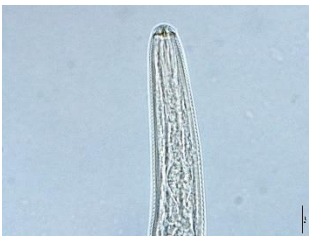
Character	EPPO			This study		
	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Body length	510–820 (655)	450-720 590	597.4-728.3 (651.5± 42.8)	536.25- 680.36	(611± 58.95)	
Stylet length	16–23 (18.5)	10-16 13.3	16.8-20.4 (18.2± 1.1)	10.-13	(11± 1.16)	
Female gonad anterior branch	112–297 (174)	-	118.5-175.5 (138.8 ± 20.1)	-		
Female gonad posterior branch	103–269 (165)	-	121.3-165.4 (134.6± 15.5)	-		
Body diameter at the anus	13–24 (17.7)	11-20 13.9	13.1-17.8 (15.2±1.3)	10-11.5	(11.5±1.2)	
Distance from Excretory pore to head tip	59–115 (88)	65-104 86	72.3-80.1 (76.2± 3.0)	74.5-90.3	(82.7± 6.45)	
Vulva %	50–67 (57)	-	52.3-59.3 (56.0± 2.5)	-		
Spicule length	-	13-24 19.3		16.9-19	(18.11±0.9)	
Gubernaculum length	-	7-14 10.6		10.3-11	(10.59±0.3)	
a	20–34 (27)	24-43 33	26.8-34.7 (30.9±2.8)	32.5-42	(37.20± 3.9)	
b	6–10 (7.9)	5-10 7.6	9-11 (9.8±0.9)	8-12	(10± 1.61)	
c	7–13 (9.4)	6-10 8.3	7-9 (7.9±0.7)	7.5-7.57	(7.53± 0.03)	



A) Female body



B) Head and stylet

C) Anterior end including
the oesophagus

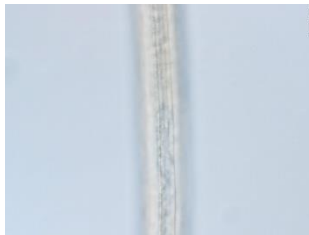
D) Metacarpus



E) Female genital system



F) Female genital system

G) Female gonad
posterior branch

H) Four lateral field



I) A tail



J) Male body



K) Male body



L) spicule and gubernaculum

Figure 1 Differential interference contrast (DIC) microscope photographs of *R. similis* (A) Female body with labial framework and stylet well developed and vulva slightly post-equatorial. (B) Head hemispherical and slightly set off and stylet well defined with rounded of equal size knobs. (C) Anterior end including the oesophagus which oesophageal glands extended into a lobe along the dorsal side of intestine (D) Metacarpus well developed elongate to ellipsoidal with distinct valves. (E-F) The female genital system composed of two opposed branches (Didelphic) which two functional and equally developed ovaries. (G) Female gonad posterior branch with spheroid spermatheca filled with rod-like sperm and vulva with slight protuberant lips. (H) Four lateral fields near midbody. (I) A tail elongate-conoid with narrowly rounded terminus. (J) Male body (K) The knob-shape head and head annules not observed. The male stylet is often indistinct and slender without knob. (L) Spicule dorsally arched and gubernaculum with small titillate.

ศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)
The Biology of Breadfruit Fruit Fly (*Bactrocera umbrosa* (Fabricius))

กรกต ดำรงค์^{1/} สันญาณี ศรีศุข^{1/}

หทัยภัทร เจษฎารมย์^{1/} ยุวรินทร์ บุญทบ^{2/}

^{1/}กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The study of breadfruit fruit fly (*Bactrocera umbrosa* (Fabricius)) biology was conducted between 2018 and 2020 with a combination of field studies and insectary-based experimental work. During November 2018 - October 2019, surveys and field collections were made across Thailand in 16 provinces including Nakhon Pathom, Suphanburi, Kanchanaburi, Samut Sakhon, Ratchaburi, Rayong, Trat, Chanthaburi, Phetchaburi, Prachuap Khiri Khan, Chumphon, Surat Thani, Nakhon Si Thammarat, Phatthalung, Songkhla and Satun. Breadfruit fruit fly were collected on various damaged fruits including jackfruits, chempedaks, breadfruits, guavas and horse mangoes. Collection sites included natural areas and farmers' orchards. The result showed that *B. umbrosa* were found on jackfruits, chempedaks and guavas that collected at Chumphon, Surat Thani, Nakhon Si Thammarat, Songkhla and Satun provinces. The life cycle of *B. umbrosa* was studied under laboratory condition ($26.80 \pm 1.16^\circ \text{C}$ and $88.49 \pm 1.33 \% \text{RH}$) during November 2019 - July 2020. It was observed that adult females laid eggs singly or in groups after her pre-oviposition period of 15 days. One adult female could lay 110-422 eggs with average 175.50 ± 89.77 eggs. Percentage of eggs hatched was 85% and egg stage lasted for 84-96 hours with average 84.21 ± 1.45 hours. Larval developmental period was 8-10 days with average 8.85 ± 0.74 days, and the survival rate of this period was 47.06%. Pupal stage averaged 11.50 ± 0.66 days with a range of 11-13 days, and it showed 60% of the survival rate. The longevity of adult

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-01-08-62

females and males were 87-119 and 80-106 days, which were 100.30 ± 11.03 and 89.90 ± 6.87 days in average, respectively. Total developmental period in laboratory from eggs to adults was 23.72 ± 0.83 days. The life table study on jackfruit pieces revealed that the mortality of the larval instar was remarkably high at 52.94%, whereas the survival rate decreased as stage and age were increased. The survival rate of adults from eggs was 24%.

Keywords : biology, breadfruit fruit fly, *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)

บทคัดย่อ

การศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (Fabricius) ดำเนินการศึกษาระหว่างปี 2561-2563 โดยสำรวจและเก็บรวบรวมผลไม้ ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง และส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายในพื้นที่ธรรมชาติและพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร เพื่อตรวจหาแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* ในเขตพื้นที่ 16 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี ระยอง ตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล ในระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2561 - ตุลาคม 2562 พบแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* จากผลไม้ ขนุน จำปาตะ ฝรั่ง ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา และสตูล จากนั้นจึงนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาวงจรชีวิต โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 26.80 ± 1.16 °C และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 88.49 ± 1.33 %RH ในระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2562 - กรกฎาคม 2563 พบว่า ตัวเต็มวัยเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์หลังจากดักได้ 15 วัน โดยวางไข่เป็นฟองเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม ๆ ตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ 110-422 ฟอง เฉลี่ย 175.50 ± 89.77 ฟอง ไข่มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 85% ระยะไข่ 84-96 ชั่วโมง เฉลี่ย 84.21 ± 1.45 ชั่วโมง ระยะหนอน 8-10 วัน เฉลี่ย 8.85 ± 0.74 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอด 47.06% ระยะดักแด้ 11-13 วัน เฉลี่ย 11.50 ± 0.66 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอด 60.00% ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุ 87-119 วัน เฉลี่ย 100.30 ± 11.03 วัน ตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุ 80-106 วัน เฉลี่ย 89.90 ± 6.87 วัน โดยสรุปวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ในห้องปฏิบัติการ จากไข่ถึงตัวเต็มวัยใช้เวลา 22.51-25.51 วัน เฉลี่ย 23.72 ± 0.83 วัน สำหรับการศึกษาดารงชีวิต (Life table) บนชิ้นเนื้อขนุน พบว่า ระยะหนอนมีอัตราการตายสูงสุด คือ 52.94% โดยการรอดชีวิตในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้จะลดลงตามระยะและอายุที่มากขึ้น จากไข่มีโอกาสรอดเป็นตัวเต็มวัยเพียง 24%

คำหลัก : ชีววิทยา แมลงวันผลไม้ *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)

คำนำ

แมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (Fabricius) จัดอยู่ในอันดับ Diptera วงศ์ Tephritidae เป็นหนึ่งในแมลงวันผลไม้ที่สำคัญในประเทศไทยที่มีจำนวนกว่า 10 ชนิด มีเขตแพร่กระจายทั่วไปในประเทศไทย มีพืชอาศัยจำพวกขนุน และจำปาตะ (มนตรี, 2544 และกลุ่มบริหารศัตรูพืช, 2557) ตัวเต็มวัยมีขนาดลำตัวและสีสันใกล้เคียงกับแมลงวันผลไม้ชนิด *B. correcta* กลางปีก็มีแถบสีน้ำตาลพาดตามแนวขวาง (มนตรี, 2544) ตัวเต็มวัยเพศผู้ถูกดึงดูดได้ด้วยสารล่อ Methyl eugenol มีพืชอาหารเป็นพืชหลายชนิดในวงศ์เดียวกันหรือวงศ์ใกล้เคียง (oligophagous) (Clarke *et al.*, 2001) พบเข้าทำลายทั่วไปในพืชสกุลขนุน หรือ *Artocarpus* วงศ์ Moraceae (Allwood *et al.*, 1999; Leblanc *et al.*, 2012) และยังมีตัวอย่างตัวเต็มวัยที่ได้จากหนอนในผล มะระ (*Momordica charantia* L.) ซึ่งเป็นพืชในวงศ์ Cucurbitaceae ด้วย (Hardy, 1973) โดยขอบเขตการแพร่กระจายของ *B. umbrosa* นั้น พบมีเขตการแพร่กระจายในประเทศไทย มาเลเซีย สิงคโปร์ ฟิลิปปินส์ เปรู อินโดนีเซีย นิวเฮบริดีส์ นิวแคลิโดเนีย ปาปัวนิวกินี สาธารณรัฐปาเลา และไมโครเนเซีย (กลุ่มบริหารศัตรูพืช, 2555; Hardy, 1973) และมีรายงานการเก็บตัวอย่าง *B. umbrosa* ตัวเต็มวัยเพศผู้ ในประเทศไทย จากจังหวัดสงขลา และจังหวัดตรัง เมื่อ พ.ศ. 2534 โดยการพิกจากผลขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) (Drew and Romig, 2013) และมีรายงานว่า พบ *B. umbrosa* ในประเทศไทยจากภาคใต้จนถึงบริเวณเพนินซูล่า ประเทศมาเลเซีย จึงถือว่าแมลงวันผลไม้ชนิดนี้เป็นชนิดที่พบได้ทั่วไปในภาคใต้ (Clarke *et al.*, 2001) เช่นเดียวกันกับ Danjuma (2013) ที่ได้ทำการศึกษาถึงความหลากหลายของชนิดแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ในสวนฝรั่งทางภาคใต้ของประเทศไทย ด้วยการใช้อัดกสารล่อตัวเต็มวัย Methyl eugenol และ *Torula* yeast ในจังหวัดนราธิวาส สงขลา ตรัง และสุราษฎร์ธานี พบแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ทั้งหมด 31 ชนิด โดยพบ *B. umbrosa* ซึ่งเป็นหนึ่งใน 8 ชนิดของแมลงวันผลไม้ที่พบได้จากกับดักสารล่อตัวเต็มวัยในทุกสถานีการทดลอง นอกจากนี้ ยูวรินทร์ และคณะ (2554); ยูวรินทร์ และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษานุกรมวิธานของแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ในภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย และศึกษานุกรมวิธานแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* จากสารล่อแมลงในเขตภาคใต้ของประเทศไทย พบแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* 15 และ 17 ชนิด ตามลำดับ โดยไม่พบแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* จากพืชผักผลไม้ที่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งต่าง ๆ ที่เข้าสำรวจ พบเพียงตัวเต็มวัยเพศผู้จากกับดัก Steiner ที่ใช้สารล่อ Methyl eugenol ที่ติดตั้งในแปลงปลูกพืช ชมพู ลำไย กระท้อน และมะม่วง และได้อธิบายลักษณะรูปร่าง คือ มีขนาดลำตัวยาว 5.8-6.5 มม. ปีกยาว 5.8-6.5 มม. หัวสีเหลือง frons สีเหลืองอมน้ำตาล มีจุดสีดำขนาดกลางใต้หนวด 2 จุด มีขน inferior fronto-orbital 2 คู่ และขน superior fronto-orbital 1 คู่ หนวดปล้องที่ 1 สีเหลืองหนวดปล้องที่ 2,3 สีน้ำตาล ปลาย arista สีน้ำตาลดำ ออก scutum สีดำ mesonotum มีแถบข้างออกทั้งสอง สีเหลือง scutellum สีเหลือง ขาสีเหลือง ปีกใส บริเวณ cell C และ bc เป็นสีน้ำตาลแดง costal เป็นแถบกว้าง และมีแถบขวางปีกสีน้ำตาล จาก costal ขยายมาจนเกือบถึง M 1+2 และมีแถบขวางปีกสี

น้ำตาล จาก costal ลงมาด้านล่าง 3 แถบ และบริเวณ cubital มีสีน้ำตาลแดง ท้องปล้องแรกสีน้ำตาล ปล้องที่ 3-5 มีสีน้ำตาลอ่อน ปล้องท้องด้านบนปล้องที่ 4 และปล้องท้องปล้องที่ 5 มีแถบสีดำขนาดสั้น ขวาง โดยมีเขตการแพร่กระจาย จังหวัดกรุงเทพ นครปฐม เชียงใหม่ ตรัง กาญจนบุรี จันทบุรี นครราชสีมา ชัยภูมิ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง ภูเก็ต กระบี่ สงขลา และ พังงา จากข้อมูลการดังกล่าวจะเห็นได้ว่าแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* มีแนวโน้มเป็นศัตรูพืชที่มีการแพร่กระจายได้ทั่วไป อาจเข้าทำลายในผลผลิตและมีโอกาสปนเปื้อนติดไปกับผลผลิตในภาค การเกษตรที่สำคัญได้ในอนาคต โดยในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ในประเทศไทยมีน้อยมาก และยังขาดข้อมูลทางด้านชีววิทยา ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ และสามารถนำไปใช้สำหรับการศึกษาวิจัยต่อยอดในด้านอื่น ๆ ได้ต่อไป เช่น ทางด้านนิเวศวิทยา การเข้า ทำลาย และการป้องกันกำจัด เป็นต้น สามารถนำไปปรับใช้เป็นคำแนะนำและวิธีการที่จะช่วยลด ปัญหาการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ในผลผลิตของเกษตรกร ทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพมากขึ้น และตรงกับความต้องการของตลาดได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างผลไม้ ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายในธรรมชาติ หรือในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร
2. อุปกรณ์สำหรับผ่าผลไม้ และภาชนะ
3. กรงเลี้ยงแมลง ขนาด 35x35x50 เซนติเมตร กล่องพลาสติกสำหรับใส่ผลไม้ ขนาด 22x29x10 เซนติเมตร กล่องพลาสติกสำหรับเลี้ยงแมลง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 6.5 เซนติเมตร และกระบอกพลาสติก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 4.5 เซนติเมตร
4. กระจกกรองเบอร์ 91 ฟุ้งกัน สาลี ปากคีบ (Forceps)
5. เอทิลแอลกอฮอล์ 95%
6. ซีลี้อย
7. ตะแกรงร่อนเบอร์ 20
8. Brewer's yeast และน้ำตาลไอซ์ซิ่ง
9. จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
10. กล้อง Stereo microscope
11. อุปกรณ์สำหรับบันทึกข้อมูล และบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa*

โดยการเก็บรวบรวมผลไม้ ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายในธรรมชาติหรือในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร ในเขตภาคกลาง เช่น จังหวัดนครปฐม สมุทรสาครและสุพรรณบุรี ภาคตะวันออก เช่น จังหวัดจันทบุรี ตราดและระยอง ภาคตะวันตก เช่น จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรีและประจวบคีรีขันธ์ และภาคใต้ เช่น จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลาและสตูล บันทึกชนิดผลไม้ บันทึกข้อมูลสถานที่ วัน/เดือน/ปี และพิกัดทางภูมิศาสตร์ที่เก็บผลไม้ นำผลไม้มายังห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาต่อ โดยใส่กล่องพลาสติกที่รองด้วยตะแกรงวางผลไม้และรองกันด้วยซีลียสูงประมาณ 1 นิ้ว เมื่อหนอนแมลงวันผลไม้เข้าสู่ระยะที่ 3 จะออกจากผลไม้มาเข้าดักแด้นี้ในซีลีย คอยตรวจดูดักแด้นี้ในซีลียทุก 2 วัน เมื่อดักแด้นี้เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม จึงร่อนซีลียด้วยตะแกรงร่อน เพื่อแยกดักแด้ออกมานำไปใส่กล่องพลาสติกและคลุมทับด้วยซีลียสูงประมาณ 0.5 นิ้ว นำไปไว้ในกรงเลี้ยงแมลง ที่ภายในมีน้ำและอาหารสำหรับตัวเต็มวัย (Brewer's yeast และน้ำตาลไอซ์ซิ่ง อัตราส่วน 3:7) เมื่อตัวเต็มวัยฟักออกมาและมีอายุประมาณ 7-10 วัน จะเป็นช่วงที่ตัวเต็มวัยมีการพัฒนาเจริญเติบโตมีสีส้มเต็มที่แล้ว จึงทำการฆ่าตัวเต็มวัยโดยนำไปใส่ในหลอดแก้วแช่ในช่องทำน้ำแข็ง (freezer) นาน 4-5 ชั่วโมง แล้วนำไปจำแนกชนิดและตรวจนับจำนวน

การบันทึกข้อมูล

บันทึกชนิดผลไม้ บันทึกข้อมูลสถานที่ วัน/เดือน/ปี และพิกัดทางภูมิศาสตร์ที่เก็บผลไม้

2. การศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa*

เก็บรวบรวมผลขนุน ที่ถูกแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* เข้าทำลาย มาเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการ เมื่อได้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* จึงนำมาเลี้ยงขยายพันธุ์ต่อ เพื่อทำการศึกษชีววิทยาในห้องปฏิบัติการ ดังนี้

2.1 วงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* โดยดำเนินการศึกษาวงจรชีวิตในระยะต่างๆ

ระยะไข่ ศึกษาอายุของไข่ด้วยการทำ Hatching Rate โดยเลี้ยงไข่ที่มีอายุ 1 ชั่วโมง ลงบนกระดาษกรองเบอร์ 91 ที่ให้ความชื้นตลอดเวลา แล้วเก็บไว้ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จากนั้นตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนที่ฟักออกจากไข่ทุก 6 ชั่วโมง โดยศึกษาจากไข่ 100 ฟอง

ระยะหนอน ศึกษาอายุและลักษณะของหนอนวัยต่าง ๆ โดยเลี้ยงหนอนในเนื้อผลขนุน บันทึกขนาด ลักษณะ และการตายของหนอนวัยต่าง ๆ โดยศึกษาจากหนอน 85 ตัว

ระยะดักแด้ ศึกษาอายุและลักษณะของดักแด้ โดยทำการบันทึกขนาด และลักษณะของดักแด้ โดยศึกษาจากดักแด้ 40 ดักแด้

ระยะตัวเต็มวัย ศึกษาอายุขัย การผสมพันธุ์ การวางไข่ และลักษณะของตัวเต็มวัย โดยเลี้ยงแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* 1 คู่ ในกล่องพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 6.5 เซนติเมตร ที่ภายในมีน้ำ อาหาร และกระบอกพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

2.5 เซนติเมตร สูง 4.5 เซนติเมตร เจาะรูขนาดเล็กจำนวน 20 รู ภายในใส่เนื้อผลขนุน เพื่อล่อให้แมลงวางไข่ บันทึกปริมาณไข่ทุกวันจนตัวเต็มวัยเพศเมียตาย นอกจากนี้ทำการบันทึกลักษณะตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ลักษณะการจับคู่ผสมพันธุ์ และการตายของตัวเต็มวัย โดยศึกษาจากแมลงวันผลไม้จำนวน 10 คู่

2.2 ตารางชีวิต (Life table) ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ทำการศึกษาในชั้นเนื้อผลขนุน โดยนำไข่ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* วางบนขนุน 20 ฟองต่อชิ้น จำนวน 100 ฟอง บันทึกจำนวนไข่ที่ฟัก หนอนวัยต่าง ๆ ดักแด้ และตัวเต็มวัย แล้วนำมาคำนวณตามวิธีของ Southwood (1966)

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลอายุและลักษณะของไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ในการศึกษาวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa*

- บันทึกข้อมูลจำนวนไข่ที่ฟัก หนอนวัยต่าง ๆ ดักแด้ และตัวเต็มวัย ในการคำนวณตารางชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa*

เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น ตุลาคม 2561 - สิ้นสุด กันยายน 2563
 - ห้องปฏิบัติการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร แหล่งปลูกผลไม้ ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ในพื้นที่ธรรมชาติหรือในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกรที่ถูกแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* เข้าทำลาย ในเขตภาคกลาง เช่น จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และสุพรรณบุรี หรือภาคตะวันออก เช่น จังหวัดจันทบุรี ตราด และระยอง หรือภาคตะวันตก เช่น จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ หรือภาคใต้ เช่น จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa*

จากการสำรวจเก็บรวบรวมผลไม้ ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย (Figure 1) ในธรรมชาติและในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร ในเขตพื้นที่ 16 จังหวัด คือ เขตพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และสุพรรณบุรี เขตพื้นที่ภาคตะวันออก ได้แก่ ระยอง ตราด และจันทบุรี เขตพื้นที่ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ เขตพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล ในเดือนพฤศจิกายน 2561 - ตุลาคม 2562 และนำผลไม้มายังห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาต่อโดยการเลี้ยงหนอนที่พบในผลไม้จนเข้าดักแด้และฟักเป็นตัวเต็มวัย พบชนิดแมลงวันผลไม้ที่ฟักออกเป็นตัวเต็มวัย มี 4 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae* และ

Bactrocera umbrosa (Table 1) โดยพบ *B. dorsalis* จำนวนมากที่สุด 6,166 ตัว จากผลขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี ระยอง ตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล พบ *B. correcta* จำนวน 935 ตัว จากผลขนุน สาเก ฝรั่ง ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัด นครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ พบ *B. carambolae* จำนวน 382 ตัว จากผลขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี ระยอง ตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และพบ *B. umbrosa* จำนวน 1,030 ตัว จากผลขนุน จำปาตะ ฝรั่ง ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา และสตูล

2. การศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa*

จากการสำรวจเก็บรวบรวมผลขนุนในเดือนตุลาคม 2562 พบแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* เข้าทำลายผลขนุนที่ได้จากพื้นที่ธรรมชาติ ในจังหวัดสุราษฎร์ธานี เป็นจำนวนมาก จึงทำการเก็บรวบรวมเพิ่มเติมนำมาเลี้ยงขยายพันธุ์ต่อในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาวงจรชีวิตและตารางชีวิต ดำเนินการศึกษาในระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึง เดือนกรกฎาคม 2563 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่ม บริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 26.80 ± 1.16 °C และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 88.49 ± 1.33 %RH

2.1 วงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa*

พบการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* 4 ระยะ (Figure 3) ดังนี้

ระยะไข่ ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นฟองเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม ๆ บางครั้งพบถึง 78 ฟองต่อกลุ่ม ไข่มีขนาดเล็กคล้ายเมล็ดข้าวสารแต่มีรูปร่างโค้งคล้ายผลกล้วย มีสีขาวผิวเป็นมันเงา สะท้อนแสง (Figure 2A.) มีขนาดกว้างเฉลี่ย 0.23 ± 0.03 มิลลิเมตร ยาวเฉลี่ย 1.12 ± 0.10 มิลลิเมตร ระยะไข่ 84-96 ชั่วโมง (Table 2) และไข่มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 85% (Table 3)

ระยะหนอน หนอนมีลักษณะหัวแหลมท้ายป้าน ไม่มีขา ส่วนหัวมีลักษณะเป็นตะขอสีดำ เมื่อหนอนฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ ลำตัวจะใส ขนาดลำตัวใกล้เคียงกับขนาดของไข่ (Figure 2B.) หนอนเคลื่อนที่โดยการยืดหดลำตัว โดยเมื่อโตเต็มที่สามารถติดตัวได้ไกลประมาณ 30 เซนติเมตร และมีขนาดลำตัวกว้างเฉลี่ย 1.79 ± 0.21 มิลลิเมตร ยาวเฉลี่ย 8.05 ± 0.63 มิลลิเมตร (Figure 2C.) ระยะ หนอน 8-10 วัน (Table 2) โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอด 47.06% (Table 3)

ระยะดักแด้ ดักแด้มีลักษณะกลมรีคล้ายถังเบียร์ ผิวภายนอกแบ่งปล้องชัดเจนตามแนวขวาง ในระยะแรกดักแด้มีสีเหลืองอ่อนและค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน จากนั้นสีจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อใกล้ฟัก (Figure 2D.) ในระยะดักแด้ไม่มีการเคลื่อนที่ มีขนาด กว้างเฉลี่ย 2.05 ± 0.11 มิลลิเมตร ยาวเฉลี่ย 5.22 ± 0.33 มิลลิเมตร ระยะดักแด้ 11-13 วัน (Table 2) โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอด 60.00% (Table 3)

ระยะตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยเป็นแมลงวันสีน้ำตาลและมีแถบสีเหลืองที่ส่วนนอก หัวสีเหลือง มีปากแบบซัซดูด มีจุดสีดำขนาดกลางใต้หนวด 2 จุด ขาสีเหลือง ปีกบางใส 1 คู่ มีแถบขวางปีกสีน้ำตาล 3 แถบชัดเจนและเป็นลักษณะเด่น (Figure 2E.) ตัวเต็มวัยหลังออกจากดักด้ 15 วัน จะเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์และวางไข่ (Figure 2F.) โดยจะจับคู่ผสมพันธุ์ในช่วงเวลาเย็น ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่ตลอดอายุขัยได้ 110-422 ฟอง เฉลี่ย 175.50 ± 89.77 ฟอง วางไข่ได้สูงสุด 78 ฟอง/วัน โดยมีอัตราส่วนเพศเมียต่อเพศผู้เท่ากับ 1:1.18 ตัวเต็มวัยเพศเมียเมื่อวางไข่มีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.50 ± 0.07 เซนติเมตร ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.90 ± 0.04 เซนติเมตร ตัวเต็มวัยเพศเมียหลังออกจากดักด้มีอายุ 87-119 วัน เฉลี่ย 100.30 ± 11.03 วัน ตัวเต็มวัยเพศผู้เมื่อวางไข่มีขนาดกว้างเฉลี่ย 1.38 ± 0.05 เซนติเมตร ลำตัวยาวเฉลี่ย 0.82 ± 0.06 เซนติเมตร ตัวเต็มวัยเพศผู้หลังออกจากดักด้มีอายุ 80-106 วัน เฉลี่ย 89.90 ± 6.87 วัน (Table 2)

2.2 ตารางชีวิต (Life table) ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa*

ทำการศึกษานับขึ้นเนื้อขนุน โดยนำไข่ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* วางในกระดาษสีดำขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร วางบนขึ้นเนื้อขนุน 20 ฟองต่อขึ้น จำนวน 5 ขึ้น จากนั้นใช้กระดาษทึบคลุมปิดไว้ บันทึกจำนวนไข่ที่ฟัก หนอนวัยต่าง ๆ ดักด้ และตัวเต็มวัย แล้วนำมาคำนวณตามวิธีของ Southwood (1966) ซึ่งมีขั้นตอนการคำนวณ ดังนี้

L_x คือ จำนวนตัวเฉลี่ยที่มีชีวิตรอดได้ในแต่ละระยะ คำนวณได้จากสูตร

$L_x + L_{x+1}$ โดย x คือ ระยะการเจริญเติบโต

L_x คือ จำนวนตัวที่มีชีวิตอยู่รอดในระยะ x

q_x คือ อัตราการตายในแต่ละระยะ คำนวณได้จากสูตร

$q_x = d_x/L_x$ โดย d_x คือ จำนวนตัวที่ตายในระยะ x

S_x คือ อัตราการรอดในแต่ละระยะ คำนวณได้จากสูตร

$S_x = 100 - 100q_x$ โดย $100q_x = 100 \times q_x$

e_x คือ ค่าที่คาดว่าจะมีชีวิตอยู่ในแต่ละระยะ คำนวณได้จากสูตร

$e_x = T_x/L_x$ โดย $T_x = L_x + L_{x+1} + \dots + L_{x+n}$

จากการทดลองพบว่า ระยะหนอน มีอัตราการตายสูงที่สุด คือ 52.94% รองลงมาเป็นระยะดักด้ และระยะไข่ คือ 40.00% และ 15.00% ตามลำดับ (Table 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บรวบรวมผลไม้ ขนุน จำปาดะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายในธรรมชาติและในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร ในเขตพื้นที่ 16 จังหวัด คือ เขตพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และสุพรรณบุรี เขตพื้นที่ภาคตะวันออก ได้แก่ ระยอง ตราด และจันทบุรี เขตพื้นที่ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ เขตพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล ในเดือนพฤศจิกายน 2561

ถึงเดือนตุลาคม 2562 พบแมลงวันผลไม้ที่เข้าทำลายขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด 4 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae* และ *Bactrocera umbrosa* โดยพบแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* จากผลขนุน จำปาตะ ฝรั่ง ที่เก็บรวบรวมจาก จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช สงขลา และสตูล และจากการศึกษาวงจรชีวิตแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ในห้องปฏิบัติการโดยมีอุณหภูมิเฉลี่ย 26.80 ± 1.16 °C และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 88.49 ± 1.33 %RH ในเดือนตุลาคม 2562 ถึง เดือนกรกฎาคม 2563 พบว่า ตัวเต็มวัยเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์หลังจากออกจากดักแค่ 15 วัน โดยวางไข่เป็นฟองเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม ๆ ตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ 110-422 ฟอง เฉลี่ย 175.50 ± 89.77 ฟอง ไข่มีเปอร์เซ็นต์การฟัก 85% ระยะไข่ 84-96 ชั่วโมง เฉลี่ย 84.21 ± 1.45 ชั่วโมง ระยะหนอน 8-10 วัน เฉลี่ย 8.85 ± 0.74 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอด 47.06% ระยะดักแด้ 11-13 วัน เฉลี่ย 11.50 ± 0.66 วัน มีเปอร์เซ็นต์การรอด 60.00% ตัวเต็มวัยเพศเมียมีอายุ 87-119 วัน เฉลี่ย 100.30 ± 11.03 วัน ตัวเต็มวัยเพศผู้มีอายุ 80-106 วัน เฉลี่ย 89.90 ± 6.87 วัน โดยสรุปวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ในห้องปฏิบัติการจากไข่ถึงตัวเต็มวัยใช้เวลา 23.72 ± 0.83 วัน สำหรับการศึกษาดารงชีวิต (Life table) ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* บนชิ้นเนื้อขนุน ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ระยะหนอนมีอัตราการตายสูงที่สุดคือ 52.94% รองลงมาเป็นระยะดักแด้ และระยะไข่ คือ 40.00% และ 15.00% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการรอดชีวิตในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของแมลงวันผลไม้จะลดลงตามระยะและอายุที่มากขึ้น จากไข่มีโอกาสรอดเป็นตัวเต็มวัยเพียง 24%

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณอดุลย์รัตน์ แคล้วคลาด นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่จาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครปฐม คุณวรเมธ บุญรอด เจ้าพนักงานการเกษตร และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรราชบุรี คุณลัดดา จันทร์วงศ์ศรี นักวิชาการเกษตร และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี คุณกองทอง ทรุษศาสน นักวิชาการส่งเสริมการเกษตรชำนาญการ และเจ้าหน้าที่จากสำนักงานเกษตรอำเภอหนองปรือ คุณยุทธ ทนโม๊ะ นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรระยอง คุณกมลภัทร ศิริพงษ์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี คุณเครือวัลย์ ดาวงษ์ นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่จากสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 คุณอุดมพร เสือมาก ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรชุมพร และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรชุมพร คุณสารรัตน์ ไชยสอง นักวิชาการเกษตร และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชสุราษฎร์ธานี คุณชัยยศ ศรีคชา สวนผลไม้จังหวัดนครศรีธรรมราช คุณศยามล แก้วบรรจง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา คุณอภิญา สุราษฎร์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ และเจ้าหน้าที่จากสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรที่ 8 คุณสมศักดิ์ แสงพระจันทร์ นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และ

อาจารย์ ดร.เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลสถานที่และแหล่งสำรวจเก็บผลไม้ในการทดลอง และขอขอบคุณ ดร.วนาพร วงษ์นิคัง นักกวีวิทยาชำนาญการ และพนักงานราชการ เจ้าหน้าที่กลุ่มบริหารศัตรูพืชที่ให้การช่วยเหลืองานวิจัยทุกท่าน ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มบริหารศัตรูพืช. 2555. *คู่มือแมลงวันผลไม้และการป้องกันกำจัด*. เอกสารวิชาการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 50 หน้า.
- กลุ่มบริหารศัตรูพืช. 2557. *แมลงศัตรูไม้ผล*. กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 151 หน้า
- มนตรี จิรสรัตน์. 2544. *แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย*. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 244 หน้า.
- ยุวรินทร์ บุญทาบ ศิริณี พูนไชยศรี ชลิตา อุณหุฒิ ลักขณา บำรุงศรี และสิทธิศิริโรดม แก้วสวัสดิ์. 2554. อนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera*. หน้า 2009-2025. ใน: *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- ยุวรินทร์ บุญทาบ ศิริณี พูนไชยศรี ชลิตา อุณหุฒิ ลักขณา บำรุงศรี และสิทธิศิริโรดม แก้วสวัสดิ์. 2555. อนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้ทองสกุล *Bactrocera* จากสารล่อแมลงในเขตภาคใต้ของประเทศไทย. หน้า 1742-1758. ใน: *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการ เกษตร.
- Allwood, A.J., A. Chinajariyawong, S. Kritsaneepaiboon, R.A.I. Drew, E.L. Hamacek, D.L. Hancock, C. Hengsawad, J.C. Jinapin, M. Jirasurat, C. Kong Krong, C.T.S. Leong and S. Vijaysegaran. 1999. Host plant records for fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Southeast Asia. *Raffles Bulletin of Zoology*. 47 (Supplement No. 7): 1-92.
- Clarke, A.R., A.J. Allwood, A. Chinajariyawong, R.A.I. Drew, C. Hengsawad, M. Jirasurat, C. Kong Krong, S. Kritsaneepaiboon and S. Vijaysegaran. 2001. Seasonal abundance and host use patterns of seven *Bactrocera* Macquart species (Diptera: Tephritidae) in Thailand and peninsular Malaysia. *Raffles Bulletin of Zoology*. 49 (2): 207-220.
- Danjuma S., S. Boonrotpong, N. Thaochan, S. Permkam and C. Satasook. 2013. Biodiversity of the genus *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) in guava *Psidium guajava* L. orchards in different agro-forested locations of southern Thailand. *International Journal of Chemical, Environmental and Biological Sciences (IJCEBS)*. 1(3): 538-544.

- Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2013. *Tropical fruit flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia*. CAB International, Wallingford, UK. 653 p.
- Hardy, D.E. 1973. The fruit flies (Tephritidae-Diptera) of Thailand and bordering countries. *Pacific Insects Monographs*. 31: 1-353.
- Leblanc, L., E.T. Vueti, R.A.I. Drew and A.J. Allwood. 2012. Host Plant Records for Fruit Flies (Diptera: Tephritidae: Dacini) in the Pacific Islands. *Proceedings of the hawaiian entomological society*. 44:11-53.
- Southwood, T.R.E. 1966. *Ecological methods, with particular reference to the study of insect populations*. London. 361 p.
- สัญญาณี ศรีคชา กรกต ดำรงค์ และสุนัดดา เขาวลิต. 2562. ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา และฤดูกาลระบาดของหนอนแดงในฝรั่ง และพุทรา. หน้า 408-415. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2561. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

Table 1 Species and number of individuals of fruit flies reared from fruits (i.e. jackfruit, breadfruit, chempedak, guava and horse mango) in 16 provinces, November 2018 – October 2019

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
20/11/2018	Nakhon Pathom	13°59'23.2"N 99°58'16.3"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	490
				<i>Bactrocera correcta</i>	162
				<i>Bactrocera carambolae</i>	74
20/11/2018	Nakhon Pathom	13°59'23.0"N 99°58'18.3"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	7
20/11/2018	Nakhon Pathom	13°59'15.1"N 99°58'13.7"E	breadfruit	-	-
20/11/2018	Nakhon Pathom	13°56'31.4"N 99°56'44.8"E	breadfruit	-	-
20/11/2018	Nakhon Pathom	13°48'58.6"N 100°13'22.0"E	breadfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	2
20/11/2018	Nakhon Pathom	13°49'36.3"N 100°12'46.9"E	jackfruit	-	-
20/11/2018	Nakhon Pathom	13°49'36.3"N 100°12'46.8"E	breadfruit	-	-
29/11/2018	Kanchanaburi	14°14'52.0"N 99°49'17.8"E	breadfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	11
04/12/2018	Suphanburi	14°14'35.5"N 99°54'44.0"E	jackfruit	-	-
04/12/2018	Suphanburi	14°10'20.9"N 99°56'38.7"E	breadfruit	-	-
04/12/2018	Suphanburi	14°10'16.3"N 99°56'50.6"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	89
				<i>Bactrocera correcta</i>	3
				<i>Bactrocera carambolae</i>	2
04/12/2018	Suphanburi	14°10'16.4"N 99°56'50.5"E	breadfruit	-	-
04/12/2018	Suphanburi	14°18'16.0"N 99°51'46.1"E	breadfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	56
				<i>Bactrocera correcta</i>	1
				<i>Bactrocera carambolae</i>	7
22/01/2019	Kanchanaburi	14°44'14.1"N 99°26'44.4"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	23
				<i>Bactrocera correcta</i>	1
				<i>Bactrocera carambolae</i>	2
22/01/2019	Kanchanaburi	14°43'44.8"N 99°24'19.9"E	jackfruit	-	-
22/01/2019	Kanchanaburi	14°43'44.1"N 99°24'19.7"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	17

Table 1 Species and number of individuals of fruit flies reared from fruits (i.e. jackfruit, breadfruit, chempedak, guava and horse mango) in 16 provinces, November 2018 – October 2019 (continue)

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
22/01/2019	Kanchanaburi	14°43'47.0"N 99°24'03.9"E	jackfruit	-	-
22/01/2019	Kanchanaburi	14°43'31.6"N 99°24'01.8"E	jackfruit	-	-
22/01/2019	Kanchanaburi	14°40'26.0"N 99°26'20.3"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	168
				<i>Bactrocera carambolae</i>	9
22/01/2019	Kanchanaburi	14°36'48.5"N 99°30'24.1"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	64
				<i>Bactrocera correcta</i>	12
				<i>Bactrocera carambolae</i>	8
22/01/2019	Kanchanaburi	14°33'02.8"N 99°27'35.0"E	breadfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	17
				<i>Bactrocera correcta</i>	5
22/01/2019	Kanchanaburi	14°39'33.5"N 99°25'34.0"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	210
				<i>Bactrocera correcta</i>	12
22/01/2019	Kanchanaburi	14°35'48.9"N 99°28'14.7"E	jackfruit	-	-
22/02/2019	Samut Sakhon	13°35'36.7"N 100°13'14.7"E	jackfruit	-	-
22/02/2019	Samut Sakhon	13°35'49.0"N 100°13'13.7"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	9
				<i>Bactrocera correcta</i>	6
22/02/2019	Samut Sakhon	13°35'47.4"N 100°13'12.9"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	5
19/03/2019	Ratchaburi	13°21'43.3"N 99°46'34.1"E	breadfruit	-	-
19/03/2019	Ratchaburi	13°21'33.1"N 99°46'42.7"E	breadfruit	-	-
19/03/2019	Ratchaburi	13°21'32.2"N 99°46'38.2"E	breadfruit	-	-
19/03/2019	Ratchaburi	13°21'34.1"N 99°46'35.7"E	breadfruit	-	-
19/03/2019	Ratchaburi	13°21'36.0"N 99°46'37.2"E	breadfruit	-	-
19/03/2019	Ratchaburi	13°21'07.7"N 99°46'04.9"E	breadfruit	-	-
19/03/2019	Ratchaburi	13°19'33.2"N 99°34'12.5"E	breadfruit	-	-
19/03/2019	Ratchaburi	13°19'31.8"N 99°34'09.3"E	jackfruit	-	-
19/03/2019	Ratchaburi	13°19'52.6"N 99°33'56.0"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	57
				<i>Bactrocera correcta</i>	28
				<i>Bactrocera carambolae</i>	2

Table 1 Species and number of individuals of fruit flies reared from fruits (i.e. jackfruit, breadfruit, chempedak, guava and horse mango) in 16 provinces, November 2018 – October 2019 (continue)

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'38.2"N 100°12'28.7"E	guava	Bactrocera dorsalis	108
				Bactrocera correcta	126
				Bactrocera carambolae	2
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'37.9"N 100°12'10.2"E	jackfruit	-	-
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'37.9"N 100°12'10.2"E	guava	Bactrocera dorsalis	132
				Bactrocera correcta	79
				Bactrocera carambolae	2
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'52.6"N 100°12'22.5"E	guava	Bactrocera dorsalis	1,193
				Bactrocera correcta	229
				Bactrocera carambolae	12
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'53.9"N 100°12'19.3"E	guava	Bactrocera dorsalis	154
				Bactrocera correcta	47
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'43.3"N 100°12'16.4"E	guava	Bactrocera dorsalis	178
				Bactrocera correcta	78
				Bactrocera carambolae	1
29/03/2019	Nakhon Pathom	13°46'49.2"N 100°03'13.9"E	guava	Bactrocera dorsalis	225
				Bactrocera correcta	138
				Bactrocera carambolae	4
01/04/2019	Rayong	12°54'09.3"N 101°31'59.0"E	jackfruit	Bactrocera dorsalis	76
01/04/2019	Rayong	12°53'55.9"N 101°31'37.1"E	breadfruit	-	-
01/04/2019	Rayong	12°53'54.3"N 101°31'37.2"E	jackfruit	-	-
01/04/2019	Rayong	12°54'25.1"N 101°32'06.0"E	jackfruit	-	-
01/04/2019	Rayong	12°54'24.2"N 101°32'07.5"E	guava	Bactrocera dorsalis	82
				Bactrocera carambolae	6
02/04/2019	Rayong	12°52'31.3"N 101°36'23.1"E	jackfruit	-	-
02/04/2019	Rayong	12°52'34.4"N 101°36'24.4"E	jackfruit	Bactrocera dorsalis	2
02/04/2019	Rayong	12°52'29.2"N 101°36'31.1"E	jackfruit	-	-
02/04/2019	Rayong	12°52'23.3"N 101°36'22.2"E	jackfruit	-	-
03/04/2019	Trat	12°18'15.6"N 102°27'36.1"E	jackfruit	-	-

Table 1 Species and number of individuals of fruit flies reared from fruits (i.e. jackfruit, breadfruit, chempedak, guava and horse mango) in 16 provinces, November 2018 – October 2019 (continue)

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
03/04/2019	Trat	12°17'24.2"N 102°23'39.3"E	jackfruit	-	-
03/04/2019	Trat	12°18'59.5"N 102°27'06.6"E	jackfruit	-	-
03/04/2019	Trat	12°18'48.2"N 102°27'00.7"E	guava	Bactrocera dorsalis Bactrocera carambolae	85 3
03/04/2019	Trat	12°15'42.7"N 102°30'13.3"E	breadfruit	-	-
03/04/2019	Trat	12°07'09.2"N 102°41'39.6"E	guava	Bactrocera dorsalis Bactrocera carambolae	165 4
03/04/2019	Trat	12°23'08.1"N 102°22'19.1"E	breadfruit	-	-
03/04/2019	Chanthaburi	12°31'06.3"N 102°09'53.6"E	breadfruit	-	-
03/04/2019	Chanthaburi	12°32'14.4"N 102°07'31.4"E	breadfruit	-	-
03/04/2019	Chanthaburi	12°33'10.0"N 102°06'57.5"E	breadfruit	-	-
04/04/2019	Chanthaburi	12°30'45.8"N 102°10'21.5"E	jackfruit	Bactrocera dorsalis	1
04/04/2019	Chanthaburi	12°34'24.8"N 102°09'43.6"E	breadfruit	-	-
04/04/2019	Chanthaburi	12°35'20.9"N 102°09'14.0"E	breadfruit	-	-
04/04/2019	Chanthaburi	12°36'49.9"N 102°08'18.4"E	breadfruit	-	-
04/04/2019	Chanthaburi	12°38'54.4"N 102°04'24.0"E	breadfruit	-	-
04/04/2019	Chanthaburi	12°41'15.2"N 102°03'01.6"E	guava	Bactrocera dorsalis Bactrocera carambolae	140 7
04/04/2019	Chanthaburi	12°41'17.6"N 102°03'00.5"E	jackfruit	Bactrocera dorsalis Bactrocera carambolae	241 18
04/04/2019	Chanthaburi	12°45'27.9"N 102°00'22.2"E	chempedak	-	-
04/04/2019	Chanthaburi	12°45'44.0"N 102°00'15.8"E	jackfruit	-	-
04/04/2019	Chanthaburi	12°45'48.3"N 102°00'18.6"E	jackfruit	Bactrocera dorsalis Bactrocera carambolae	29 1

Table 1 Species and number of individuals of fruit flies reared from fruits (i.e. jackfruit, breadfruit, chempedak, guava and horse mango) in 16 provinces, November 2018 – October 2019 (continue)

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
04/06/2019	Phetchaburi	12°50'01.4"N	jackfruit	Bactrocera dorsalis	98
		99°43'60.0"E		Bactrocera carambolae	3
04/06/2019	Prachuap Khiri Khan	11°53'03.8"N	jackfruit	-	-
		99°47'43.3"E			
04/06/2019	Prachuap Khiri Khan	11°20'36.2"N	guava	Bactrocera dorsalis	88
		99°32'59.6"E		Bactrocera correcta	8
				Bactrocera carambolae	13
26/07/2019	Chumphon	10°49'57.1"N	jackfruit	Bactrocera umbrosa	53
		99°13'07.8"E		Bactrocera dorsalis	9
				Bactrocera carambolae	11
26/07/2019	Chumphon	10°48'43.4"N 99°14'15.7"E	breadfruit	-	-
26/07/2019	Chumphon	10°48'44.0"N 99°14'17.7"E	chempedak	Bactrocera umbrosa	28
26/07/2019	Chumphon	10°48'21.4"N 99°14'22.8"E	horse mango	Bactrocera dorsalis	236
				Bactrocera carambolae	8
26/07/2019	Chumphon	10°21'12.8"N 99°06'58.2"E	breadfruit	-	-
26/07/2019	Surat Thani	9°39'58.6"N	jackfruit	Bactrocera dorsalis	250
		99°06'20.4"E		Bactrocera carambolae	6
26/07/2019	Surat Thani	9°39'55.3"N	horse mango	Bactrocera dorsalis	52
		99°06'23.3"E		Bactrocera carambolae	4
26/07/2019	Surat Thani	9°39'47.0"N 99°06'13.2"E	chempedak	-	-
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°25'09.4"N	horse mango	Bactrocera dorsalis	57
		99°51'15.0"E		Bactrocera carambolae	12
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°25'27.2"N	jackfruit	Bactrocera dorsalis	5
		99°51'20.6"E			
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°23'15.1"N	guava	-	-
		99°49'43.6"E			
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°26'21.6"N	chempedak	-	-
		99°45'56.8"E			
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°26'07.7"N	guava	Bactrocera umbrosa	9
		99°46'44.4"E		Bactrocera dorsalis	19
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°25'57.5"N	guava	Bactrocera dorsalis	5
		99°46'33.4"E			
19/08/2019	Songkhla	7°11'53.2"N 100°35'24.5"E	breadfruit	-	-

Table 1 Species and number of individuals of fruit flies reared from fruits (i.e. jackfruit, breadfruit, chempedak, guava and horse mango) in 16 provinces, November 2018 – October 2019 (continue)

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
19/08/2019	Songkhla	7°09'10.4"N 100°32'41.1"E	chempedak	Bactrocera umbrosa	42
				Bactrocera dorsalis	100
				Bactrocera carambolae	17
19/08/2019	Songkhla	7°09'10.4"N 100°32'43.9"E	chempedak	Bactrocera umbrosa	4
				Bactrocera dorsalis	15
19/08/2019	Songkhla	7°09'10.4"N 100°32'41.5"E	chempedak	Bactrocera dorsalis	8
20/08/2019	Songkhla	6°53'41.3"N 100°21'19.3"E	chempedak	Bactrocera umbrosa	18
				Bactrocera dorsalis	386
				Bactrocera carambolae	86
20/08/2019	Songkhla	6°53'23.3"N 100°21'02.1"E	chempedak	Bactrocera umbrosa	13
20/08/2019	Songkhla	6°53'19.5"N 100°24'20.6"E	guava	Bactrocera dorsalis	182
				Bactrocera carambolae	6
20/08/2019	Songkhla	6°53'06.6"N 100°23'41.5"E	jackfruit	Bactrocera umbrosa	117
				Bactrocera dorsalis	19
20/08/2019	Songkhla	6°58'08.1"N 100°26'07.5"E	chempedak	Bactrocera umbrosa	89
				Bactrocera dorsalis	33
				Bactrocera carambolae	7
20/08/2019	Songkhla	7°00'24.7"N 100°18'13.8"E	jackfruit	Bactrocera umbrosa	134
				Bactrocera dorsalis	13
20/08/2019	Songkhla	7°00'24.8"N 100°18'13.8"E	chempedak	-	-
20/08/2019	Songkhla	7°00'27.5"N 100°18'06.8"E	chempedak	Bactrocera umbrosa	3
24/08/2019	Chumphon	10°49'56.9"N 99°13'07.9"E	jackfruit	Bactrocera dorsalis	3
				Bactrocera carambolae	1
24/08/2019	Chumphon	10°49'44.6"N 99°13'09.4"E	jackfruit	Bactrocera dorsalis	10
24/08/2019	Surat Thani	9°39'46.7"N 99°06'12.8"E	chempedak	-	-
26/08/2019	Songkhla	6°58'09.0"N 100°34'07.1"E	chempedak	Bactrocera dorsalis	91
26/08/2019	Satun	6°46'12.9"N 100°08'35.0"E	chempedak	Bactrocera umbrosa	24
26/08/2019	Satun	6°45'54.5"N 100°08'37.5"E	chempedak	Bactrocera umbrosa	33
26/08/2019	Satun	6°45'44.1"N 100°03'54.0"E	chempedak	Bactrocera umbrosa	71

Table 1 Species and number of individuals of fruit flies reared from fruits (i.e. jackfruit, breadfruit, chempedak, guava and horse mango) in 16 provinces, November 2018 – October 2019 (continue)

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
26/08/2019	Satun	6°47'32.5"N	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	238
		100°04'59.9"E		<i>Bactrocera carambolae</i>	38
26/08/2019	Songkhla	6°57'00.5"N	chempedak	<i>Bactrocera dorsalis</i>	32
		100°08'03.3"E			
27/08/2019	Phatthalung	7°33'52.4"N	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	63
		100°07'26.5"E		<i>Bactrocera carambolae</i>	6
20/10/2019	Surat Thani	9°39'47.1"N 99°06'13.0"E	chempedak	<i>Bactrocera umbrosa</i>	44
21/10/2019	Songkhla	7°00'27.5"N	jackfruit	<i>Bactrocera umbrosa</i>	32
		100°18'06.8"E		<i>Bactrocera dorsalis</i>	75
21/10/2019	Songkhla	6°53'18.5"N	jackfruit	<i>Bactrocera umbrosa</i>	54
		100°23'37.1"E		<i>Bactrocera dorsalis</i>	19
22/10/2019	Surat Thani	9°40'23.7"N	jackfruit	<i>Bactrocera umbrosa</i>	262
		99°05'06.1"E		<i>Bactrocera dorsalis</i>	24
22/10/2019	Surat Thani	9°40'30.0"N 99°05'15.9"E	jackfruit	-	-

Table 2 Development stages of *Bactrocera umbrosa* (Fabricius) under laboratory condition (26.80±1.16°C and 88.49±1.33 %RH)

Stages of <i>B. umbrosa</i>	n ¹	Range (days)	Mean±SD (days)
Egg incubation	100	84-96 (hr.)	84.21±1.45 (hr.)
Laval period	85	8-10	8.85±0.74
Pupal period	40	11-13	11.50±0.66
Adult longevity			
Female	10	87-119	100.30±11.03
Male	10	80-106	89.90±6.87
Total development period			
From egg to adult (days)		22.51-25.51	23.72±0.83

¹= number of observations

Table 3 Life table of *Bactrocera umbrosa* (Fabricius) in jackfruit, *Artocarpus heterophyllus*

x	l_x	L_x	d_x	q_x	$100q_x$	S_x	e_x
Egg stage	100	92.50	15.00	0.15	15.00	85.00	1.87
Laval stage	85	62.50	45.00	0.53	52.94	47.06	1.11
Pupal stage	40	32.00	16.00	0.40	40.00	60.00	0.80
Adult	24	-	-	-	-	-	-

x = Developmental stage

l_x = Number entering stage

L_x = Number alive in each age interval

d_x = Number dead during stage x

$100q_x$ = Percent apparent mortality

S_x = Survival rate within stage

e_x = life expectancy



Figure 1 Fruit samples

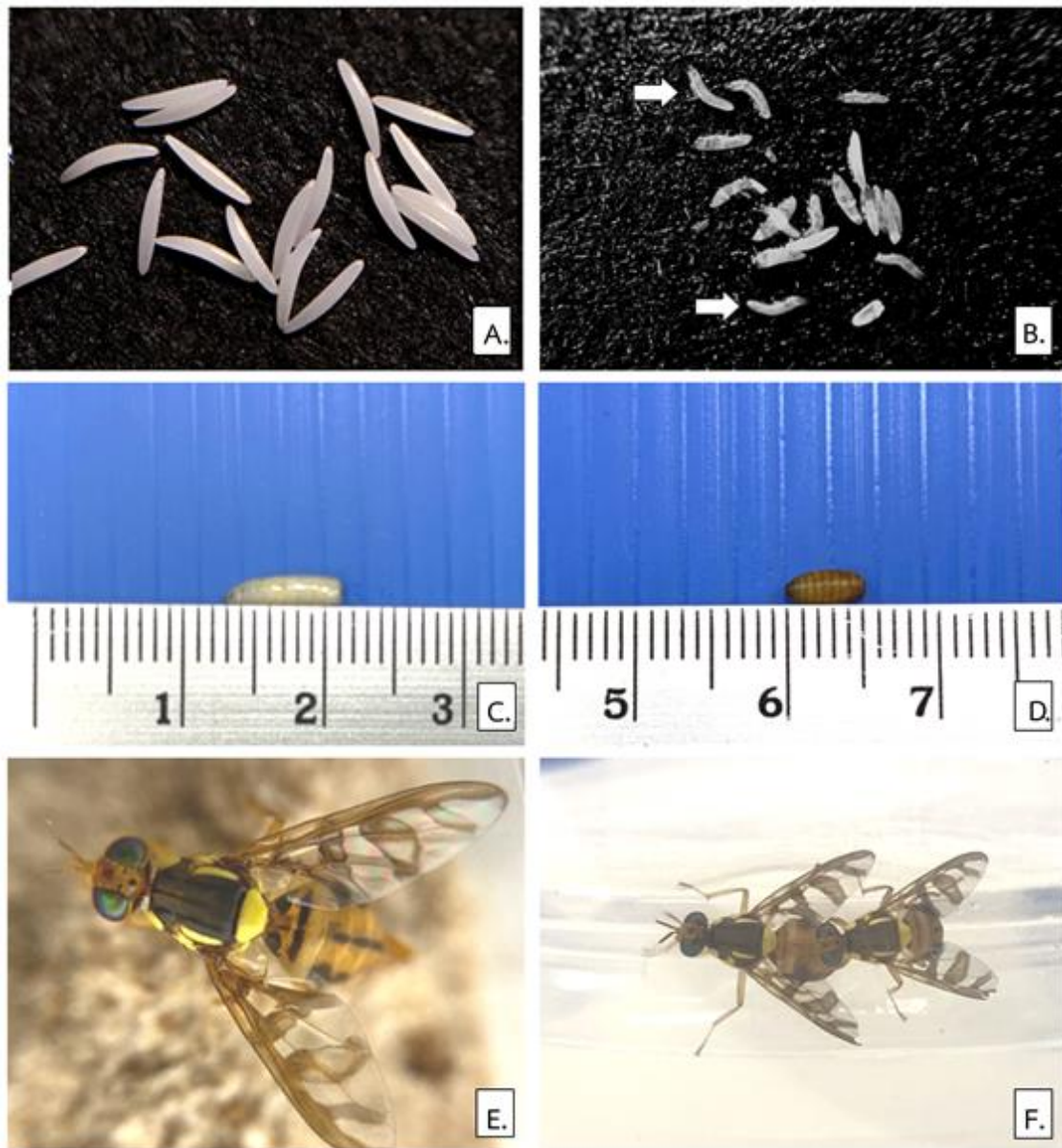


Figure 2 *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)

- A. Eggs
- B. Newly hatched larvae
- C. Final stage of larva
- D. Pupa
- E. Female adult
- F. Mating



Adults
Male: 80-106 days
Female: 87-119 days



Pupae 11-13 days



Eggs 84-96 hours



Larvae 8-10 days



Figure 3 Life cycle of *Bactrocera umbrosa* (Fabricius)

ศึกษานิต ชีววิทยา และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์
ของหอยน้ำคั่วพิษสกุล *Physella*
Species, Biology, and Geographical Distribution
of Aquatic Pest Snail *Physella*

อภิรักษ์ เอี่ยมสุวรรณสุข ดาราพร รินทะรักษ์ ศุภกร วงษ์เรืองพิบูล
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Species, biology, and geographical distribution of aquatic pest snail *Physella* were elucidated from October 2018 to September 2020. Totally 163 specimens of *Physella* were collected from 3 provinces (Bangkok, Nakhon Pathom, and Kanchanaburi). 78 samples were morphologically identified as *Physella acuta* while 2 samples were *Physella bonushenricus*. This snail prefers to live with *Hydrilla verticillata* and *Nymphaea* spp. One egg cluster contains around 11-43 eggs with gelatinous capsule. The average length and weight of newly hatched snails are 1.37 mm and 0.002 g, respectively. Snails begin laying eggs at the age of 5 to 6 weeks old.

Keywords : aquatic pest snail, biology, geographical distribution, *Physella*, species

บทคัดย่อ

ดำเนินศึกษานิต ชีววิทยา และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำคั่วพิษสกุล *Physella* ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 – กันยายน 2563 ได้ตัวอย่างหอย *Physella* ทั้งหมด 163 ตัวอย่างจาก 3 จังหวัด (จังหวัดกรุงเทพฯ กาญจนบุรี และนครปฐม) พบว่าเป็นชนิด *Physella acuta* จำนวน 78 ตัวอย่าง และ *Physella bonushenricus* จำนวน 23 ตัวอย่าง หอยชนิดนี้พบอาศัยอยู่กับพืชน้ำบางชนิด ได้แก่ สาหร่ายหางกระรอก และบัวประดับ จากการศึกษาลักษณะการวางไข่ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีลักษณะเป็นเมือกเหนียวห่อหุ้มกลุ่มไข่อีกชั้นหนึ่ง จำนวนไข่ต่อคลัสเตอร์ประมาณ 11-43 ฟอง ลูกหอยที่เพิ่งเริ่มเกิดในสัปดาห์แรกมีความยาวเปลือกเฉลี่ย 1.37 มิลลิเมตร น้ำหนัก 0.002 กรัม และจะเริ่มวางไข่ได้เมื่ออายุ 5-6 สัปดาห์

คำหลัก : ชนิด ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ หอยน้ำ *Physella*

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-01-09-62

คำนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชน้ำหลายชนิดที่มีความสวยงาม มีศักยภาพสูงในการเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ต่างประเทศต้องการและให้ราคาสูง ไม้ประดับสร้างรายได้ให้กับประเทศนับร้อยล้านบาทและมีแนวโน้มที่จะเติบโตต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญของการผลิตไม้ประดับและการส่งออกคือปัญหาการเข้าทำลายจากหอยน้ำ ศัตรูพืชซึ่งสร้างความเสียหายแก่พรรณไม้ประดับ นอกจากนี้ตัวและไข่หอยยังติดไปกับต้นไม้ ทำให้เสียเวลา ในการล้างทำความสะอาดก่อนนำส่งออก ถ้าหากมีการพบเห็นตัวและไข่หอยติดไปกับพรรณไม้ประดับส่งออกจะถูกเผาทำลาย ทำให้ภาพพจน์การส่งออกไม้ประดับของประเทศไทยเสื่อมเสียอีกด้วย

กรมวิชาการเกษตรกำลังทำการวิจัยหอยศัตรูพรรณไม้ประดับและสำรวจความหลากหลายชนิดของหอยน้ำในระบบนิเวศเกษตร พบว่าหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella* (วงศ์ Physidae) เป็นหนึ่งในชนิดที่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถทำความเสียหายแก่พรรณไม้ประดับเป็นอย่างมาก มักพบหอยและไข่หอยสกุนี้ติดไปกับไม้ประดับ และเข้าทำลายโดยการกัดกินใบจนเสียหาย ทั้งนี้หอยชนิดนี้ไม่ได้มีถิ่นอาศัยดั้งเดิมอยู่ในประเทศไทย มีศักยภาพในการรุกรานสูง จากการสำรวจเบื้องต้นมีรายงานการพบในแหล่งน้ำในประเทศไทยดังเช่นเขื่อนลำพระเพลิง ณ จังหวัดนครราชสีมา

อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับหอย *Physella* ในด้านของชีววิทยาดังเช่น อนุกรมวิธาน วงจรชีวิต การสืบพันธุ์ แหล่งที่อยู่อาศัย และอาหาร เป็นต้น การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ ทั้งนี้ข้อมูลทางด้าน ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ จะทำให้เข้าใจถึงธรรมชาติ และพฤติกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอ้างอิงเชิงวิชาการ เพื่อการป้องกันกำจัดและมีความจำเป็นต่อการวางแผนเพื่อการจัดการหอยน้ำศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ (pest management) ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล่องพลาสติกขนาดต่าง ๆ
- กระดาษขุ่นกั้นประแสงค์
- เวอร์เนีย (เครื่องมือวัดขนาดเปลือกหอย)
- อาหารปลาชนิดเม็ด
- กล้องถ่ายภาพดิจิทัล
- สำหร่าย และไม้ประดับ
- ผักสด
- ตู้ปลา
- เครื่องกำเนิดออกซิเจน
- GPS

วิธีการ

1) เก็บตัวอย่างหอยและศึกษาการแพร่กระจาย

1.1 สํารวจและเก็บตัวอย่างหอยสกุล *Physella* ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ และแปลงปลูกพรรณไม้หน้าของเกษตรกรในพื้นที่ภาคเหนือ จังหวัดเชียงใหม่ ภาคกลาง จังหวัดสุพรรณบุรี นครปฐม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ ภาคตะวันออก จังหวัดฉะเชิงเทรา จันทบุรี ภาคตะวันตก จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และภาคใต้ จังหวัดกระบี่ ตรัง ชุมพร ระนอง และสุราษฎร์ธานี

1.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง ดำเนินการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่กำหนด โดยแบ่งเก็บพื้นที่ละ 5 จุดตามขอบตลิ่ง พื้นดินขอบบ่อ และพันธุ์พืชน้ำ

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกพิกัดการกระจายของหอยสกุล *Physella* โดยเครื่อง GPS และนำมาทำแผนที่การกระจายพันธุ์โดยใช้โปรแกรม Google Earth

- บันทึกชนิดพันธุ์ไม้ที่พบในบริเวณแหล่งน้ำที่หอยสกุล *Physella* อาศัยอยู่ บันทึกลักษณะทางภูมิศาสตร์ของพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง

- บันทึกค่าวิเคราะห์คุณภาพน้ำจากแหล่งที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ค่า pH และค่าออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen, DO)

2) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา น้ำหนักและจำแนกชนิด

นำหอยที่เก็บตัวอย่างมาได้มาวัดความสูงของเปลือก (จาก apex จนถึงด้านล่างสุดของ aperture) ความยาวของเปลือก ความกว้างของรูเปิด (aperture) จำนวนวง (whorl) ลักษณะของเปลือก ชั่งน้ำหนักหอย นำมาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างความยาว ความสูงของเปลือกและน้ำหนัก ด้วยวิธี correlation analysis

จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเปลือก ดังเช่น ลักษณะรูปทรงของเปลือก (shell shape) รูเปิด (aperture) จำนวนวง (whorl) ลักษณะตีน (foot) ตามวิธีการในคู่มือของ Brown (1994)

3) ศึกษาวงจรชีวิต

3.1) นำหอยมาเลี้ยงเพื่อศึกษาวงจรชีวิตในกล่องพลาสติกขนาด 13 x 13 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ที่ภายในบรรจุน้ำประมาณ 3 ลิตร พร้อมสาหร่ายหางกระรอก นำไปเลี้ยงในบริเวณที่มีแสงอุณหภูมิตั้งที่ 25±2 องศาเซลเซียส ให้อาหารปลาชนิดเม็ดและผักกาดหอมทุก 3 วัน และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำและให้แคลเซียมผงทุก 7 วัน วัดความสูงความยาวของเปลือก น้ำหนัก วัดค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ

3.2) เมื่อหอยเกิดการผสมพันธุ์และวางไข่ บันทึกจำนวนไข่ต่อกลุ่ม ให้นำไข่มาเลี้ยงในกล่องพลาสติกบรรจุน้ำและสาหร่ายหางกระรอกกล่องใหม่ เมื่อลูกหอยรุ่นที่ 1 ฝักออกมาจากไข่แล้ว นับจำนวน ชั่งน้ำหนักและวัดขนาดลูกหอยที่เกิดขึ้นใหม่ทุกสัปดาห์

3.3) เลี้ยงลูกหอยรุ่นที่ 1 จนกระทั่งเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยและสามารถผสมพันธุ์ได้ ให้ดำเนินการตามข้อที่ 3.1 และ 3.2 จนกระทั่งเกิดลูกหอยรุ่นที่ 2

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก เช่น ลักษณะรูปร่าง สี และลวดลายบนเปลือก ตรวจสอบรายละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- บันทึกความกว้างและความสูงของเปลือก ความกว้างของวงรอบเปลือกความกว้าง ขนาดของปากเปิดเปลือก

เวลาและสถานที่

ดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 – กันยายน 2563 โดยเก็บตัวอย่างหอยสกุล *Physella* ตามธรรมชาติและแปลงปลูกทั่วประเทศไทย นำมาศึกษาชนิด ชีววิทยา และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ ณ กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

พบหอยชนิดนี้แพร่กระจายเฉพาะที่ภาคกลางและภาคตะวันตกของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างหอยศัตรูพืช *Physella* ได้จากกรุงเทพ 89 ตัวอย่าง และจังหวัดกาญจนบุรี 39 ตัวอย่าง นครปฐม 38 ตัวอย่าง ลักษณะเด่นของหอยในสกุลนี้คือ มีเปลือกเวียนซ้าย ไม่มีฝาปิด มีสีของเปลือกที่พบตั้งแต่สีน้ำตาลออกส้มยันสีดำสนิท สีของ foot มีสีดำ พบอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนิ่งที่ใสสะอาด มีพืชอาศัยดังนี้ คือ สาหร่ายหางกระรอก *Hydrilla verticillata* และบัวประดับ *Nymphaea* spp. สามารถเคลื่อนไหวได้รวดเร็วกว่าหอยน้ำศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ เช่น *Radix* พบหอยในสกุลนี้ 2 ชนิด ได้แก่ *Physella acuta* ซึ่งมีลักษณะเปลือกเป็นรูปไข่ apex แหลม มีความยาวเปลือก (shell length) ตั้งแต่ 4-11 มม. เฉลี่ยเท่ากับ 8.24 ± 2.11 มม. มีความกว้างเปลือก (shell width) ตั้งแต่ 2-7 มม. เฉลี่ยเท่ากับ 4.67 ± 1.19 มม. มีความยาวรูเปิด (aperture length) ตั้งแต่ 3-8 มม. เฉลี่ยเท่ากับ 5.74 ± 1.37 มม. มีความกว้างรูเปิด (aperture width) ตั้งแต่ 2-6 มม. เฉลี่ยเท่ากับ 3.84 ± 1.17 มม. และมีจำนวนวงรอบ (whorl) ตั้งแต่ 4-5 วง และ *Physella bonushenricus* ซึ่งจะมีลักษณะเปลือกทรงเหลี่ยม มี apex ที่มีลักษณะแบน โดยพบ *P. acuta* 143 ตัวอย่างในพื้นที่ 3 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพ กาญจนบุรี และ นครปฐม ส่วน *Physella bonushenricus* พบเพียง 23 ตัวอย่างในกรุงเทพเท่านั้น

จากการศึกษาลักษณะการวางไข่ในหึ่งปฏิบัติการ พบว่ามีลักษณะของไข่คล้ายกับไข่ของหอยศัตรูพืช *Radix* กล่าวคือ มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวห่อหุ้มกลุ่มไข่อีกชั้นหนึ่ง จำนวนไข่ต่อคลัสเตอร์ประมาณ 11-43 ฟอง ไข่จะฟักเป็นลูกหอยภายใน 2-5 วัน และเริ่มวางไข่ครั้งแรกได้เมื่อลูกหอยอายุ 30-35 วัน (5-6 สัปดาห์) จากการศึกษาน้ำหนักของลูกหอยเกิดใหม่ทุกสัปดาห์จนครบ 8 สัปดาห์ สามารถสร้างกราฟได้ดังใน Fig. 3 แสดงให้เห็นว่าน้ำหนักหอยในสัปดาห์ที่ 8 (0.035 กรัม) เพิ่มขึ้นคิดเป็น 17 เท่าของสัปดาห์ที่ 2 (0.002 กรัม) และจากการศึกษาความยาวเปลือก สามารถ

สร้างกราฟได้ดังใน Fig. 4 แสดงให้เห็นว่าความยาวเปลือกในสัปดาห์ที่ 8 (6.97 มิลลิเมตร) เพิ่มขึ้นคิดเป็นประมาณ 5 เท่าของสัปดาห์ที่ 2 (1.37 มิลลิเมตร)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาตัวอย่างหอยสกุล *Physella* จำนวน 166 ตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี และนครปฐม พบว่าเป็นชนิด *Physella acuta* จำนวน 143 ตัวอย่าง และ *Physella bonushenricus* จำนวน 23 ตัวอย่าง หอยชนิดนี้พบอาศัยอยู่กับพืชน้ำบางชนิด ได้แก่ สาหร่ายหางกระรอก และบัวประดับ จากการศึกษาลักษณะการวางไข่ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีลักษณะเป็นเมือกเหนียวห่อหุ้มกลุ่มไข่อีกชั้นหนึ่ง จำนวนไข่ต่อคลัสเตอร์ประมาณ 11-43 ฟอง และสามารถสร้างกราฟการเจริญเติบโตจากน้ำหนักและความยาวเปลือกของหอยอายุ 1-8 สัปดาห์ได้

เอกสารอ้างอิง

- ยุพา วรยศ. 2534. พันธุ์ไม้น้ำ Aquatic Plants BO351 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 500 หน้า
 วนาพร วงษ์นิคัง, ศรุต สุทธิอารมณ, ศรีจันทร์ ศรีจันทร์, วิภาดา ปลอดภัย, บุษบง มนัสมันคง, พวงผกา อ่างมณี. 2553. การศึกษาชนิดและทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพรรณไม้น้ำ. รายงานวิจัยประจำปี. กลุ่มบริหารศัตรูพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1569-1580.
- สุกัญญา พริกจำรูญ. 2548. คู่มือการเพาะเลี้ยงและส่งออกพรรณไม้น้ำปลาสวยงาม. สำนักพิมพ์น็อนบุ๊คมีเดีย. 130 หน้า
- อรุณี รอดลอย, สุจินต์ หนูขวัญ และยุพเยาว์ สายจันทร์. 2555. การศึกษาชนิดและการกระจายพันธุ์ของพรรณไม้น้ำในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทย. กลุ่มงานวิจัยพรรณไม้น้ำ สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 316 หน้า.
- Albrecht, C., Kroll, O., Terrazas, E. and Wilke, T. 2009. Invasion of ancient Lake Titicaca by the globally invasive *Physa acuta* (Gastropoda: Pulmonata: Hygrophila). *Biological Invasions* 11: 1821–1826.
- Bousset, L., Henry, P. Y., Sourrouille, P. and Jarne, P. 2004. Population biology of the invasive freshwater snail *Physa acuta* approached through genetic markers, ecological characterization and demography. *Molecular Ecology* 13: 2023–2036.
- Brandt, R. A. M. 1974. The non-marine aquatic mollusca of Thailand. *Archiv fuer Molluskenkunde* 105: 1 – 423.
- Brown, D. S. 1994. *Freshwater snails of Africa and their medical importance*. 2 eds, Taylor and Francis, London, UK.

- Chlyeh, G., Dodet, M., Delay, B., Khallaayoune, K. and Jarne, P. 2006. Spatio-temporal distribution of freshwater snail species in relation to migration and environmental factors in an irrigated area from Morocco. *Hydrobiologia* 553: 129–142.
- Clampitt, P. T. 1970. Comparative ecology of the snails *Physa gyrina* and *Physa integra*. *Malacologia* 10:113-151.
- Dillon, R. T., Jr. 2000. *The Ecology of Freshwater Molluscs*. Cambridge University Press, United Kingdom. 509 pp.
- Dillon, Jr. R. T. and Jacquemin, S. J. 2015. Heritability of Shell morphometrics in the freshwater pulmonate gastropod *Physa*. *PLoS ONE* 10(4): e0121962.
- Gittenberger, E., Janssen, A. W., Kuijper, W. J., Kuiper, J. G. J., Meijer, T., Van der Velde, G. et al. 2004. *De Nederlandse zoetwatermollusken. Recente en fossiele weekdieren uit zoet en brak water*. Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis, European Invertebrate Survey-Nederland, KNNV Uitgeverij, Utrecht, The Netherlands.
- Lorencová, E., Beran, L., Horsáková, V. and Horsák, M. 2015. Invasion Of Freshwater Molluscs In The Czech Republic: Time Course And Environmental Predictors. *Malacologia* 59(1): 105–120.
- Raković, M., Raković, M., Petrović, A., Popović, N., Đuknić, J., Naunovic, Z. and Paunović, M. 2016. Haplotype variation in the *Physa acuta* group (Basommatophora): genetic diversity and distribution in Serbia. *Mediterranean Marine Science* 17(1): 292-301.
- Turner, A. M. and Montgomery, S. L. 2009. Hydroperiod, predators and the distribution of physid snails across the freshwater habitat gradient. *Freshwater Biology* 54: 1189–1201.
- Van Leeuwen, C. H. A., Huig, N., Van Der Velde, G., Van Alen, T. A., Wagemaker, C. A. M., Sherman, C. D. H., Laassen, M. K., And Figuerola, J. 2013. How did This Snail Get Here? Several Dispersal Vectors Inferred for an Aquatic Invasive Species. *Freshwater Biology* 58: 88–99.
- Wethington, A. R. and Dillon, R. T. Jr. 1993. Reproductive development in the hermaphroditic freshwater snail, *Physa*, monitored with complementing albino lines. *Proceeding Royal Society of London B* 252: 109-114.

Wethington, A. R. and Lydeard, C. 2007. A molecular phylogeny of Physidae (Gastropoda: Basommatophora) based on mitochondrial DNA sequences. Journal of Molluscan Studies 73: 241 - 257.

Table 1 All *Physella* samples collected throughout Thailand.

Province	Species	
	<i>Physella acuta</i>	<i>Physella bonushenricus</i>
Bangkok	66	23
Kanchanaburi	39	-
Nakhon Pathom	38	-
Total	143	23

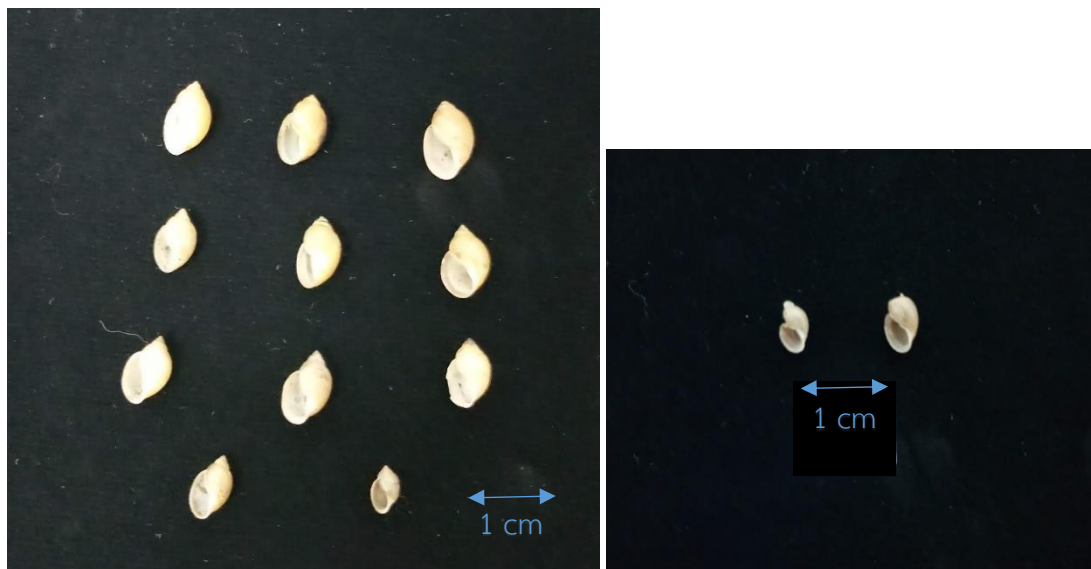


Figure 1: *Physella acuta* (left) and *Physella bonushenricus* (right)

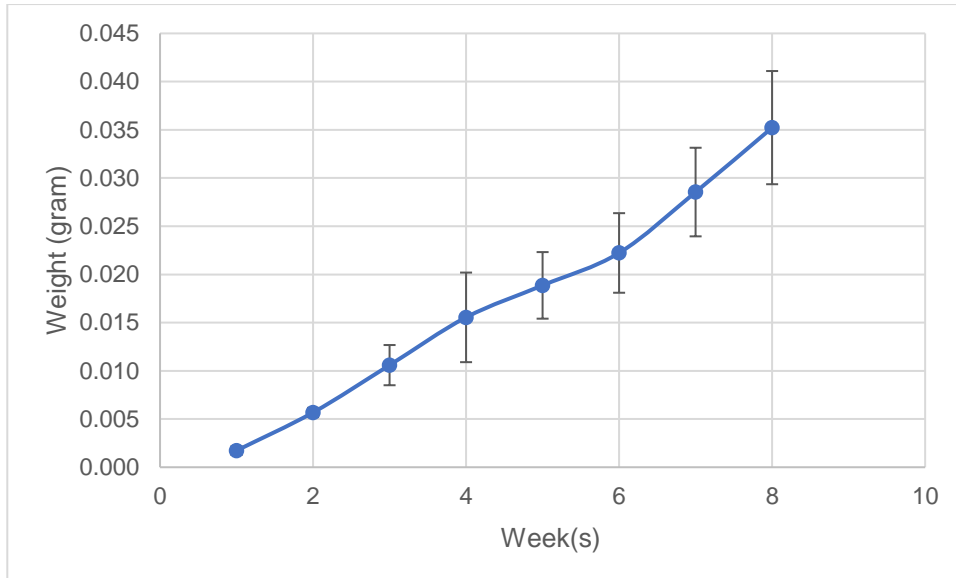


Figure 2 Average weight of *Physella acuta* individuals from first week to eighth week after hatching

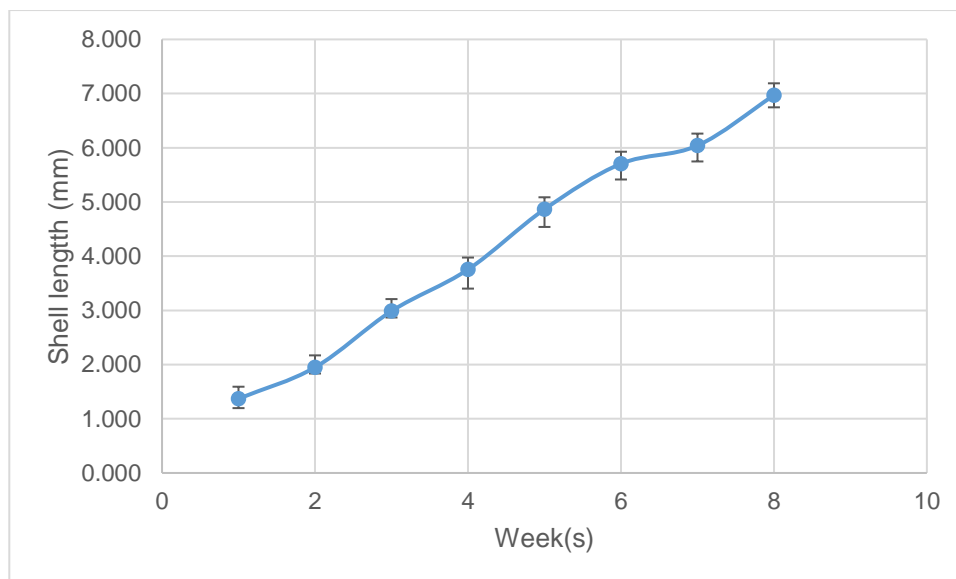


Figure 2 Average shell length of *Physella acuta* individuals from first week to eighth week after hatching

สัณฐานวิทยาและชีววิทยาของเพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch
(Hemiptera: Aphididae) ในประเทศไทย
Morphology and Biology of Cowpea Aphids, *Aphis craccivora* Koch
(Hemiptera: Aphididae) in Thailand

เกศสุตา สนศิริ จารุวัฒน์ แท้กุล ยุวรินทร์ บุญทบ สุนัดดา เชาวลิต
อิทธิพล บรรณาการ จอมสุรางค์ ดวงธิสาร
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

เพลี้ยอ่อนถั่ว *Aphis craccivora* Koch เป็นแมลงปากดูดศัตรูสำคัญของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย เนื่องจากสามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 80 วงศ์ และยังสามารถเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชแก่พืชถึง 30 ชนิด หากเพลี้ยอ่อนลงทำลายจำนวนมากจะทำให้ผลผลิตเสียหายและลดลง ดังนั้นวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยา พืชอาหาร และเขตการแพร่กระจายของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* พร้อมทั้งจัดทำแนวทางวินิจฉัย และได้ตัวอย่างเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงในรูปแบบสไลด์ถาวร รวมถึงจัดทำฐานข้อมูลสำหรับเป็นแหล่งสืบค้นข้อมูลศัตรูพืช จากการศึกษาโดยการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากแปลงปลูกพืชตระกูลถั่ว พืชตระกูลกะหล่ำ และพืชตระกูลแตงทั่วภูมิภาคของประเทศไทย ระหว่างเดือน ตุลาคม 2562 ถึง กันยายน 2563 ได้ตัวอย่างเพลี้ยอ่อน จำนวน 500 ตัวอย่าง จำแนกชนิดโดยใช้แนวทางวินิจฉัยตาม Blackman and Eastop, (2000) สามารถจำแนกเพลี้ยอ่อนได้ 1 ชนิด ได้แก่ *Aphis craccivora* Koch การศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนถั่ว *A. craccivora* ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยทำการเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว พบว่า มีการลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะตัวอ่อนมี 5 วัย ใช้ระยะเวลา 4 - 6 วัน ระยะตัวเต็มวัย 5 -30 วัน

คำหลัก : อนุกรมวิธาน เพลี้ยอ่อน Aphididae

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-01-10-63

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 กระจเจียบ มะเขือ ขี้เหล็ก และชบา เป็นต้น โดยทั้งตัวอ่อน และตัวเต็มวัยเข้าทำลายพืชโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชบริเวณใต้ใบ หรือส่วนอ่อนๆ ของพืช เช่น ยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอกและผล ทำให้พืชมีลักษณะผิดปกติ ใบเหลือง ใบย่น ดอกร่วง ผลบิดเบี้ยว และเมล็ดลีบ ผลและใบที่ถูกทำลายจะแห้งและร่วงไปในที่สุด ทำให้ผลผลิตเสียหายและลดลงมากกว่า 30% และที่สำคัญเพลี้ยอ่อนยังขับมูลน้ำตาล (Honeydew) ซึ่งเป็นอาหารของมดและราดำ (sooty mold) ทำให้ราดำเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วจนปกคลุมใบและผล ใบจึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้อย่างเต็มที่ ส่วนผลจะสกปรกไม่เป็นที่ต้องการของตลาด นอกจากนี้จะดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชแล้วเพลี้ยอ่อน *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 พืชตระกูลกะหล่ำ 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) สืบค้นข้อมูลเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* ที่จากเอกสารต่าง ๆ ที่มีการรายงานไว้ในประเทศไทยและต่างประเทศ หรือจากข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์

2) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่าง

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากแหล่งปลูกพืชตระกูลถั่ว พืชตระกูลแตง พืชตระกูลกะหล่ำ ส้ม มันสำปะหลัง มะเขือ และพริก โดยตัดส่วนของพืชที่มีตัวอ่อน หรือตัวเต็มวัยที่มีเพลี้ยอ่อนเกาะอยู่ด้วยกรรไกรตัดกิ่ง นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมพร้อมพืชอาศัยนำไปใส่กล่องพลาสติก และนำเพลี้ยอ่อนอีกส่วนหนึ่งดองในน้ำยาสำหรับดองเพลี้ยอ่อน (แอลกอฮอล์ 80% 2 ส่วน กรดแลคติก 1 ส่วน) บันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พืชอาหาร ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย สถานที่ วัน เดือน ปี พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ซึ่งประกอบด้วยค่าละติจูด (Latitude) ค่าลองจิจูด (Longitude) ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (Altitude) และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง นอกจากตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว มีตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้จากนักวิชาการ และตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

3) สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนในแปลงปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย ดังนี้

ปีที่ 1 (2563)

ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม พระนครศรีอยุธยา สุพรรณบุรี ลพบุรี นครสวรรค์

พิษณุโลก และเพชรบูรณ์

ภาคเหนือ ได้แก่ ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เชียงราย แพร่ และน่าน

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง จันทบุรี ตราด

และชลบุรี

ปีที่ 2 (2564)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ชัยภูมิ ร้อยเอ็ด ขอนแก่น เลย

ยโสธร สกลนคร ศรีสะเกษ หนองคาย อุดรธานี อุบลราชธานี

ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ ภูเก็ต พัทลุง ตรัง และสงขลา

4) การศึกษาทางด้านชีววิทยา

นำเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* ที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยจะทำการศึกษาวงชีวิตของเพลี้ยอ่อนตัวในพืชอาหารอย่างน้อย 2 ชนิด (จะทำการศึกษาในพืชอาหารที่เพลี้ยอ่อนตัวลงทำลายมากเป็นอันดับ 1 และ 2 จากการสำรวจ) วิธีการโดยนำตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* จำนวน 200 ตัว มาเพาะเลี้ยงรวมกันในกล่องพลาสติกขนาด 14 x 23 x 7 เซนติเมตร ให้ใบถั่วฝักยาวเป็นอาหารโดยใช้สำลีชุบน้ำพันรอบก้านใบเพื่อรักษาความสด เมื่อตัวเต็มวัยออกลูกทำการแยกตัวอ่อนโดยใช้ฟุ้งกันเบอร์ 0 เชื้อเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* แต่ละตัวไปเพาะเลี้ยงใน petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 2 เซนติเมตร รองด้วยกระดาษกรองที่มีความชื้น petri dish ละ 1 ตัว และใส่ใบถั่วฝักยาวขนาด 3 x 3 เซนติเมตร เพื่อเป็นอาหาร ทำการเปลี่ยนใบถั่วทุก 2 วัน สังเกตการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิต บันทึกข้อมูลจำนวนเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* ที่รอดชีวิตทุกๆวันจนกระทั่งเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* เป็นตัวเต็มวัย และนับจำนวนตัวอ่อนที่ตัวเต็มวัยออกลูกทุกวัน จนกระทั่งตัวเต็มวัยตาย นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างตารางชีวิตแบบ biological life table โดยใช้เทคนิคของ Napompeh (1973) และอินทวัฒน์ (2548)

5) การศึกษาทางด้านอนุกรมวิธาน

นำตัวอย่างตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชมาตรวจลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo บันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาด รูปร่าง ลักษณะ สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนแต่ละระยะ

การทำสไลด์ถาวร

- นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่เก็บโดยการดองในแอลกอฮอล์มาทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ Blackman and Eastop (2000) ดังนี้
 - นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากขวดดอง ใช้เข็มเจาะบริเวณส่วนกลางอกด้านบนของเพลี้ยอ่อน และรีดเอาของเหลวและตัวอ่อนที่อยู่ภายในตัวออก ระมัดระวังอย่าให้ปากเสียหาย นำเพลี้ยอ่อนที่เจาะแล้วใส่ในหลอดแก้วที่มีแอลกอฮอล์ 95% ไปต้มโดยวิธีวอเตอร์บัท (water bath) นาน 1-2 นาที
 - ดูดแอลกอฮอล์ออก เติมน้ำละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium hydroxide: KOH) 10% แช่ทิ้งไว้ 3-5 นาที
 - ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่น 5-6 ครั้ง แล้วแช่ทิ้งไว้ในน้ำกลั่นอีก 5-6 นาที

- ดูดน้ำกลั่นออก เต็มกรดเกลือเชียวละซติค แข็งทิ้งไว้ 2-3 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
- ดูดกรดเกลือเชียวละซติคออก เต็มโคลฟออย แข็งทิ้งไว้ 10-20 นาที หรือจนกว่าตัวอย่างเพ็ลี่ยอ่อนใส

การเม้าท์สไลด์

หยดแคนนาดาบัลซัมเพียงเล็กน้อยลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ เชี่ยวเพ็ลี่ยอ่อนลงในหยดแคนนาดาบัลซัม ให้เพ็ลี่ยอ่อนหงายท้องขึ้น จัดหมวด ขา ไซฟิงคูไล และหางให้อยู่ในตำแหน่งสวยงาม จากนั้นหยดไซลีนลงบนกึ่งกลางแผ่นสไลด์ที่สะอาด ค่อยๆคว่ำแผ่นสไลด์ลงบนแผ่นแก้วปิดสไลด์ช้าๆ รีบพลิกแผ่นสไลด์ให้ด้านแผ่นแก้วปิดสไลด์อยู่ด้านบน นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 7-15 วัน การเม้าท์สไลด์ด้วยวิธีนี้สามารถเก็บสไลด์ได้คงทนนานนับปี

การวินิจฉัยชนิด

- นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดกับเอกสารแนวทางการวินิจฉัยเพ็ลี่ยอ่อน ลักษณะสำคัญของเพ็ลี่ยอ่อนที่ใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่ ส่วนหัว; ร่องหวอดและร่องบริเวณหน้าผาก ความสั้นยาวของหวอด จำนวนปล้องและความยาวส่วนปลายของปล้องสุดท้าย ความยาวของปาก ส่วนอก; ความยาวของปลายขาคู่หลังและหนามบนน่องขา ส่วนท้อง; จะมีตุ่มขนาดเล็กปรากฏบริเวณปล้องท้องปล้องที่ 1 และ 7 โดยเฉพาะปล้องที่ 7 ตำแหน่งของตุ่มขนาดเล็กที่ปรากฏอยู่ด้านบนหรือด้านล่างรูหายใจใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกระดับสกุล แต่ในเพ็ลี่ยอ่อนบางชนิดไม่ปรากฏตุ่มดังกล่าว วาดรูปแสดงลักษณะต่างๆที่สำคัญ

- บันทึกรายละเอียดต่างๆ ของเพ็ลี่ยอ่อนที่สำรวจพบ เช่น ลักษณะ รูปร่าง ขนาด สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพ็ลี่ยอ่อนในแต่ละระยะ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์เพ็ลี่ยอ่อนแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เม้าท์ (mount) สไลด์

- จัดทำแนวทางการวินิจฉัยเพ็ลี่ยอ่อนและวาดภาพลักษณะสำคัญประกอบ
- เก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑสถาน โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

การบันทึกข้อมูล

บันทึกรายละเอียด ชื่อพืช พันธุ์พืช สถานที่เก็บตัวอย่าง วัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) ซึ่งประกอบด้วยค่าละจิจูด (Latitude) ค่าลองจิจูด (Longitude) ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล (Altitude) วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างและชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ นอกจากตัวอย่างเพ็ลี่ยอ่อนที่ได้จากสภาพธรรมชาติแล้ว

มีตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑน์ กรมวิชาการเกษตร ตัวอย่างที่ได้จากนักวิชาการ และ ตัวอย่างจากผู้มาขอรับบริการตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด เพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

เวลาและสถานที่

เวลา : ตุลาคม 2562 - กันยายน 2563

สถานที่ : - แหล่งปลูกพืชผักที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ ภาคกลาง จำนวน 10 แปลง
ภาคเหนือ จำนวน 10 แปลง

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สืบค้นข้อมูลพืชอาหาร เขตการแพร่กระจาย ที่มีรายงานในประเทศไทยและเก็บรวบรวม ตัวอย่างเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* จากแหล่งปลูกพืชตระกูลถั่ว พืชตระกูลแตง พืชตระกูลกะหล่ำ ส้ม มันสำปะหลัง มะเขือ และพริก จำนวน 500 ตัวอย่าง ในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา นครปฐม สุพรรณบุรี กรุงเทพมหานคร ปทุมธานี นครนายก พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ลพบุรี สุพรรณบุรี ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ น่าน ฉะเชิงเทรา ปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง จันทบุรี ตราด และชลบุรี นำมาจัดทำสไลด์ถาวร และนำไปอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30-60 วัน และ นำไปจัดจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ตรวจสอบลักษณะสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดโดยใช้ แนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อนของ Blackman and Eastop (2000) พบว่า เพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมได้จากพืชตระกูลถั่ว ได้แก่ ถั่วฝักยาว ถั่วพู ถั่วแปบ มันสำปะหลัง และพริก เป็นเพลี้ยอ่อนชนิด *A. craccivora* (Table 1) เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาว 1.90 – 2.31 มิลลิเมตร มีสีเทาดำถึงสีดำเป็นมันเงา หัวและหนวดปล้องสุดท้ายสีน้ำตาล หนวดสั้นกว่าลำตัว ไซฟิงคูไลและส่วนหางสีน้ำตาลหรือสีดำ ส่วนปากยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไซฟิงคูไลยาวกว่าส่วนหาง ส่วนหางมีรูปร่างคล้ายเส้น มีขน 4-7 เส้น บริเวณส่วนท้องด้านบนมีแถบสีดำ (Figure 3) จากการศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยทำการเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว พบว่า มีการลอกคราบ ทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะตัวอ่อนมี 5 วัย ใช้ระยะเวลา 4 - 6 วัน ระยะตัวเต็มวัย 5 -30 วัน (Figure 4)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาว 1.90 – 2.31 มิลลิเมตร มีสีเทาดำถึงสีดำเป็นมันเงา หัวและหนวดปล้องสุดท้ายสีน้ำตาล หนวดสั้นกว่าลำตัว ไซฟิงคูไลและส่วนหางสีน้ำตาลหรือสีดำ ส่วนปากยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไซฟิงคูไลยาวกว่าส่วนหาง ส่วนหางมีรูปร่างคล้าย

ลีน มีขน 4-7 เส้น บริเวณส่วนท้องด้านบนมีแถบสีดำ วงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนตัว *A. craccivora* ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยทำการเลี้ยงด้วยใบถั่วฝักยาว พบว่า มีการลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ระยะตัวอ่อนมี 5 วัย ใช้ระยะเวลา 4 - 6 วัน ระยะตัวเต็มวัย 5 -30 วัน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนักกีฏวิทยาและเจ้าหน้าที่กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยาทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลง ตลอดจนเตรียมตัวอย่างแมลงเพื่อการจัดจำแนกชนิด

เอกสารอ้างอิง

ลักขณา บำรุงศรี และ ชฎาภรณ์ เฉลิมวิเชียรพร. 2554. แมลงปากดูดชนิดที่สำคัญในประเทศไทย.

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. หน้า 39-64.

lackman, 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.

Warunee, S. 2002. Taxonomic Study of Aphids (Homoptera: Aphididae) in Northern Thailand. Ph. D. Thesis, Mahidol University, Bangkok.



Figure 1 Collect aphids In legumes in planting plots in various provinces of Thailand



Figure 2 Preparation of bean plants to be used as food crops for *A. craccivora* aphids for study biology

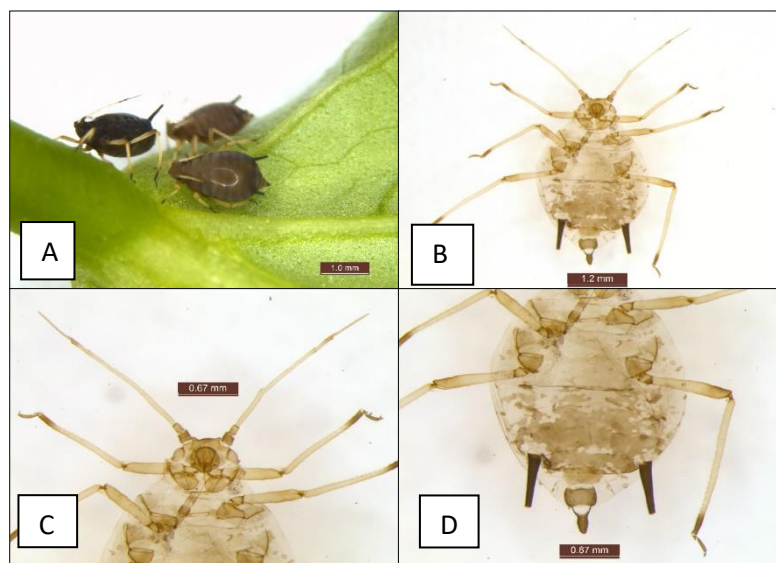


Figure 3 *Aphis craccivora* Koch; A. dorsal view of the body, B. head, C. caudal and siphunculi on slide

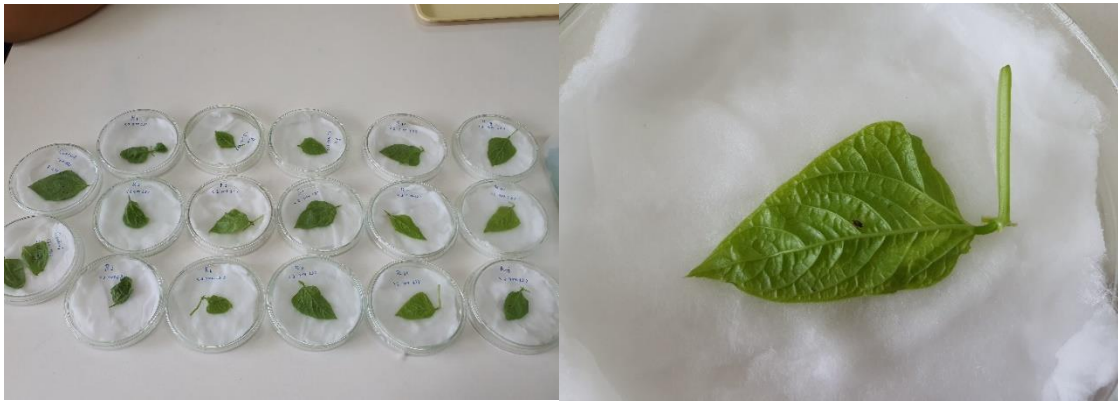


Figure 4 Conducted biological studies cowpea aphid in the laboratory



Figure 5 The different stages of growth of aphids

- A) Adult B) Nymph : Instar I C) Nymph : Instar II
D) Nymph : Instar III E) Nymph : Instar IV

ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Neoscytalidium dimidiatum*

Crous & Slippers and Gruyter

Study on biology and ecology of *Neoscytalidium dimidiatum*

Crous & Slippers and Gruyter

พรพิมล อธิปัญญาคม^{1/} ชนินทร ดวงสอาด^{2/} มะโนรัตน์ สุดสงวน^{2/}

^{1/}ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Brown spot or stem canker is an important disease of dragon fruit. The causal fungus infected caused by mold. *Neoscytalidium dimidiatum*, the causal agent of the disease could infect flowers, stems and fruits, which causing the great damage to the production of dragon fruit. In Thailand, the informative data of brown spot disease was not available. This study was conducted to determine the biology and ecology of *N. dimidiatum*, which could apply for further study on the brown spot disease management. The dragon fruit plantation located in Chanthaburi, Chiang Rai, Chiang Mai, Nakhon Pathom, Nakhon Ratchasima, Pathum Thani, Rayong, Ratchaburi, Sakon Nakhon, Samut Prakan, Samut Sakhon and Uthai Thani province had been observed and 32 of brown spot disease samples were collected from these planting areas. The disease samples could be divided into 2 groups based on the presented symptoms. The first group showed brown spot symptom on stems, whereas the second group showed the brown spot symptom together with the anthracnose on stems. The total number of 44 isolates could be obtained from collected samples. The 32 out of 44 isolates, which obtained from the brown spot symptoms on stems, could be identified as *Neoscytalidium dimidiatum*. The 12 fungal isolates obtained from the anthracnose symptoms could be identified as *Colletotrichum gloeosporioides*. Based on the specimens collected from this study, the brown spot symptoms comprised of six stages. The first stage of brown spot symptom presented the white spot with the red minute

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-02-06-61

dot in the middle. The second stage, the color spot symptom turned to red or grey color. It is most likely rare to isolate the fungal from the disease tissue of these both stages. The third stage, the spot extended and later turned into raised brown scabs with pycnidia inside. The fourth stage, the yellow halo around the scab lesions on stems. The fifth stage, the lesions enlarged and formed a grey stacked circle. The final stage, presented the severe symptoms. The lesions came off then become the large hole on stems. The pycnidiospores of *Neoscytalidium dimidiatum* embedded in pycnidia and could be found in disease stage 3-6. The arthroconidia could be found only on the dead tissue in the last stage. The growth study on various media found that arthroconidia of *N. dimidiatum* could form on PDA, but pycnidiospores could found on any isolates on various media.

The growth rate of *N. dimidiatum* on various media had been evaluated based on four isolates namely, M0328 (collected from Sakon Nakhon province), M0331 (collected from Uthai Thani province), M0354 (collected from Chanthaburi province) and M0355 (collected from Nakhon Ratchasima province). It was found that the growth of all isolates presented the best results on PDA. The growth rate of *N. dimidiatum* was at three centimeter per day. The optimum temperature for all isolates in term of growing were 25, 30, 35 degrees Celsius and room temperature. In contrast with the growth of *N. dimidiatum* at 40 degrees Celsius, which presented the less growth.

Keywords: *Neoscytalidium dimidiatum*, brown spot, stem canker, biology and ecology

บทคัดย่อ

โรคที่สำคัญของแก้วมังกรคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem canker) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล ทำให้เกิดความเสียหายกับเกษตรกรเป็นจำนวนมาก สำหรับประเทศไทยนั้นยังมีข้อมูลยังไม่มีการศึกษา รายละเอียดของชีววิทยาและนิเวศของรา *N. dimidiatum* เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะทางชีววิทยา นิเวศวิทยาของราชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อเพื่อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม ผลการศึกษาโดยเก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จำนวน 32 ตัวอย่าง จากจันทบุรี เชียงราย เชียงใหม่ นครปฐม นครราชสีมา ปทุมธานี ระยอง ราชบุรี สกลนคร สมุทรปราการ สมุทรสาคร และอุทัยธานี พบอาการโรค 2 ชนิด คือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลเกิดร่วมกับโรคแอนแทรคโนสที่ลำต้น แยกเชื้อสาเหตุได้ทั้งหมดจำนวน 44 ไอโซเลต จำแนกชนิดได้รา 2 ชนิด คือ *Neoscytalidium dimidiatum*

จำนวน 32 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และ *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 12 ไอโซเลต แยกได้จากอาการโรคแอนแทรคโนส และศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum* ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บกิ่งของแก้วมังกรปกติมาทำการแยกเชื้อ ไม่พบรา *N. dimidiatum* และเก็บส่วนที่เป็นโรครมา 6 ระยะ **ระยะที่ 1** ลักษณะอาการระยะเริ่มแรกแสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว มักจะพบแผลสเก็ดสีแดงตรงกลางจุดแผล **ระยะที่ 2** ลักษณะจุดกลางแผลเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีเทา จากการตรวจเชื้อระยะที่ 1 และ 2 ไม่พบเชื้อสาเหตุ **ระยะที่ 3** แผลขยายใหญ่ขึ้นตรงกลางเป็นสเก็ดสีน้ำตาล แข็ง ตรงกลางแผลเชื้อสร้างส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia ฝังอยู่ภายในแผล **ระยะที่ 4** แผลสีเหลืองเป็นวงเกิดล้อมรอบจุดแผลสเก็ดสีน้ำตาลหรือเกิดแผลด้านข้างด้านใดด้านหนึ่งของกิ่ง **ระยะที่ 5** แผลขยายตัวใหญ่ขึ้น มีลักษณะคล้ายสเก็ด สีเทา เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน **ระยะที่ 6** เมื่ออาการรุนแรงแผลหลุดออกกลายเป็นรูขนาดใหญ่บนกิ่ง พบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore ในส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่า pycnidia ในระยะที่ 3-6 และยังพบเชื้อสาเหตุสร้างสปอร์ที่เรียกว่า arthroconidia ในส่วนของเนื้อเยื่อที่ตายระยะที่ 6 เมื่อทำการแยกเชื้อสาเหตุบนอาหารสังเคราะห์ PDA ในระยะที่ 3-6 พบรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์ที่เรียกว่า arthroconidia เช่นกัน และไม่พบสปอร์แบบ pycnidiospore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ M 0328 (จากจังหวัดสกลนคร) M 0331 (จากจังหวัดอุทัยธานี) M 0354 (จากจังหวัดจันทบุรี) และ M 0355 (จากจังหวัดนครราชสีมา) พบว่า ราทั้ง 4 ไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 เซนติเมตร นาน 3 วัน การศึกษาชนิดของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลตพบว่าเชื้อรา *N. dimidiatum* ทุกไอโซเลตเจริญได้ดีที่ อุณหภูมิ 25 30 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ และเจริญได้น้อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

คำหลัก : *Neoscytalidium dimidiatum* โรคลำต้นจุดสีน้ำตาล โรคแคงเคอร์ ชีววิทยาและนิเวศวิทยา

คำนำ

แก้วมังกรเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมสูง เพราะมีสมญานามว่าเป็น ‘ผลไม้สุขภาพ’ ของผู้สูงอายุ ผู้ป่วยโรคเบาหวาน คนอ้วนที่ต้องการลดน้ำหนัก และสามารถป้องกันโรคมะเร็งได้ เนื่องจากในเมล็ดมีสารแอนติออกซิเดนต์สูง ดังนั้นผู้บริโภคจึงนิยมบริโภคแก้วมังกรกันมากขึ้นและยังเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในต่างประเทศด้วย จึงมีการขยายไปสู่ตลาดต่างประเทศ และในปัจจุบันแก้วมังกรยังเป็นพืชที่นิยมปลูกเป็นการค้าในอีกหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย บราซิล อินเดีย คอสตาริกา อียิปต์ อิสราเอล ญี่ปุ่น มัลดีเวส เม็กซิโก นิการากัว ไต้หวัน อเมริกา และเวียดนาม อย่างไรก็ตามการส่งออกแก้วมังกรยังจำกัดอยู่กับเฉพาะบางประเทศเท่านั้น

ในปี 2562 มีปริมาณการส่งออกแก้วมังกร จำนวน 580,731 กิโลกรัม มีมูลค่าเท่ากับ 55,018,068 บาท และในปี 2563 มีปริมาณการส่งออกแก้วมังกร จำนวน 771,658 กิโลกรัม มีมูลค่าเท่ากับ 38,487,113 บาท มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นแต่มูลค่าการส่งออกลดลง อย่างไรก็ตามประเทศไทยก็มีความพยายามต้องการขยายตลาดไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งจะทำให้การผลิตแก้วมังกรมีความสำคัญมากขึ้น ถ้าเกษตรกรสามารถผลิตแก้วมังกรที่มีคุณภาพดีก็สามารถเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร แต่ในปัจจุบันปัญหาที่สำคัญต่อการผลิตแก้วมังกรที่สำคัญอย่างหนึ่งคือปัญหาด้านศัตรูพืช โดยเฉพาะปัญหาโรคพืชเป็นปัญหาที่สำคัญมาก มีผลทำให้เกษตรกรเลิกปลูกกันมาก เช่นพื้นที่ปลูกในจังหวัดจันทบุรี พื้นที่ปลูกแก้วมังกรในจังหวัดจันทบุรีและสมุทรสาครลดลง ซึ่งแต่เดิมเมื่อเริ่มปลูกแก้วมังกรในปี 2540 เกษตรกรได้รับผลผลิตมากมาย ไม่พบปัญหาการระบาดของศัตรูพืช เนื่องจากเป็นพืชใหม่ การสะสมของศัตรูพืชยังไม่มาก แต่ในปัจจุบันนี้พบการระบาดของโรคมก เกษตรกรไม่สามารถควบคุมและป้องกันกำจัดโรคได้ โรคระบาดทั้งที่ลำต้นและผล ทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก มีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกันมาก และใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชไม่ถูกต้อง ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง บางสวนต้องรื้อแปลงปลูกทิ้งเลย การป้องกันกำจัดโรคของแก้วมังกรที่สำคัญที่เกษตรกรจะต้องปฏิบัติคือการกำจัดส่วนที่เป็นโรคทิ้ง แต่เกษตรกรไม่สามารถปฏิบัติได้ ส่วนใหญ่จะทิ้งเศษซากส่วนที่เป็นโรคไว้ในแปลง จึงมีการสะสมของเชื้อโรคมก เมื่อมีการปลูกในฤดูต่อไปก็จะเกิดการระบาดของโรคง่ายและรวดเร็ว และประเทศไทยอยู่ในประเทศเขตร้อน การปลูกแก้วมังกรซึ่งเป็นพืชวงศ์กระบองเพชรนั้น ถ้าปลูกในพื้นที่ๆ มีอากาศร้อนและมีฝนตก ทำให้เชื้อสามารถแพร่กระจายและระบาดได้อย่างรวดเร็ว

สำหรับในประเทศไทยนั้นพบโรคระบาดเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้น และผล พรพิมล และคณะ (2550) รายงานการสำรวจโรคแก้วมังกรจากแหล่งปลูกแก้วมังกรในจังหวัด เชียงราย พะเยา ระยอง ราชบุรี และสมุทรสาคร พบโรคของแก้วมังกร 5 ชนิด ได้แก่ โรคเน่าเปื่อยที่ดอก เกิดจากเชื้อรา *Choanephora* โรคผลเน่า เกิดจากเชื้อรา *Drechslera cactivora* โรคแอนแทรคโนสที่ผล เกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum* sp. โรค stem canker เกิดจากเชื้อรา *Dothiorella* sp. และโรคแอนแทรคโนสบนลำต้น เกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum gloeosporioides* โดยโรคแก้วมังกรส่วนใหญ่พบในแหล่งปลูกแก้วมังกรในภาคกลางและภาคตะวันออก โรคที่สำคัญคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem cancer) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล (Athipunyakom *et al.*, 2015) โรคแอนแทรคโนสเข้าทำลายทั้งลำต้นและผล มีสาเหตุเกิดจากรา *Collectotrichum gloeosporioides* และ *C. truncatum* (พรพิมล และคณะ, 2550; Athipunyakom and Likhitekaraj, 2010; Athipunyakom *et al.*, 2012; Athipunyakom *et al.*, 2015) โรคผลเน่าที่เกิดจากรา *Bipolaris cactivora* (พรพิมล และคณะ, 2550; Athipunyakom *et al.*, 2015) อย่างไรก็ตามโรคที่สำคัญของแก้วมังกรและทำความเสียหายแก่เกษตรกรมากคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem cancer) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล (Athipunyakom *et al.*, 2015) ซึ่งในปัจจุบันพบการระบาดของโรคนี้ในหลายประเทศในเขต

ประเทศเอเชียอื่น ได้แก่ ประเทศไต้หวัน (Chuang *et al.* 2012; Lin *et al.*, 2015) จีน (Lan *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2013; 2015; Xu *et al.*, 2018) มาเลเซีย (Masratul *et al.*, 2013; 2015) และ เวียดนาม (Hieu *et al.*, 2015) นอกจากนั้นมีการระบาดของโรคนี้นในประเทศอิสราเอล (Ezra *et al.* 2013) รัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา (Sanahuja *et al.*, 2016) ในปี 2558 องค์กรทางการเกษตรระดับนานาชาติ Food and Fertilizer Technology Center หรือ FFTC ในประเทศไต้หวัน ได้จัดการประชุมเชิงปฏิบัติการเกี่ยวกับแก้วมังกร Workshop on Improving Pitaya Production and Marketing ระหว่างวันที่ 7-9 กันยายน 2558 โดยมีนักวิชาการร่วมประชุมและเสนอผลงานจาก ประเทศไต้หวัน ไทย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย เมียนมาร์ เวียดนาม อิสราเอล และ อินโดนีเซีย จากการประชุมครั้งนี้พบว่าปัญหาโรคที่สำคัญที่สุดที่ระบาดในหลายประเทศในเขตเอเชีย คือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ มีการระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว และการป้องกันกำจัดค่อนข้างยาก ซึ่งแต่ละประเทศกำลังเร่งดำเนินการงานวิจัยศึกษาอยู่ สำหรับประเทศไทยนั้นยังมีข้อมูลยังไม่มีการศึกษา รายละเอียดของชีววิทยาและนิเวศของรา *N. dimidiatum* เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะทางชีววิทยา นิเวศวิทยาของราชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อเพื่อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมตลอดจนสามารถนำข้อมูลนี้ไปวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กระดาษ ถุงพลาสติก ปากกาเคมี ดินสอ กรรไกรตัดกิ่ง และ GPS
2. อุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ แผ่นไม้อัดทับตัวอย่าง กระดาษ
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ slide cover slip ปากคีบ เข็มเขี่ยปลายแหลม ตะเกียงยาทาเล็บ
4. สารเคมีสำหรับ mount slide ได้แก่ lactophenol, lactic acid, shear's solution
5. สารเคมี ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ: สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอลกอฮอล์ 75%
6. อาหารวุ้นสังเคราะห์ corn meal agar (CMA), potato dextrose agar (PDA)
7. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน ปีกเกอร์ เป็นต้น
8. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เป็นต้น
9. กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายรูปและ camera lucida สำหรับวาดภาพจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. ศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

1.1 เก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร

เก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง เก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้ว ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เพื่อนำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างที่เก็บมาตรวจหาสปอร์

1.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplanting นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาคัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

1.3 การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ศึกษารูปร่างลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ

1.4 เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคพืช

เก็บตัวอย่างโรคพืชและมาจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยนำส่วนของพืชที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผ่นไม้อัดตัวอย่างโรคพืช เปลี่ยนกระดาษทุกวัน จนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง แล้วนำตัวอย่างแห้งโรคพืชมาเก็บในถุงกระดาษ พร้อมลงรายละเอียดข้อมูล ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

1.5 การศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

เก็บแก้วมังกรแสดงอาการระยะต่าง ๆ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เพื่อนำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ

2. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

นำรา *N. dimidiatum* ที่แยกได้จากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จากศูนย์เก็บเชื้อสาเหตุโรคพืช กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ M 0328 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดสกลนคร M 0331 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดอุทัยธานี M 0354 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัด

จันทบุรี และ M 0355 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดนครราชสีมา โดยนำรา *N. dimidiatum* ทั้ง 4 ไอโซเลต มาศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ

2.1 การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหาร

สังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำ 6 กรรมวิธี โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1	Potato dextrose agar (PDA)
กรรมวิธีที่ 2	Malt extract agar (MEA)
กรรมวิธีที่ 3	Czapek's agar (CzA)
กรรมวิธีที่ 4	Oat meal agar (OMA)
กรรมวิธีที่ 5	V-8 juice agar (V-8 A)
กรรมวิธีที่ 6	Corn meal agar (CMA)

วิธีการทดลอง

เทอาหารแต่ละชนิดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้อาหารเย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของเชื้อราที่เตรียมไว้ นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแต่ละชนิด วางทิ้งไว้ในห้องปฏิบัติการ

การบันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

2.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหาร

สังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำ 9 กรรมวิธี โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1	อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 2	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 3	อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 4	อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
กรรมวิธีที่ 5	อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

วิธีการทดลอง

เทอาหาร PDA ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้อาหารเย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของเชื้อราที่เตรียมไว้ นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

การบันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยเชื้อราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงแก้วมังกร อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดอื่นๆ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

1.1 เก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร

เก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จำนวน 32 ตัวอย่าง จากจันทบุรี (10 ตัวอย่าง) เชียงราย (1 ตัวอย่าง) เชียงใหม่ (1 ตัวอย่าง) นครปฐม (3 ตัวอย่าง) นครราชสีมา (4 ตัวอย่าง) ปทุมธานี (1 ตัวอย่าง) ระยอง (1 ตัวอย่าง) ราชบุรี (2 ตัวอย่าง) สกลนคร (5 ตัวอย่าง) สมุทรปราการ (1 ตัวอย่าง) สมุทรสาคร (1 ตัวอย่าง) และอุทัยธานี (2 ตัวอย่าง) (Table 1) พบอาการโรค 2 ชนิด คือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล (Figure 1a) และโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลเกิดร่วมกับโรคแอนแทรคโนสที่ลำต้น มักจะพบอาการในกิ่งเดียวกัน (Figure 1b) จากการศึกษาครั้งนี้พบอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลมากกว่าโรคแอนแทรคโนส โดยเฉพาะแปลงที่ไม่มีการจัดการในการเก็บส่วนที่เป็นโรคที่จะพบการระบาดของโรคนี้น่ามากและเป็นปัญหาที่สำคัญในการผลิตแก้วมังกร ซึ่งพบการระบาดของโรคนี้นั้นหลายประเทศในเขตประเทศเอเซียนั้น ได้แก่ ประเทศไต้หวัน (Chuang *et al.* 2012; Lin *et al.*, 2015) จีน (Lan *et al.*, 2012; Yi *et al.*, 2013; 2015; Xu *et al.*, 2018) มาเลเซีย (Masratul *et al.*, 2013; 2015) และ เวียดนาม (Hieu *et al.*, 2015) Masyahit *et al.* (2009) สำหรับโรคแอนแทรคโนสสาเหตุเกิดจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* มีรายงานครั้งแรกที่ประเทศมาเลเซีย โดยทำการสำรวจโรคของแก้วมังกร ระหว่างเดือนธันวาคม 2550 ถึง เดือนสิงหาคม 2551 เก็บตัวอย่างส่วนที่เป็นโรคที่ลำต้นและผลมาศึกษาสาเหตุของโรคในห้องปฏิบัติการ และพบโรคนี้นั้นระบาดรุนแรงมากที่สุดที่มะละกา ในขณะที่พบการระบาดของโรคนี้น้อยที่สุดที่รัฐกาลันตัง

1.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากเก็บตัวอย่างอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จำนวน 32 ตัวอย่าง พบอาการโรค 2 ชนิด คือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลเกิดร่วมกับโรคแอนแทรคโนสที่ลำต้น เมื่อทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ราทั้งหมดจำนวน 44 ไอโซเลต เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 และ -20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษารายละเอียดของเชื้อเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อ

1.3 การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการแยกเชื้อสาเหตุได้ทั้งหมด 44 ไอโซเลต ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

จำแนกได้รา 2 ชนิด คือ *Neoscytalidium dimidiatum* จำนวน 32 ไอโซเลต (Figure 2a and Table 2) แยกได้จากอาการโรคลำต้นจุดสีน้ำตาล และ *Colletotrichum gloeosporioides* จำนวน 12 ไอโซเลต (Figure 2b and Table 2) แยกได้จากอาการโรคแอนแทรคโนส จากนั้นแยกเชื้อบริสุทธิ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 และ -20 องศาเซลเซียส และนำรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ M 0328 M 0331 M 0354 และ M 0355 ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ ที่เลือก 4 ไอโซเลตนี้มาทำการศึกษาเพราะว่าทำให้เกิดโรครุนแรงในพื้นที่ปลูกแก้วมังกรที่เก็บตัวอย่างมา

Neoscytalidium dimidiatum Crous & Slippers and Gruyter

ลักษณะอาการของเชื้อ

ลักษณะอาการระยะเริ่มแรกแสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว มักจะพบแผลสเก็ดสีแดงตรงกลางจุดแผล (Figure 3) ต่อมาลักษณะแผลจากจุดขาวเปลี่ยนเป็นแดงหรือน้ำตาลและต่อมาเปลี่ยนเป็นสเก็ดสีน้ำตาลนูนขึ้น (Figure 4) ถ้าอาการรุนแรงแผล ขยายใหญ่ขึ้น มีส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสีดำอยู่ตรงกลาง (Figure 5a-5d) พบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore ซึ่งจะพบสปอร์ชนิดนี้บนพืชที่แสดงอาการของโรคเท่านั้น ไม่พบบนอาหารสังเคราะห์ (Figure 5f) อยู่ในส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา เรียกว่า pycnidia (Figure 5e) และเก็บส่วนของดอกแก้วมังกรมาศึกษาเชื้อสาเหตุ จากการตรวจแยกเชื้อบนอาหาร PDA ไม่พบเชื้อสาเหตุ

1.4 เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคพืช

เก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชจำนวน 32 ตัวอย่าง ในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และราจำนวน 44 ไอโซเลต ในกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

1.5 การศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

ศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum* ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บกิ่งของแก้วมังกรปกติมาทำการแยกเชื้อ ไม่พบรา *N. dimidiatum* และเก็บส่วนที่เป็นโรคมานาน 6 ระยะ **ระยะที่ 1** ลักษณะอาการระยะเริ่มแรกแสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว มักจะพบแผลสเก็ดสีแดงตรงกลางจุดแผล จากการตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในห้องปฏิบัติการไม่พบราสาเหตุโรคพืชบนลำต้นแก้วมังกรที่แสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว และเมื่อนำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting บนอาหารสังเคราะห์ PDA ก็ไม่พบเชื้อเช่นเดียวกัน (Figure 6a) **ระยะที่ 2** ลักษณะจุดกลางแผลเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีเทา (Figure 6b) จากการตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในห้องปฏิบัติการไม่พบราสาเหตุโรคพืชบนลำต้นแก้วมังกรที่แสดงอาการในระยะที่ 2 และเมื่อนำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting บนอาหารสังเคราะห์ PDA ก็ไม่พบเชื้อเช่นเดียวกัน **ระยะที่ 3** แผลขยายใหญ่ขึ้นตรงกลางเป็นสเก็ดสีน้ำตาล แข็ง ตรงกลางแผลเชื้อสร้างส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia ฝังอยู่ภายในแผล (Figure 6c) จากการตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในห้องปฏิบัติการพบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore ในส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่า pycnidia ซึ่งจะพบ

สปอร์ชนิดนี้บนพืชที่แสดงอาการของโรคเท่านั้น ไม่พบบนอาหารสังเคราะห์ PDA **ระยะที่ 4** ต่อมาแผลสีเหลืองเป็นวงเกิดลุ่มรอบจุดแผลสเก็ดสีน้ำตาลหรือเกิดแผลด้านข้างด้านใดด้านหนึ่งของกิ่ง (Figure 6d) **ระยะที่ 5** แผลขยายตัวใหญ่ขึ้น มีลักษณะคล้ายสเก็ด สีเทา เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน (Figure 6e) **ระยะที่ 6** เมื่ออาการรุนแรงแผลหลุดออกกลายเป็นรูขนาดใหญ่บนกิ่ง (Figure 6f) **ระยะที่ 4 - ระยะที่ 6** พบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore ในส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่า pycnidia เช่นกัน จากการศึกษาครั้งนี้ลักษณะอาการระยะที่ 1 มีลักษณะอาการจุดขาวมีจุดแดงตรงกลาง และในระยะที่ 6 ในส่วนของเนื้อเยื่อที่ตายแล้วอาจพบรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์ที่เรียกว่า arthroconidia (Figure 7c and 7d)

จากการศึกษาในอาการระยะที่ 1 แสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว มักจะพบแผลสเก็ดสีแดงตรงกลางจุดแผล ไม่พบเชื้อสาเหตุบนลำต้น แต่ พรพิมลและคณะ (2563) ศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบรา *N. dimidiatum* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว แม่นยำ พบว่าเมื่อนำเนื้อเยื่อลักษณะอาการระยะที่ 1 และ 2 มาศึกษาเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* จำนวน 2 คู่ ได้แก่ NdDOA-8F/NdDOA-6R และ NdDOA-7F/ITS4 ผลการศึกษาพบรา *N. dimidiatum* ในเนื้อเยื่อพืชในขณะที่ไม่พบเชื้อสาเหตุจากการศึกษา ลักษณะสัญญาณวิทยาของเชื้อบนเนื้อเยื่อพืชและบนอาหารสังเคราะห์ การศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบรา *N. dimidiatum* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล สามารถยืนยันได้ว่า รา *N. dimidiatum* เข้าทำลายพืชตั้งแต่วัยที่ 1 เชื้อเจริญเข้าไปในลำต้นแล้ว เพราะฉะนั้นถ้าเกษตรกรพบอาการลักษณะในระยะที่ 1 เกษตรกรจะต้องพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชทันทีเพื่อที่จะยับยั้งไม่ให้อาการเจริญไปถึงระยะที่ 2 ซึ่งระยะ 2 เป็นผลจากจุดขาวเปลี่ยนเป็นแดงหรือน้ำตาลและต่อมาเปลี่ยนเป็นสเก็ดสีน้ำตาลนูนขึ้น แต่ก็ยังไม่พบเชื้อสาเหตุ แต่ถ้าทิ้งไว้จนถึงระยะที่ 3 - ระยะที่ 6 นั้นราสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสีดำอยู่ตรงกลาง และสร้างสปอร์แบบ pycnidiospore เชื้อจะแพร่กระจายอย่างรวดเร็วและการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราจะไม่สามารถกำจัดโรคได้ การศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อนี้จะมีประโยชน์ในการป้องกันกำจัดโรคให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

เมื่อทำการแยกเชื้อสาเหตุจากอาการระยะที่ 3 - ระยะที่ 6 บนอาหารสังเคราะห์ PDA พบรา *N. dimidiatum* สร้างโคโลนีบนอาหาร PDA เจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่ออายุ 3 วัน โคโลนีเจริญเติบโตเร็ว เส้นใยฟูเจริญบนอาหาร โคโลนีสีเขียวมะกอกจนถึงสีเทาดำ สร้าง pigment สีเทาดำบนอาหารสังเคราะห์ PDA (Figure 7a) ในขณะที่โคโลนีมีสีขาวจนถึงสีเขียวมะกอกบนอาหารสังเคราะห์ MEA (Figure 7b) เส้นใยรวมกันเป็นก้อน เส้นใยเริ่มแรกมีสีอ่อนและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่ออายุมากขึ้น ราสร้างสปอร์เรียกว่า arthroconidia บนอาหารสังเคราะห์ PDA สีน้ำตาลดำ ปลายตัด ผ่องหนา ขนาด 9.1×5.5 ไมครอน เส้นใยสีน้ำตาลแตกกิ่ง (ภาพที่ 7c และ 7g) หรือสร้าง arthroconidia บนแผลเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว มีลักษณะคล้ายสเก็ด สีเทา เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน (Figure 6e) หรือพบบนแผลหลุดออกกลายเป็นรูขนาดใหญ่บนกิ่ง (Figure 6f)

การจำแนกชนิดราสาเหตุสอดคล้องกับ Chuang *et al.* (2012) และ Lin *et al.* (2015) ที่ศึกษารา *N. dimidiatum* ประเทศไต้หวัน Lan *et al.* (2012) Yi *et al.* (2013; 2015) Xu *et al.* (2018) ศึกษาชนิดนี้ในประเทศจีน Masratul *et al.* (2013; 2015) ศึกษาชนิดนี้ในประเทศมาเลเซีย และ Hieu *et al.* (2015) ศึกษาชนิดนี้ในประเทศเวียดนาม รวมทั้ง Ezra *et al.* (2013) ศึกษาชนิดนี้ในประเทศอิสราเอล (Ezra *et al.* 2013) และ Sanahuja *et al.* (2016) ศึกษาชนิดนี้รัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา

2. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

นำรา *N. dimidiatum* ที่แยกได้จากโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ M 0328 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดสกลนคร M 0331 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดอุทัยธานี M 0354 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดจันทบุรี และ M 0355 แยกจากโรคลำต้นเน่าสีน้ำตาล จังหวัดนครราชสีมา โดยนำรา *N. dimidiatum* ทั้ง 4 ไอโซเลต มาศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ

2.1 การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0328 (จากจังหวัดสกลนคร) ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ราไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA โดยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร นาน 3 วัน รองลงมาได้แก่อาหาร CZA และ V-8 A โคโลนีของเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.93 และ 8.92 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 3 and Figure 8)

ผลการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0331 (จากจังหวัดอุทัยธานี) ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ราไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA MEA OMA และ CZA โดยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 เซนติเมตร นาน 3 วัน รองลงมาได้แก่อาหาร V-8 A โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.97 ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 3 and Figure 9)

ผลการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0354 (จากจังหวัดจันทบุรี) ในห้องปฏิบัติการ พบว่าราไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA OMA V-8 A และ CZA โดยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 เซนติเมตร นาน 3 วัน (Table 3 and Figure 10)

ผลการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0355 (จากจังหวัดนครราชสีมา) ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ราไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA โดยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร นาน 3 วัน

รองลงมาได้แก่อาหาร V-8 A OMA และ CZA โคโลนีของเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.97 8.85 และ 8.80 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 3 and Figure 11)

2.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ศึกษาชนิดอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ M 0328 (จังหวัดสกลนคร) M 0331 (จังหวัดอุทัยธานี) M0354 (จังหวัดจันทบุรี) และ M 0355 (จังหวัดนครราชสีมา) บนอาหารสังเคราะห์ พบว่าเชื้อรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0328 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 30 35 องศาเซลเซียส เมื่ออายุ 5 วัน โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซนติเมตร ทั้ง 3 อุณหภูมิ การเจริญของเชื้อราชนิดนี้เจริญในอุณหภูมิรองลงมาได้แก่ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.26 เซนติเมตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการเจริญของเชื้อรา *N. dimidiatum* อุณหภูมิ 25 30 35 องศาเซลเซียส และเชื้อราเจริญได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.08 เซนติเมตร และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง (Table 4 and Figure 12)

รา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0331 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซนติเมตร ทั้ง 4 อุณหภูมิ เมื่ออายุ 3 วัน และเชื้อราเจริญได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.03 เซนติเมตร และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง (Table 4 and Figure 13) รา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0354 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซนติเมตร ทั้ง 4 อุณหภูมิ เมื่ออายุ 3 วัน และเชื้อราเจริญได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.03 เซนติเมตร และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง (Table 4 and Figure 14)

รา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0355 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซนติเมตร ทั้ง 4 อุณหภูมิ เมื่ออายุ 3 วัน และเชื้อราเจริญได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.22 เซนติเมตร และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง (Table 4 and Figure 15)

จากการทดลองครั้งนี้สรุปว่ารา *N. dimidiatum* ทุกไอโซเลตเจริญได้ดีที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส และเจริญได้น้อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการศึกษาชีวและนิเวศวิทยาของรา *N. dimidiatum* ทำให้ทราบวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum* โดยเก็บลักษณะอาการของโรครมา 6 ระยะ พบว่า**ระยะที่ 1** ลักษณะอาการระยะเริ่มแรกแสดงอาการจุดเล็กๆ สีขาว มักจะพบแผลสเก็ดสีแดงตรงกลางจุดแผล **ระยะที่ 2** ลักษณะจุดกลางแผลเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือสีเทา จากการตรวจเชื้อระยะที่ 1 และ 2 ไม่พบเชื้อสาเหตุ **ระยะที่ 3** แผลขยายใหญ่ขึ้นตรงกลางเป็นสเก็ดสีน้ำตาล แข็ง ตรงกลางแผลเชื้อสร้างส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia ฝังอยู่ภายในแผล **ระยะที่ 4** แผลสีเหลืองเป็นวงเกิดล้อมรอบจุดแผลสเก็ดสีน้ำตาลหรือเกิดแผลด้านข้างด้านใดด้านหนึ่งของกิ่ง **ระยะที่ 5** แผลขยายตัวใหญ่ขึ้น มีลักษณะคล้ายสเก็ด สีเทา เกิดเป็นวงเรียงซ้อนกัน **ระยะที่ 6** เมื่ออาการรุนแรงแผลหลุดออกกลายเป็นรูขนาดใหญ่บนกิ่ง พบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore ในส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่า pycnidia ในระยะที่ 3-6 และยังพบเชื้อสาเหตุสร้างสปอร์ที่เรียกว่า arthroconidia ในส่วนของเนื้อเยื่อที่ตายระยะที่ 6 เมื่อทำการแยกเชื้อสาเหตุบนอาหารสังเคราะห์ PDA ในระยะที่ 3-6 พบรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์ที่เรียกว่า arthroconidia เช่นกัน การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ M 0328 (จากจังหวัดสกลนคร) M 0331 (จากจังหวัดอุทัยธานี) M 0354 (จากจังหวัดจันทบุรี) และ M 0355 (จากจังหวัดนครราชสีมา) พบว่าราทั้ง 4 ไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 เซ็นติเมตร นาน 3 วัน การศึกษาชนิดของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลตพบว่าเชื้อรา *N. dimidiatum* ทุกไอโซเลตเจริญได้ดีที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส และเจริญได้น้อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การศึกษารักรังนี้ได้ข้อมูลชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *N. dimidiatum* เพื่อเป็นข้อมูลในการหาแนวทางป้องกันกำจัดที่เหมาะสมของโรคราต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกร เมื่อเกษตรกรพบอาการลักษณะในระยะที่ 1 เกษตรกรจะต้องพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชทันทีเพื่อที่จะยับยั้งไม่ให้อาการเจริญไปถึงระยะที่ 2 ซึ่งระยะ 2 เป็นแผลจากจุดขาวเปลี่ยนเป็นแดงหรือน้ำตาลและต่อมาเปลี่ยนเป็นสเก็ดสีน้ำตาลนูนขึ้น แต่ก็ยังไม่พบเชื้อสาเหตุ แต่ถ้าทิ้งไว้จนถึงระยะที่ 3 - ระยะที่ 6 นั้นราสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสีดำอยู่ตรงกลาง และสร้างสปอร์แบบ pycnidiospore เชื้อจะแพร่กระจายอย่างรวดเร็วและการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราจะไม่สามารถกำจัดโรคได้ การศึกษาวงจรชีวิตของเชื้อนี้จะมีประโยชน์ในการป้องกันกำจัดโรคให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสมาชิก กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตมงคล พจนา ตระกูลสุขรัตน์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์
 บูรณี พัววงศ์แพทย์ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ณ์ภูริมา โฆษิตเจริญกุล และอมรรรัตน์ ภูไพบูลย์.
 2550. การศึกษาชนิดของโรคแก้วมังกรและกวนอิมเพื่อการส่งออก. รายงานผลงานวิจัย
 ประจำปี 2550. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. จตุจักร กรุงเทพฯ หน้า
 1024 – 1034.
- พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และ ชนินทร ดวงสอาด. 2552. โรคผลเน่าของแก้วมังกร
 สาเหตุเกิดจาก *Bipolaris cactivora*. หน้า 216-223. ใน การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ
 ครั้งที่ 9 “อารักขาพืชไทย เทิดไท้องค์ภูมิ ตามวิถีเศรษฐกิจพอเพียง” ณ โรงแรมสุโขทัยแกรนด์
 จังหวัดอุบลราชธานี . 24-26 พฤศจิกายน 2552.
- พรพิมล อธิปัญญาคม ชนินทร ดวงสอาด และ. มะโนรัตน์ สุดสงวน. 2563. การตรวจสอบรา
Neoscytalidium dimidiatum ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction. (กำลังพิมพ์).
 ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2563 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- Athipunyakom, P, S. Likhitekaraj. 2010. Fruit Rot Diseases of Dragon fruit (*Hylocereus*
 spp.) in Thailand, pp. 156. In 9th International Mycological Congress, Edinburgh,
 UK, 1-6 August.
- Athipunyakom P, S. Seemadua and C. Doungsa-ard. 2012. Anthracnose Diseases of
 Dragon Fruit in Thailand. pp. 90. In The Internatrional Conference on Tropical
 and Subtropical Plant Diseases 2012, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand,
 7-10 February.
- Athipunyakom P, S. Seemadua and C. Doungsa-ard. 2015. Diseases of dragon fruit in
 Thailand: Incidence and Management Strategies pp. 95-106. In: International
 Workshop on Improving Pitaya Production and Marketing, Frenghshan, Kaohsiung,
 Taiwan, 7-9 September 2015.
- Chuang. M.F., H. F. Ni, H. R. Yang, S. L. Shu, S. Y. Lai, and Y. L. Jiang. 2012. First Report
 of Stem Canker Disease of Pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*)
 Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. *Plant Disease*. 96 (11): 906-907.
- Ezra D, O. Liarzi, T. Gat, M. Hershovich, M. Dudai. 2013. First Report of Internal Black
 Rot Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* (Pitahaya)
 Fruit in Israel. *Plant Disease* 97 (11):1513.
- Hieu, N.T., and N.V. Hoa. 2015. Management Strategies of Major Pitaya Diseases in
 Vietnam. pp. 129- 142. In: International Workshop on Improving Pitaya
 Production and Marketing, Frenghshan, Kaohsiung, Taiwan, 7-9 September 2015.

- Lan, G.B., Z.F. He, P-G. Xi and Z.-D. Jiang. 2012. First Report of Brown Spot Disease Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in Guangdong, Chinese Mainland. *Plant Disease*. 96 (11): 1702.
- Lin, C.P., H.F. Ni, P.J. Ann, H.R. Yang, J.W. Huang, M.F. Chuang, S.L. Shu, S.Y. Lai, Y.L. Jiang and J.N. Tsai. 2015. Pathogen identification and management of pitaya canker and soft rot in Taiwan. pp. 107-118. In : Y.L. Jiang et al. (eds). *Improving Pitaya Production and Marketing*. FFTC, Taipei, Taiwan. 219 pp.
- Masratul Hawa M, Salleh B and Latiffah Z. 2013. Identification and Molecular Characterizations of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Stem Canker of Red-fleshed Dragon Fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *J Phytopathol*. 161 (11-12): 841-849
- Masratul Hawa M, Salleh B and Latiffah Z. 2015. An overview of fungal diseases of pitaya in Malaysia pp. 87-93. *In: International Workshop on Improving Pitaya Production and Marketing*, Frengshan, Kaohsiung, Taiwan, 7-9 September 2015.
- Masyahit M., K. Sijam, Y. Awang and M. Ghazali Mohd Satar. 2009. The First Report of the Occurrence of Anthracnose Disease Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. on Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.) in Peninsular Malaysia. *American Journal of Applied Sciences* 6 (5): 902-912
- Mizrahi, Y. 2015. Thirty-one of research and development in the vine cacti pitaya in Israel. pp. 1-18. *In International Workshop on Improving Pitaya Production and Marketing*, Frengshan, Kaohsiung, Taiwan, 7-9 September 2015.
- Hui-Fang Ni, C-W. Huang, S-L. Hsu, S-Y. Lai and H-R. Yang. 2013. Pathogen characterization and fungicide screening of stem cancer of pitaya. *J. Taiwan Agric. Res.* 62 (3): 225-234.
- Fullerton R.A., P.A. Sutherland, R. S. Rebstock, Nguyen Thanh Hieu, Nguyen Ngoc Anh Thu, Dang Thuy Linh, Ngo Thi Kim Thanh, Nguyen Van Hoa. 2018. The Life Cycle of Dragon Fruit canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* and implication for control. pp. 71-80. *In: Dragon Fruit Regional Network Initiation Workshop & Steering Committee Meeting*. Taiwan 22-27, April 2018.
- Sanahuja G., P. Lopez, and A. J. Palmateer. 2016. First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Stem and Fruit Canker of *Hylocereus undatus* in Florida. *Plant Disease*. 100 (7): 1499.

- Taba, S., N. miyahira and K. Nasu. 2007. Fruit rot of Strawberry pear (pitaya) caused by *Bipolaris cactivora*. J. Gen.Plant Pathol. 73: 374-376.
- Valencia-Botín A.J., J.S Sandoval-Islas and E. Cárdenas-Soriano. 2004. A new stem spot disease of Pithaya [Hylocereus undatus (Haw.) Britton and Rose] caused by Fusicoccum -like anamorph of Botryosphaeria dothidea (Moug.:Fr.) Ces.and De Not. in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatologia 22 (1): 140-142.
- Wang, C.L. and Lin, C.C. 2005. Fruit rot of pitaya and stem rot of cacti in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 14: 269-274.
- Xu M., Y. Peng, Z. Qi, Z. Yan, L. Yang, M-D He, Q-X Li, C-L Liu, Y-Z Ruan, S-S Wei, J. X, Y-Q Xia and H Tang. Identification of *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker disease of pitaya in Hainan, China. Australasian Plant Pathology. 47 (5): 547-553.
- Yi R.H., L.J. Gan, D.H. Yan, Z.J. Wu, Y.T. Tong, F.F Wu. 2013. Identification and biological characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* causing pitaya canker disease. Acta Phytophylacica Sinica (Journal of Plant Protection). 40 (2) :102–108.
- Yi R.H., Q.L. Lin, J.J. Mo, F.F. Wu and J. Chen. 2015. Fruit internal brown rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on pitahaya in Guangdong province, China. Australasian Plant Pathology Society. Australasian Plant Dis. Notes. 10 (1): 13.

Table 1 Brown spot or stem canker and anthracnose diseases of dragon fruit collected from various locations.

No. of sample	Diseases of dragon fruit	Locations
1	brown spot and anthracnose	Tha Mai District, Chanthaburi
2	brown spot and anthracnose	Tha Mai District, Chanthaburi
3	brown spot	Tha Mai District, Chanthaburi
4	brown spot	Tha Mai District, Chanthaburi
5	brown spot	Na Yai Am District, Chanthaburi
6	brown spot	Na Yai Am District, Chanthaburi
7	brown spot and anthracnose	Na Yai Am District, Chanthaburi
8	brown spot	Na Yai Am District, Chanthaburi
9	brown spot and anthracnose	Makham District, Chanthaburi
10	brown spot and anthracnose	Makham District, Chanthaburi
11	brown spot	Phan District, Chiang Rai
12	brown spot	Fang District, Chiang Mai
13	brown spot	Bang Phli District, Samut Prakan
14	brown spot	Lan Sak District, Uthai Thani
15	brown spot	Lan Sak District, Uthai Thani
16	brown spot	Klaeng District, Rayong
17	brown spot and anthracnose	Nakhon Chai Si District, Nakhon Pathom
18	brown spot and anthracnose	Nakhon Chai Si District, Nakhon Pathom
19	brown spot	Sam Phran District, Nakhon Pathom
20	brown spot and anthracnose	Damnoen Saduak District, Ratchaburi
21	brown spot	Bang Phae, Ratchaburi
22	brown spot and anthracnose	Ban Phaeo District, Samut Sakhon
23	brown spot and anthracnose	Pak Chong District, Nakhon Ratchasima
24	brown spot and anthracnose	Pak Chong District, Nakhon Ratchasima
25	brown spot	Pak Chong District, Nakhon Ratchasima
26	brown spot	Pak Chong District, Nakhon Ratchasima
27	brown spot	Thanyaburi District, Pathum Thani
28	brown spot	Sawang Daen Din District, Sakon Nakhon
29	brown spot and anthracnose	Sawang Daen Din District, Sakon Nakhon
30	brown spot	Mueang District, Sakon Nakhon
31	brown spot	Mueang District, Sakon Nakhon
32	brown spot	Mueang District, Sakon Nakhon

Table 2 Pant pathogenic fungi isolated from brown spot disease and anthracnose disease on the stem of dragon fruit from various locations.

ชนิดของรา	No. of isolate	No. of sample	Locations
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0340	1	Tha Mai District, Chanthaburi
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0200	1	Tha Mai District, Chanthaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0354	2	Tha Mai District, Chanthaburi
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0201	2	Tha Mai District, Chanthaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0341	3	Tha Mai District, Chanthaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0342	4	Tha Mai District, Chanthaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0343	5	Na Yai Am District, Chanthaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0344	6	Na Yai Am District, Chanthaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0345	7	Na Yai Am District, Chanthaburi
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0202	7	Na Yai Am District, Chanthaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0346	8	Na Yai Am District, Chanthaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0347	9	Makham District, Chanthaburi
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0203	9	Makham District, Chanthaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0348	10	Makham District, Chanthaburi
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0204	10	Makham District, Chanthaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0349	11	Phan District, Chiang Rai
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0350	12	Fang District, Chiang Mai
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0351	13	Bang Phli District, Samut Prakan
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0331	14	Lan Sak District, Uthai Thani
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0352	15	Lan Sak District, Uthai Thani
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0353	16	Klaeng District, Rayong
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0356	17	Nakhon Chai Si District, Nakhon Pathom
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0205	17	Nakhon Chai Si District, Nakhon Pathom
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0357	18	Nakhon Chai Si District, Nakhon Pathom
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0206	18	Nakhon Chai Si District, Nakhon Pathom
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0358	19	Sam Phran District, Nakhon Pathom
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0359	20	Damnoen Saduak District, Ratchaburi
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0207	20	Damnoen Saduak District, Ratchaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0360	21	Bang Phae, Ratchaburi
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0361	22	Ban Phaeo District, Samut Sakhon
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0208	22	Ban Phaeo District, Samut Sakhon
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0362	23	Pak Chong District, Nakhon Ratchasima
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0209	23	Pak Chong District, Nakhon Ratchasima
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0363	24	Pak Chong District, Nakhon Ratchasima
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0210	24	Pak Chong District, Nakhon Ratchasima
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0355	25	Pak Chong District, Nakhon Ratchasima
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0364	26	Pak Chong District, Nakhon Ratchasima
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0365	27	Thanyaburi District, Pathum Thani
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0366	28	Sawang Daen Din District, Sakon Nakhon
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0367	29	Sawang Daen Din District, Sakon Nakhon
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M 0211	29	Sawang Daen Din District, Sakon Nakhon
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0368	30	Mueang District, Sakon Nakhon
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0369	31	Mueang District, Sakon Nakhon
<i>Neocystidium dimidiatum</i>	M 0328	32	Mueang District, Sakon Nakhon

Table 3 The colony growth of *Neoscytalidium dimidiatum* from 4 isolates after 3 days on various media.

Media	Colony growth of <i>N. dimidiatum</i> from 4 isolates after 3 days (cm.)			
	M0328	M0331	M0354	M 0355
PDA	9.00 a	9.00 a	9.00 a	9.00 a
MEA	7.38 b	9.00 a	6.91 b	6.10 b
OMA	7.64 b	9.00 a	9.00 a	8.85 a
CMA	5.26 c	4.23 b	3.57 c	4.20 c
V-8 A	8.92 a	8.97 a	9.00 a	8.97 a
CZA	8.93 a	9.00 a	9.00 a	8.80 a
CV	17.99	21.88	26.49	25.24

Remarks:

- M 0328 isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Mueang District, Sakon Nakhon
- M 0331 isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Lan Sak District, Uthai Thani
- M 0354 isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Tha Mai District, Chanthaburi
- M 0355 isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Pak Chong District, Nakhon Ratchasima

Table 4: The colony growth of *Neoscytalidium dimidiatum* from 4 isolates after 3 days on various temperature.

Temperature	Colony growth of <i>N. dimidiatum</i> from 4 isolates after 3 days (cm.)			
	M0328	M0331	M0354	M 0355
Room temperature	7.26 b	9.00 a	9.00 a	9.00 a
25	9.00 a	9.00 a	9.00 a	9.00 a
30	9.00 a	9.00 a	9.00 a	9.00 a
35	9.00 a	9.00 a	9.00 a	9.00 a
40	3.08 c	6.03 b	3.03 b	5.22 b
CV	32.85	14.60	30.84	19.58

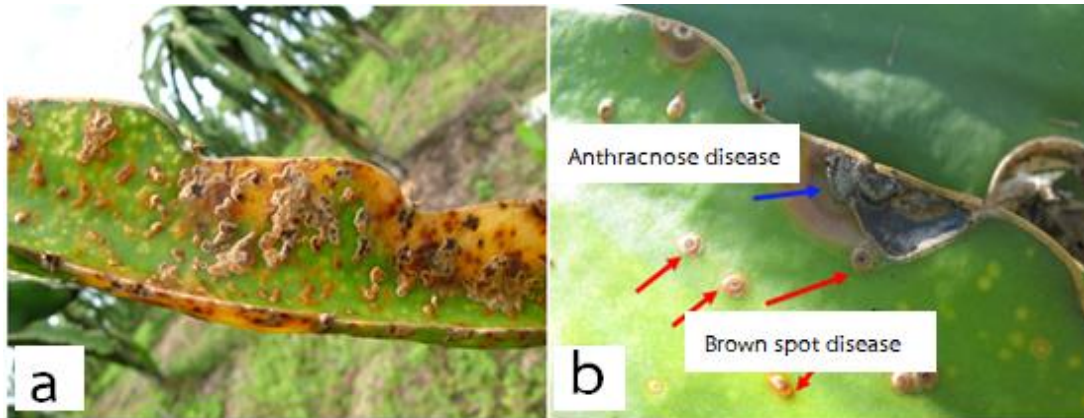


Figure 1 Brown spot symptom and anthracnose symptom on the stem of dragon fruit at Makham District, Chanthaburi

a) Brown spot symptom

b) Brown spot symptom and anthracnose symptom



Figure 2 The brown spot and anthracnose diseases on the stem of dragon fruit in Pak Chong District, Nakhon Ratchasima

a) Brown spot/ Stem canker symptom

b) Anthracnose symptom

c) *Neoscytalidium dimidiatum* on stem canker/brown spot symptom

d) *Colletotrichum gloeosporioides* on anthracnose symptom



Figure 3 The brown spot disease on the stem of dragon fruit showed white spots often with the red fleck at the center.



Figure 4 The color spot symptom turned to red or grey color



Figure 5 The brown spot and anthracnose diseases on the stem of dragon fruit
 a-d) The spot extended and later turned into raised brown scabs with pycnidia inside.
 e) Cross section through pycnidia
 f) pycnidiospore

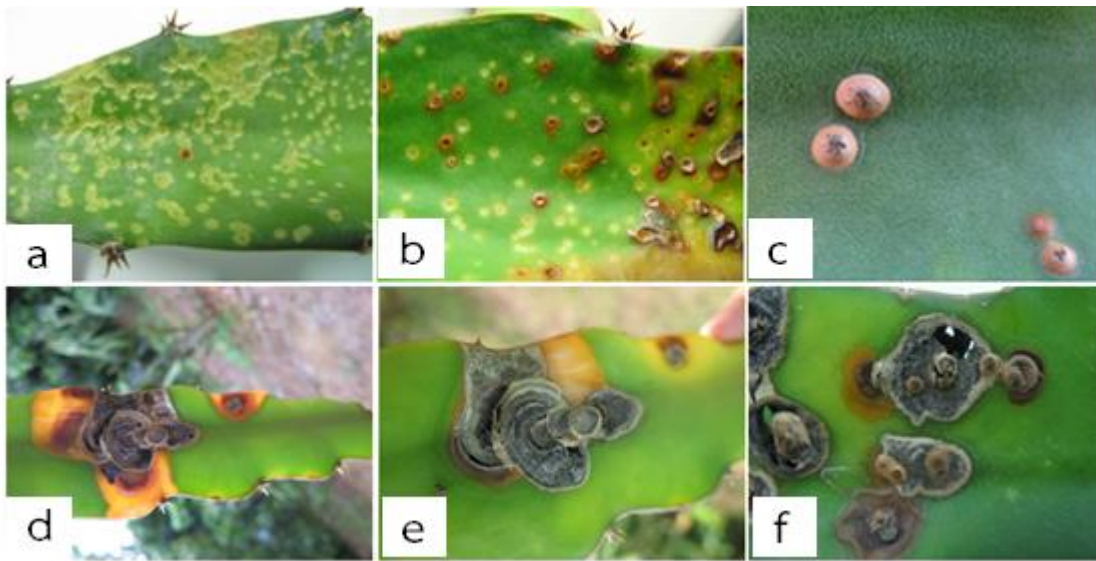


Figure 6: The brown spot disease on the stem of dragon fruit caused by *Neoscytalidium dimidiatum*

- a) The first stage of brown spot symptom presented the white spot with the red minute dot in the middle.
- b) The second stage, the color spot symptom turned to red or grey color.
- c) The third stage, the spot extended and later turned into raised brown scabs with pycnidia inside.
- d) The fourth stage, the yellow halo around the scab lesions on stems.
- e) The fifth stage, the lesions enlarged and formed a grey stacked circle.
- f) The final stage, presented the severe symptoms.

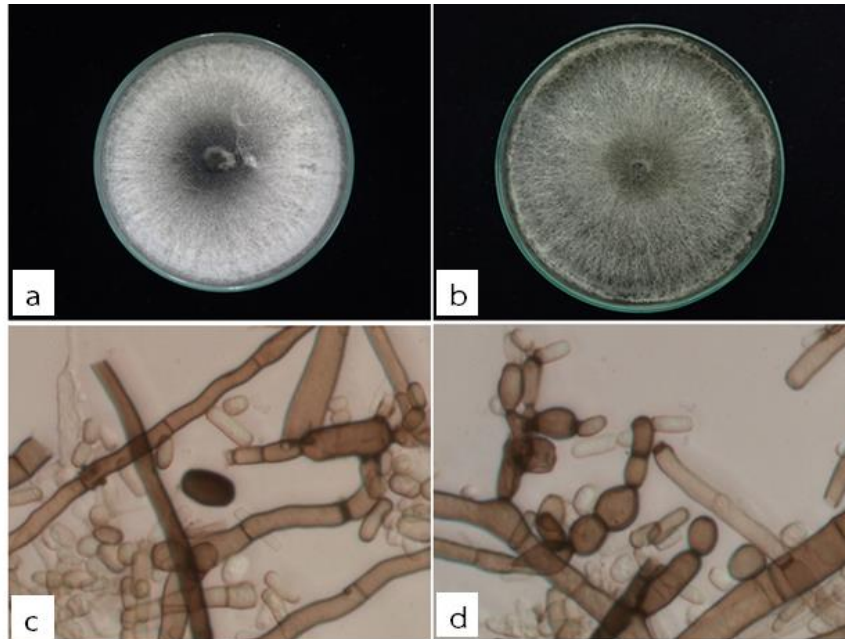


Figure 7 Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* after 3 days on synthetic media.

- a) Colony on PDA (potato dextros agar) b) Colony on MEA (malt extract agar)
c-d) arthroconidia (100X)

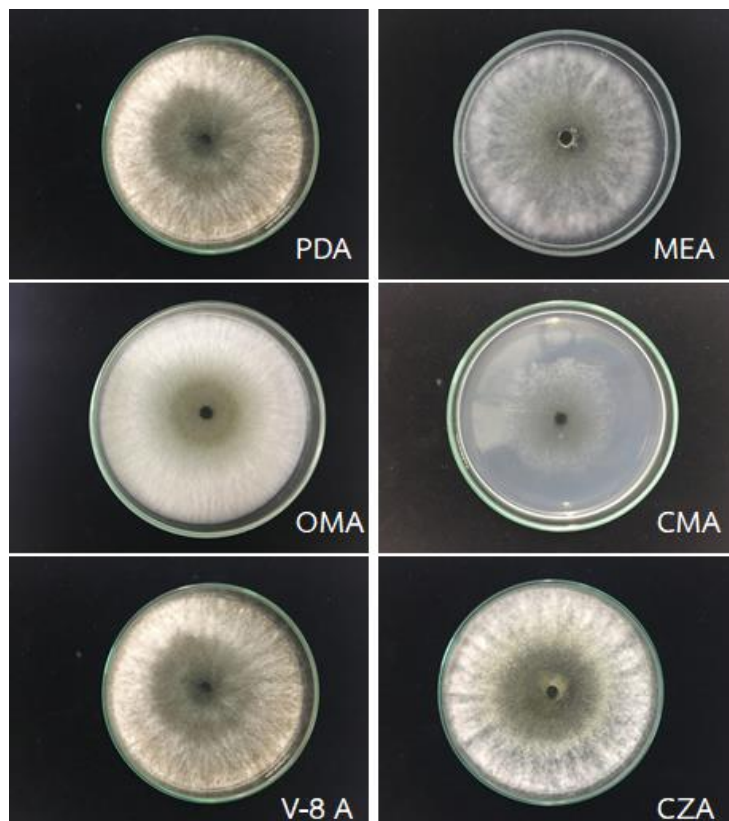


Figure 8: Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0328) isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Mueang District, Sakon Nakhon after 3 days on various media.

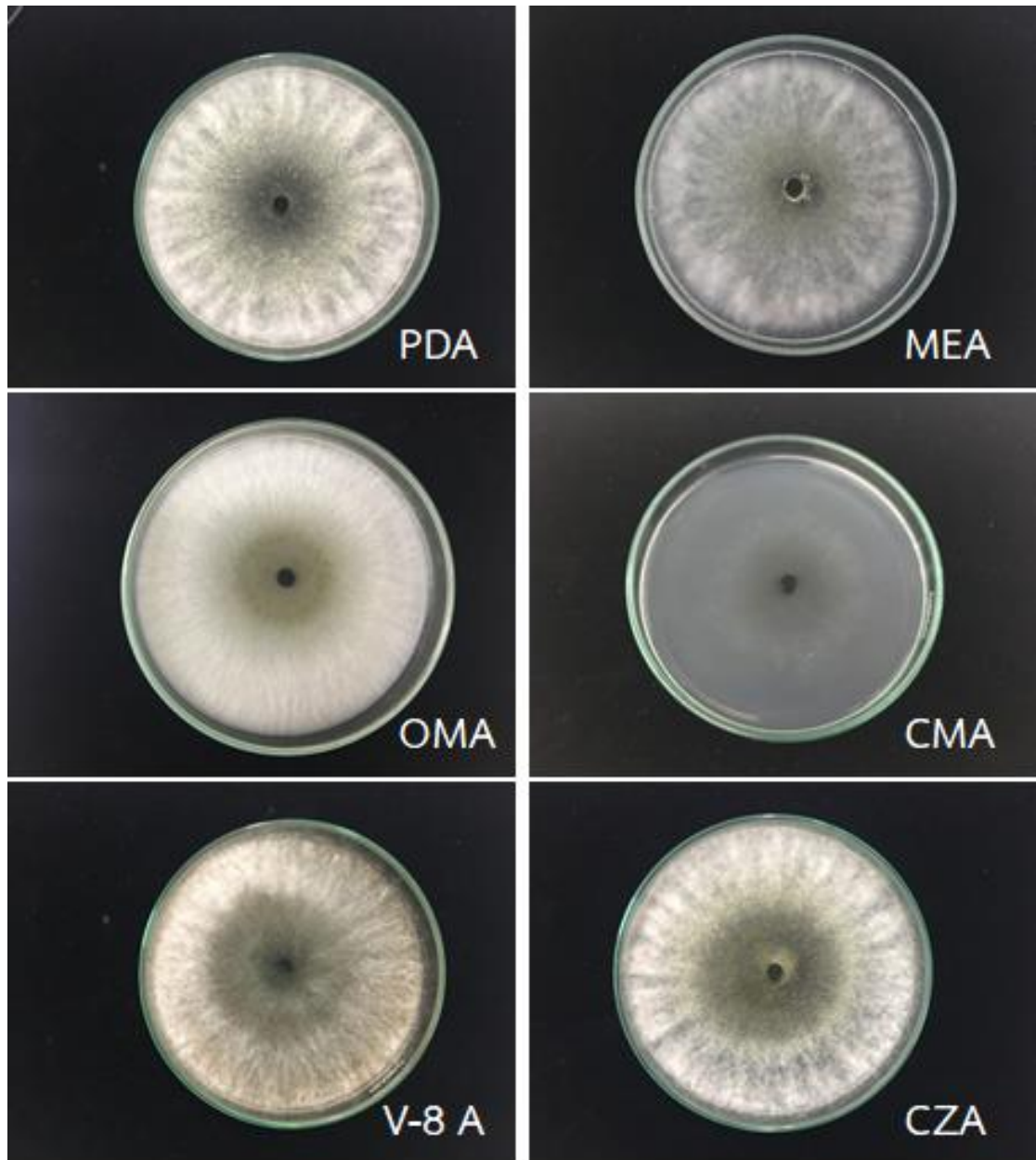


Figure 9: Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0331) isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Lan Sak District, Uthai Thani after 3 days on various media.

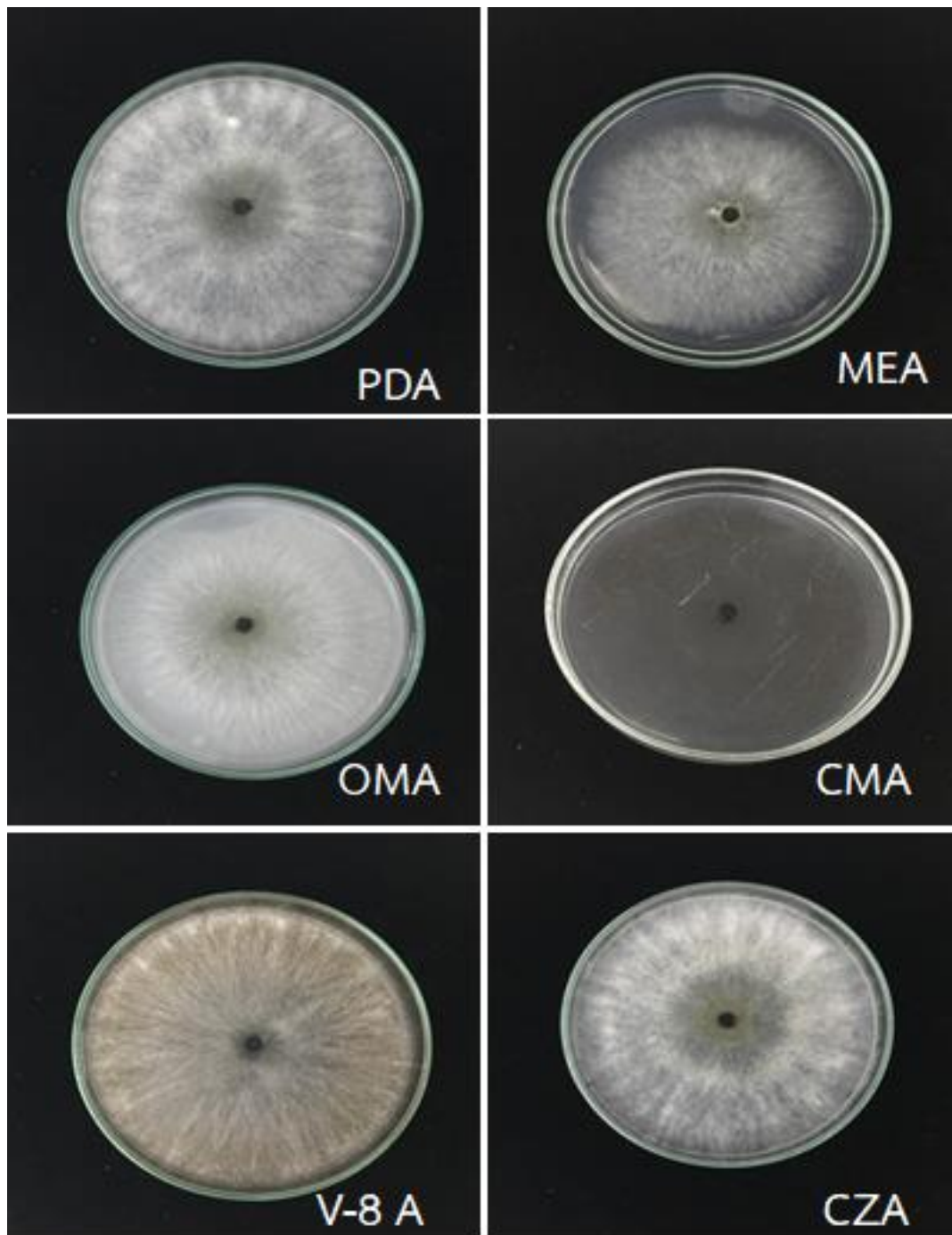


Figure 10: Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0354) isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Tha Mai district, Chanthaburi after 3 days on various media.

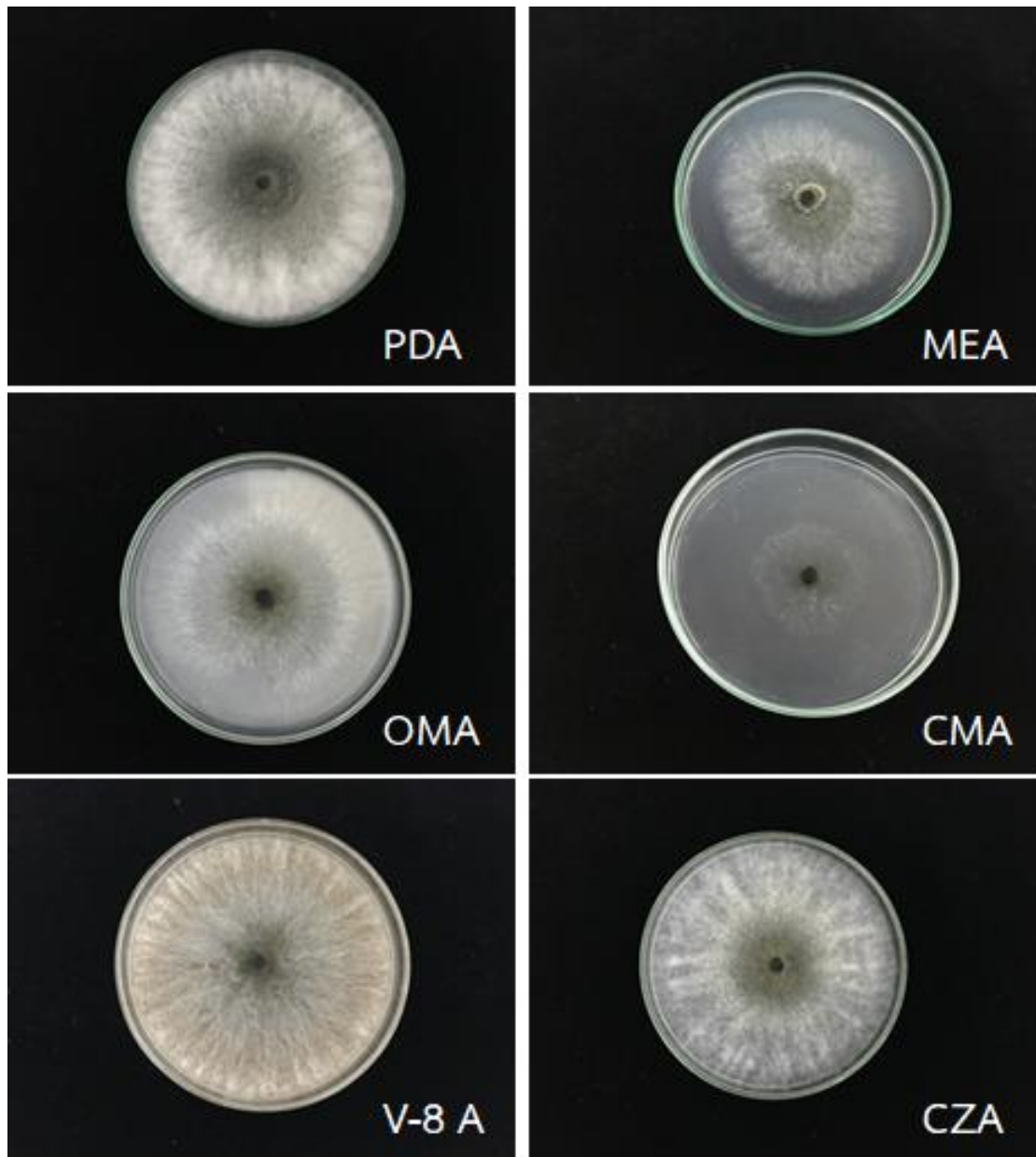


Figure 11: Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0355) isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Pak Chong District, Nakhon Ratchasima after 3 days on various media.

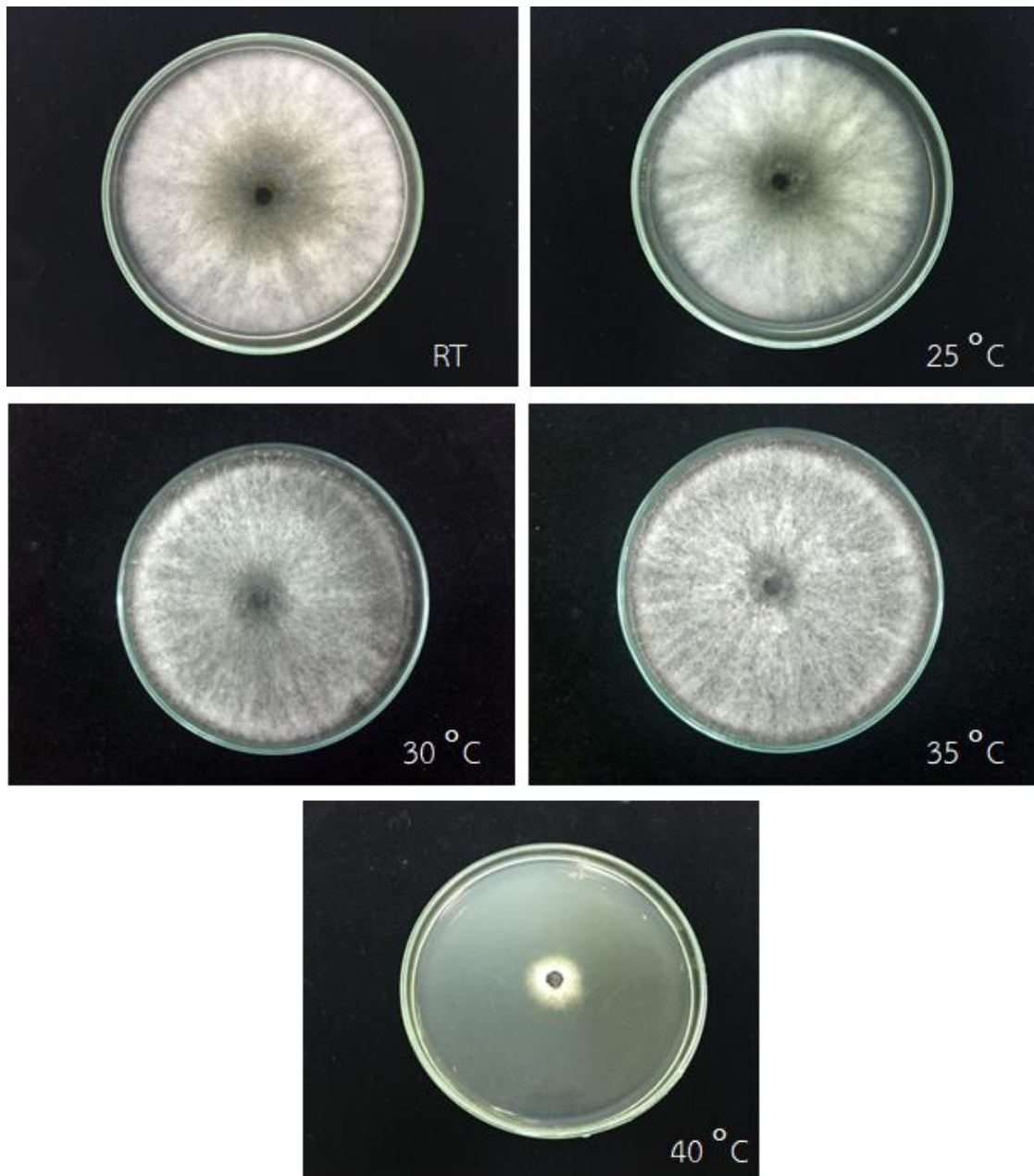


Figure 12: Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0328) isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Mueang District, Sakon Nakhon after 3 days on various temperature.

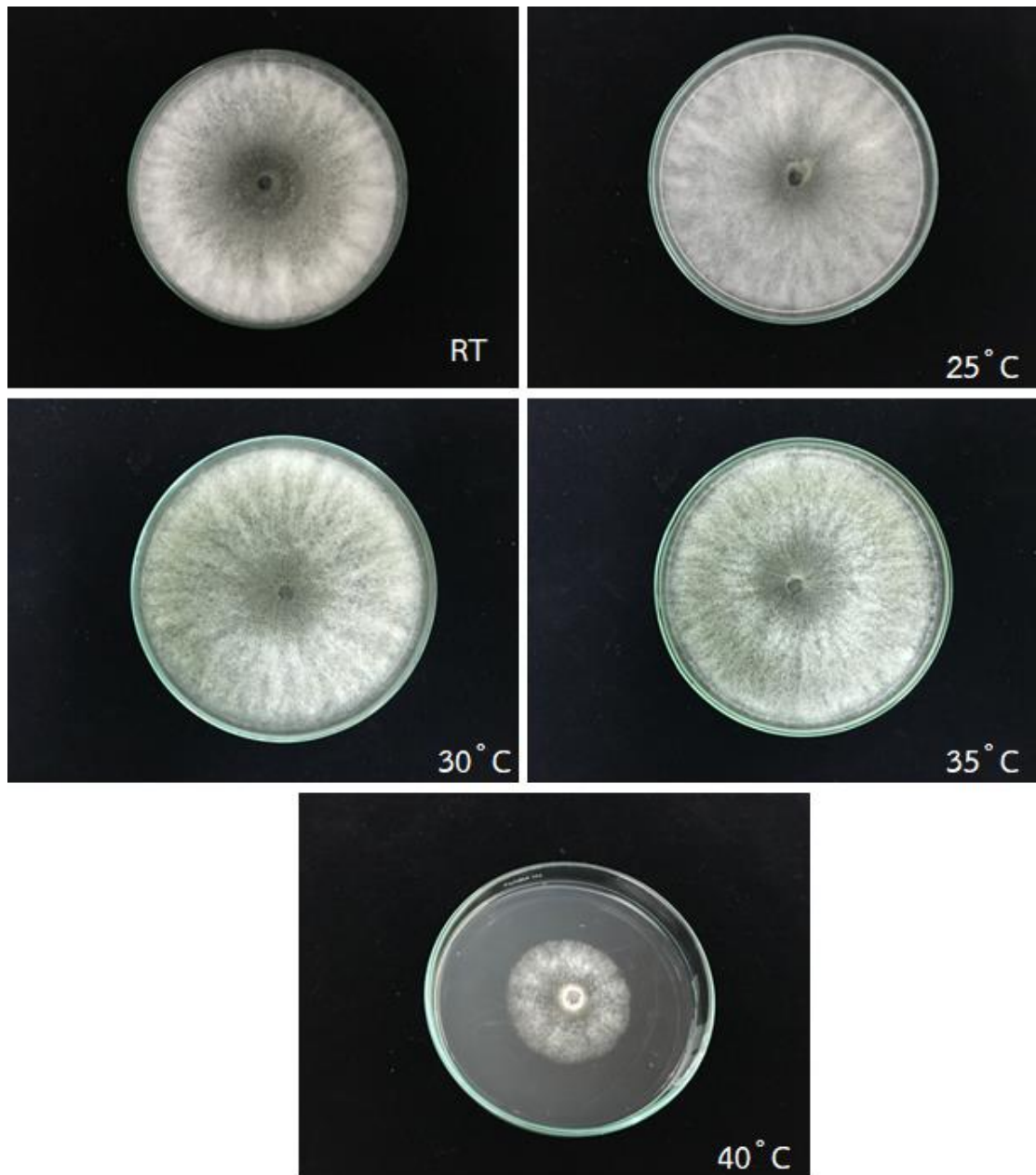


Figure 13: Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0331) isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Lan Sak District, Uthai Thani after 3 days on various temperature.

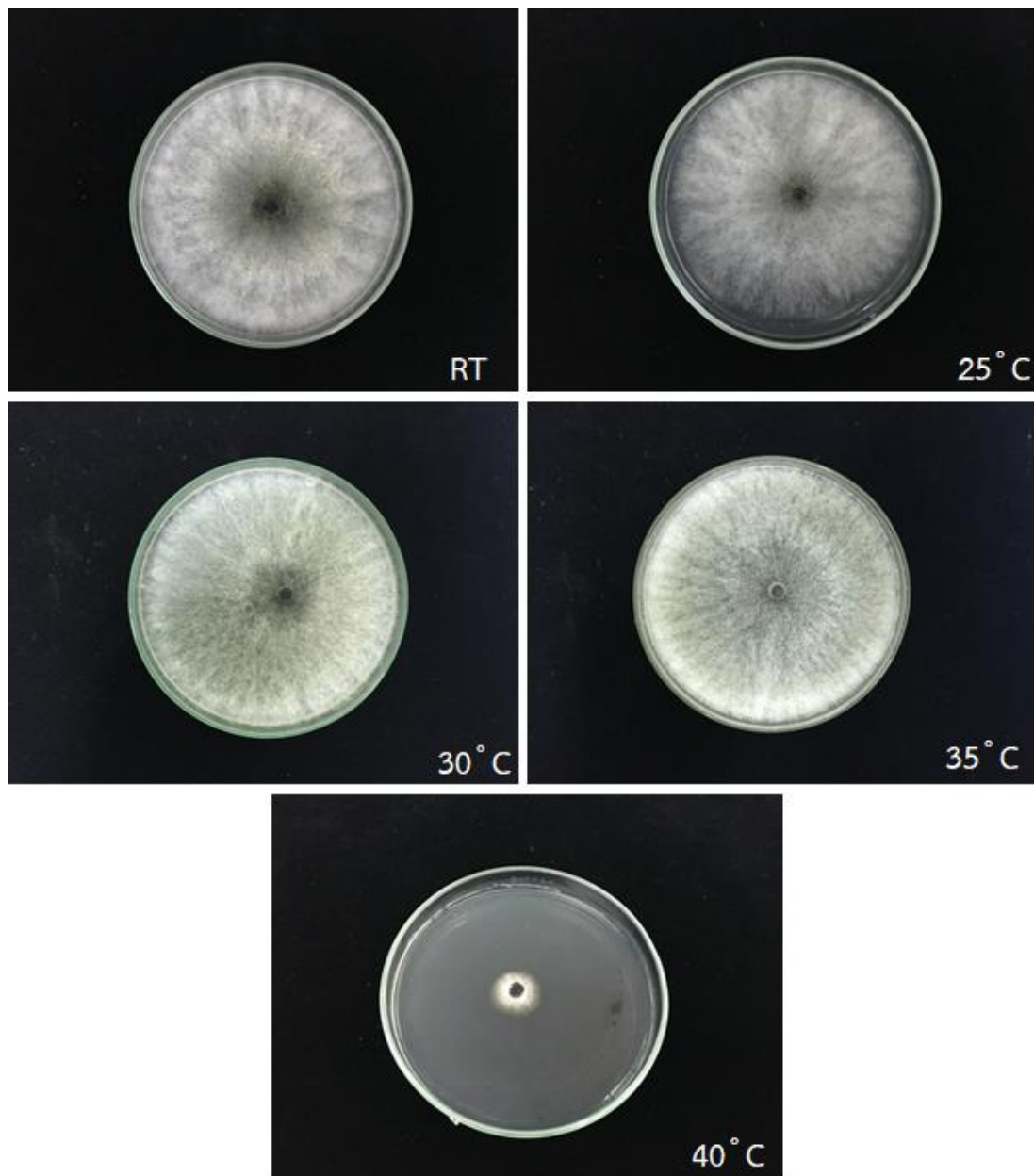


Figure 14: Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0354) isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Tha Mai district, Chanthaburi after 3 days on various temperature.

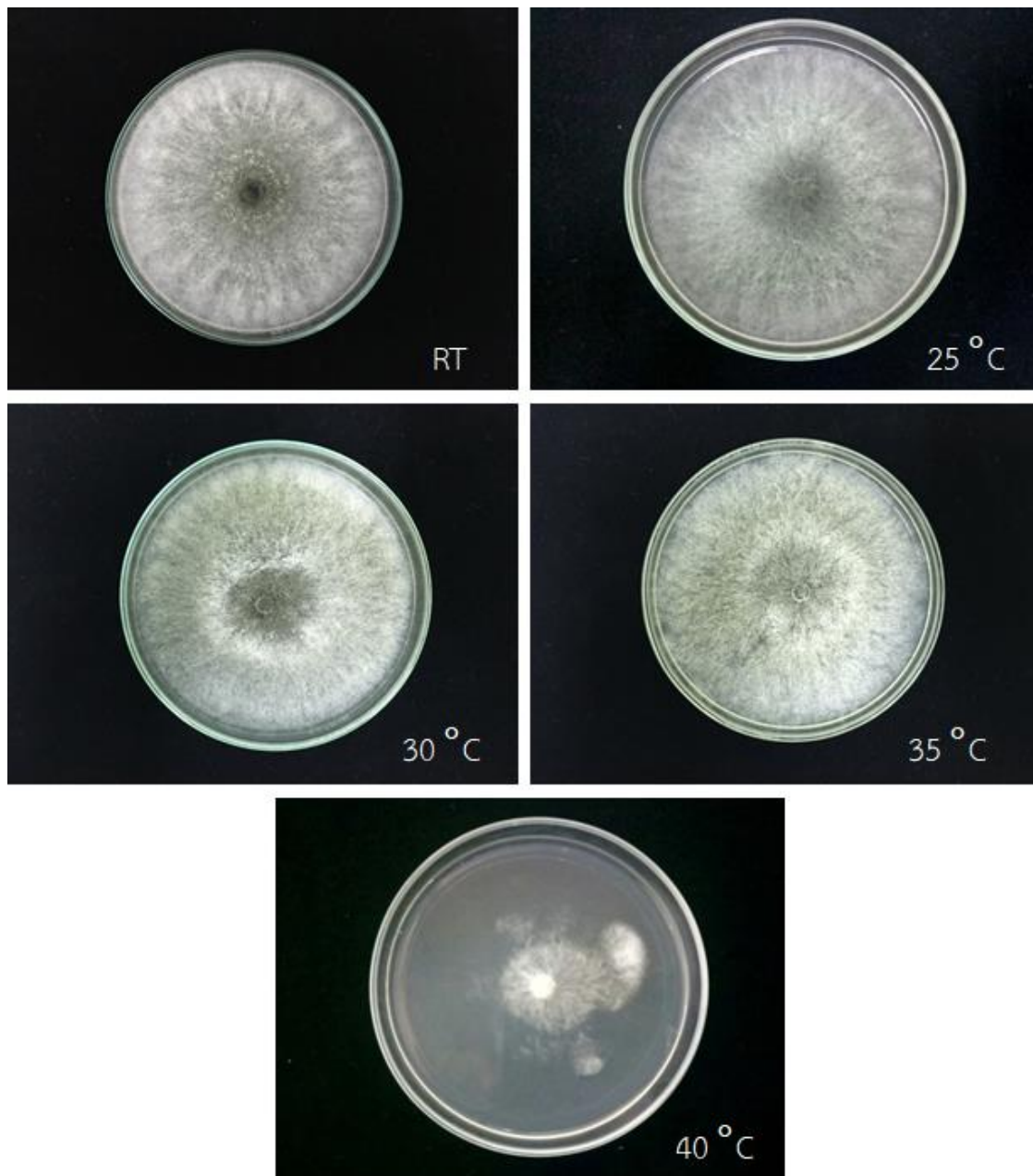


Figure 15: Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0355) isolated from brown spot disease on the stem of dragon fruit at Pak Chong District, Nakhon Ratchasima after 3 days on various temperature.

การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อ *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) ที่เข้าทำลายพริกในประเทศไทย

Biological and molecular characterization of *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) infecting pepper in Thailand

ภูวนารถ มณีโชติ^{1/} นางเกศสุดา สนศิริ^{2/} วาสนา รุ่งสว่าง^{3/} วิจิตรา โชคบุญ^{4/}

^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/} กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{4/} สำนักวิจัยและพัฒนาการการเกษตรเขตที่ 6

Abstract

Pepper (*Capsicum annum*) is an important crop in Thailand. Pepper yellows disease caused by *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) is one of the most important plant viruses infecting pepper crop worldwide. The aims of this research are 1) biological characterization of PeVYV based on host responses against virus infection and 2) molecular characterization of *CP gene*. The 42 samples showing upward leaf curling, internodal shortening and interveinal yellowing were collected from fields in Bangkok, Kanchanaburi, Suphan Buri, Ayutthaya and Srisaket Province. Seven samples were positive for PeVYV infected by RT-PCR. Symptoms on pepper induced by isolate BKK displayed upward leaf curling and interveinal yellowing at 20 days posted inoculation. By the complete of *CP gene* of three isolates namely, isolate BKK (Bangkok), SBR (Suphan Buri) and KBR (Kanchanaburi) were identified as *Pepper vein yellows virus*. The *CP gene* were 621 nucleotides which encoded 206 amino acid residues, shared 99.2% - 99.8% and 99% - 99.5% sequence identities, respectively. Neighbor joining phylogenetic tree of nucleotide and amino acid sequences clustered Thai isolates of PeVYV together and separate them from PeVYV isolates found in other countries.

Keywords : Pepper, Pepper yellows disease, *Polerovirus*, PeVYV.

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-02-07-62

บทคัดย่อ

พริก (*Capsicum annuum*) เป็นพืชที่นิยมชนิดหนึ่งของประเทศไทย โรคเส้นใบเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตพริกในหลายประเทศ การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติด้านชีววิทยาในการตอบสนองของพริกต่อเชื้อไวรัส และด้านชีวโมเลกุลของเชื้อ PeVYV ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการใบม้วนขึ้น ขอบปล้องสั้น และเนื้อใบระหว่างเส้นใบเหลือง จากแปลงปลูกในกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา และศรีสะเกษ จำนวน 42 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ PeVYV จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น 3 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต BKK (กรุงเทพมหานคร) ไอโซเลต SBR (สุพรรณบุรี) และ ไอโซเลต KBR (กาญจนบุรี) ในงานวิจัยนี้ใช้ไอโซเลต BKK ศึกษาการตอบสนองของพริกต่อเชื้อไวรัส พบว่าพริกแสดงอาการใบม้วนขึ้นและเนื้อใบเหลืองชัดเจนหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ 20 วัน จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน CP ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่ายีน CP มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสเป็นกรดอะมิโน 206 เรซิดิวส์ มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99% - 99.5% ตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP พบว่าเชื้อ PeVYV ที่แยกได้จากพริกของไทยจับกลุ่มใกล้ชิดกันและแยกออกจากเชื้อ PeVYV ที่พบในต่างประเทศ

คำหลัก : พริก โรคไวรัสพริก โรคเส้นใบเหลืองพริก เชื้อ *Polerovirus*

คำนำ

พริกจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการปลูกอย่างกว้างขวางตามแหล่งต่างๆ ทั่วโลก ปัญหาโรคไวรัสก่อให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตพริกเป็นอย่างมาก ซึ่งพบว่ามีเชื้อไวรัสอย่างน้อย 68 ชนิดที่สามารถเข้าทำลายต้นพริก (Knierim *et al.*, 2013) สำหรับประเทศไทยเชื้อไวรัสที่ก่อความเสียหายให้กับพริกมากที่สุดได้แก่ *Cucumber mosaic virus*, *Chilli veinal mottle virus*, *Tobacco mosaic virus*, *Pepper yellow leaf curl virus*, *Capsicum chlorosis virus* (กรมวิชาการเกษตร, 2552) และ *Tomato necrosis virus* (Chiemsombat *et al.*, 2010; Hassani-mehraban *et al.*, 2011) และในปี 2556 Knierim *et al.* (2013) พบว่าพริกตามแหล่งปลูกพริกในจังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี แสดงอาการใบด่าง ใบเหลือง ใบด่างประ เส้นใบเหลือง ใบลดรูปและเสียรูปและลำต้นแคระแกรน เมื่อตรวจวิเคราะห์แล้วพบว่าเชื้อ *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) ถือว่าเป็นรายงานการพบเชื้อไวรัสชนิดนี้ครั้งแรกในประเทศไทย

เชื้อ PeVYV จัดอยู่ในแฟมิลี *Luteoviridae* จีนัส *Polerovirus* มีรายงานการพบในหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น (Yohana *et al.*, 1995) อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน ไทย (Knierim *et al.*, 2013) สหรัฐอเมริกา (Villanueva *et al.*, 2013; Alabi *et al.*, 2015) ชูदान (Alfaro-Fernández *et al.*, 2014) จีน (Tan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015) และออสเตรเลีย (Maina *et al.*, 2016) ต้นพริกที่ติดเชื้อ PeVYV ซึ่งอาการที่ปรากฏบนพริกจะมีความแตกต่างกันออกไป เช่น ลำต้นแคระแกรน ใบด่าง ใบเหลือง เส้นใบใส เส้นใบเหลือง ใบหงิก ขอบปล้องสั้น และใบม้วนขึ้น คล้ายกับขาดธาตุแมกนีเซียม

เชื้อไวรัส PeVYV สามารถถ่ายทอดโรคโดยการเสียบกิ่ง และมีแมลงพวกเพลี้ยอ่อนฝ้าย (Aphis gossypii) เป็นพาหะในการถ่ายทอดโรค ความสัมพันธ์ในการถ่ายทอดโรคระหว่างเชื้อไวรัสกับเพลี้ยอ่อนเป็นแบบ circulative persistent manner (Murakami *et al.*, 2017; Murakami *et al.*, 2011; Yohana *et al.*, 1995)

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาคุณสมบัติด้านชีววิทยาในการตอบสนองของพริกต่อเชื้อไวรัส รวมทั้งด้านชีวโมเลกุลของเชื้อ PeVYV เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับเป็นองค์ความรู้เพื่อเผยแพร่สู่เกษตรกร และการจัดการโรคไวรัสในพริก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคเส้นใบเหลือง
2. สารเคมี
 - ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์สารพันธุกรรมเชื้อไวรัส
 - ไนโตรเจนเหลว
 - ชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan)
 - One Step RT-PCR kit (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.

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรค

สำรวจและเก็บตัวอย่างพริกที่มีลักษณะอาการใบด่าง ใบเหลือง เส้นใบใส และเสียวรูปจากแหล่งปลูกพริกจากที่ต่างๆ ได้แก่ จังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก สุพรรณบุรี เชียงใหม่ และเชียงราย โดยการสำรวจ ในพื้นที่ประมาณ 2 ไร่ ทำการสำรวจทุกแถวปลูก ในกรณีที่พื้นที่สำรวจมีพื้นที่มากกว่า 2 ไร่ขึ้นไป จะทำการสุ่มสำรวจโดยสำรวจแถวเว้นแถว พร้อมทั้งถ่ายภาพในแปลงปลูก ลักษณะอาการที่พบในพริกและบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืช

สกัดอาร์เอ็นเอรวมด้วยชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งใบพริกแต่ละตัวอย่างให้มีปริมาณ 100 มิลลิกรัม แล้วบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วย้ายมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ FARB ปริมาตร 500 มิลลิลิตรและเติม Mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. ย้ายส่วนของพืชมาใส่ Filter Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นดูดส่วนของเหลวใส่ใน Collection tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3. เติม 70% Ethanol ปริมาตร 1 เท่าของทั้งส่วนของเหลวใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันแล้วย้ายมาใส่ใน FARB Mini Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทั้งส่วนใส

4. ล้างอาร์เอ็นเอครั้งที่ 1 ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทั้งส่วนของเหลวใส จากนั้นล้างอาร์เอ็นเอครั้งที่ 2 ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทั้งส่วนใสแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที

5. นำ FARB Column มาวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บอาร์เอ็นเอรวมที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3. ไพรมเมอร์และการสังเคราะห์ยีน CP บางส่วน (3' end of CP gene) และยีน CP

1. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน CP บางส่วนของไวรัส โดยใช้ไพรมเมอร์ที่รายงานโดย Sharman *et al.* (2015) ซึ่งจะได้ขนาดขึ้นดีเอ็นเอ 370 คู่เบส

Forward primer Pol3870F : 5'- ATCACBTTCGGGCCGWSTYTWTCAGA -3'

Reverse primer AS3 : 5'- CACGCGTTCACCTATTTIGGRTTITG -3'

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน CP โดยใช้ไพรมเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PeVYV ของประเทศญี่ปุ่นในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB594828) ซึ่งจะได้ขนาดขึ้นดีเอ็นเอ 621 คู่เบส

Forward primer PeVYV-CPF 5'- ATGAATACGGGAGGGGTTAG -3'

Reverse primer PeVYV-CPR 5'- ACATCATAGACCAGGGGGGGG -3'

ส่วนผสมของ One step RT-PCR ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Nuclease free water	5	ไมโครลิตร
2x One step Mix	10	ไมโครลิตร
10 pmole Pol3870F	0.5	ไมโครลิตร
10 pmole AS3	0.5	ไมโครลิตร
20x RT-RI Blend	1	ไมโครลิตร
RNA template	3	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

1) First strand synthesis	50 °C	20 นาที
Predenaturation	95 °C	2 นาที
2) Three step-cycling 35 cycles		
Denaturation	95 °C	20 วินาที
Annealing	55 °C	20 วินาที
Extension	72 °C	45 วินาที
3) Final extension	72 °C	5 นาที

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม Redsafe Nucleic Acid Straining Solution ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, USA)

4. การโคลนยีน

แยกดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบขนาดและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis เชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ พลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega, USA) โดยเติมดีเอ็นเอ 150 นาโนกรัม, T4 DNA ligase buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, pGEM-T easy vector 50 นาโนกรัม และ T4 DNA ligase 3 Units รวมปริมาตรสาร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี heat shock transformation คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีน CP ด้วยวิธี blue-white selection แล้วตรวจสอบโคลนของพลาสมิดสายผสมที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาวจำนวน 10 โคโลนี และสีฟ้า 1 โคโลนี มาผสมน้ำปริมาตร 8 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วตรวจสอบยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Crinivirus*

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR มาจำแนกยีนด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ PeVYV ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีนโปรตีนด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ *Crinivirus* ไอโซเลตต่าง ๆ ด้วย Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al.*, 2018)

6. การศึกษาการตอบสนองของพืชอาศัยต่อเชื้อไวรัส

ศึกษาการตอบสนองและลักษณะอาการของเชื้อไวรัสในพริกขี้หนูสวน โดยนำเพลี้ยอ่อนที่ปราศจากเชื้อ PeVYV มาทำให้อุดอาหารในจานเลี้ยงเชื้อสะอาดประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำเพลี้ยอ่อนที่อุดอาหารมาปล่อยลงบนต้นพริกที่มีเชื้อ PeVYV เพื่อให้ดูดกินน้ำเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเพลี้ยอ่อนมาปล่อยลงบนต้นพริกปกติที่ปราศจากเชื้อ PeVYV จำนวน 10 ตัวต่อต้น นาน

12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกำจัดเพลี้ยอ่อนโดยการพ่นสารเคมีกำจัดเพลี้ยอ่อน แล้วนำต้นพริกมาเก็บไว้ในกรงกันแมลง แล้วบันทึกผลโดยบันทึกระยะเวลาที่ต้นพืชทดสอบแสดงอาการของโรค บันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืช และบันทึกภาพอาการที่ปรากฏ จากนั้นนำพืชทดสอบมาตรวจหาเชื้อ PeVYV ในต้นพริกด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ตามวิธีการข้อ 3

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

1. ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. แปลงปลูกพริกในจังหวัดกรุงเทพมหานคร สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ศรีสะเกษ และ พระนครศรีอยุธยา
3. โรงเรือนพืชทดลอง กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
4. โรงเรือนเลี้ยงแมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ตัวอย่างพริกเป็นโรคเส้นใบเหลือง

ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการอาการเนื้อใบเหลืองคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร เส้นใบเขียว และใบเสีกรูปทรง จากแปลงปลูกพริกในจังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 30 ตัวอย่าง กาญจนบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง กรุงเทพมหานคร จำนวน 3 ตัวอย่าง และพระนครศรีอยุธยา จำนวน 4 ตัวอย่าง (ภาพที่ 1) รวมทั้งสิ้น 42 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค One Step RT-PCR โดยใช้ คูไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน CP บางส่วน (3' end of CP gene) ของเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Potterovirus* ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสขนาด 370 คู่เบส (Sharman *et al.*, 2015) จากจังหวัด กาญจนบุรี 1 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง และกรุงเทพมหานคร 3 ตัวอย่าง (ภาพที่ 2) ส่วน ตัวอย่างพริกจากจังหวัดศรีสะเกษและพระนครศรีอยุธยา ปรากฏว่าไม่พบตัวอย่างที่เป็นโรค เส้นใบเหลือง

ลักษณะอาการของพริกที่ตรวจพบเชื้อ PeVYV ครั้งนี้พบว่ามีอาการเหมือนกับที่รายงานในต่างประเทศ เช่น อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน (Knierim *et al.*, 2013) ถึงแม้ตัวอย่างพริกที่พบในจังหวัดพระนครศรีอยุธยาและศรีสะเกษจะมีอาการเหมือนกันแต่ไม่พบว่าเป็นโรคเส้นใบเหลือง เนื่องจากนี้ลักษณะอาการใบเหลืองพริกอาจเกิดจากการขาดธาตุอาหารหรือสามารถเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น เชื้อ CMV หรือเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Potyvirus* และ *Crinivirus* เป็นต้น (Tsai *et al.*, 2008)

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน CP

จากการทำวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน CP (P3 ORF) ของเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร (BKK) ไอโซเลตกาญจนบุรี (KBR) และไอโซเลตสุพรรณบุรี (SBR) พบว่า ยีน CP ของทั้ง 3 ไอโซเลต มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัส เป็นกรดอะมิโนได้ 206 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 22.94 - 22.97 กิโลดาลตัน

จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 3) และกรดอะมิโนของโปรตีน CP (ภาพที่ 4) พบว่าเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลตของไทยมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99% - 99.5% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเชื้อ PeVYV ที่พบในต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น อิสราเอล จีน ออสเตรเลีย สเปน มาเลเซีย และอินโดนีเซีย พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระดับ 92.9% - 98.9% และกรดอะมิโนที่ระดับ 95.1% - 100% (ตารางที่ 1) และการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลตของไทยจับกลุ่มใกล้เคียงกันและแยกออกจากเชื้อไอโซเลตอื่นที่พบในต่างประเทศ (ภาพที่ 5) และยังพบว่าทั้ง 3 ไอโซเลตของไทยยังจับกลุ่มอยู่ร่วมกับไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในเอเชีย (Asian population) เช่นกับเดี่ยวรายงานของ Liu *et al.* (2015)

3. การตอบสนองของพริกต่อเชื้อ PeVYV

การตอบสนองของพริกขี้หนูสวน (*Capsicum annuum*) ต่อเชื้อ PeVYV โดยนำเปลือยอ่อนที่ปลอดเชื้อไวรัสไปปล่อยบนต้นพริกที่เป็นโรคนาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมงแล้ว จึงนำมาปล่อยบนต้นพริกปกติ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วสังเกตอาการบนพืชทดสอบ พบว่าต้นพริกเริ่มแสดงอาการเหลืองหลังจากที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 14 วัน และพัฒนาอาการของโรคจนเห็นอาการใบเหลืองชัดเจนหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 20 วัน (ภาพที่ 6)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

โรคเส้นใบเหลืองของพริกที่เกิดจากเชื้อ PeVYV พบว่าพริกที่เป็นโรคจะแสดงอาการใบม้วนขึ้นและเนื้อใบเหลืองคล้ายขาดธาตุอาหาร ในต่างประเทศมีรายงานว่าส่งผลให้ผลผลิตของพริกเสียหายและลดลงมาก จากการปลูกเชื้อไวรัสในพริกขี้หนูสวนพบว่าพริกขี้หนูสวนแสดงอาการใบม้วนขึ้นและเนื้อใบเหลืองชัดเจนหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ 20 วัน และยังพบว่าลำต้นแคระแกร็นอีกด้วย แต่เนื่องจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ยังพบมีรายงานพืชอาศัยอื่น ๆ น้อย และยังไม่มีการรายงานและการศึกษาเกี่ยวกับความเสียหายและการลดลงของผลผลิตของพริกที่เกิดจากเชื้อนี้ จึงเห็นว่าควรจะมีการศึกษาพืชอาศัยรองและผลกระทบต่อผลผลิตของพริกที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2552. คู่มือโรคผัก. บริษัท เอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด กรุงเทพฯ. 153 หน้า.
- Alabi, O.J., Al Rwahnih, M., Jifon, J.L., Gregg, L., Crosby, K.M., Mirkov, T.E., 2015. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting Pepper (*Capsicum* spp.) in the United States. *Plant Dis.* 99(11), 1656-1656.
- Alfaro-Fernández, A., ElShafie, E.E., Ali, M.A., El Bashir, O. O. A., Córdoba-Sellés, M.C., Ambrosio, M.I.F.S., 2014. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting Hot pepper in Sudan. *Plant Dis.* 98(10), 1446-1446.
- Chiemsombat, P., Sharman, M., Srivilai, K., Campbell, P., Persley, D., Attathom, S., 2010. A new *Tospovirus* species infecting *Solanum esculentum* and *Capsicum annuum* in Thailand. *Australasian Plant Dis. Notes* 5(1), 75-78.

- Hassani-Mehraban, A., Cheewachaiwit, S., Relevante, C., Kormelink, R., Peters, D., 2011. *Tomato necrotic ring virus* (TNRV), a recently described tospovirus species infecting tomato and pepper in Thailand. *Eur. J. Plant Pathol.* 130(4), 449-456.
- Knierim, D., Tsai, W.-S., Kenyon, L., 2013. Analysis of sequences from field samples reveals the presence of the recently described *Pepper vein yellows virus* (genus *Polerovirus*) in six additional countries. *Arch. Virol.* 158(6), 1337-1341.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., and Tamura, K., 2018. MEGAX: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6), 1547-11549.
- Liu, M., Liu, X., Li, X., Zhang, D., Dai, L. and Tang, Q. 2015. Complete genome sequence of a Chinese isolate of pepper vein yellows virus and evolutionary analysis based on the CP, MP and RdRp coding regions. *Arch. Virol.* 161(3):677-683.
- Maina, S., Edwards, O.R., Jones, R.A.C., 2016. First complete genome sequence of *Pepper vein yellows virus* from Australia. *Genome Announcements* 4(3), e00450-00416.
- Murakami, R., Kawano, S., 2017. A natural host and diversity of *Pepper vein yellows virus* in Japan. *JARQ* 51(1), 59-68.
- Murakami, R., Nakashima, N., Hinomoto, N., Kawano, S., Toyosato, T., 2011. The genome sequence of *Pepper vein yellows virus* (family *Luteoviridae*, genus *Polerovirus*). *Arch. Virol.* 156(5), 921-923.
- Sharman, M., Lapbanjob, S., Sebnunruang, P., Belot, J.-L., Galbieri, R., Giband, M. and Suassuna, N. 2015. First report of *Cotton leafroll dwarf virus* in Thailand using a species-specific PCR validated with isolates from Brazil. *Australasian Plant Dis. Notes* 10:24.
- Tan, W.P., Dong, Y.Z., Sun, X.H., Liang, Y.C., Liu, H.X., Zhu, X.P. 2015. The first identification of *Pepper vein yellows virus* in Shandong Province, China. *Plant Dis.* 99(9), 1288.
- Tsai, W. S., Huang, Y. C., Zhang, D. Y., Reddy, K., Hidayat, S. H., Srithongchai, W. 2008. Molecular characterization of the CP gene and 3' UTR of *Chilli veinal mottle virus* from South and Southeast Asia. *Plant Pathol.* 57:408-416.
- Villanueva, F., Castillo, P., Font, M.I., Alfaro-Fernández, A., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2013. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting sweet pepper in Spain. *Plant Dis.* 97(9), 1261-1261.
- Yonaha, T., Toyosato, T., Kawano, S., Osaki, T., 1995. Pepper vein yellows virus, a novel *Luteovirus* from bell pepper plants in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61(3), 178-184.
- Zhang, S.B., Zhao, Z.B., Zhang, D.Y., Liu, Y. 2015. First report of *Pepper vein yellows virus* infecting red pepper in Mainland China. *Plant Dis.* 99(8), 1190-1190.

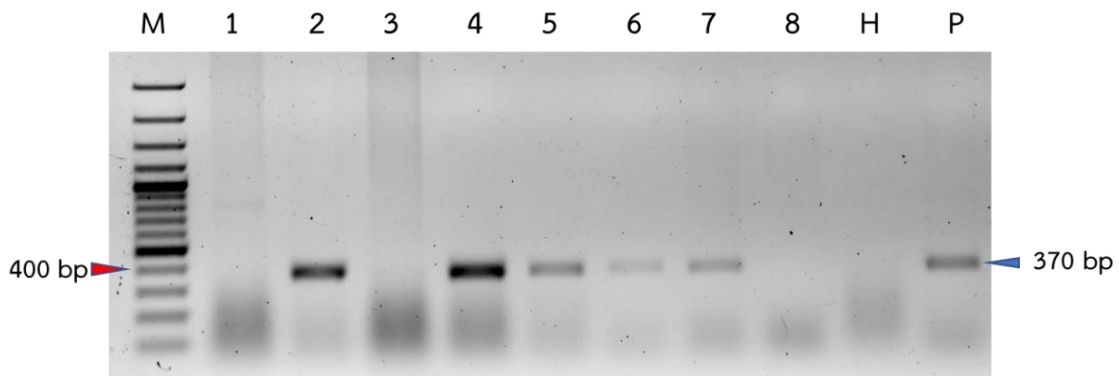
ตารางที่ 1 เปรอ์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน CP ของเชื้อ *Pepper vein yellows virus* ทั้ง 3 ไอโซเลต กับไอโซเลตอื่น ๆ ในต่างประเทศ

Isolate	ลำดับกรดอะมิโน																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 PeVYV-BKK_Thailand		99.5	99	99.5	99	100	99.5	99.5	99.5	99.5	98.1	98.1	99	98.1	97.1	97.6	96.1	97.6	95.1	52.9
2 PeVYV-SBR_Thailand	99.4		99.5	99	99.5	99.5	99	99	99	99	98.5	97.6	99.5	97.6	97.6	98.1	96.6	98.1	95.6	53.4
3 PeVYV-KBR_Thailand	99.2	99.8		98.5	99	99	98.5	98.5	98.5	98.5	98.1	97.1	99	97.1	97.1	97.6	96.1	97.6	95.1	52.9
4 LC126052.1:Yo-2_Japan	98.4	98.7	98.9		98.5	99.5	99	99	99	99	97.6	97.6	98.5	97.6	96.6	97.1	95.6	97.1	95.1	52.9
5 LC528383.1:Aceh2-2017_Indonesia	98.2	98.6	98.7	98.2		99	98.5	98.5	98.5	98.5	98.1	97.1	99	97.1	97.1	97.6	97.1	97.6	95.1	53.4
6 LC126055.1:MI-3_Japan	98.2	98.6	98.7	99.5	98.1		99.5	99.5	99.5	99.5	98.1	98.1	99	98.1	97.1	97.6	96.1	97.6	95.1	52.9
7 LC126050.1:TsY-6_Japan	98.2	98.6	98.7	99.5	98.1	99.4		100	99	99	97.6	98.5	98.5	97.6	97.6	97.1	95.6	97.1	94.7	52.4
8 LC126048.1:TsY-4_Japan	98.1	98.4	98.6	99.4	97.9	99.5	99.8		99	99	97.6	98.5	98.5	97.6	97.6	97.1	95.6	97.1	94.7	52.4
9 LC126036.1:TU-1_Japan	97.9	98.2	98.4	99.2	98.1	99.4	99.4	99.2		99.5	97.6	97.6	98.5	98.1	96.6	97.1	95.6	97.1	94.7	52.9
10 LC126042.1:ToY-1_Japan	97.7	98.1	98.2	98.7	97.9	98.6	98.9	98.7	98.6		97.6	97.6	98.5	98.1	96.6	97.1	95.6	97.1	94.7	52.9
11 LC126035.1:SM-2_Japan	97.4	98.1	98.2	98.7	97.6	98.6	98.9	98.7	98.6	98.1		96.1	99	97.1	96.1	97.6	96.1	96.6	94.2	53.4
12 LC126031.1:NO-2_Japan	97.3	97.6	97.7	98.6	97.1	98.7	99	98.9	98.7	97.9	97.9		97.1	96.1	96.1	95.6	94.2	95.6	93.2	51
13 KP326573.1:HN_China	97.3	97.9	98.1	98.6	98.1	98.7	98.7	98.6	99	97.9	98.6	98.1		97.1	97.1	98.5	97.1	97.6	95.1	53.4
14 LC126037.1:TU-2_Japan	97.1	97.4	97.6	98.4	97.1	98.6	98.6	98.4	98.6	98.4	98.1	97.9	98.1		95.1	95.6	94.2	95.6	93.2	52.4
15 LC126039.1:TU-4_Japan	96.6	97.3	97.4	97.6	97.7	97.7	97.7	97.6	97.7	96.9	96.9	97.1	97.7	96.8		96.6	96.1	96.6	94.7	52.9
16 KU999109.1:12KNX1_Australia	96.3	96.3	96.5	96.6	96.6	96.8	96.8	96.6	97.3	96.3	96.6	96.5	97.1	96.3	96.5		97.1	97.6	94.7	53.4
17 KY523072.1:Almeria2-2013_Spain	95.8	96.1	96.3	96.8	96.1	96.6	96.9	96.8	96.6	96.5	96.8	96.1	96.6	95.8	96	95.7		96.1	93.7	53.9
18 MN337276.1:UKM_Malaysia	95.3	96	96.1	96.6	95.8	96.8	96.6	96.5	96.8	95.8	96.1	96	96.5	96.1	96	95.5	95.3		96.1	52.7
19 HM439608.2:ls_Israel	92.9	92.9	93.1	93.1	93.4	92.8	92.8	92.6	92.4	92.3	92.3	91.9	92.1	91.6	92.6	91.9	92.4	91.9		52.9
20 MF425857.1:MYMV-ANETF1S2_2_Ethiopia	57.7	58.1	58.2	58.2	57.9	57.9	58.1	57.9	58.2	58.1	58.2	57.4	58.2	57.6	57.7	58.7	58.1	58.3	58.8	

ลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของพริกที่แสดงอาการใบเหลือง ใบเสียรูปทรง ใบม้วนงอขึ้น
พบในแปลงปลูกพริก ก : กายจนบุรี, ข : สุพรรณบุรี, ค : กรุงเทพมหานคร,
ง-จ : พระนครศรีอยุธยา และ ฉ : ศรีสะเกษ



ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอของยีน *CP* บางส่วน มีขนาด 370 คู่เบส (ลูกศรสีน้ำเงิน) ที่เพิ่มปริมาณของ ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค One Step RT-PCR

M : 100 bp DNA ladder (Biotechrabbit, Germany)

1-3 : ตัวอย่างพริกในแปลงจังหวัดกาญจนบุรี

4 และ 8 : ตัวอย่างพริกในแปลงจังหวัดสุพรรณบุรี

5-7 : ตัวอย่างพริกที่พบในกรุงเทพมหานคร

H : พริกปกติ (Negative control)

P : ตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control)

KBR-CP	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC	60
PKR-P3	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC	60
SBR-CP	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC *****	60
KBR-CP	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTTCGCACCCCTGGGCGCACA	120
BKK-CP	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTTCGCACCCCTGGGCGCACA	120
SBR-CP	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTTCGCACCCCTGGGCGCACA *****	120
KBR-CP	CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT	180
BKK-CP	CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT	180
SBR-CP	CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT *****	180
KBR-CP	GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT	240
BKK-CP	GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT	240
SBR-CP	GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT *****	240
KBR-CP	TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA	300
BKK-CP	TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA	300
SBR-CP	TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA *****	300
KBR-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA	360
BKK-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA	360
SBR-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA *****	360
KBR-CP	TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCACTGCAAGCTTACT	420
BKK-CP	TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCACTGCAAGCTTACT	420
SBR-CP	TCCTCTTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCACTGCAAGCTTACT *****	420
KBR-CP	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCGCTCACCAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480
BKK-CP	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCGCTCACCAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480
SBR-CP	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCGCTCACCAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG *****	480
KBR-CP	GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC	540
BKK-CP	GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC	540
SBR-CP	GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC *****	540
KBR-CP	TACAGAGGCAACGGGACAAAGAACGTTGCTGCCGGTTTCTTTCAGATCCGGTTTACTGTG	600
BKK-CP	TACAAAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCCCGGGTTTCTTTCAGATCCGGTTtACTGTG	600
SBR-CP	TACAAAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCCCGGGTTtCTTtCAGATCCGGTTtACTGTG **** *****	600
KBR-CP	CAACTGCACAACCCCAAATGA	621
BKK-CP	CAaTTGCACAACCCCAAATGA	621
SBR-CP	CAATTGCACAACCCCAAATGA *** *****	621

ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับ
 นิวคลีโอไทด์ของยีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต
 KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี
 BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร
 SBR: ไอโซเลตสระบุรี
 (*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

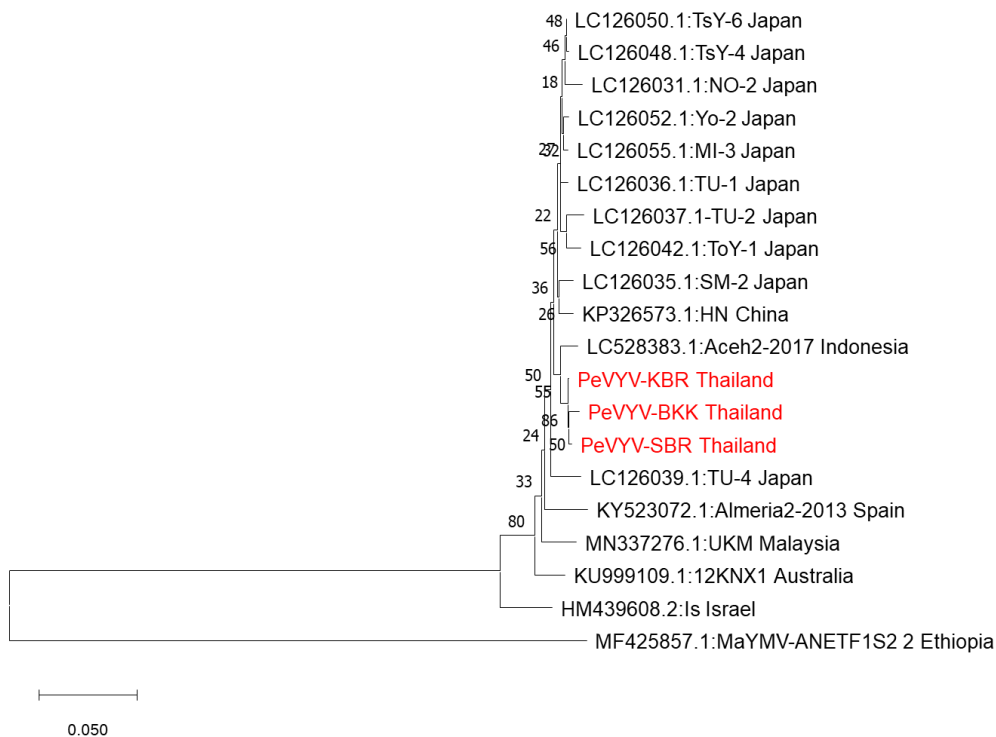
KBR-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRP VVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV	60
BKK-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRP VVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV	60
SBR-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRP VVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV	60

KBR-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFG PCLSESVALS GGV LKAYHEYKITMVNIRFVSE	120
BKK-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFG PSLSESVALS GGV LKAYHEYKITMVNIRFVSE	120
SBR-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFG PSLSESVALS GGV LKAYHEYKITMVNIRFVSE	120

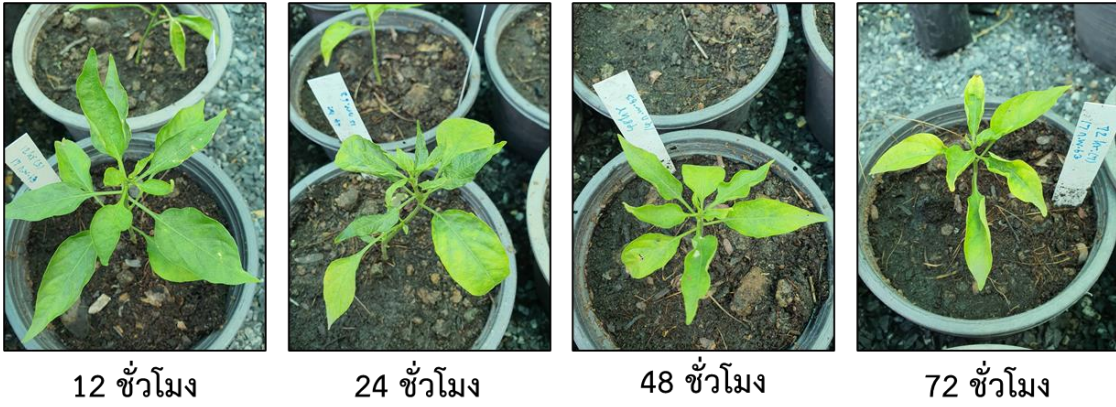
KBR-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTS EDQFRL	180
BKK-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTS EDQFRL	180
SBR-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTS EDQFRL	180

KBR-CP	YKNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK	206
BKK-CP	YRNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK	206
SBR-CP	YKNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK	206
* *****		

ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร SBR: ไอโซเลตสระบุรี (*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน



ภาพที่ 5 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Pepper vein yellows virus* ที่แยกได้จากพริกในประเทศไทย (อักษรสีแดง) กับไอโซเลตอื่น ๆ ในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA X และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications และใช้ข้อมูลของเชื้อ *Maize yellow mosaic virus* (MaYMV) ไอโซเลต ANETF1S2_2 ของประเทศเอธิโอเปียเป็น outgroup



ภาพที่ 6 ต้นพริกที่ได้รับการปลูกเชื้อโดยเชื้ออ่อนที่ 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ต้นพริกแสดงอาการใบเหลือง ในส่วนของเนื้อใบอย่างชัดเจนหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 20 วัน

การจำแนกชนิดเชื้อ *Crinivirus* ของพืชตระกูลแตงในประเทศไทย
 Identification of plant virus in the genus *Crinivirus* infecting
 cucurbitaceous plants in Thailand

ภูวนารถ มณีโชติ^{1/} สุนัดตา เขาวลิต^{2/} วาสนา รุ่งสว่าง^{3/} วิจิตรา โชคบุญ^{4/}

^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{4/}สำนักวิจัยและพัฒนาการการเกษตรเขตที่ 6

Abstract

cucurbit plants are the most important vegetable crop in Thailand for domestic consumption and seed production. The criniviruses including *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) and *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) are the plant virus that caused yellowing symptoms and caused in high yield losses for cucurbit production. The aim of this research is to be identification of the criniviruses infected cucurbits based on biological and molecular characterization. During October 2019 – September 2020, the 211 samples of cucurbit plants including cucumber, pumpkin, Field pumpkin, bitter gourd, luffa and ivy gourd showing severe yellowing, chlorotic mottling, interveinal yellowing symptoms and stunting were collected from fields in Bangkok, Kanchanaburi, Suphan Buri, Nakhon Pathom, Chiang Rai, Chiang Mai, Chanthaburi, Sakaeo and Srisaket Province. Total RNAs of all samples were extracted and tested for *Crinivirus* infection by One step RT-PCR using universal primers which specific to conserved region on RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp) of the genus *Crinivirus*. By the RT-PCR result, criniviruses were not detected in all tested samples.

Keywords : cucurbit plants, *Crinivirus*, CYSDV, CVYV

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-02-08-62

บทคัดย่อ

พืชตระกูลแตงเป็นพืชที่นิยมชนิดหนึ่งของประเทศไทยเพื่อใช้บริโภคและผลิตเมล็ดพันธุ์ โรคเส้นใบเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) และ *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) ไวรัสในสกุล *Crinivirus* เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตพริกในหลายประเทศ การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อ *Crinivirus* ที่เข้าติดเชื้อในพืชตระกูลแตง ในช่วงเดือนตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 ได้เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา ฟักทอง มะระจีน และตำลึง ที่แสดงอาการเนื้อใบเหลือง ใบด่างและลำต้นแคระแกร็น ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เชียงราย เชียงใหม่ จันทบุรี สระแก้ว และศรีสะเกษ จำนวน 211 ตัวอย่าง มาตรวจสอบหาเชื้อ *Crinivirus* ด้วยเทคนิค One step RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณอนุรักษของยีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ของไวรัสในกลุ่ม *Crinivirus* ผลการตรวจด้วย เทคนิค One step RT-PCR ปรากฏว่าตรวจไม่เชื้อ *Crinivirus* จากตัวอย่างพืชตระกูลแตงทั้งหมดที่เก็บมาตรวจครั้งนี้

คำหลัก : พืชตระกูลแตง โรคไวรัสพืชตระกูลแตง เชื้อ *Crinivirus*

คำนำ

พืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา ฟักทอง เมล่อน แตงโม แคนตาลูป สควอช และมะระ เป็นพืชที่มีการปลูกอย่างกว้างขวางทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยซึ่งมีการปลูกมากเพื่อใช้บริโภคและผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งออกโดยเฉพาะในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง การระบาดของโรคพืช โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญในการผลิตพืชตระกูลแตง เพราะทำให้พืชนั้นเกิดความเสียหายและผลผลิตลดลง ซึ่งถ้าหากพืชถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายในระยะต้นกล้าจะส่งผลให้ต้นพืชแคระแกรนหรือถ้าหากรุนแรงมากก็จะทำให้ต้นพืชตาย ซึ่งเชื้อไวรัสที่สำคัญของพืชตระกูลแตง ที่มีรายงานการระบาดในแหล่งปลูกในประเทศไทย เช่นไวรัสในกลุ่ม *Cucumovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tospovirus*, *Polerovirus* และ *Crinivirus* เป็นต้น เชื้อไวรัสในจีนัส *Crinivirus* ได้แก่ *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) และ *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) พบว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลผลิตพืชตระกูลแตงลดลงอย่างมากและมีการระบาดตามพื้นที่ปลูกพืชตระกูลแตงทั่วโลก ทั้งในแถบเมดิเตอร์เรเนียน อเมริกา และเอเชียมากถึง 80-100% (Abou-Jawdah *et al.*, 2000; Abrahamian *et al.*, 2014; Marco and Aranda, 2005; Wintermantel *et al.*, 2009) โดยพืชที่ติดเชื้อจะแสดงอาการใบซีด จุดซีดระหว่างเส้นใบ ใบด่างลาย ใบเหลือง และลำต้นแคระแกรน การแพร่กระจายของโรคนี้อาจเกิดขึ้นได้ง่ายและรวดเร็วโดยมีแมลงห้ำหิว (*Bemisia tabaci*) เป็นแมลงพาหะ (Kao *et al.*, 2000; Louro *et al.*, 2000; Orfanidou *et al.*, 2014) สำหรับประเทศไทยข้อมูลของเชื้อ *Crinivirus* ยังมีน้อยมาก ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะจำแนก

ชนิดของเชื้อ *Crinivirus* ที่แยกจากพืชตระกูลแตง ศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาเกี่ยวกับอาการบนพืชอาศัย และพันธุกรรมของเชื้อ รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อที่พบในแหล่งปลูกต่าง ๆ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการโรคไวรัส
2. สารเคมี
 - ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์สารพันธุกรรมเชื้อไวรัส
 - ไนโตรเจนเหลว
 - ชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan)
 - One Step RT-PCR kit (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.

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการของโรค

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่มีลักษณะอาการใบต่าง ใบเหลือง เส้นใบใส และเสีกรูป จากแหล่งปลูกต่างๆ ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เชียงราย เชียงใหม่ จันทบุรี สระแก้ว และศรีสะเกษ โดยการสำรวจในพื้นที่ประมาณ 2 ไร่ ทำการสำรวจทุกแถวปลูก ในกรณีที่พื้นที่สำรวจมีพื้นที่มากกว่า 2 ไร่ขึ้นไป จะทำการสุ่มสำรวจโดยสำรวจแถวเว้นแถว พร้อมทั้งถ่ายภาพในแปลงปลูก ลักษณะอาการที่พบในแปลงปลูกและบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืช

สกัดอาร์เอ็นเอรวมด้วยชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งใบพืชตระกูลแตงแต่ละตัวอย่างให้มีปริมาณ 100 มิลลิกรัม แล้วบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วย้ายมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ FARB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และเติม Mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. ย้ายส่วนของพืชมาใส่ Filter Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นดูดส่วนของเหลวใส่ใน Collection tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. เติม 70% Ethanol ปริมาตร 1 เท่าของทั้งส่วนของเหลวใส่ที่ได้ ผสมให้เข้ากันแล้วย้ายมาใส่ใน FARB Mini Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทั้งส่วนของเหลวใส่
4. ล้างอาร์เอ็นเอครั้งที่ 1 ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทั้งส่วนของเหลวใส่ จากนั้นล้างอาร์เอ็นเอครั้งที่ 2 ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทั้งส่วนของเหลวใส่แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที
5. นำ FARB Column มาวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บอาร์เอ็นเอรวมที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3. ไพรมเมอร์และการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อ *Crinivirus*

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ universal primers เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *RdRp* บน RNA1 ของไวรัสในจีนัส *Crinivirus* ซึ่งจะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 745 คู่เบส (Wintermantel and Hladky, 2010) ดังนี้

Forward primer CriniRdRp251F 5'- TNGGNAARGGNGARAG -3'

Reverse primer CriniRdRp995R 5'- GTRTTNGAYAACCAHGTRTTHG -3'

เมื่อมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ universal primers ก็จะนำมาตรวจหาชนิดของไวรัสด้วยไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ CYSDV หรือ CCYV โดยจะเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *Hsp70h* บน RNA2 ดังนี้

เชื้อ CYSDV ได้ขนาดดีเอ็นเอ 749 คู่เบส (Abrahamian *et al.*, 2013)

Forward primer CY-HSPF 5'- AATCAGTTTGTGACAGTCTAGG -3'

Reverse primer CY-HSPR 5'- GGTTTCTTCTCGCACTCCA -3'

เชื้อ CCYV ได้ขนาดดีเอ็นเอ 462 คู่เบส (Okuda *et al.*, 2010)

Forward primer CY-HSPF 5'- AATCAGTTTGTGACAGTCTAGG -3'

Reverse primer CY-HSPR 5'- GGTTTCTTCTCGCACTCCA -3'

ส่วนผสมของ One step RT-PCR ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Nuclease free water	5	ไมโครลิตร
2x One step Mix	10	ไมโครลิตร
10 pmole Pol3870F	0.5	ไมโครลิตร
10 pmole AS3	0.5	ไมโครลิตร
20x RT-RI Blend	1	ไมโครลิตร
RNA template	3	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

1) First strand synthesis	50 °C	20 นาที
Predenaturation	95 °C	2 นาที
2) Three step-cycling 35 cycles		
Denaturation	95 °C	20 วินาที
Annealing	55 °C	20 วินาที
Extension	72 °C	45 วินาที
3) Final extension	72 °C	5 นาที

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม Redsafe Nucleic Acid Straining Solution ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, USA)

4. การโคลนยีน

แยกดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบขนาดและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis เชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ พลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega, USA) โดยเติมดีเอ็นเอ 150 นาโนกรัม, T4 DNA ligase buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, pGEM-T easy vector 50 นาโนกรัม และ T4 DNA ligase 3 Units รวมปริมาตรสาร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี heat shock transformation คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอไวรัส ด้วยวิธี blue-white selection แล้วตรวจสอบโคลนของพลาสมิดสายผสมที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาวจำนวน 10

โคลนนี้และสี่ฟ้า 1 โคลนนี้ มาผสมน้ำปริมาตร 8 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วตรวจสอบยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Crinivirus*

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR มาจำแนกยีนด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ *Crinivirus* ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีนโปรตีนด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ *Crinivirus* ไอโซเลตต่าง ๆ ด้วย Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al.*, 2018)

6. การศึกษาการตอบสนองของพืชอาศัยต่อเชื้อไวรัส

ศึกษาลักษณะอาการของเชื้อไวรัสบนพืชอาศัยต่าง ๆ ได้แก่ แตงกวา แตงโม เมลอน ชุกินี และฟักทอง เป็นต้น โดยนำแมลงหิวข้าวที่ปราศจากเชื้อไวรัสมาปล่อยลงบนต้นพืชที่มีเชื้อ *Crinivirus* เพื่อให้ดูดกินน้ำเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายแมลงหิวข้าวมาปล่อยลงบนต้นพืชปกติที่ปราศจากเชื้อไวรัส จำนวน 10 ตัวต่อต้น นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกำจัดแมลงหิวข้าวโดยการพ่นสารเคมีกำจัดแมลงหิวข้าวแล้วนำต้นพืชมาเก็บไว้ในกรงกันแมลง

การบันทึกผลโดยบันทึกระยะเวลาที่ต้นพืชทดสอบแสดงอาการของโรค บันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืช และบันทึกภาพอาการที่ปรากฏ จากนั้นนำพืชทดสอบมาตรวจหาเชื้อ *Crinivirus* ในต้นพืชด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ตามวิธีการข้อ 3

เวลาที่และสถานที่

ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

1. ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. แปลงปลูกแตงกวาและพืชตระกูลแตงในจังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี เชียงราย เชียงใหม่ สระแก้ว และศรีสะเกษ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ตัวอย่างพืชตระกูลแตงและการตรวจสอบหาเชื้อ *Crinivirus* ด้วยเทคนิค One Step RT-PCR

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา (ภาพที่ 1) มะระ (ภาพที่ 2 ก-ข) บวบ (ภาพที่ 2 ค-ง) ฟักทอง (ภาพที่ 2จ) ฟักแฟง (ภาพที่ 2ฉ) และ ตำลึง (ภาพที่ 2 ช-ฉ) ที่แสดงอาการเส้นใบสีใบต่าง ใบเหลืองและเสียรูปทรงในจังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี เชียงราย เชียงใหม่ สระแก้ว และศรีสะเกษ รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 221 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) มาตรวจสอบด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ด้วย universal primers ของยีน RdRp เชื้อไวรัสในกลุ่ม เชื้อ *Crinivirus* ผลปรากฏว่า ไม่พบแถบดีเอ็นเอเชื้อไวรัสในทุกตัวอย่าง

พืชตระกูลแตงนั้นมีรายงานไวรัสที่สามารถเข้าทำลายได้มากกว่า 70 ชนิด (Lecoq, 2003) เช่น *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV), *Beet pseudo-yellows virus* (BPYV) เป็นต้น (Orfanidou *et al.*, 2019; Alicia Pozzi *et al.*, 2020) ซึ่งไวรัสดังกล่าวจะทำให้พืชแสดงอาการใบด่างหรือเหลือง เส้นใบสี เสียวรูปทรง ขอบปล้องสั้น และลำต้นแคระแกร็น หากเป็นการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสหลายชนิดก็จะยิ่งทำให้อาการของโรครุนแรงมากขึ้น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการตรวจไม่พบเชื้อ *Crinivirus* จากตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการอาการเส้นใบและใบเหลือง ทั้ง 110 ตัวอย่างนั้น อาจเนื่องมาจากว่าลักษณะอาการของโรคที่พบเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ซึ่งพบว่าเชื้อไวรัสมากกว่า 70 ชนิด ที่สามารถเข้าติดเชื้อในพืชตระกูลแตงได้ ดังนั้นหากต้องการตรวจหาเชื้อ *Crinivirus* จะต้องเก็บตัวอย่างพืชมาตรวจให้มากกว่านี้ และควรเก็บตัวอย่างในพื้นที่ให้มากขึ้นในหลายจังหวัดที่มีการปลูกพืชตระกูลแตง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่เป็นแหล่งปลูกและผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ใหญ่ที่สุดของประเทศ สำหรับวิธีการตรวจสอบต้องอาศัยวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น เทคนิค Next Generation Sequencing (NGS) มาใช้ในการตรวจสอบ

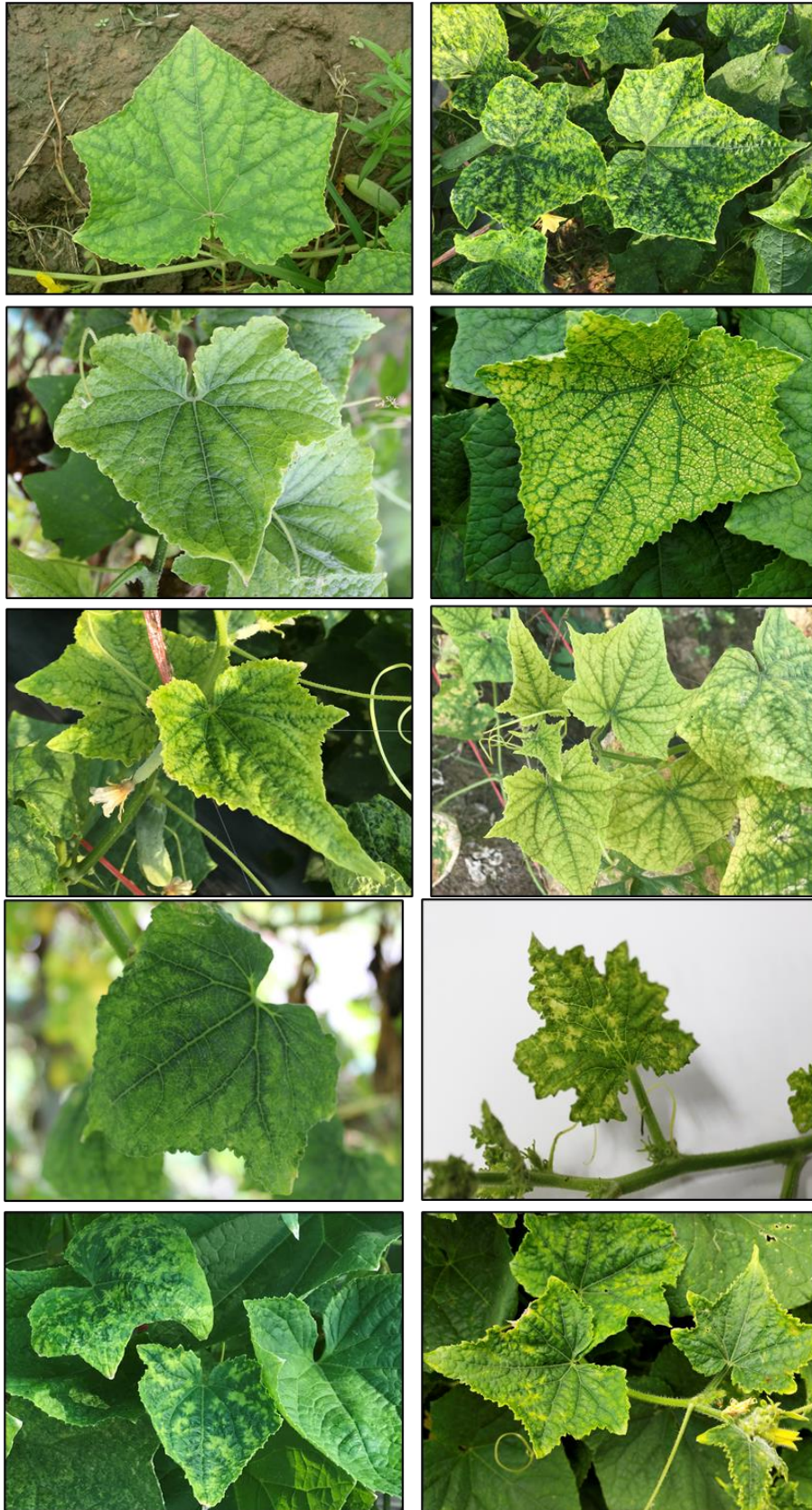
เอกสารอ้างอิง

- Abou-Jawdah, Y., Sobh, H., Fayad, A., Lecoq, H., Delécolle, B., Trad-Ferré, J., 2000. *Cucurbit yellow stunting disorder virus: A new threat to cucurbits in Lebanon. J. Plant Pathol.* 80(1), 55-60.
- Abrahamian, P.E., Abou-Jawdah, Y., 2014. Whitefly-transmitted criniviruses of cucurbits: current status and future prospects. *Virus Dis.* 25(1), 26-38.
- Abrahamian, P.E., Seblani, R., Sobh, H. and Abou-Jawdah, Y., 2013. Detection and quantitation of two cucurbit criniviruses in mixed infection by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 193(2): 320-326.
- Pozzi, A.E., Bruno, C., Luciana, C.E., Celli, M.G., Conci, V.C. and Perotto, M.C. 2020. Relative incidence of cucurbit viruses and relationship with bio-meteorological variables. *Australas. Plant Pathol.* 49: 167–174.
- Kao, J., Jia, L., Tian, T., Rubio, L., and Falk, B.W., 2000. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (Genus *Crinivirus*) in North America. *Plant Dis.* 84(1): 101-101.

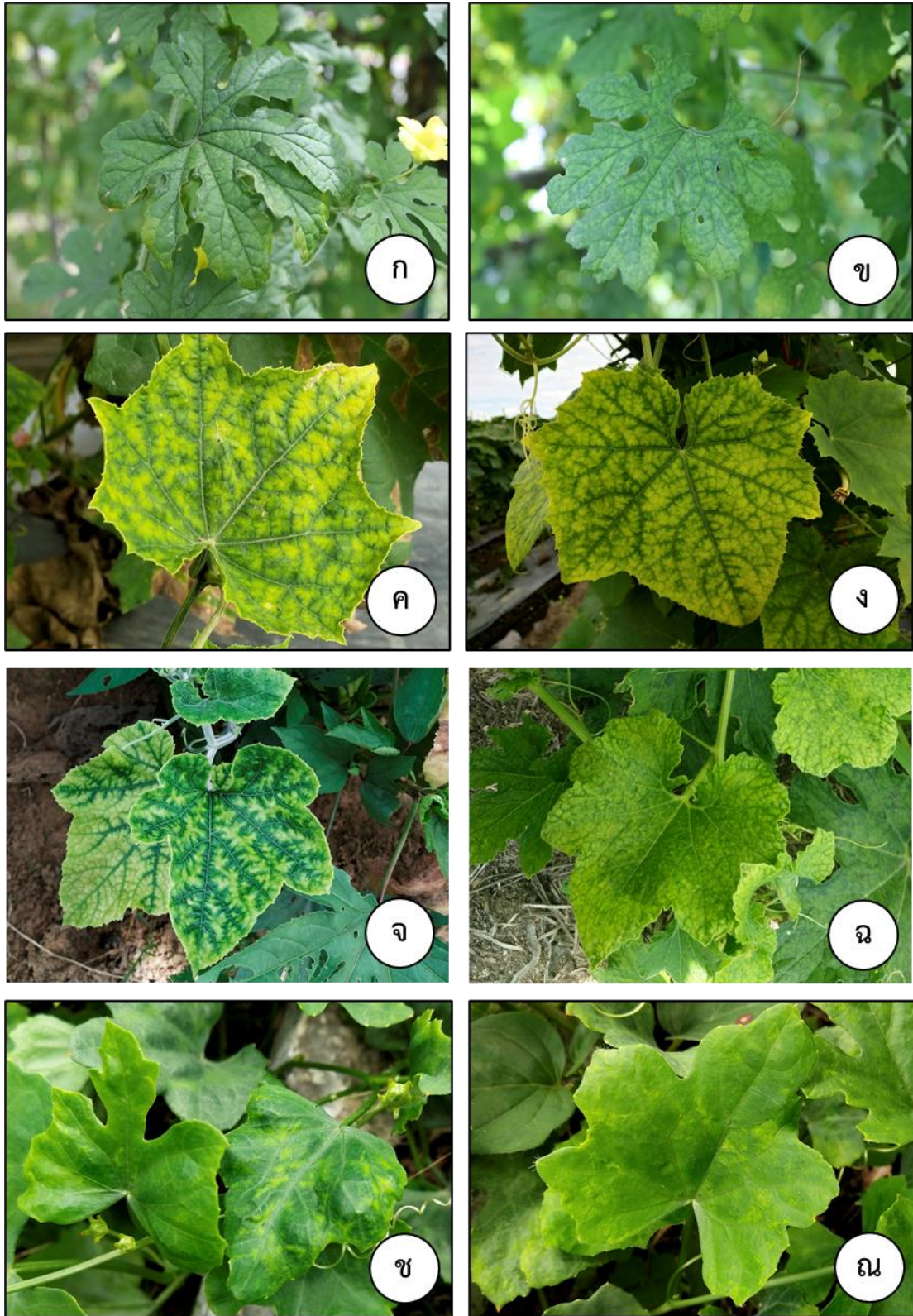
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547-1549.
- Lecoq, H. 2003. Cucurbits. In G. Loebenstein, and G. Thottapilly (Eds.), *Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries* (pp. 665–688). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Louro, D., Vicente, M., Vaira, A.M., Accotto, G.P. and Nolasco, G., 2000. *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (Genus *Crinivirus*) Associated with the yellowing disease of cucurbit crops in Portugal. *Plant Dis.* 84(10): 1156-1156.
- Marco, C.F. and Aranda, M.A., 2005. Genetic diversity of a natural population of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *J. Gen. Virol.* 86(Pt 3): 815-822.
- Okuda, M., Okazaki, S., Yamasaki, S., Okuda, S. and Sugiyama, M., 2010. Host range and complete genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new member of the genus *Crinivirus*. *Phytopathology* 100(6): 560-566.
- Orfanidou, C., Maliogka, V.I. and Katis, N.I., 2014. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in Greece. *Plant Dis.* 98(10): 1446-1446.
- Wintermantel, W.M. and Hladky, L.L., 2010. Methods for detection and differentiation of existing and new crinivirus species through multiplex and degenerate primer RT-PCR. *J. Virol. Methods* 170(1-2): 106-114.
- Wintermantel, W.M., Hladky, L.L., Cortez, A.A., Natwick, E.T., 2009. A new expanded host range of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* includes three agricultural crops. *Plant Dis.* 93(7): 685-690.

ตารางที่ 1 ผลตรวจหาเชื้อ *Crinivirus* ด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ในตัวอย่างพืช ตระกูลแตง
ที่เก็บจากแปลงปลูกใน 9 จังหวัด

จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	ผลการตรวจวิเคราะห์
กรุงเทพมหานคร	25	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
กาญจนบุรี	25	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
สุพรรณบุรี	18	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
นครปฐม	15	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
เชียงราย	30	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
เชียงใหม่	20	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
จันทบุรี	15	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
สระแก้ว	36	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
ศรีสะเกษ	27	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
รวมทั้งสิ้น	211	



ภาพที่ 1 แสดงภาพที่แสดงอาการใบด่าง ใบด่างประ เส้นใบใส เนื้อใบเหลือง คล้ายอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Crinivirus* ที่พบในแปลงปลูก



ภาพที่ 2 พืชตระกูลแตงที่แสดงอาการใบต่าง ใบต่างประ เส้นใบใส เนื้อใบเหลือง คล้ายอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Crinivirus* ที่พบในแปลงปลูก ได้แก่ (ก-ข): มosaic (ค-ง): บวมเหลือง (จ): ฟักทอง (ฉ): ฟักแฟง และ (ช-ฉ): ตำลึง

ชีววิทยาของเทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excell.)Biology of *Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excell.

ัญชนก จงรักไทย อัญศยา พรพมา เอกรัตน์ ธนุทอง
กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาชีววิทยาของเทียนนา ทำการทดลองระหว่าง ตุลาคม 2562 - กันยายน 2563 โดยสำรวจในพื้นที่นาข้าวด้วยวิธีแบบสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่ 13 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด สุพรรณบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท นครสวรรค์ เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน พบเทียนนาในทุกจังหวัดดังกล่าว และได้ตัวอย่างเทียนนา จำนวน 35 ตัวอย่าง และเมล็ดแห้ง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การงอกในห้องปฏิบัติการ พบว่า เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 53.0 เปอร์เซ็นต์ เริ่มงอกครั้งแรกเพียง 2 วันหลังเพาะเมล็ด และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุดในช่วง 2-4 วันหลังเพาะ เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด 74 เปอร์เซ็นต์ ต่ำสุด 29 เปอร์เซ็นต์ แต่เมล็ดที่เก็บจากบางพื้นที่สามารถงอกได้อีกที่ระยะ 102 วันหลังทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดมีการพักตัว การงอกในสภาพเรือนทดลอง พบว่า เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 15.5 เปอร์เซ็นต์ เริ่มงอกครั้งแรก 4 วันหลังเพาะเมล็ด เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด 39 เปอร์เซ็นต์ ต่ำสุด 2 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ในระหว่างทำการทดลองจะยังคงเก็บข้อมูลการงอกต่อไป เพื่อทราบระยะเวลาที่เมล็ดยังสามารถงอกได้

คำหลัก : ชีววิทยา เทียนนา

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-03-05-63

คำนำ

เทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Excell.) อยู่ในวงศ์ Onagraceae เป็นพืชอายุปีเดียว ลำต้นตั้ง สูง 30-70 ซม. ลำต้นมักมีสีม่วงแดง เป็นเหลี่ยม โคนต้นส่วนที่แช่น้ำมักมีเยื่อสีขาวหุ้ม รากมีเนื้อสีขาว เพื่อช่วยหายใจ ใบเดี่ยวแตกจากลำต้นแบบสลับ แผ่นใบรูปหอก ปลายแหลม ใบเรียบ ไม่เป็นขน ใบและเส้นกลางใบและลำต้น กลีบเลี้ยงสีเขียว 4 กลีบ กลีบดอกสีเหลือง 4 กลีบ ผลรูปทรงกระบอก ยาวประมาณ 1.5 ซม. เมล็ดรูปกระสวยสีน้ำตาล ในบางท้องถิ่นที่พบเทียนนาอีกชนิดหนึ่งขึ้นปะปน เรียกว่าหญ้ารังกา (*Jussiaea suffruticosa* L.) ชนิดนี้ลำต้นสีม่วงแดง ตามใบและลำต้นเป็นขน ดอกสีเหลืองเช่นกัน แต่มีขนาดใหญ่กว่า (วิรัชและคณะ, 2547)

เทียนนาเป็นวัชพืชที่มักขึ้นในพื้นที่ชื้นแฉะในเขตร้อน มักอยู่ในน้ำ นาข้าว ริมชายน้ำ และหนองน้ำ โดยถูกบันทึกว่าเป็นวัชพืชหลักในนาข้าว ทั้งดินร่วนปนดินเหนียวและดินเหนียว Holm *et al.* (1979) กล่าวว่าเทียนนาเป็นวัชพืชที่แพร่หลายอย่างมากในข้าว และพื้นที่ชุ่มน้ำทั่วทั้งสามทวีป โดยมีรายงานว่าเป็นวัชพืชที่รุนแรงในประเทศอินเดีย เกาะบอร์เนียว ไทย มาเลเซีย ไนจีเรีย และตริเนแดด 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 ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษา ชีววิทยา 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 พร้อมเชือกใส่ตะเกียง และป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
- 7) กระดาษติดตัวอย่างพืช พร้อมแฟ้มปก
- 8) น้ำยาชุบตัวอย่างพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริกคลอไรด์ เอทิลแอลกอฮอล์
- 9) การบูร
- 10) เครื่องรับสัญญาณดาวเทียม เพื่อระบุพิกัด
- 11) อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางพลาสติก กระบะปูน และป้ายแสดงกรรมวิธี
- 12) สารกำจัดวัชพืช
- 13) สมุดบันทึก

วิธีการ

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างในพื้นที่แปลงปลูกข้าวในภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดสุพรรณบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท และนครสวรรค์ ภาคเหนือ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน พิชณุโลก กำแพงเพชร และพิจิตร และตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมา อุบลราชธานี

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

นำเมล็ดเทียบนาที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วนับเมล็ดที่ จำนวน 100 เมล็ด โรยในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงขอบล่างของกระถาง จำนวน 10 กระถาง รดน้ำให้ความชื้นทุกวัน

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 ต้นพืชทั้งหมดที่ออก

วิธีการปฏิบัติการทดลอง หว่านเมล็ดเทียนนา จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง จำนวนกรรมวิธีต่างๆ ตามกรรมวิธีของ ศิริพร และคณะ, 2558

บันทึกข้อมูล ความสูงต้น จำนวนกิ่ง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ติดผล จำนวนผลต่อต้น และจำนวนเมล็ดต่อผลของพืชแต่ละต้นในแต่ละกระบะ

เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่าง ตุลาคม 2562 - กันยายน 2563 (ระยะเวลา 1 ปี) ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ และพื้นที่นาข้าว

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1) การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

การสำรวจและเก็บตัวอย่างต้น และเมล็ดเทียนนา โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในนาข้าว จังหวัด สุพรรณบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท นครสวรรค์ เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน พบเทียนนาในทุกจังหวัดที่สำรวจ และได้ตัวอย่างเทียนนา จำนวน 35 ตัวอย่าง และเมล็ดแห้ง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลอง (Figure 1)

2) ศึกษาการงอกในหึ่งปฏิบัติการ

หลังจากทดสอบความงอกในสภาพห้องปฏิบัติการ เป็นระยะเวลา 4 เดือน หลังเริ่มทดสอบพบว่า เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 55.2 เปอร์เซ็นต์ เริ่มงอกครั้งแรกเพียง 2 วันหลังเพาะเมล็ด และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุดในช่วง 2-4 วันหลังเพาะเมล็ด เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุด 74 เปอร์เซ็นต์ ต่ำสุด 29 เปอร์เซ็นต์ แต่เมล็ดที่เก็บจากบางพื้นที่สามารถงอกได้อีกที่ระยะ 102 วันหลังทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดมีการพักตัว และยังคงเก็บข้อมูลการงอกต่อไป เพื่อทราบระยะเวลาที่เมล็ดยังสามารถงอกได้ (Figure 2)

3) การงอกในสภาพเรือนทดลอง

หลังจากทดสอบความงอกในสภาพเรือนทดลอง เป็นระยะเวลา 4 เดือน หลังเริ่มทดสอบพบว่า เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 20.7 เปอร์เซ็นต์ เริ่มงอกครั้งแรก 4 วันหลังเพาะเมล็ด เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด 39 เปอร์เซ็นต์ ต่ำสุด 2 เปอร์เซ็นต์ และยังคงเก็บข้อมูลการงอกต่อไป เพื่อทราบระยะเวลาที่เมล็ดยังสามารถงอกได้ (Figure 3)

4) การเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด

เตรียมแปลงทดลอง และหว่านเมล็ดเทียนนา จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร จำนวน 20 กระบะ ขณะนี้อยู่ระหว่างบันทึกข้อมูล (Figure 4)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจในพื้นที่นาข้าวในพื้นที่ 9 จังหวัด พบเทียนนาในทุกจังหวัด และได้ตัวอย่างเทียนนา จำนวน 35 ตัวอย่าง และเมล็ดแห้ง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส โดยเมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 53.0 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด 74 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดที่เก็บจากบางพื้นที่สามารถงอกได้ที่ระยะ 102 วันหลังทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดมีการพักตัว และการงอกในสภาพเรือนทดลอง พบว่า เมล็ดเทียนนามีความงอกเฉลี่ย 15.5 เปอร์เซ็นต์ เริ่มงอกครั้งแรก 4 วันหลังเพาะเมล็ด เปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด 39 เปอร์เซ็นต์ ต่ำสุด 2 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ในระหว่างทำการทดลองจะยังคงเก็บข้อมูลการงอกต่อไป เพื่อทราบระยะเวลาที่เมล็ดยังสามารถงอกได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ พนักงานและจ้างเหมา ของกลุ่มวิจัยวัชพืช ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- วิรัช จันทรศรีมี ช่อม เปรมัชเชียร ทวี แสงทอง จันทรเพ็ญ ประคองวงศ์ ไชยยศ สุพัฒน์กุล มาลี ณ นคร สุนันทา เพ็ญสุด ศรีสม สุวรรณวงศ์ ศิริพร ชิงสนธิพร. 2547. *วัชพืชสามัญภาคกลาง*. สมาคมวิชาการวัชพืชแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 135 หน้า.
- Holm LG, Doll J, Holm E, Pancho JV, Herberger JP, 1997. *World Weeds: Natural Histories and Distribution*. New York, USA: John Wiley & Sons Inc. 1115 p'
- Begum M, Juraimi AS, Azmi M, Omar SRS, Rajan A, 2008. *Soil seedbank of the Muda rice granary in north-west Peninsular Malaysia invaded by the weed Fimbristylis miliacea (L.) Vahl*. Plant Protection Quarterly, 23(4):157-161. (Online) Available: <http://www.weedinfo.com.au> (March 9, 2018)
- Ferrer PP, and Laguna E, 2009. [English title not available]. (Sobre *Ludwigia hyssopifolia* (G. Don) Exell (Onagraceae) como integrante de la flora subespontánea valenciana.) *Acta Botanica Malacitana*, 34:228-230.
- Ferrer PP, Laguna E, Collado-Rosique F, Vizcaino-Matarredona A, 2009. About *Murdannia spirata* (L.) Brückn. (Commelinaceae), a new non-native species in the European flora. (Sobre *Murdannia spirata* (L.) Bruckn. (Commelinaceae), nueva especie alóctona en la flora Europea.) *Anales de Biología*, 31:117-120.
- Gordon E, and Valk AGvan der, 2003. Secondary seed dispersal in *Montrichardia arborescens* (L.) Schott dominated wetlands in Laguna Grande, Venezuela. *Plant Ecology*, 168(2):177-190.



Figure 1 Habitat of *Ludwigia hyssopifolia*. 1) tree 2) flower and 3) fruit

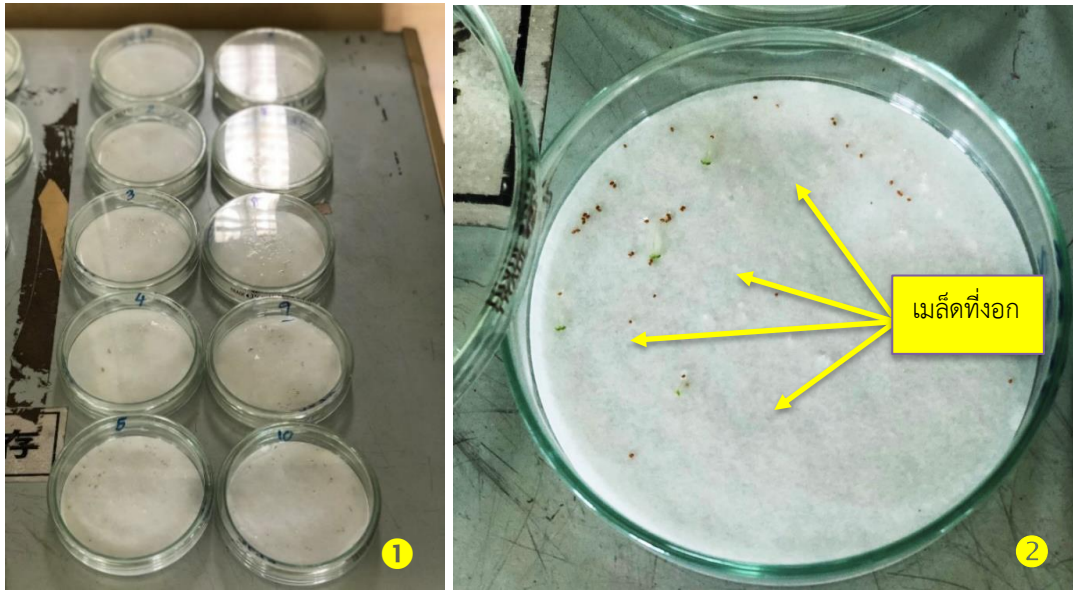


Figure 2 Germination test 1) petri dish for germination test 2) germinated seeds



Figure 3 Germination test 1) flowerpot for germination test 2) seedling



Figure 4 Experimental plot of *Ludwigia hyssopifolia*. 1) experimental plot 2) seedling 3) and 4) tree

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Trichoderma asperellum*
T. harzianum และ *T. viride*

DNA Barcoding for *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*
and *T. viride* Identification

ชนินทร์ ดวงสอด^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} สุณีรัตน์ สิมะเตือ^{1/}
อมรรักษ์ คัดใจเดียว^{1/} มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{3/}

^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

Abstract

The fungal identification based on genealogical concordance has been applied to classify and identify fungal, especially in many cryptic and complex species. The DNA data of genes obtained from fungi had been analyzed for the identification and also applied as barcodes of certain species of fungi. Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture is a responsible agency to verify the fungal species in the bioproduct, which to be registered. This will benefit users of biological control products. This study was conducted during October 2017 - September 2020 in order to obtain the DNA barcodes of *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* and *T. viride*. The *Trichoderma* was isolated from soil and surround roots with additional isolates selected from culture collection of Plant Pathology Research Group. The morphological characters had been observed to identify the *Trichoderma* isolates, which could be identified into two group species namely, *T. asperellum* and *T. harzianum*. Whereas *T. viride* could not be found from any isolates. To confirm the identification, the phylogenetic reconstruction using molecular data of the Internal Transcribed Spacer (ITS) and the translation elongation factor 1-alpha (tef1) compared with the type sequences of the genus *Trichoderma*. The dataset obtained from Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) presented the monophyletic and congruent topology.

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-09-60

The results showed that *T. asperellum* isolates presented as a complex species, which comprised of *T. asperellum* and *T. asperelloides*. The isolates of *T. harzianum* also presented in *Harzianum* complex and the identity to *T. lentiforme* and *T. lexii*. The isolates of *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme* and *T. lexii* have been curated in the culture collection of Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture. The ITS and *tef1* barcodes of *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme*, *T. lexii*, *T. harzianum* and *T. viride* were also databased for the identification.

Keywords : *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. viride* barcoding

บทคัดย่อ

ปัจจุบันข้อมูลและวิธีการทางชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทมากในงานอนุกรมวิธานเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อราโดยเฉพาะกรณีที่ไม่สามารถชี้ขาดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานรับผิดชอบตรวจสอบความถูกต้องของชนิดสายพันธุ์เชื้อราที่ระบุในสารชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดโรคพืช ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์ที่สามารถใช้สารชีวภัณฑ์ได้ตรงชนิด การศึกษาครั้งนี้ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2563 เพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum* และ *T. viride* เก็บและรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *Trichoderma* จากตัวอย่างดิน และจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช เมื่อจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกได้เชื้อรา *T. asperellum* และ *T. harzianum* แต่ไม่พบเชื้อรา *T. viride* เมื่อจำแนกชนิดด้วยวิธี phylogenetic reconstruction โดยเปรียบเทียบกับ type sequence ของเชื้อรา *Trichoderma* พบว่า topology ที่ได้จากการวิเคราะห์ยีนตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) และ the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) ด้วย Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian inference (BI) มีความสอดคล้องกัน และเป็น monophyletic พบว่า ตัวอย่างเชื้อราในกลุ่ม *T. asperellum* เป็น complex species สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ส่วนเชื้อราในกลุ่ม *T. harzianum* ก็พบว่าเป็น complex species สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. lentiforme* และ *T. lexii* จากการศึกษาครั้งนี้ได้ไอโซเลทของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme* และ *T. lexii* รวมถึง ดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง ITS และ *tef1* ของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme*, *T. lexii*, *T. harzianum* และ *T. viride* จะเก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา

คำหลัก : *Trichoderma asperellum* *T. harzianum* *T. viride* บาร์โค้ด

คำนำ

เชื้อราหลายสปีชีส์ใน genus *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะทางด้านการเกษตรที่มีการใช้เชื้อรา ใน genus *Trichoderma* เป็นสารชีวภัณฑ์ (biocontrol agent) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013; Kindermann *et al.*, 1998; Mbarga *et al.*, 2012) อันเนื่องมาจากคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อรา *Trichoderma* เป็นเชื้อราที่มีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับ เชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการแย่งใช้สารอาหารและพื้นที่ในการเจริญ รวมถึงยังสามารถใช้สารอาหาร และเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasite) นอกจากนี้ เชื้อรา *Trichoderma* ยังสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด และสารที่เชื้อรา *Trichoderma* สร้างขึ้นยังส่งผลดีต่อพืช โดยช่วยในการเจริญเติบโต (plant growth) รวมถึงกระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงต่อการเข้าทำลายของ เชื้อราสาเหตุโรคพืช (plant defence responses) ดังนั้น เชื้อรา *Trichoderma* จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืช โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียแก่พืช เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และช่วยลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช

Trichoderma asperellum *T. harzianum* และ *T. viride* เป็นเชื้อราที่เป็นที่รู้จักใน genus *Trichoderma* และมีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีอย่างแพร่หลาย ซึ่งมีการส่งเสริมให้ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยทั้งทางภาครัฐและเอกชน รวมถึงมีการผลิตเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* ในเชิงการค้า การตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง หากมีการใช้ชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ไม่ถูกต้องหรือไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เช่น เกิดการปนเปื้อน หรือการผสมกันของเชื้อราปฏิชีวนะมากกว่า 1 ชนิด จะส่งผลกระทบต่อผลประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (Druzhinina *et al.*, 2010) ในปัจจุบันมีหลายบริษัทมาขอขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ของ เชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* แต่เนื่องจากลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาเชื้อราใน genus *Trichoderma* นั้นมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย จึงทำให้ยากต่อการจำแนกในระดับสปีชีส์

การจัดจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* สามารถทำได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Rifai, 1969; Bissett, 1984; Bissett, 1991a-c; Bissett, 1992) เช่น รูปร่างลักษณะและขนาดของ conidia สี ลักษณะผิว conidia (ornamentation) ลักษณะการแตกกิ่งก้าน การฟอร์มเส้นใยแบบ sterile หรือ fertile ความยาวที่ยื่นออกมาจากก้านชูสปอร์ แต่ทั้งนี้ ลักษณะความแตกต่างที่มีการรายงานหรือบันทึกไว้ดังกล่าวสามารถใช้แยกความแตกต่างของได้อย่างชัดเจนสำหรับบางสปีชีส์ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ หรือมีความคลุมเครือระหว่าง strain ของบางสปีชีส์ (Singh *et al.*, 2014) เช่น ในเชื้อรา *T. harzianum* ซึ่งมีหลายการศึกษาพบว่า เชื้อราที่ถูกจัดจำแนกว่าเป็น *T. harzianum* มีมากกว่า 1 ชนิด ซึ่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงลักษณะของ cultures นั้นมีความแตกต่าง แต่

เป็นความแตกต่างที่คลุมเครือ และไม่เพียงพอหรือสามารถจัดจำแนก (Muthumeenakshi *et al.*, 1994; Fujimori and Okuda, 1994; Zimand *et al.*, 1994)

ปัจจุบันมีศึกษาการจำแนกและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* โดยใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) กันมากขึ้น โดยส่วนใหญ่ใช้ตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) (Dodd *et al.*, 2000; Kindermann *et al.*, 1998) แต่พบว่าการจำแนกด้วย ITS เพียงหนึ่งตำแหน่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *Trichoderma* บางสปีชีส์ได้ เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* เหล่านี้มีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน มักจะมีความคล้ายคลึงหรือมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก เช่น มีรายงานว่า *T. asperellum* เป็น complex species (มีมากกว่า 1 สปีชีส์ภายใต้ชื่อ *T. asperellum*) และลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของ conidia ไม่สามารถใช้อ้างอิง หรือเปรียบเทียบเพื่อจำแนกชนิดได้ แต่เมื่อใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS) translation elongation factor 1 (*tef1*) RNA polymerase subunit 2 (*rpb2*) and actin (ACT) ในการจำแนก (Samuels and Ismaiel, 2009) พบว่า เชื้อราชนิดนี้ประกอบไปด้วย *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ซึ่งได้รับการบันทึกเป็นอีกสปีชีส์ของเชื้อรา *Trichoderma* (Samuels *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้งสองสปีชีส์นี้มีความใกล้เคียงอย่างมากกับเชื้อรา *T. yunnanense* โดยสามารถแยกความแตกต่างได้โดยเปรียบเทียบข้อมูลของดีเอ็นเอเท่านั้น (Samuels *et al.*, 2010) สำหรับเชื้อรา *T. harzianum* นั้น Chaverri *et al.* (2003) ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางด้านพันธุกรรมจาก 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS *tef1* calmodulin และ actin เชื้อรา *Trichoderma* ที่พบในประเทศอินเดียจำนวนหลายไอโซเลทที่จัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่าเป็น *T. viride* แต่เมื่อใช้ข้อมูลของดีเอ็นเอจากตำแหน่ง ITS และ elongation factor พบว่าเชื้อราเหล่านี้คือเชื้อรา *T. asperellum* หรือ *T. asperelloides* (Sriram *et al.*, 2013) จากการศึกษาลักษณะของ conidia ของเชื้อรา *T. harzianum* พบว่ามีความใกล้เคียงกับ conidia ของเชื้อรา *T. viride* โดยมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของลักษณะ ความหนาแน่น และเฉดสีของ conidia อีกทั้งเชื้อรา *T. viride* ยังมีความใกล้เคียงกับ *T. asperellum* ดังนั้น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ไม่สามารถใช้อ้างอิงเพื่อ จัดจำแนกอย่างชัดเจนได้ (Singh *et al.*, 2014)

การตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. harzianum* และ *T. viride* จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง หากมีการใช้ชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ไม่ถูกต้องหรือไม่ เป็นไปตามวัตถุประสงค์ เช่น เกิดการปนเปื้อน หรือการผสมกันของเชื้อราปฏิปักษ์มากกว่า 1 ชนิด จะส่งผลกระทบต่อผลประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช (Druzhinina *et al.*, 2010)

ในปัจจุบันการจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถบ่งชี้ชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ที่ชัดเจนได้ในระดับ genus แต่ในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ เนื่องจากลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาเชื้อราใน genus ของเชื้อราทั้งสองชนิดนั้นมีความแตกต่าง

เพียงเล็กน้อย จึงทำให้ยากต่อการจำแนกในระดับสปีชีส์ต้องมีการพิจารณาลักษณะทางด้านพันธุกรรม มาร่วมวิเคราะห์ เพื่อป้องกันความแตกต่างและการจัดจำแนกที่ถูกต้อง กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบในการตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ที่ขอขึ้นทะเบียน ดังนั้นจึงดำเนินการวิจัยเพื่อจำแนกชนิดที่ถูกต้องของเชื้อรา *Trichoderma* เพื่อให้ได้ข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. harzianum* และ *T. viride* เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบชนิดเชื้อรา *T. asperellum*, *T. harzianum* และ *T. viride* ที่นำมาขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้การตรวจสอบเพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร รวมถึงประสิทธิภาพและความยั่งยืนในการใช้เชื้อรา *Trichoderma* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช อีกทั้งข้อมูลของลักษณะทางด้านพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษา สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อราดังกล่าวในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร และเพื่อใช้เปรียบเทียบหรือศึกษาความหลากหลาย และการวิวัฒนาการต่อไป

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* ที่ถูกต้อง และเพื่อให้ได้เชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* มาตรฐาน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อราดังกล่าวในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร

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 สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดดูแรน กระจกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate
5. สารเคมี ได้แก่

- Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)
- High fidelity Phusion® DNA Polymerase (New England Biolabs)
- 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 translation elongation factor 1-alpha (tef1)

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. ศึกษาข้อมูลของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride*

รวบรวมข้อมูลสถานะของอนุกรมวิธานของรา *Trichoderma* ให้เป็นปัจจุบัน ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง การจัดจำแนกชนิดของ *Trichoderma* โดยใช้ข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุล

2. เก็บและรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride*

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบราก ตัวอย่างพืช เพื่อแยกหาเชื้อรา *Trichoderma* โดยวิธี soil plate และ dilution plate technique และนำเชื้อรา *Trichoderma* จาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ จากสารชีวภัณฑ์ที่มีขายในท้องตลาดในปัจจุบัน รวมถึงไอโซเลทที่มีการส่งเสริมโดยหน่วยงานของภาครัฐ

แยกตัวอย่างของเชื้อราเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการสกัด DNA และเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยจัดเก็บใน culture collection ของกลุ่ม

วิจัยโรคพืช สำนักวิจัย-พัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ เพื่อใช้ในการศึกษาหรือเป็นตัวอย่างอ้างอิงต่อไป

3. ศึกษา และจำแนกชนิดเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะข้อมูลสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

นาราทที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโคนี้ด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) ศึกษา และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆ ของราที่วัดขนาดไว้

จำแนกชนิดเชื้อรา

เปรียบเทียบลักษณะของรา *Trichoderma* ที่ศึกษากับคู่มือของ Rifai (1969) Bissett (1984) Bissett (1991a-c) และ Bissett (1992)

4. จำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตัดหรือเขี่ยเส้นใยรวมถึง conidia ของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

V9G: TTACGTCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

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 tef1 และ LSU ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix

(biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เตรียม 1% agarose gel และผสม SERVA HiSens Stain G ในอัตราส่วน 1:50,000 ผสมผลิตภัณฑ์ PCR 5 ไมโครลิตร ด้วย loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกับ โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021.0.3 และ บันทึกข้อมูลในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence) แต่ละตำแหน่งมาจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ร่วมกับ type sequences ของแต่ละตำแหน่งได้แก่ ITS และ tef1 จากรายงานศึกษานุกรมวิธานของเชื้อราวงศ์ *Trichoderma* (Samuels and Ismaiel, 2009; Li *et al.*, 2013; Chaverri *et al.*, 2015; Jaklitsch and Voglmayr, 2015; Robbertse *et al.*, 2017) และตรวจสอบการจัดเรียงของชุดข้อมูล (alignment) ด้วยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MAFFT X (Kumar *et al.*, 2018) ใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) เพื่อกรองส่วนที่เป็น ambiguous sequence จากนั้นจัดทำ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง ITS และ tef1 บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจำแนก

จำแนกชนิดของรา *Trichoderma* โดยวิเคราะห์จาก combined dataset ของ ITS และ tef1 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)

การบันทึกข้อมูล

เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราใน Culture Collection ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) ข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ consensus sequences) จะถูกเก็บบันทึกและใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการตรวจสอบสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป จัดเก็บดีเอ็นเอต้นแบบไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma*

การเก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดเชื้อรา *Trichoderma* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างดินมาแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ รวมถึงเชื้อราจาก culture collection เมื่อศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบเชื้อราที่มีลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 74 ไอโซเลท (Figure 1, Table 1) จากการจำแนกชนิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ การเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope พบว่าเชื้อราทั้ง 74 ไอโซเลท สามารถจำแนกเบื้องต้นได้เชื้อรา *T. asperellum* จำนวน 72 ไอโซเลท และเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 2 ไอโซเลท แต่ไม่พบเชื้อรา *T. viride* (Table 1)

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

นำเชื้อรา *T. asperellum* จำนวน 70 ไอโซเลท และเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 2 ไอโซเลท มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation เมื่อเชื้อราเจริญจนมีขนาดโคโลนีประมาณ 6 เซนติเมตร จึงดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของยีนตำแหน่ง ITS, LSU และ *tef1* ด้วยไพรเมอร์ของแต่ละตำแหน่ง ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท MacroGen Korea เพื่อทำ purification และ sequencing

จัดทำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021.0.3 จากนั้นจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ร่วมกับ type sequences โดยใช้ข้อมูลของยีนตำแหน่ง ITS และ tef1 ในการวิเคราะห์เนื่องจากข้อมูลของตำแหน่ง LSU ของ type sequence มีข้อมูลจำกัด โดยข้อมูลที่ใช้มาจากรายงานศึกษานุกรมวิธานของเชื้อราวงศ์ *Trichoderma* (Samuels and Ismaiel, 2009; Li *et al.*, 2013; Chaverri *et al.*, 2015; Jaklitsch and Voglmayr, 2015; Robbertse *et al.*, 2017) (Table 2) จำแนกชนิดของรา *Trichoderma* โดยวิเคราะห์จาก combined dataset ของ ITS-tef1 ของ 322 taxa โดยมี *Protocrea* เป็น outgroup ทำการวิเคราะห์รวม 1,814 bases/taxa มีข้อมูลของแต่ละ partition ดังนี้ ITS = 766 bases และ tef1 = 1,048 bases

เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction พบว่า topology ที่ได้จาก ML และ BI มีความสอดคล้องกัน และเป็น monophyletic (Figure 2) โดย phylogram ที่ได้จาก ML พิจารณาค่า bootstrap support values ($\geq 70\%$) ที่วิเคราะห์จาก 1,000 ซ้ำ และ BI ได้จากค่าเฉลี่ยของ 20,000 converged trees ดังนั้นผลการจัดจำแนกด้วยข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อรา *Trichoderma* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อรากลุ่ม *T. asperellum* ซึ่งมีรายงานว่าเป็น complex species (Samuels and Ismaiel, 2009; Jaklitsch and Voglmayr, 2015) จำนวน 72 ไอโซเลทสามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. asperellum* จำนวน 15 ไอโซเลท และจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. asperelloides* จำนวน 57 ไอโซเลท ซึ่งแต่ละชนิดจัดอยู่ใน clade เดียวกันกับ type sequences ของเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ตามลำดับ (Figure 1 และ Table 2)

ส่วนเชื้อรากลุ่ม *T. harzianum* ซึ่งมีรายงานว่าเป็น complex species (Chaverri *et al.*, 2015; Jaklitsch and Voglmayr, 2015) จำนวน 2 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *T. lentiforme* (M0994) และ *T. lexii* (M0204) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเชื้อราทั้งสองชนิดเมื่อพิจารณาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *T. harzianum* จึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อราทั้งสองไอโซเลทสามารถจำแนกด้วยข้อมูลหรือลักษณะเดิมว่าเป็น *T. harzianum sensu lato* แต่หากพิจารณาจากการจำแนกด้วยข้อมูลเชิงลึกของข้อมูลพันธุกรรม พบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดคือ *T. lentiforme sensu stricto* และ *T. lexii sensu stricto* (Figure 2 และ Table 2) ทั้งนี้จากตัวอย่างที่ทำการศึกษานี้ยังไม่พบไอโซเลทของเชื้อรา *T. harzianum sensu stricto* และ เชื้อรา *T. viride sensu stricto*

อนุกรมวิธานและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Trichoderma* มีดังนี้

Harzianum Clade

Trichoderma lentiforme (Rehm) P. Chaverri, Samuels & F.B. Rocha, *Mycologia* 107 (3): 577 (2015)

Synonymy:

≡ *Hypocrea lentiformis* Rehm, *Hedwigia* 37: 193 (1898)

Classification

Kingdom	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
Class	<i>Sordariomycetes</i>
Subclass	<i>Hypocreomycetidae</i>
Order	<i>Hypocreales</i>
Family	<i>Hypocreaceae</i>
Genus	<i>Trichoderma</i>
Species	<i>lentiforme</i>

Optimum Growth Temperature 25-30 °C

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราสร้างสปอร์น้อยบนอาหาร PDA สร้างสปอร์สีเขียว (Figure 3) เป็นวงชั้น ๆ 1-2 วงบางครั้งพบสปอร์สีเขียวเหลืองบริเวณขอบวงแต่ละชั้น อาจได้กลิ่นหอมหวานอ่อนๆ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และสปอร์จะมีสีเข้มขึ้น ลักษณะของ phialides เป็นแบบ lageniform, obpyriform หรือ obclavate, ความยาวประมาณ (0.9-)1.3-1.9(-3.7) μm กว้างประมาณ 1.0-3.5 μm สปอร์มีลักษณะกลมแบน (2.0-)2.5-3.2 (-3.7) \times (1.7-)2.5-2.7(-3.2) μm ผนังสปอร์ผนังเรียบใส

Accession No.: M0204

หมายเหตุ – เดิมเชื้อรา *T. lentiforme* มีการจำแนกเป็นเชื้อรา *T. harzianum* มาก่อน เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคทางดินโดยชีววิธี (González *et al.*, 2020) โดยเฉพาะโรคทางดิน (Chaverri and Samuels, 2002) และเชื้อรานชนิดนี้ เป็น telemorph ของเชื้อรา *T. harzianum* (Chaverri and Samuels, 2002) และมีรายงานว่าเชื้อรานชนิดนี้สามารถพบได้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และพบได้ในประเทศไทย (Chaverri *et al.*, 2015)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>GAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAAGTGTTCCTCGGCGGGATCTCTG
CCCCGGGTGCGTCGAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACAAAACCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTT
ATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTTCGAAATGAATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC
AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTT
```

AGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACTCGCATCGGGAGCGCG
GCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAATTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>AACGTGGTCGTTATCGTACGTATCATCTGTTCCTCACGTGGCATCATTGCGCGCTTTGATCCTCAAACACTTGTGCTAACTAC
CGTCTTCTAGGGGTGCGTATTCCATCAATCATCTTGAAAGAGATCGATCGAACACAGTACTGACTTGCTACAACAGCCACGTGCGAC
TCCGAAAAGTCGACCACCGTGAGTTACACCCTCTTCTTCGCTCCGACATCAGACATCATTTGGTGCGGGACATCTCTTGAAATACA
GGGCTAACCATTCATCATAACAGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGGCGTGGTATCGACCGTCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGG
TAAGCTTAACTGATTTTCGCTCGATTCTCCCTCAAATTCATTGTGCCGACGATTCTGAAGAGAATTTTCGTGTCGACAATTT
TTCGTACCCCGCTTTCCATTACCCCTCTTTGAGCGACGCAAATTTTTTTTGTGTCTTTTGGTTTTAGTGGGGTTTTCTTGCGA
CCCCACTAGCTCACTGCTTTTTTTTTTTTTGGCTTCACTCTCACTTCCCCGCCATTCAACGTACTCTGTGTCTTTGGTATTGAGC
GATGCTAACCACTTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCGAAGTTCGCAAGGGTTCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAG
GCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTC
TTCTTCATCAACTCATGCTTCAATTGCAAGCCAGTGCTAACAGGCAATCACAGACG

Trichoderma lixii (Pat.) P. Chaverri, *Mycologia* 107 (3): 578 (2015)

Synonymy:

≡ *Hypocrea lixii* Pat., *Revue Mycologique Toulouse* 13 (51): 138 (1891)

Classification

Kingdom	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
Class	<i>Sordariomycetes</i>
Subclass	<i>Hypocreomycetidae</i>
Order	<i>Hypocreales</i>
Family	<i>Hypocreaceae</i>
Genus	<i>Trichoderma</i>
Species	<i>lixii</i>

Optimum Growth Temperature 25-35 °C

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราสร้างสปอร์น้อยบนอาหาร PDA สร้างสปอร์สีเขียวอ่อน (Figure 4) ตรงกลาง
โคโลนี เส้นใยรอบนอกสีใส ไม่มีกลิ่น ลักษณะของ phialides เป็นแบบ ampulliform หรือ
lageniform ความยาวประมาณ 1.0-2.7 µm กว้างประมาณ 2 µm สปอร์มีลักษณะกลมแบน ขนาด
(2.5-)3.0-3.5 (-3.7) x (2.2-)2.5-3.2(-3.5) µm ผนังสปอร์ผนังเรียบ เมื่อแก่สปอร์จะมีสีเข้ม

Accession No.: M0994

หมายเหตุ - เดิมเชื้อรา *T. lixii* มีการจำแนกเป็นเชื้อรา *T. harzianum* มาก่อน เนื่องจากลักษณะทาง
สัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน ลักษณะของเชื้อรา *T. lixii* จะคล้ายกับ *T. harzianum* และ *T. lentiforme*
เชื้อรา *T. lixii* มีรายงานว่าสามารถนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (Chaverri and Samuels,
2002) และ เชื้อราชนิดนี้สามารถพบได้ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Chaverri *et al.*, 2015)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>TAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACCTGT
TGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGACGCCCGGACCAAGGCGCCCGGAGGACCAACCAAACCTCTTTTTGTAT
ACCCCTCGCGGGTTTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGA
TCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCG
TTGGGGATCGGCCCTGCCCTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGC
ACACTCGCATCGGGAGCGGGCGCGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCG
CTGAACTTAAGCATATCAA
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
>CATGTTCTTGATGAAATCACGGTGGCCGGGAGCGTCTGTGAATTGCTTGTAGACTGGCTTGAATCGCTGTGTGAAGTTGATG
GAAAGAACATACCAATGACGGTGACATAGTACTTGGGAGTCTCGAACTTCCACAGCAATGTCGATGGTGATACCACGCTCACGC
TCGGCCTTGAGCTTGTCAAGAACCCCAAGCATACTTGAAGGAACCCCTTCCGAGTTCGGCGGCTTCTATTGATGAAAAAGTGGTTA
GCATCGCTGAAAGTGACGAGACACAGAACACGTTGAATGATGGCTGGGAAGTGAGAGCGAAGCAGAAAAAAGCAGTGAGCTAG
TGGGGGTGCACAAGAAACCCCACTAAAACCAACGACAGCAAAAAATTTTTCGCTCGCTGCAAAGGAGGGGTAATGCAAAGCGGG
GTGATGAAAAATTGTTGACACGAAAATTCTCTGCAGAATTGTCGGGCACAATTGAATGTGGAGGGAGAGTTGGGGCGAAAATGAGT
TGAAGCTTACCTTCTCGAATTCTCGATGGTACGACGGTCGATACCACCGCACTGGTAGATCAAGTGACCGGTCTGTATGATAACT
GGTTAGCCCTGTGTTCAAAGAGTAGATGTCCCGTATCAAACGACGTTTGTATCGGAGCAGGAGAAGAGGGTGCAACTCACGGTGG
TCGACTTTCGGAGTCGACGTGGCTGTTGTAGCAAGTCACTGTGTTTCGATCGATCTCATTCAAGATGATTGATGGAATACGCA
CCCCTAGAAGATGGTAGTTAGCACAAAGTGTGAGAATCAGAGCGGCGACTGATGCCGACGTGAAAGGATAATACGTACGATAACG
ACCACGTTGATGTGAGTCT
```

Trichoderma harzianum Rifai, *Mycological Papers* 116: 38 (1969)

Synonymy:

=*Sporotrichum narcissi* Tochinai & Shimada, *Trans. Sapporo nat. Hist. Soc.*: 124 (1930)

=*Trichoderma nunbergii* Svilv., *ZentBl. Bakt. ParasitKde*, Abt. 2: 135 (1932)

Classification

Kingdom	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
Class	<i>Sordariomycetes</i>
Subclass	<i>Hypocreomycetidae</i>

Order	<i>Hypocreales</i>
Family	<i>Hypocreaceae</i>
Genus	<i>Trichoderma</i>
Species	<i>harzianum</i>

Optimum Growth Temperature 30-35 °C

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราสร้างสปอร์น้อยบนอาหาร PDA สร้างสปอร์สีเขียว (Figure 2) เป็นวงชั้น ๆ บางครั้งพบสปอร์สีเขียวเหลืองบริเวณขอบวงแต่ละชั้น ไม่มีกลิ่น ลักษณะของ phialides เป็นแบบ ampulliform ตรงปลายแคบ ความยาวประมาณ 6.2-7.5 μm กว้างประมาณ 3.2-3.5 μm สปอร์มีลักษณะกลมแบน ขนาด (2.0-2.5-3.0(-3.7) x (2.2-)2.7-3.5(-4.2) μm ผนังสปอร์ผนังเรียบ

Enzyme Production protease chitinase β -1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

Accession No.: neotype CBS 226.95

หมายเหตุ - อ้างอิงจาก type sequence (Mycobank, 2020)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>AF057606_ACCGAATTTAACTCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAAGTNGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTC
GCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCGGAAGACCAACTAAAACCTTATTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTTTTATAATCTGAG
CCTTCTCGGCGCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTCCAACAACGGAATCTCTTGGTTCTGGCATCGATAAAGAA
CCCACAAAATGCAATAAATAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCGCCAGTATTCTG
GCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCTCGAACCCTCCGGGGGTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTAGCGGGTG
GCCGTCTCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCATCGGAGCGCGCGCGTCC
ACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGAT

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>AF348101_CTACAGTGCGGTGGTATCGACCGTCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTCAACTATTTTCGCTCGAT
TCTCCTCCACATTTAATTGTGCCGATAATTCTGCAGAGAATTTTCGTGTGACAATTTTTCATCACCCCGATTGCAATACCCCT
CCTTTGCAGCGACGCAAAATTTTTGGCTGTCGTTTGGTTTTAGTGGGTTTTCTCGTGCACCCCACTAGGTCACTGCTTTTTTCTG
CTTCGCTCTTACTGCCAGCCATCATTCAACGTGCTCTGCGTCTCATCACTTTTCAGCGATGCTAACCACTTTTCCATCAATAGGAAG
CCGCCGAACCTCGGCAAGGTTCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGAC
ATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTCTTTCCATCAACTTCACACAGCGATTACAAG
CCAGTGCTAACAGCAATTCACAGACGCTCCCGCCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGC
GCTATCCTCATCATTGCCCGCGTACTGGTGAG

the Large Subunit (LSU, 28S)

>MH874152_GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCGAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA
TTTGAAATCTGGTCCCTAGGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGTGAGGTGCCGCCGAGTTCCCTGGAACGGGACG

CCACAGAGGGTGAGAGCCCCGCTGGCTGGCCGCCGAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCT
 CAAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCA
 CCTTGAAAAGAGGGTTAAATAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGGGCGCGGCGGATCATCCGGGGT
 TCTCTCCGGTGCACCTTCGCCGCTAGGCCAGCATCAGTTCGTCGCGGGGAAAAAGGCTTCGGGAACGTGGCTCCTCCGGGAG
 TGTTATAGCCCGTTGCATAATACCCTGCGGTGGACTGAGGACCGCGCATCTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCACCAGCGACCCG
 TCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCGTCTTCGTATGCGAGTGTTCGGGTGTCAAACCCCTACGCGTAATGAAAGTGAACGCAGGTGA
 GAGCTTCGGCGCATCATCGACCGATCTGATGTTCTCGGATGGATTTGAGTAAGAGCATAACGGGGCCGGACCCGAAAGAAGGTGA
 ACTATGCCTGTATAGGGTGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGGAGGCTCGCAGCGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATATGGG
 CATGGGGGGCGAAAGACTAATCGAACCTTCTAGTAGCTGGTTCCGCG

Viridae Clade

Trichoderma asperellum Samuels, Lieckf. & Nirenberg, *Sydowia* 51: 81 (1999)

Classification

Kingdom	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
Class	<i>Sordariomycetes</i>
Subclass	<i>Hypocreomycetidae</i>
Order	<i>Hypocreales</i>
Family	<i>Hypocreaceae</i>
Genus	<i>Trichoderma</i>
Species	<i>asperellum</i>

Optimum Growth Temperature 30-35 °C

ลักษณะของเชื้อ บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างสปอร์สีเขียว (Figure 5) เป็นวงชั้น ๆ บริเวณวงแต่ละชั้นจะไม่พบการสร้างสปอร์ ไม่มีกลิ่น ลักษณะของ phialides เป็นแบบ terminated branches และ lageniform ยาว (4.0-)6.2-9.7(-15.2) μm กว้าง (2.5-)3.0-3.5(-5.0) μm สปอร์มีลักษณะกลมแบนหรือกลมรี ขนาด (2.2-)3.0-3.5(-4.7) \times (3.0-)3.5-4.0(-4.7) μm สีเขียว ผนังสปอร์ลักษณะแบบ warty ไม่พบการสร้าง chlamydospores บนอาหาร

Enzyme Production protease chitinase β -1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

Accession No.: M0227, M0228, M0229, M0231, M0572, M0573, M0577, M0578, M0579, M0876, M0877, M0885, M0886, M0929

หมายเหตุ - การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อเสนอแนะที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>GAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACGTTACCAAACGTTGCTCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTGCAGCCCCGGA
 ACCAGGCGCCCGCGGAGGAACCAACAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGACGTATTTCTTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCA
 AAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
 AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAAC
 CCTCGAACCCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGGGTGCCGGCCCTAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG
 CAGCCTCTCTGCGCAGTAGTTTGCACAACCTCGCACGGGAGCGCGCGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTTCTGAAA

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>ATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTCATTTACTGCTTTTCCCATCAATTTTTGGCACAATCATATGCCCGACAATTCTGCTCTCA
 GTTTTGTCTTTTTTCCAGCGTCACCCCGCTTTGCCAGTCTACCTACCCCTCCTTTGGCACAGCAAAAATTTCTGGCTGCCTTG
 TTTGGCTTTAGTGGGGTGTCAAATTTTTGGCAGCAACCCGCTATGCCACTGCACCTCTTCCATACCCACCACATGCTATTTG
 CTAATCGCGTCGTCTTTTTTGTTCATTATGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTCGCAAGGGTTCCTTCAAG
 TATGCGTGGGTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAA
 GACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTGGACTCTTCTCTAGCTATCGACATTCCAAGTCCGCCATTCTAACATGCTCTTCCCA
 CAGACGCTCCCGGTACCCGTGATTTTCAT

the Large Subunit (LSU, 28S)

>CGACCTCCACGTCCGCCTACTCCTCGGGGCATCGTTTCTAGACCGAGGGCGAGGTATGGGTGAGACGCTTGAGCGCCATCCATTT
 TCAGGGCTAGTACATTCGGCAGGTGAGTTGTTACACAGTCCCTAGCGGATTCCGACTTCCATGGCCACCGTCTGCTGTCAAGATG
 TACTAACGCCTTTTGTGGTGTCTGATGAGCGTCTACTCTGGCACCTTAACCTCGGTTCCGGTTCATCCCGCATCGCCAGTTCTGCTT
 ACCAAAAATGGCCCACTAGTGTGATACATTGAATGCCACGTTCAACTAAGTAACAAGGGCTTCTTACATATTTAAAGTTTGAGA
 ATGGATGAAGGCAATATAGCGCCCCGAGTCCCTAATCATTGCTTTACCTCATAAACTGAGCTCAACACTGCTATCCTGAGGGGA
 AACTTCGGCGGAAACAGCTACTAGAAGGTTTCGATTAGTCTTTCCGCCCATGCCCATATTTGACGATCGATTTGCACGTGAGAAC
 CGCTGCGAGCTCCACAGAGTTTCTCTGGCTTACCCTATACAGGCATAGTTACCTTCTTTCCGGTCCGGCCCCGTATGCTCT
 TACTCAAATCCATCCGAGAACATCAGGATCGGTGATGATGCGCCGAAGCTCTCACCTGCGTTCATTTTACGCGTAGGGGTT
 TGACACCCGAACACTCGCATACGAAGACGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTGCTGGTGACATTACGCCAGCATCCTTG
 CAGATGCGCGTCTCAGTCCACCGCAGGGTATTATGCAACGGGTATAACACTCCCGGAGGAGCCAGTTCGCAAGCCTTTTTTC
 CCCCAGCAGAACTGATGCTGGCTGAACGCGCGAAGTGCACCGGAGAGAACCCCGGATGATCCGCCGCGCCAAAGTCTGGTCA
 CAAGCGCTTCCCTTCAACAATTTACGTAAGTCTTTTCAAGGTGCTTTTCATCTTTGATCACTTACTTGTGCGCT
 ATCGGTCTCTGGCAATATTTAGCTTTAGAAGACATATACCTCCATTTTGGAGCAGATTCCAAACTACTCGACTCGTGAAGGAG
 CTTTACAGAGGCTCGGTGGCCAGCCAGACGGGGCTCTACCCTCTGTGGCGTCCCGTCCAGGAACTCGGGCGGCACCTCACCA
 AAAGCATCCTTACAAATTCAACTCGGACCCGAGGGGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTAC

Trichoderma asperelloides Samuels, *Mycologia* 102 (4): 961 (2010)

Classification

Kingdom	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
Class	<i>Sordariomycetes</i>
Subclass	<i>Hypocreomycetidae</i>
Order	<i>Hypocreales</i>
Family	<i>Hypocreaceae</i>

Genus *Trichoderma*
Species *asperelloides*

Optimum Growth Temperature 25-30 °C

ลักษณะของเชื้อ บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างสปอร์สีเขียว (Figure 6) เป็นวงชั้น ๆ บริเวณวงแต่ละชั้นจะไม่พบการสร้างสปอร์ ไม่มีกลิ่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะคล้ายคลึงกับ *T. asperellum* conidiophore ลักษณะยาว ตรงปลายก้านเป็น single phialide หรือเป็นกลุ่มของ phialides 2-4 ที่แยกกันอย่างชัดเจน ลักษณะของ phialides เป็นแบบ flask-shaped และมีลักษณะโป่งพองตรงกลาง ยาว (4.0-)6.2-9.7(-15.2) μm กว้าง (2.5-)3.0-3.5(-5.0) μm สปอร์มีลักษณะกลมแบน หรือกลมรี ขนาด (2.2-)3.0-3.5(-4.7) \times (3.0-)3.5-4.0(-4.7) μm สีเขียว ผนังสปอร์ลักษณะแบบ warty chlamydospores แบบ subglobose มีขนาด (4.5-)7.2-11.2(-15.0) \times (5.0-) 6.5-9.5(-11.0) μm

Enzyme Production protease chitinase β -1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

Accession No.: M0008, M0009, M0010, M0011, M0013, M0097, M0098, M0099, M0100, M0101, M0102, M0103, M0104, M0105, M0106, M0107, M0108, M0109, M0110, M0111, M0112, M0113, M0114, M0115, M0197, M0198, M0199, M0200, M0201, M0202, M0203, M0205, M0230, M0232, M0233, M0279, M0280, M0281, M0282, M0366, M0367, M0427, M0428, M0530, M0570, M0571, M0574, M0576, M0651, M0673, M0745, M0884, M0887, M0930, M0931, M0932, M0995

หมายเหตุ การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อเสนอแนะที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>GTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCG
GCGGGGTACGCCCCGGTGCCTCGCAGCCCCGGAACAGCGCCCGGAGGAACCAACCAAACTTTTCTGTAGTCCCCTCG
CGGACGTATTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATT
CTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTCACCCCTCGAACCCCTCCGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCACACGG
GTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCTCGCAGTAGTTTGCAAACTCGCACCGGGAGCGCGCGCGG
TCCACGTCCGTAACACCCAACTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCA
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
>TAAGCTAATTTCACTGCTTTTCCCATCAATTTTTGGCACAATTATATGCCCGACAATTCTGTTCTCAGTTTTGTCTTTTTTTTTTC
AGCATCACCCGCTTTGCCAGCCTACCTACCCCTCTTTGGCACAGCAAAAATTTCTCGTGCCTTGTGGCTTTTAGTGGGGT
GTCAATTTTTTTGACGGCAACCCCACTATCGCCACTGTACCTCTTTCCATCATCCACCACATGCTATTTGTTCAATCGCATCGTCTA
TTTTCAATATCTCTTGTTCATTATGCTGATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCGAACTCGGCAAGGGTTCCTCAAGTATGCGT
GGGTTCTTGACAAGCTCAAGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTAT
```

GTCACCGTCATTGGTATGTTTTGGACACTTCAGTCGACATTGCAAGATCGTCATTCTAACATACTCTCCCCACAGACGCTCCCGGTC
ACCGTGATTT

the Large Subunit (LSU, 28S)

>CTTCGTCACGACCTCCACGTCGGCCTACTCCTCGGGGCATCGTTTCTACCCCGAGGGCGAGGTATGGGTGAGACGCTTGAGCGCC
ATCCATTTTCAGGGCTAGTACATTGGCAGGTGAGTTGTTACACAGTCCTTAGCGGATTCCGACTTCCATGGCCACCGTCCTGCTG
TCAAGATGTACTAACGCCTTTTGTGGTGTCTGATGAGCGTCTACTCTGGCACCTTAACCTCGCGTTTCGGTTCATCCCCGATCGCCA
GTTCTGCTTACCAAAAATGGCCCACTAGTGTGATACATTGAATGCCACGTTCAACTAAGTAACAAGGGCTTCTTACATATTTAA
AGTTTGAGAATGGATGAAGGCAATATAGCGCCCCGAGTCCCTAATCATTGCTTTACCTCATAAACTGAGCTCAACACTGCTAT
CCTGAGGGAACTTCGGCGGAAACCAGCTACTAGAAGGTTGATTAGTCTTTTCGCCCCATGCCCATATTTGACGATCGATTTGCA
CGTCAGAACCCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCTCTGGCTTACCCTATACAGGCATAGTTCACCTTCTTTTCGGGTCCGGCCCC
GTATGCTCTTACTCAAATCCATCCGAGAACATCAGGATCGGTGATGATGCGCGAAGCTCTCACCTGCGTTCATTTTATTACGC
GTAGGGGTTTGACACCCGAACACTCGCATAACGAAGACGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTGCTGGTGACCATTACGCCA
GCATCCTTGCAGATGCGCGGTCTCAGTCCACCGCAGGTATTATGCAACGGGCTATAAACTCCCGAGGAGCCACGTTCCCGAA
GCCTTTTTCCCCGCGACGAAGTGTGCTGGCTGAACGCGGCGAAGTGACCCGAGAGAAACCCCGATGATCCGCCGCGCCAA
GTCTGGTCACAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAAGTGTGTTTCAAGGTGCTTTTTCATCTTTGATCACTCTAC
TTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCAATATTTAGCTTTAGAAGACATATACCTCCCATTTTGAGCAGCATTCCCAAATACTCGACTCG
TCGAAGGAGCTTTACAGAGGCTCGGTGGCCAGCCAGACGGGGCTCTCACCTCTGTGGCGTCCCGTTCCAGGGAAGTCCGGGCGGC
ACCTCACAAAAGCATCCTCTACAAATTACAACCTCGGACCCGGAGGGGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTCACTCGCC
GTTACTGGGGCA

Trichoderma viride Pers., *Neues Magazin für die Botanik* 1: 92 (1794)

Synonymy:

=*Pyrenium lignorum* Tode, *Fungi Mecklenburgenses Selecti* 1: 33, tab. 3, fig. 29
(1790)

=*Trichoderma glaucum* E.V. Abbott, *Iowa State College Journal of Science*: 27
(1927)

=*Hypocrea rufa* (Pers.) Fr., *Summa vegetabilium Scandinaviae* 2: 383 (1849)

Classification

Kingdom	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
Class	<i>Sordariomycetes</i>
Subclass	<i>Hypocreomycetidae</i>
Order	<i>Hypocreales</i>
Family	<i>Hypocreaceae</i>
Genus	<i>Trichoderma</i>
Species	<i>viride</i>

Optimum Growth Temperature 25-30 °C

ลักษณะของเชื้อ บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างสปอร์สีเขียว บางครั้งพบว่าเชื้อสร้างกลิ่นคล้ายกลิ่นของมะพร้าว สปอร์มักพบสร้างกระจุกอยู่ตรงกลางโคโลนี ขนาดประมาณ 1-4 mm (Figure 4) ลักษณะของ phialides เป็นแบบ lageniform มักพองตรงกลาง ลักษณะตรง ปลายแบบตะขอ ยาว (5.0-)6.5-11(-18) μm กว้าง (1.5-)2.5-3.5(-4.0) μm สปอร์มีลักษณะกลมแบน ขนาด (2.7-)3.2-4.2(-5.0) x (3.0-)3.5-4.5(-5.5) μm สีเขียว ผนังสปอร์ลักษณะแบบ warty

Enzyme Production protease chitinase β -1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

Accession No.: epitype CBS 119325

หมายเหตุ - อ้างอิงจาก type sequence (Mycobank, 2020)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>NR138441_GAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACCATAACAACTGTTGCCTCGGCGGGTCACGCC
CCGGGTGCGTCGAGCCCCGGGAACAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTTT
ACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGAGCGAAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGC
CTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGTCGCGCTTGGGGACTTCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCC
CCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCATGCGAGTAGTTTGCACAACTCGCACGGGAGCGCGGCGCTCCACGTCC
GTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAG
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
>DQ672615_CATTTCTGCTTTTTCACTACGCTTCTGGCCCAATCGTGCCGACAATTCTGTTCTCAGTCTTGTCACTTTGCCC
TCGCAGCATCACACCCCGCTTTGCCTGCTTACCCCTCATTTTGACAGCAAAAATTTCTGGCTGCTTATTTGGCTCTGAGTGG
GGTGCCAACTTTTGTGGCAGCGACCCGCTATGCCACTGTCCCTCATCCATCGTCCCAACACATTGTGCTCATTCAATCGCATC
GCTTTTTGCCTCAATTCCTTTGGGTTTATTGTGCTGATCATGTTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCAAGGGTCTTTCA
AGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCC
AGATACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTGGTCCCTCAATGACATTTGCCATCATCATTCTAACGTGCCACTCTGCAGACGC
TCCCGGCCACCGTGATTTTCAAGAACATGATCACTGTTACCTCCAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGTTACTG
GTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCAGCTCTGCTCGCCTACACCCTGGGTGTCAAGCAGCTCATC
GTTGCCATCAACAAGATGGACTGCAACTGGGCGGAGGCTGTTACCTTGAGATCATCAAGGAGACCTCCAACCTCATCAAGAA
GGTCGGCTTCAACCCCAAGACCGTTGCCTTCGTCATCTCCGCTTCAACGGCGACAACATGTTGGCCGCTCCTCCAACCTGCC
CCTGGTACAAGGGCTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGCAAGTCCACCGCAAGACCCTTCTCGAGGCCATTGACGCCATTGAGCC
CCCCAAGCGTCCCACAGACAAGCCCTCCGCTCTGCCCTTACAGGATGTTTACAAGATCGGTGGTATTGGAACAGTCCCTGTCCGGCC
GTATCGAGACTGGTATCCTCAAGCCCGGTATGGTCGTTACCTTCGCTCCCGCAACGTCAACACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATG
CACCACGAGCAGCTCGTTGAGGGTGTCCCGGTGACAACGTTGGATTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAGGATATCCGCCGTGG
AAACGTTGCCGGTACTCCAAGAACGACCCTCCATGGCTGCCGCTTCTTCAACGCCAGGTCATTGTCATGAACCACCTGGCC
AGTTCGGTGGCGGATACGCTCCCTGCTCA
```

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาครั้งนี้ ได้ชนิดที่ถูกต้อง รายละเอียดลักษณะทางสัณฐานวิทยา และดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Trichoderma asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme*, *T. lexii*, *T. harzianum* และ *T. viride* จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS), the translation elongation factor 1-alpha (tef1) และ the Large Subunit (LSU, 28S) และยังได้ไอโซเลทของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme* และ *T. lexii* เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบชนิดที่ถูกต้องของเชื้อรา *Trichoderma* และ *Chaetomium* ที่มีการขอขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์เชื้อราโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร อีกทั้งข้อมูลชนิดที่ถูกต้องลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลพันธุกรรม ที่ได้จากการศึกษาเป็นประโยชน์ทางการศึกษาในหน่วยงานราชการ เช่น กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สถาบันการศึกษา และหน่วยงานเอกชน ซึ่งจะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* ในประเทศไทย รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลและองค์ความรู้เพื่อใช้ในการต่อยอดงานวิจัยวิจัย เช่น การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะเพื่อการตรวจสอบชนิดที่แม่นยำและรวดเร็ว

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะใช้เป็นฐานข้อมูล และองค์ความรู้เพื่อใช้ในการต่อยอดงานวิจัย โดยข้อมูลและผลที่ได้จากการวิจัย จะทำให้ได้วิธีการจัดจำแนก และชนิดที่ถูกต้องรวมทั้งข้อมูลลักษณะทางด้านพันธุกรรม เช่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานของเชื้อรา *T. asperellum*, *T. asperelloides*, *T. lentiforme*, *T. lexii*, *T. harzianum* และ *T. viride* เพื่อใช้เปรียบเทียบและตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเชื้อราในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร โดยจะช่วยลดความเสี่ยงในการใช้ชนิดของสารชีวภัณฑ์ที่ไม่ถูกต้องหรือไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสมาชิก กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany* 62: 924-931.
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69: 2357-2372.

- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany* 69: 2373-2417.
- Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany* 69: 2418-2420.
- Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. *Canadian Journal of Botany* 70: 639-641.
- Brotman, Y., Kapuganti, J.G. and A. Viterbo. 2010. *Trichoderma*. *Current Biology* 20: R390-R391.
- Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- Chaverri, P., F. Branco-Rocha, W. Jaklitsch, R. Gazis, T. Degenkolb and G.J. Samuels. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* 107: 558-590.
- Chaverri, P., L.A. Castlebury, G.J. Samuels and D.M. Geiser. 2003. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum/Hypocrea lixii* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 302-313.
- Chaverri, P. and G.J. Samuels. 2002. *Hypocrea lixii*. Pat., the teleomorph of *Trichoderma harzianum* Rifai. *Mycological Progress* 1: 283-286.
- Dodd, S.L., R.N. Crowhurst, A.G. Rodrigo, G.J. Samuels, R.A. Hill and A. Stewart. 2000. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research* 104: 23-34.
- 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.
- Druzhinina, I.S., C.P. Kubicek, M. Komon-Zelazowska, T.B. Mulaw and J. Bissett. 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC evolutionary biology* 10: 1-14.
- Fujiimori, F. and T. Okuda. 1994. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. I. Fungi. *Journal of antibiotics* 47: 173-182.
- González, V., E. Armijos and A. Garcés-Claver. 2020. Fungal endophytes as biocontrol agents against the main soil-borne. *Agronomy* 10: 1-20. doi.org/10.3390/agronomy10060820.

- Hermosa, M.R., I. Grondona, E.A. Iturriaga, J.M. Diaz-Minguez, C. Castro, E. Monte and I. Garcia-Acha. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1890- 1898.
- 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.
- Jaklitsch, W.M. and H. Voglmayr. 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology* 80: 1-87.
- John, R.P., R.D. Tyagi, D. Prévost, S.K. Brar, S. Pouleur and R.Y. Surampalli. 2010. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. *Crop Protection* 29: 1452-1459.
- 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.
- Kamala, Th., S.I. Devi, K.C. Sharma and K. Kennedy. 2015. Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma biodiversity hot spot region with special reference to manipur. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 285261, 21 pages.
- Kindermann, J., Y. El-Ayouti, G.J. Samuels and C.P. Kubicek. 1998. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genetics and Biology* 24: 298-309.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Li, Q., P. Tan, Y. Jiang, K.D. Hyde, E.H.C. McKenzie, A.H. Bahkali, J. Kang and Y. Wanf. 2013. A novel *Trichoderma* species isolated from soil in Guizhou, *T. guizhouense*. *Mycological Progress* 12: 167-172.
- Liu, K.L., A. Porras-Alfaro, C.R. Kuske, S.A. Eichorst and G. Xie. 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1523-1533.

- Mbarga, J.B., G.M. Ten Hoopen, J. Kuate, A. Adiobo, M.E.L. Ngonkeu, Z. Ambang, A. Akoa, P.R. Tondje and B.A.D. Begoude. 2012. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection* 36: 18-22.
- Muthumeenakshi, S., P.R. Mills, A.E. Brownd and D.A. Seaby. 1994. Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology* 140: 769-777.
- Mycobank. 2020. *Hypocercaceae*. (Online). Available. <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search> (February 18, 2021).
- Nylander, J.A., J.C. Wilgenbusch, D.L. Warren 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.
- 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.
- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-116.
- Robbertse, B. P.K. Strobe, P. Chaverri, R. Gazis, S. Ciufu, M. Domrachev and C.L. Schoch. 2017 Improving taxonomic accuracy for fungi in public sequence databases: applying 'one name one species' in well-defined genera with *Trichoderma/Hypocrea* as a test case. *Database* 1-14. doi:10.1093/database/bax072.
- Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Samuels, G.J., S.L. Dodd, W. Gams, L.A. Castlebury and O. Petrini. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146-170.
- Samuels, G.J., S.L. Dodd, B. Lu, O. Petrini, H.J. Schroers and I.S. Druzhinina. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology* 56: 67-133.
- Samuels, G.J. and A. Ismaiel. 2009. *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtia*: Two new *T. hamatum*-like species. *Mycologia* 101: 142-156.
- Samuels, G.J., A. Ismaiel, M. Bon, S.D. Respini, and O. Petrini. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* 102: 944-966.

- de los Santos-Villalobos, S., D.A. Guzmán-Ortiz, M.A. Gómez-Lim, J.P. Délano-Frier, S. de-Folter, P. Sánchez-García and J.J. Peña-Cabriales. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biological Control* 64: 37-44.
- Singh, A., M. Shahid and M. Srivastava. 2014. Phylogenetic relationship of *Trichoderma asperellum* Tasp/8940 using Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. *International Journal of Advanced Research* 2: 979-986.
- Sriram, S., M.J. Savitha, H.S. Rohini and S.K. Jalali. 2013. The most widely used fungal antagonist for plant disease management in India, *Trichoderma viride* is *Trichoderma asperellum* as confirmed by oligonucleotide barcode and morphological characters. *Current Science* 104: 1332-1340.
- 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.
- Thines, M., T. Aoki, P.W. Crous, K.D. Hyde, R. Lücking, E. Malosso, T. W. May, A.N. Miller, S.A. Redhead, A.M. Yurkov and D.L. Hawksworth. 2020. Setting scientific names at all taxonomic ranks in italics facilitates their quick recognition in scientific papers. *IMA Fungus* 11: 1-5.
- 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.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, R. Marra, S.L. Woo and M. Lorito. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1-10.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp.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.
- Zimand, G., L. Valinsky, Y. Elad, I. Chet and S. Manulis. 1994. Use of the RAPD procedure for the identification of *Trichoderma* strains. *Mycological Research* 98: 531-534.

Table 1 List of specimens observed on this study.

Voucher No.	Complex	<i>Trichoderma</i>	Sources	Locations
M0008	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Tak Fha, Nakhon Sawan
M0009	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Ban Rai, Uthai Thani
M0010	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Pak Chong, Nakhon Ratchasima
M0011	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Na Yaiarm, Chanthaburi
M0013	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil	Mae Tang, Chiangmai
M0097	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil	Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom
M0098	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil	San Sai, Chiangmai
M0099	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil	Tha Chana, Surat Thani
M0100	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0101	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0102	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil	Maejo, San Sai, Chiangmai
M0103	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0104	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Bang Yai, Nonthaburi
M0105	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0106	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0107	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0108	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0109	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0110	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0111	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Koh Samui, Suratthani
M0112	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Pak Chong, Nakhon Ratchasima
M0113	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Mae Saluai, Chiangrai
M0114	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Lad Yao, Nakhon Sawan
M0115	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Na Yaiarm, Chanthaburi
M0197	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Na Yaiarm, Chanthaburi
M0198	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Nakhon Sawan
M0199	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0200	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0201	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0202	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0203	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0204	<i>T. harzianum</i>	<i>T. lentiforme</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0205	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0227	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	soil surround roots	Thamai, Chanthaburi
M0228	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	soil surround roots	Na Yaiarm, Chanthaburi

Table 1 List of specimens observed on this study. (Continued)

Voucher No.	complex	<i>Trichoderma</i>	Sources	Locations
M0229	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	soil surround roots	Na Yaiarm, Chanthaburi
M0230	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Tha Muang, Kanchanaburi
M0231	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	soil surround roots	Klongnoi, Surat Thani
M0232	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Klongnoi, Surat Thani
M0233	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Plant Pathology Research Group
M0279	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0280	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0281	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0282	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0366	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	San Kam Pang, Chiangmai
M0367	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Doi Sa Ket, Chiangmai
M0427	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Mueang, Nong Khai
M0428	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Mueang, Nong Khai
M0530	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0570	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0571	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Chiang Khong, Chiangrai
M0572	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0573	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0574	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0575	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0576	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0577	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0578	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0579	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	soil surround roots	Phaya Mengrai, Chiangrai
M0651	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0673	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0745	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0876	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0877	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0884	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0885	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0886	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0887	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group

Table 1 List of specimens observed on this study. (Continued)

Voucher No.	complex	<i>Trichoderma</i>	Sources	Locations
M0929	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperellum</i>	soil surround roots	Pichai, Uttaradit
M0930	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Tha Muang, Kanchanaburi
M0931	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Tha Yang, Petchaburi
M0932	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	soil surround roots	Mueang, Chanthaburi
M0994	<i>T. harzianum</i>	<i>T. lixii</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group
M0995	<i>T. asperellum</i>	<i>T. asperelloides</i>	DOA culture collection	Plant Pathology Research Group

Table 2 List of *Trichoderma* included in this study.

<i>Trichoderma</i>	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
<i>T. aeroaquaticum</i>	Viride	BCC 36135, NBRC 108034	NR134333	AB646530
<i>T. aeruginum</i>	Green	CBS 120541	NR134379	FJ860608
<i>T. aethiopicum</i>	Longibrachiatum	CBS 130628	MH865819	EU401616
<i>T. afarasin</i>	Harzianum/H complex	CBS 130755	NR137301	AF348093
	Harzianum/H complex	GJS 06-98	FJ442630	FJ463327
<i>T. afroharzianum</i>	Harzianum/H complex	GJS 04-186, CBS 124620	NR137304	FJ463301
<i>T. aggressivum f. aggressivum</i>	Harzianum	DAOM 222156, IMI 393971	NR137299	AF348098
<i>T. aggressivum f. europaeum</i>	Harzianum	CBS 100526	NR145035	FJ467645
<i>T. alni</i>	Harzianum	CBS 120623	NR134375	EU498312
<i>T. alutaceum</i>	Polysporum	CBS 120535	NR134382	FJ179567
<i>T. americanum</i>	Hypocreanum	GJS 96-191	DQ835411	DQ835435
<i>T. andinense</i>	Longibrachiatum	CBS 345.97, GJS 90-140	MH549084	AY956321
<i>T. appalachense</i>	Viride	GJS 97-243, CBS 133558	NR134340	DQ307502
<i>T. applanatum</i>	Hypocreanum	CGMCC 3.17526, 7792	KJ783291	KJ634759
<i>T. arundinaceum</i>	Brevicompectum	CBS 119575, ATCC 90237	DQ080074	EU338291
<i>T. asperelloides</i>	Viride	CBS 125938, GJS 04-116 (pT)	GU198301	GU248412
	Viride	M0008	this study	this study
	Viride	M0009	this study	this study
	Viride	M0010	this study	this study
	Viride	M0011	this study	this study
	Viride	M0013	this study	this study
	Viride	M0097	this study	this study
	Viride	M0098	this study	this study
	Viride	M0099	this study	this study
	Viride	M0100	this study	this study
	Viride	M0101	this study	this study
	Viride	M0102	this study	this study
	Viride	M0103	this study	this study
	Viride	M0104	this study	this study
	Viride	M0105	this study	this study
	Viride	M0106	this study	this study

Table 2 List of *Trichoderma* included in this study. (Continued)

<i>Trichoderma</i>	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
<i>T. asperelloides</i>	Viride	M0107	this study	this study
	Viride	M0108	this study	this study
	Viride	M0109	this study	this study
	Viride	M0110	this study	this study
	Viride	M0111	this study	this study
	Viride	M0112	this study	this study
	Viride	M0113	this study	this study
	Viride	M0114	this study	this study
	Viride	M0115	this study	this study
	Viride	M0197	this study	this study
	Viride	M0198	this study	this study
	Viride	M0199	this study	this study
	Viride	M0200	this study	this study
	Viride	M0201	this study	this study
	Viride	M0202	this study	this study
	Viride	M0203	this study	this study
	Viride	M0205	this study	this study
	Viride	M0230	this study	this study
	Viride	M0232	this study	this study
	Viride	M0233	this study	this study
	Viride	M0279	this study	this study
	Viride	M0280	this study	this study
	Viride	M0281	this study	this study
	Viride	M0282	this study	this study
	Viride	M0366	this study	this study
	Viride	M0367	this study	this study
	Viride	M0427	this study	this study
	Viride	M0428	this study	this study
	Viride	M0530	this study	this study
	Viride	M0570	this study	this study
	Viride	M0571	this study	this study
	Viride	M0574	this study	this study
	Viride	M0576	this study	this study
	Viride	M0673	this study	this study
	Viride	M0745	this study	this study
	Viride	M0884	this study	this study
Viride	M0887	this study	this study	
Viride	M0930	this study	this study	
Viride	M0931	this study	this study	
Viride	M0932	this study	this study	
Viride	M0995	this study	this study	
<i>T. asperellum</i>	Viride	CBS 433.97, ATCC 204424	AY380912	AF456907

Table 2 List of *Trichoderma* included in this study. (Continued)

<i>Trichoderma</i>	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
<i>T. asperellum</i>	Viride	CGMCC 6422	KF425754	KF425756
	Viride	M0227	this study	this study
	Viride	M0228	this study	this study
	Viride	M0229	this study	this study
	Viride	M0231	this study	this study
	Viride	M0572	this study	this study
	Viride	M0573	this study	this study
	Viride	M0575	this study	this study
	Viride	M0577	this study	this study
	Viride	M0578	this study	this study
	Viride	M0579	this study	this study
	Viride	M0876	this study	this study
	Viride	M0877	this study	this study
	Viride	M0885	this study	this study
	Viride	M0929	this study	this study
<i>T. atlanticum</i>	Polysporum	CBS 120632	NR134397	FJ860649
<i>T. atrobrunneum</i>	Harzianum/H complex	GJS 92-110, CBS 548.92	NR137298	AF443942
<i>T. atrogelatinosum</i>	Harzianum	CBS 237.63	AF400751	KJ871083
<i>T. atroviride</i>	Viride	CBS 142.95	MH862505	AF456887
<i>T. auranteffusum</i>	Brevicompactum	CBS 119284	NR134383	FJ860613
<i>T. aureoviride</i>	Green	CBS 120536, C.P.K. 2848	NR144877	-
	Green	CBS 245.63	MH858276	AF534575
<i>T. austriacum</i>	Hypocreanum	CBS 122494	NR134384	FJ860619
<i>T. austrokonigii</i>	Viride	CBS 119092, BPI GJS 99-146	NR134364	DQ307561
<i>T. avellaneum</i>	Basal	CBS 121667, CTR 77-155	DQ020000	AY225857
<i>T. balearicum</i>	Psychrophilum	CBS 133222, S402, WU 33371	-	KJ665434
<i>T. bannaense</i>	Harzianum/H complex	HMAS 248840	NR154570	KY688037
<i>T. barbatum</i>	Stromaticum	CBS 125733, BPI GJS 04-308	NR134430	HQ342223
<i>T. bavaricum</i>	Polysporum	CBS 120538	NR134385	FJ860620
<i>T. bissettii</i>	Longibrachiatum	CBS 137447, UTHSC 08-2443	NR134442	HG931266
<i>T. brevicompactum</i>	Brevicompactum	CBS 109720, GJS 04-381	DQ000635	EU338299
<i>T. britannicum</i>	Green	CBS 253.62, SB1	NR160088	KF134796
<i>T. britaniae</i>	Longibrachiatum	WU 31610	NR138454	JQ685865
<i>T. brunneoviride</i>	Harzianum	CBS 121130	NR134376	EU498316
<i>T. caerulescens</i>	Viride	CBS 130011, S195	NR134432	JN715621
<i>T. caesareum</i>	Stromaticum	CBS 124369, BPI GJS 01-225	NR134427	HQ342216
<i>T. calamagrostidis</i>	Psychrophilum	CBS 121133	NR134386	FJ860622
<i>T. camerunense</i>	Harzianum/H complex	GJS 99-230, CBS 138272	NR137300	AF348107
<i>T. capillare</i>	Longibrachiatum	CBS 130629	-	JN182283
	Longibrachiatum	SFC 101151	MF185967	MF185944
<i>T. caribbaeum</i> var. <i>caribbaeum</i>	Viride	GJS 97-3, CBS 119093	NR166015	DQ284977
<i>T. caribbaeum</i> var. <i>aequatoriale</i>	Viride	DIS 320c, CBS 119055	DQ323436	DQ289010

Table 2 List of *Trichoderma* included in this study. (Continued)

<i>Trichoderma</i>	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
<i>T. catoptron</i>	Harzianum	BPI 843645, CBS 114232	NR134348	AY737726
<i>T. ceciliae</i>	Lone lineage	CBS 130010	NR160253	KJ665444
<i>T. ceraceum</i>	Green	CBS 114245, DAOM 232831, ATCC MYA-3222, GJS 95-159	EU330953	AY937437
<i>T. ceramicum</i>	Harzianum	GJS 88-70, CBS 114576	NR134388	FJ860628
<i>T. cerebriforme comb. nov</i>	Viride	GJS85-245, CBS 139045	NR134447	KP109824
<i>T. cerinum</i>	Harzianum	DAOM 230012	NR111835	AY605802
<i>T. chlamydosporicum</i>	Green	HMAS 248850	NR154577	KY688052
<i>T. chlorosporum</i>	Green	GJS 88-33, CBS 114231	MH862958	KJ871143
<i>T. christiani</i>	Harzianum	CBS 132572	-	KJ665438
<i>T. chromospermum</i>	Green	CBS 114577, BPI 749362	NR138432	AY391974
<i>T. cinnamomeum</i>	Harzianum	CBS 114235, BPI 745554	NR144871	KJ871252
<i>T. citrinoviride</i>	Longibrachiatum	DAOM 172792	NR077178	AY865637
<i>T. citrinum</i>	Hypocreanum	CBS 894.85	NR134368	DQ835481
<i>T. compactum</i>	Harzianum	CBS 121218	NR138435	KF134798
<i>T. composticola</i>	Viride	CBS 133497	-	KC285631
	Viride	CBS 439.95	DQ315439	AY937413
<i>T. costaricense</i>	Green	P.C. 21, INB 0003527695	NR134345	AY391980
<i>T. crassum</i>	Green	DAOM 164916, CBS 336.93	NR134370	EU280048
<i>T. cremeoides</i>	Green	CBS 131486, WU 33300	-	KJ665456
<i>T. cremeum</i>	Green	GJS 91-125, CBS 111146	AY737760	AY737736
<i>T. croceum</i>	Polysporum	DAOM 167068, CBS 337.93	DQ083026	AY750879
<i>T. crystalligenum</i>	Psychrophilum	CBS 118980	NR134365	DQ345342
<i>T. dacrymycellum</i>	Harzianum	WU 29042, WU 29044	FJ860749	FJ860633
<i>T. danicum</i>	Green	CBS 121273	NR134389	FJ860634
<i>T. delicatulum</i>	Basal	CBS 120631	FJ860751	FJ860636
<i>T. deliquescens</i>	Deliquescens	CBS 121131	NR134394	FJ860644
<i>T. dingleyae</i>	Viride	CBS 119056	NR138443	AF348117
<i>T. dorotheae</i>	Viride	GJS 99-202, CBS 119089	NR166014	DQ307536
<i>T. effusum</i>	Longibrachiatum	DAOM 230007	DQ083008	AY937419
<i>T. eijii</i>	Viride	TUFC 100002, CBS 133190	NR144879	JX684011
<i>T. endophyticum</i>	Harzianum/H complex	CBS 130729, DIS 217a	FJ442243	FJ463319
<i>T. epimyces</i>	Harzianum	CBS 120524	NR134377	EU498320
<i>T. estonicum</i>	Green	GJS 96-129, CBS 111147	AY737767	AY737733
<i>T. europaeum</i>	Polysporum	CBS 121276, WU 29250	-	FJ179574
<i>T. euskadiense</i>	Longibrachiatum	CBS 130013	NR160254	KJ665492
<i>T. evansii</i>	Viride	CBS 123079, DIS 341HI	NR138449	EU883566
<i>T. fertile</i>	Semiorbis	DAOM 167161	NR134336	AY605801
<i>T. flagellatum</i>	Longibrachiatum	CBS 130626	MH865822	FJ763149
<i>T. flaviconidium</i>	Viride	Lost, GJS 99-51	DQ023301	AY665710
<i>T. flavofuscum</i>	Green	CBS 248.59	AF398492	AF401020
<i>T. floccosum</i>	Stromaticum	GJS 01-238, CBS 124372	NR137306	HQ342218

Table 2 List of *Trichoderma* included in this study. (Continued)

<i>Trichoderma</i>	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
<i>T. foliicola</i>	Polysporum	CBS 130008	NR134434	JQ685862
<i>T. fomiticola</i>	Semiorbis	CBS 121136	NR134391	FJ860639
<i>T. gamsii</i>	Viride	GJS 04-09, BPI 872183	NR131317	DQ307541
<i>T. ghanense</i>	Longibrachiatum	ATCC 208858, IAM 13109	NR120299	AY937423
<i>T. gillesii</i>	Longibrachiatum	CBS 130435	-	JN175583
<i>T. gliocladium</i>	Green	CBS 130009	NR160252	KJ665502
<i>T. gracile</i>	Longibrachiatum	CBS 130714, GJS 10-263, BPI 882295	-	JN175598
<i>T. guizhouense</i>	Harzianum/H complex	HGUP 0038, CBS 131803	JN191311	JN215484
<i>T. hainanense</i>	Green	HMAS 248837, CGMCC 3.18392	NR154568	KY688033
<i>T. hamatum</i>	Viride	DAOM 167057	NR134371	AF456911
<i>T. harzianum</i>	Harzianum/H complex	CBS 226.95	AF057606	AF348101
	Harzianum/H complex	GJS 05-107	FJ442679	FJ463329
<i>T. hausknechtii</i>	Harzianum	CBS 133493	-	KJ665515
<i>T. hebeiense</i>	Stromaticum	HMAS 248743	NR153278	KX344434
<i>T. helicolixii</i>	Green	CBS 133499	-	KJ665517
<i>T. helicum</i>	Helicum	ATCC MYA-4845	NR153213	EU280055
<i>T. hispanicum</i>	Viride	CBS 130540, S453	NR138451	JN715659
<i>T. hunua</i>	Semiorbis	CBS 238.63	NR160091	KJ665519
<i>T. hunanense</i>	Green	HMAS 248841, CGMCC 3.18395	NR154571	KY688039
<i>T. inhamatum</i>	Harzianum/H complex	CBS 273.78	NR134378	AF348099
<i>T. intricatum</i>	Viride	GJS 97-88, CBS 119059	NR134343	AY376060
<i>T. istrianum</i>	Viride	CBS 130539	-	KJ665522
<i>T. italicum</i>	Harzianum	CBS 132567	-	KJ665525
<i>T. ivoriense</i>	Stromaticum	CBS 125734	NR134428	HQ342217
<i>T. junci</i>	Viride	CBS 120926	NR134392	FJ860641
<i>T. konilangbra</i>	Longibrachiatum	GJS 96-145, CBS 100808	MH862712	JN258681
<i>T. koningii</i>	Viride	CBS 457.96, ATCC 64262	NR138456	AY376046
	Viride	GJS 90-18	DQ323409	DQ289007
<i>T. koningiopsis</i>	Viride	CBS 119075	NR131281	AF456910
<i>T. kunigamense</i>	Longibrachiatum	TAMA 0193, NBRC 109640	NR134334	AB807645
<i>T. lacuwombatense</i>	Polysporum	CBS 122668, GJS 99-198	NR134356	KJ665547
<i>T. lanuginosum</i>	Stromaticum	CBS 125718, GJS 01-176	NR134429	HQ342221
<i>T. leguminosarum</i>	aff. Longibrachiatum	CBS 130014	-	KJ665551
<i>T. lentiforme</i>	Harzianum/H complex	GJS 98-6, CBS 100542	NR144868	AF469195
	Harzianum/H complex	M0204	this study	this study
<i>T. leucopus</i>	Polysporum	CBS 122499	NR134393	FJ179571
<i>T. lieckfeldtia</i>	Viride	CBS 123049	NR138438	EU856326
<i>T. lixii</i>	Harzianum/H complex	CBS 110080, ATCC MYA-2478	NR131264	AF443938
	Harzianum/H complex	M0994	this study	this study
<i>T. longibrachiatum</i>	Longibrachiatum	CBS 816.68, ATCC 18648	NR120298	AY865640
<i>T. longipile</i>	Green	DAOM 177227-1a	NR134354	AF534622

Table 2 List of *Trichoderma* included in this study. (Continued)

<i>Trichoderma</i>	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
<i>T. longisporum</i>	Green	HMAS 248843, CGMCC 3.18397	NR154573	KY688043
<i>T. luteffusum</i>	Polysporum	CBS 120537	NR134395	FJ860645
<i>T. luteocrystallinum</i>	Deliquescens	CBS 123828	NR134396	FJ860646
<i>T. margaretense</i>	Brevicomactum	CBS 120540	NR134387	FJ860625
<i>T. martiale</i>	Viride	CBS 123052, GJS 04-40	NR134363	EU248618
<i>T. mediterraneum</i>	Polysporum	CBS 136459	-	KJ665568
<i>T. medusae</i>	Stromaticum	CBS 125719, BPI GJS 01-171	NR134426	HQ342214
<i>T. megalocitrinum</i>	Psychrophilum	B.E.O. 00-09	DQ835511	AY225855
<i>T. melanomagnum</i>	Deliquescens	GJS 99-153, BPI 843663	NR134351	AY737751
<i>T. microcitrinum</i>	Hypocreanum	BPI 1112833	NR138445	DQ835449
<i>T. mienum</i>	Semiorbis	TUFC 61533, CBS 132690	NR134433	JQ621978
<i>T. minutisporum</i>	Polysporum	DAOM 167069	NR111192	KJ665612
<i>T. moravicum</i>	Semiorbis	CBS 120539	NR134398	FJ860651
<i>T. neocrassum</i>	Green	CBS 114230, GJS 01-227	-	JN133572
<i>T. neokoningii</i>	Viride	CBS 120070	NR138446	KJ665620
<i>T. neorufoides</i>	Viride	CBS 119506	NR134399	FJ860553
<i>T. neorufum</i>	Viride	CBS 111144	NR077132	FJ860653
<i>T. neosinense</i>	Viride	CBS 134884, GJS 94-11	NR134362	KJ665624
<i>T. neotropiale</i>	Harzianum/H complex	GJS 11-185, CBS 130633	MH865818	FJ967803
<i>T. nothescens</i>	Viride	CBS 134882	NR138440	DQ307512
<i>T. novae-zelandiae</i>	Longibrachiatum	CBS 639.92, G.J.S 81-265	NR111193	AY865639
<i>T. nybergianum</i>	Polysporum	CBS 122500	NR134400	FJ179575
<i>T. oblongisporum</i>	Semiorbis	DAOM 176226, CBS 343.93	MH862412	AY750884
<i>T. ochroleucum</i>	Viride	CBS 119502	NR134401	FJ860659
<i>T. olivascens</i>	Viride	CBS 132574, CBS 119322	DQ677650	KC285624
<i>T. orientale</i>	Longibrachiatum	CBS 130428, GJS 88-81	NR111317	EU401581
<i>T. oligosporum</i>	Psychrophilum	HMAS 245079, CGMCC 3.17527	NR134444	KJ634764
<i>T. ovalisporum</i>	Viride	CBS 133299	NR134342	AY376037
<i>T. pachypallidum</i>	Polysporum	CBS 122126	NR134402	FJ860662
<i>T. parapiluliferum</i>	Polysporum	CBS 112771, BPI GJS 91-60	NR134341	FJ179578
<i>T. parareesei</i>	Longibrachiatum	CBS 125925	MH863773	GQ354353
<i>T. pararogersonii</i>	Viride	CBS 133496	-	KJ665625
	Viride	CTCCSJ-F-KZ40688	KY750455	KY978633
<i>T. paratroviride</i>	Viride	CBS 136489	-	KJ665627
	Viride	CS107-5	KT153590	KT153586
<i>T. paraviridescens</i>	Viride	CBS 119321	NR134367	DQ672610
<i>T. parepimyces</i>	Harzianum	CBS 122769	NR134403	FJ860664
<i>T. parestonicum</i>	Green	CBS 120636	NR134404	FJ860666
<i>T. patella</i>	Longibrachiatum	CBS 110081, BPI GJS 91-141	NR134338	AY937427
<i>T. paucisporum</i>	Viride	CBS 118645, BPI GJS 01-13	NR134360	DQ109540
<i>T. peltatum</i>	Psychrophilum	BPI GJS08-207	NR134422	EF392731
<i>T. petersenii</i>	Viride	CBS 119051	NR138442	DQ284979

Table 2 List of *Trichoderma* included in this study. (Continued)

<i>Trichoderma</i>	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
<i>T. pezizoides</i>	Viride	CBS 115283	NR138436	AY225859
<i>T. phellinicola</i>	Hypocreanum	CBS 119283	NR134406	FJ860672
<i>T. phyllostachydis</i>	Green	CBS 114071	NR103608	FJ860673
<i>T. piluliferum</i>	Polysporum	CBS 120927	NR134407	FJ860674
<i>T. pinnatum</i>	Longibrachiatum	CBS 131292, GJS 04-100	-	JN175571
<i>T. placentula</i>	Polysporum	CBS 120924	NR134408	FJ179580
<i>T. pleuroti</i>	Harzianum	CBS 124387	NR134421	HM142382
<i>T. pleuroticola</i>	Harzianum	CBS 124383	NR134420	HM142381
<i>T. polysporum</i>	Polysporum	CBS 820.68	NR134448	AY605810
<i>T. poronioideum</i>	Polysporum	CBS 139046, BPI GJS 01-203	NR134446	KP109823
<i>T. protopulvinatum</i>	Hypocreanum	CBS 739.83	NR134409	FJ860679
<i>T. protrudens</i>	Brevicompactum	CBS 121320	NR134373	-
<i>T. pseudocandidum</i>	Green	BPI 843652, PC59	AY737757	AY737742
<i>T. pseudogelatinosum</i>	Harzianum	TUFC 60186, CNUN309	NR144878	HM920202
<i>T. pseudokoningii</i>	Longibrachiatum	CBS 408.91	NR120296	AF400986
<i>T. pseudolacteum</i>	Lone lineage	TMI 8484, CBS 133191	NR134436	JX238493
<i>T. pseudonigrovirens</i>	Green	GJS 99-64, BPI 842416	AY737777	AF534582
<i>T. pseudostramineum</i>	Hypocreanum	TUFC 60104, CNUN334	HM769758	HM920206
<i>T. psychrophilum</i>	Psychrophilum	CBS 119129, Hy8	JN133558	AY737752
<i>T. pubescens</i>	Viride	DAOM 166162	NR077179	AY750887
<i>T. pyramidale</i>	Harzianum/H complex	CBS 135574	-	KJ665699
	Harzianum/H complex	SFC101249	MF185991	MF185943
<i>T. reesei</i>	Longibrachiatum	QM 6a, CBS 383.79	NR120297	AF401004
<i>T. rifaai</i>	Harzianum/H complex	DIS 355b, CBS 130746	NR137305	FJ463324
<i>T. rossicum</i>	Stromaticum	DAOM 230011	HQ342419	AY937441
<i>T. rosulatum</i>	Green	HMAS 252548	NR134438	KF729984
<i>T. rubi</i>	Lone lineage	CBS 127380, WU 33316	-	KJ665704
<i>T. rufobrunneum</i>	Harzianum	HMAS 252547	NR134439	KF729992
<i>T. samuelsii</i>	Viride	CBS 130537, S5	NR138452	JN715651
<i>T. saturnisporopsis</i>	Longibrachiatum	CBS 128829	NR138455	JQ685869
<i>T. saturnisporum</i>	Longibrachiatum	CBS 330.70, ATCC 18903	NR103704	EU280044
<i>T. scalesiae</i>	Viride	CBS 120069	NR144876	DQ841726
<i>T. sempervirentis</i>	Viride	CBS 133498, S599	-	KC285755
<i>T. seppoi</i>	Polysporum	C.P.K. 3161, CBS 122498	NR134413	FJ179581
<i>T. silvae-virgineae</i>	Green	CBS 120922	NR134414	FJ860696
<i>T. simmonsii</i>	Harzianum/H complex	GJS 91-138, CBS 130431	NR137297	AF443935
<i>T. sinense</i>	Longibrachiatum	DAOM 230000	NR134425	AY750889
<i>T. sinoluteum</i>	Polysporum	HMAS 252868	NR134445	KJ634777
<i>T. sinuosum</i>	Green	CBS 114247	NR144872	AY737743
<i>T. solani</i>	Longibrachiatum	CBS 130506, GJS 08-81	-	JN175597
<i>T. solum</i>	Harzianum	HMAS 248848	NR154576	KY688050
<i>T. spinulosum</i>	Green	CBS 310.50, CBS 311.50	NR134415	FJ860701

Table 2 List of *Trichoderma* included in this study. (Continued)

<i>Trichoderma</i>	Clade	Ex-type/Voucher	GenBank Number	
			ITS	tef1
<i>T. spirale</i>	Green	DAOM 183974	NR077177	EU280049
<i>T. stercorearium</i>	Hypocreanum	CBS 148.85, ATCC 62321	NR134355	FJ860607
<i>T. stilbohypoxyli</i>	Viride	CBS 992.97, ATCC MYA 2970	NR134361	DQ109546
<i>T. stipitatum</i>	Green	HMAS 266613	NR134440	KF729991
<i>T. stramineum</i>	Harzianum	GJS 02-84, CBS 114248	NR134347	AY737746
<i>T. strictipile</i>	Green	DAOM 172827, CBS 347.93	NR134337	AY865644
<i>T. strigosellum</i>	Viride	CBS 102817, C.P.K. 3604	NR134437	EU248631
<i>T. strigosum</i>	Viride	DAOM 1661214, CBS 348.93	NR103571	AY376057
<i>T. stromaticum</i>	Stromaticum	CBS 101875, GJS 97-183	NR077128	AY937418
<i>T. subalpinum</i>	Lone lineage	CBS 119128	-	FJ860705
<i>T. subeffusum</i>	Viride	CBS 120929	NR134416	FJ860707
<i>T. surrotundum</i>	Green	GJS 88-73, CBS 111145	NR134350	AF534594
<i>T. taiwanense</i>	Viride	GJS 95-93, CBS 119058	NR144874	DQ284973
<i>T. tawa</i>	Harzianum	GJS 97-174, CBS 114233	NR138430	FJ463313
<i>T. taxi</i>	Lone lineage	ZJUF0986, CGMCC 1672	NR134366	DQ859029
<i>T. texanum</i>	Viride	CBS 139784, LESF551	NR137308	KT278988
<i>T. thailandicum</i>	Green	GJS 97-61, BPI 745832	NR163514	AY737748
<i>T. thelephoricola</i>	Green	GJS 95-135, BPI 737702	NR134352	AY737735
<i>T. theobromicola</i>	Viride	DIS 85f, CBS 119120	NR134359	EU856321
<i>T. tomentosum</i>	Harzianum	CBS 349.93, DAOM 178713a	MH862417	AY750882
<i>T. tremelloides</i>	aff. Longibrachiatum	CBS 121140	NR134417	FJ860714
<i>T. trixiae</i>	Viride	CBS 134702	NR138444	DQ307526
<i>T. tropicosinense</i>	Green	HMAS 244983	NR134441	KF923286
<i>T. tsugarensis</i>	Longibrachiatum	TAMA 0203, NBRC 109641	NR134335	AB807647
<i>T. turrialbense</i>	Brevicompactum	CBS 112445	NR138448	EU338284
<i>T. valdunense</i>	Viride	CBS 120923	NR134418	FJ860717
<i>T. velutinum</i>	Harzianum	DAOM 230013, TUB F-784	-	AF510444
<i>T. vermipilum</i>	Stromaticum	PPRI 3359, CBS 127103	AF400268	HQ342219
<i>T. vinosum</i>	Viride	GJS 99-158, CBS 119087	NR144870	AY376047
<i>T. virens</i>	Green	CBS 249.59, ATCC 13213	MH857855	AY750891
<i>T. virescentiflavum</i>	Green	PC 278	NR134349	AY737749
<i>T. viridarum</i>	Viride	CBS 132568, CBS 120065	NR138439	KC285658
<i>T. viride</i>	Viride	CBS 119325	NR138441	DQ672615
<i>T. viridescens</i>	Viride	CBS 433.34	NR138429	AF456905
<i>T. viridialbum</i>	Viride	CBS 133495, S177	-	KC285705
<i>T. virilente</i>	Viride	CBS 132569, DAOM 234234	NR138447	KJ665772
<i>T. voglmayrii</i>	Lone lineage	CBS 117711	NR134358	DQ086146
<i>T. yunnanense</i>	Viride	CBS 121219	NR134419	GU198243
<i>T. yunnanense</i>	Viride	YMF1.01694	AY941823	AY941825
<i>Protocrea pallida</i>	-	CBS 299.78	NR111329	EU703900
<i>Protocrea farinosa</i>	-	CBS 121551	NR119700	EU703889

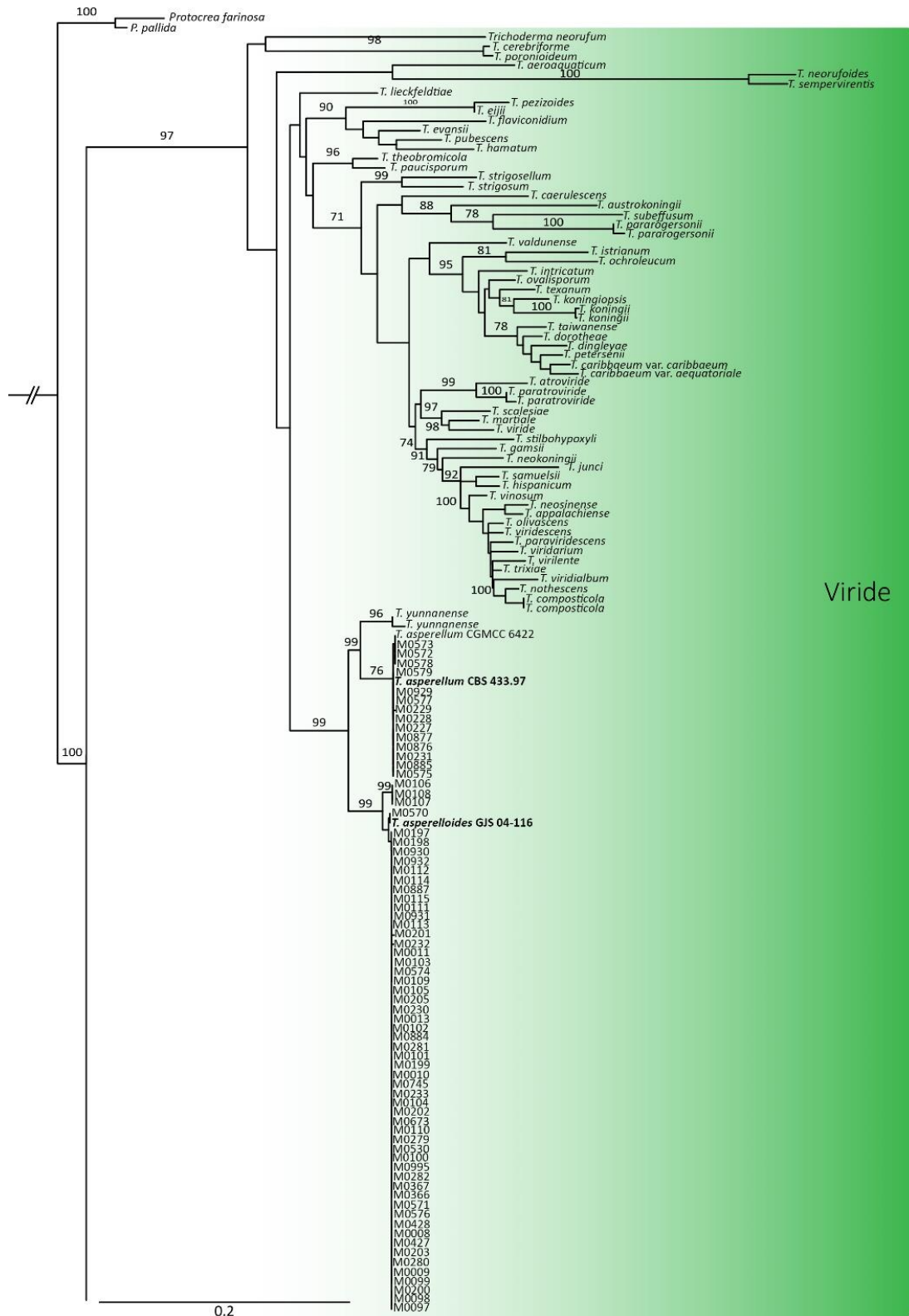


Figure 2 Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of dataset of ITS and *tef1* gene regions. Bootstrap support values ($\geq 70\%$) from 1,000 replicates above nodes.

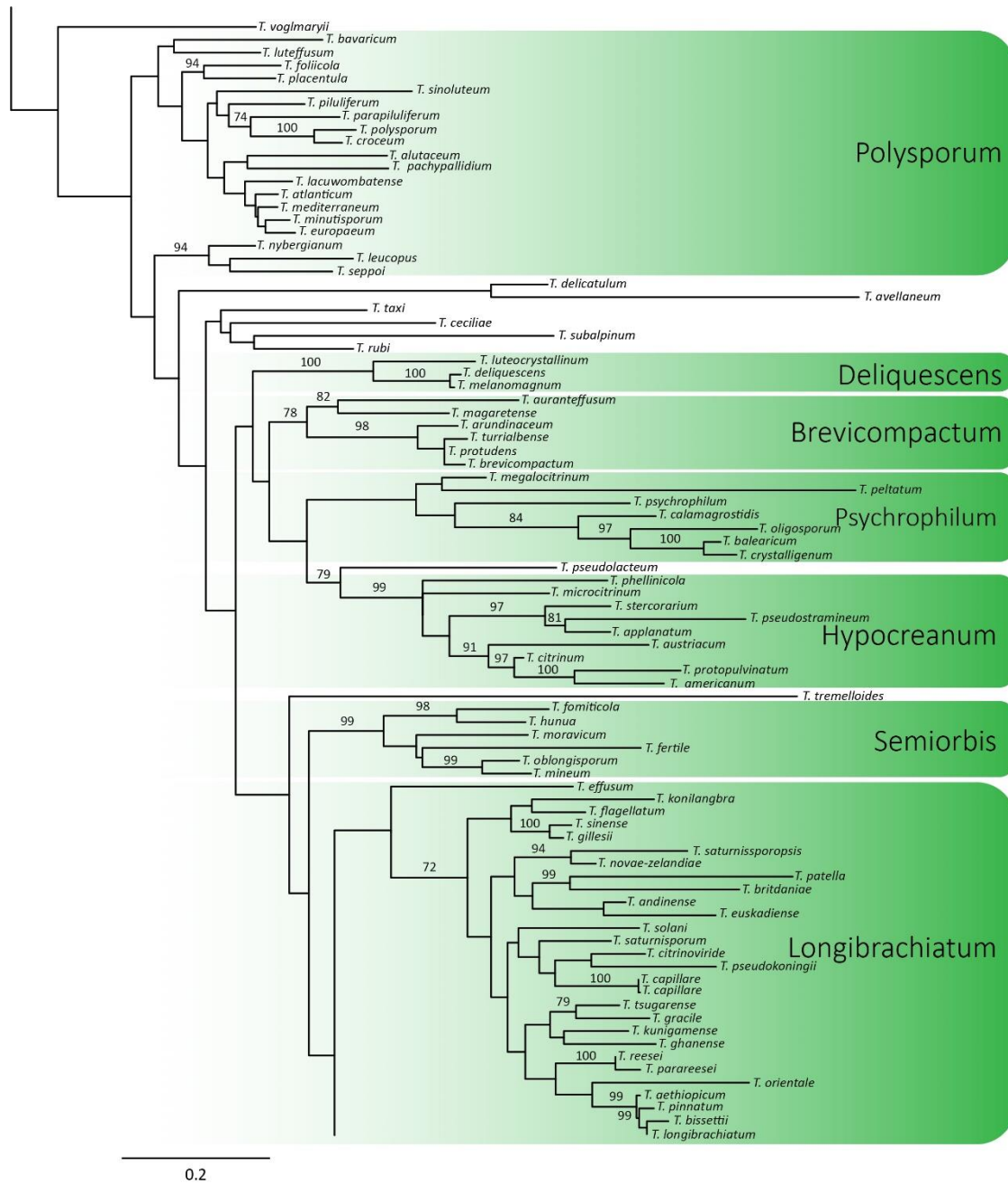


Figure 2 Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of dataset of ITS and tef1 gene regions. Bootstrap support values ($\geq 70\%$) from 1,000 replicates above nodes. (Continued)

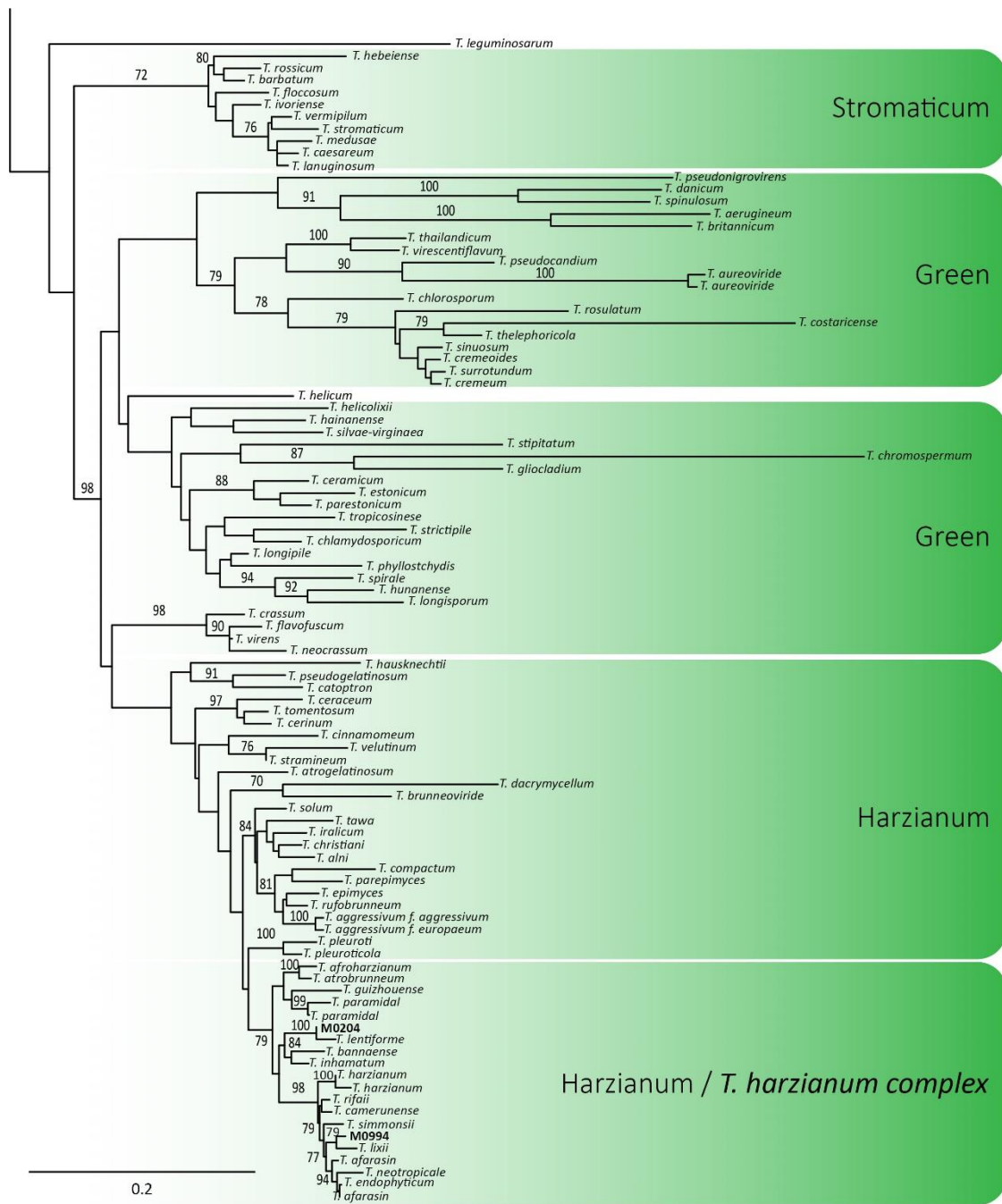


Figure 2 Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of dataset of ITS and *tef1* gene regions. Bootstrap support values ($\geq 70\%$) from 1,000 replicates above nodes. (Continued)



Figure 3 Colony and conidiophores with phialides (40x) of *Trichoderma lentiforme* (M0204)

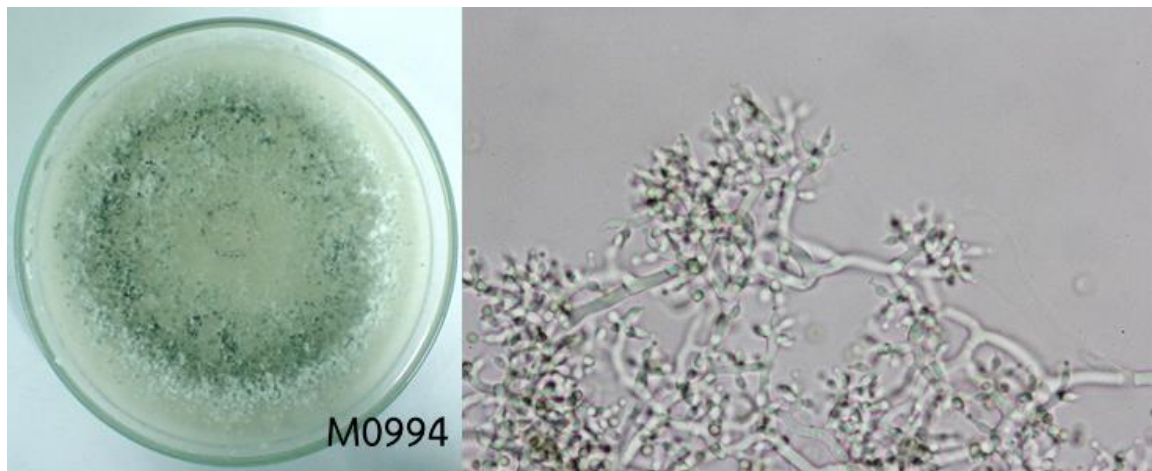


Figure 4 Colony and conidiophores with phialides (40x) of *Trichoderma lixii* (M0994)

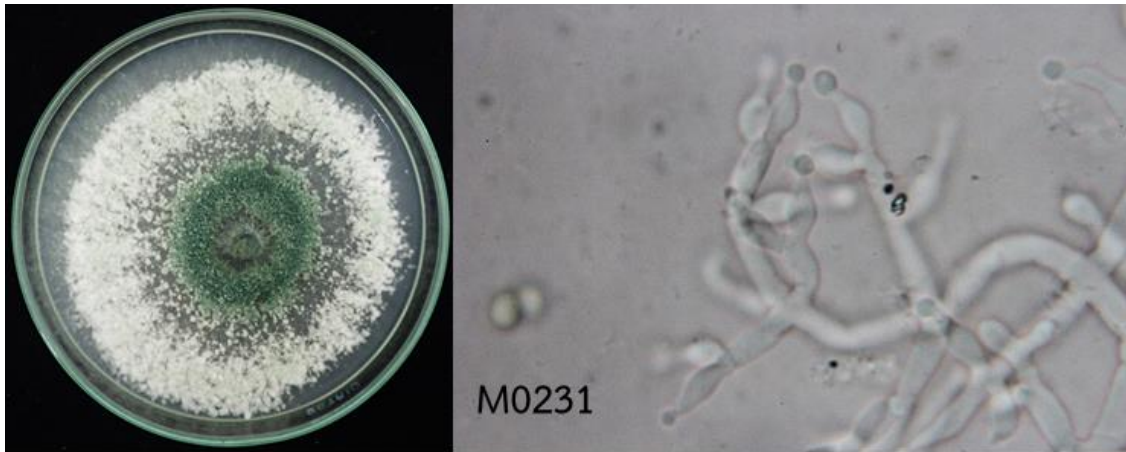


Figure 5 Colony and conidiophores with phialides (100x) of
Trichoderma asperellum (M0108)

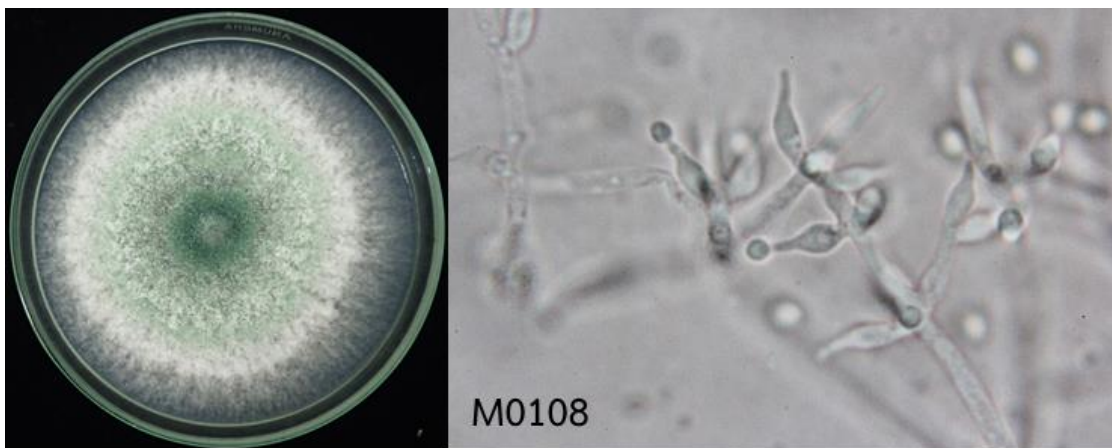


Figure 6 Colony and conidiophores with phialides (100x) of
Trichoderma asperelloides (M0108)

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera
(Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทย
DNA Barcoding for Identification of Thrips in Suborder Tubulifera
(Thysanoptera: Tubulifera) in Thailand

อิทธิพล บรรณาการ เกศสุตา สนศิริ สิทธิศิโรตม์ แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Taxonomy and DNA sequences of Thrips in suborder Tubulifera was studied by surveying and collecting other crops such as agricultural plants, horticulture plants, and ornamental plants in the Middle, Northeast and Northern part of Thailand during October 2017 to September 2020. 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, 361 were found to represent Thrips in suborder Tubulifera Family Phlaeothripidae (3 genera, 3 species): 34 Cuban laurel thrips; *Gynaikothrips ficorum* (Marchal), 325 Gold-tipped tubular thrips; *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) and 2 *Podothrips* sp.. Some samples of each location 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 molecular identifications, 3 genera were found to be *Gynaikothrips*, *Haplothrips* and *Podothrips*. 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.

Keyword : Tubulifera, Taxonomy, Molecular, Biology

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-11-61

บทคัดย่อ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทยโดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2563 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 361 ตัวอย่างและสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae ได้ 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟไทร *Gynaikothrips ficorum* (Marchal) 34 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) 325 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. 2 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลายเขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ดอก ใบอ่อนและใบแก่ของพืช ทั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน COI (Cytochrome oxidase subunit I) ของเพลี้ยไฟที่เก็บรวบรวมได้ สามารถสรุปได้ว่าเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera 3 ชนิดที่พบในประเทศไทยมีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera นำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑสถานแมลงกรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

คำสำคัญ : เพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera อนุกรมวิธาน อนุชีววิทยา

คำนำ

เพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera เป็นเพลี้ยไฟอีกอันดับย่อยหนึ่งที่มีความสำคัญทางการเกษตร โดยเพลี้ยไฟในอันดับย่อยนี้มักพบเป็นศัตรูสำคัญของชนิดพืชที่มีโครงสร้างของใบค่อนข้างแข็งและหนา เช่น มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ ขนุน มังคุด กระท้อน ไทร และพืชพลังงานที่สำคัญ เช่น สบู่ดำ มันสำปะหลัง และปาล์มน้ำมัน โดยระยะตัวอ่อนของเพลี้ยไฟในอันดับย่อย Tubulifera แต่ละชนิดนั้น จะไม่มีความแตกต่างกันมากเหมือนกับอันดับย่อย Terebrantia ที่สามารถวิเคราะห์ชนิดได้บ้างในเบื้องต้นจากขนาด สีของลำตัว และลวดลายบนลำตัว จึงทำให้การศึกษาและวิเคราะห์เพลี้ยไฟในอันดับย่อยนี้มีความยากในการดำเนินการ ในประเทศไทยมีรายงานถึงชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อยนี้ค่อนข้างน้อย เช่น *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) และ *Haplothrips* sp. เป็นศัตรูสำคัญของมะม่วง ถั่วฝักยาว ส้มเขียวหวาน มะม่วงหิมพานต์ ส้มโอ เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ กล้วย ชนิด *Gynaikothrips ficorum* และ *Gynaikothrips* sp. ชนิด *Ernothrips* sp. และ ชนิด *Liothrips* sp. ซึ่งเป็นศัตรูสำคัญของไทร (ศิริณี, 2544) นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างเพลี้ยไฟอันดับย่อยนี้ที่เก็บ-รักษาในพิพิธภัณฑสถานแมลง ซึ่งยังไม่ได้ดำเนินการศึกษาต่อถึงระดับชนิด จึงจำเป็นต้องดำเนินการศึกษาสัณฐานวิทยา และลำดับ

พันธุกรรมของเปลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ซึ่งจะทำให้ทราบถึงข้อมูลและชนิดของเปลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ที่ถูกต้อง และใช้เป็นข้อมูลสำหรับการป้องกันกำจัด อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์ชนิดของเปลี้ยไฟศัตรูพืชในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การศึกษาลำดับพันธุกรรมจะทำให้ทราบถึงความแปรปรวนของยีนเปลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ในพื้นที่ทุกภูมิภาคของประเทศไทยว่ามีความแตกต่างหรือใกล้เคียงกันอย่างไร การศึกษานี้จะได้ข้อมูลซึ่งไม่มีหน่วยงานอื่นในประเทศทำวิจัยเชิงลึกเช่นนี้ อีกทั้งยังเป็นการวิเคราะห์ชนิดศัตรูพืชโดยวิธีใหม่ที่ทันสมัยสามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับนักวิชาการทั่วไป บริษัทเอกชน และผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร ทั้งนี้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และลำดับพันธุกรรมของเปลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถนำมาศึกษา phylogeny กับเปลี้ยไฟศัตรูพืชอื่นๆ ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างเปลี้ยไฟที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ปากคีบ พู่กัน ขวดดอง กล่องพลาสติก ถังพลาสติก ถังรักษาความเย็น อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ 50-100% AGA โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% โคลฟออย 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 เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเปลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera

วิธีการ

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเปลี้ยไฟในแปลงปลูกพืช เช่น มะม่วง มะละกอ มังคุด ข้าวโพด แก้วมังกร หน่อไม้ฝรั่ง กระเจี๊ยบ ถั่วลิสง บัว ดาวเรือง ทานตะวัน เป็นต้น ในแหล่งปลูกพืชทุกภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อศึกษาจำนวนชนิดของเปลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืช เช่น ใบ และดอก ให้เปลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้พู่กันเขี่ยเปลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA (Alcohol 60%: Glycerine: Acetic acid อัตราส่วน 10:1:1) สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และแอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเปลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเปลี้ยไฟนำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ และนำ

ตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของ ศิริณี (2544) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพได้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดตองตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง จัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิด (key) ของเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้ จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตร โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล

การศึกษาลำดับพันธุกรรม

นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ได้จำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้ stereo microscope (ตัวอย่างกลุ่มเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ทำสไลด์ถาวร) ที่เก็บรวบรวมได้จากแต่ละพื้นที่ไปศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

วิธีการหาลำดับเบส COI ปรับปรุงจากวิธีการศึกษาของ 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 หลังจากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (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 10mM dNTPs, 5 U/μl Amplitaq, 25 mM MgCl₂ , 10X PCR buffer, 20mM sense and antisense primer ขั้นตอนและอุณหภูมิของขั้นตอนการทำ PCR (Biomethra Thermo Cycler) คือ

Initial denaturation	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) เพื่อหาความจำเพาะเจาะจงของ เพลี้ยไฟภายในแหล่งเดียวกันและระหว่างแหล่งที่เก็บตัวอย่าง รวมถึงเปรียบเทียบ กับฐานข้อมูลใน GenBank และศึกษาความใกล้เคียงกันของเพลี้ยไฟแต่ละชนิด

การบันทึกข้อมูล

พืชอาศัย สถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

เวลาและสถานที่:

เดือน ตุลาคม 2560 ถึง เดือน กันยายน 2563

1. แปลงปลูกพืชในทุกภูมิภาคของประเทศไทย
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง ห้องปฏิบัติการกลาง
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกพืช เช่น มะม่วง มะละกอ มังคุด ข้าวโพด แก้วมังกร หน่อไม้ฝรั่ง กระเจี๊ยบ ถั่วลิสง บัว ดาวเรือง ทานตะวัน เป็นต้น ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย และนำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยซึ่งปรับปรุงมาจาก Okajima (2006) และ Palmer, *et. al.* (1989) ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae ได้ 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟไทร *Gynaikothrips ficorum* (Marchal) 34 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) 325 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. 2 ตัวอย่าง โดยมีแนวทางการวินิจฉัยชนิดและลักษณะทางอนุกรมวิธานดังนี้

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera

- 1 - Forewings parallel-sided, not constricted medially; antennal segment III with one outer sense-cone, head as long as board or longer, tube longer than head, metathoracic sternopleural suture absent, maxillary stylets shorter and wider apart, abdominal terga II to VI (or VII) each with pair of sigmoid wing retaining setae, setae on abdominal tergite IX longer than half length of tube.....*Gynaikothrips ficorum*
- Forewings not parallel-sided, maxillary stylets narrower.....2
- 2 - Metathoracic sternopleural sutures absent, fore femur unarmed, abdomen

gradually fore tarsus with or without tooth; antennal segment VII as long as segment VI, antennal segment III with one or two sense-cones, antennal segment IV with three sense-cones*Haplothrips gowdeyi* (Franklin)
 - Metathoracic sternopleural sutures present, basantra well developed, usually longer than board, fore tibia often with an inner subapical tubercle.....*Podothrips*

เพลี้ยไฟไทร *Gynaikothrips ficorum* (Marchal, 1980)

Phloeothrips ficorum Marchal, 1908: 252, *Leptothrips flavicornis* Bagnall, 1909: 529, *Liothrips bakeri* Crawford DL, 1910: 161, *Leptothrips reticulatus* Karny, 1912: 22, *Gynaikothrips flavus* Ishida, 1931: 40, *Haplothrips blesai* Plata, 1973: 165

ลำตัว (Body) ขนาดใหญ่ ลำตัวสีน้ำตาล (Figure 1-A) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 2.50–2.80 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่ เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.00 –2.00 มิลลิเมตร

หัว (Head) ส่วนหัวมีความยาวมากกว่าความกว้าง มีเส้นจางด้านหลังของตารวม (Fig. 1-B) ปลายเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยวมีลักษณะทู่ และยาวไม่ถึงขอบด้านหลังของตารวม ส่วนปากเกือบอยู่ในระนาบเดียวกันกับเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยว มีหนวด 8 ปล้อง ปล้องหนวดปล้องที่ 3-4 มีขนาดใหญ่ สีเหลือง ปล้องหนวดปล้องที่ 8 สีนน้ำตาลอ่อนหนวดปล้องที่ 3-4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึก 1 และ 3 เส้น ตามลำดับ

อก (Thorax) อกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีเส้นขนขนาดใหญ่หลากหลายรูปแบบ พื้นที่ขอบอกด้านบนมีขนาดเล็ก พื้นที่ขอบอกด้านข้างเจริญดี เส้นเชื่อมระหว่างอกสั้นกว่าร่องแคบลึกบริเวณตรงกลางส่วนอก สันหลังอกปล้องสุดท้ายมีลวดลายเป็นแบบร่างแหเส้นยาว (Fig. 1-C) ปีกคู่หน้าขนาดกันมีสีขาวยึดประกอบด้วยเส้นขนที่ตั้งเป็นคู่กัน 15 เส้น แผ่นแข็งด้านล่างโคนปีกเป็นรูปสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ ปลายขามีสีเหลือง

ท้อง (Abdomen) ส่วนท้องปล้องท้องปล้องที่ 2-7 มีเส้นขนรูปโค้งปล้องละ 2 คู่ สำหรับใช้เก็บปีก เส้นขนที่ปล้องท้องปล้องที่ 9 ยาวกว่าครึ่งหนึ่งของปล้องท้องปล้องที่ 10 (มีความยาวประมาณ 0.8 เท่าของปล้องท้องปล้องที่ 10) (Fig. 1-D)

เพศผู้ มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมียปลายขาคู่หน้าไม่มีฟัน เส้นขนคู่ที่ 2 บนแผ่นแข็งด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 9 สั้นและแข็ง

ความสำคัญ เพลี้ยไฟไทร (cuban laurel thrips) เป็นชนิดที่สามารถพบได้มากที่สุดในสกุล *Gynaikothrips* เนื่องจากมีพืชอาหารหลายชนิดรวมถึงพื้นที่การปลูกพืชที่แพร่หลายในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เพลี้ยไฟไทรมีขนาดลำตัวใหญ่ และมีลักษณะเด่นที่บริเวณอกปล้องแรกซึ่งมีลักษณะเป็นร่างแห หนวดสีเหลือง และมีฟันที่ปลายขาคู่หน้าขนาดเล็กมาก ซึ่งแตกต่างจากชนิด *Gynaikothrips uzeli* ที่มีเส้นขนบริเวณด้านล่างของปลายส่วนอกยาวกว่าเส้นขนบริเวณด้านบนของ

ส่วนนอก แต่อย่างไรก็ตามประชากรเพลี้ยไฟในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้นั้นมีความแปรปรวนในเรื่องขนาดความยาวของเส้นขน ทั้งนี้ Wang และ Okajima (1995) ได้รายงานไว้ว่า เพลี้ยไฟชนิด *Gynaikothrips ficorum* อาจจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับชนิด *Gynaikothrips uzeli* ที่มักพบมากในแหล่งที่ปลูกไม้ยืนต้นและพืชสวน

พืชอาหาร ไทร มะกอกฝรั่ง เบญจมาศ

เขตการแพร่กระจาย เพลี้ยไฟไทรมีต้นกำเนิดในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปัจจุบันสามารถพบได้ทั่วโลก

เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin, 1908)

Anthothrips gowdeyi Franklin, 1908: 724, *Anthothrips usitatus* Bagnall, 1910: 695, *Anthothrips variabilis* Crawford DL, 1910: 166, *Haplothrips karnyi* Bagnall, 1913: 296, *Haplothrips brevicollis* Bagnall, 1913: 297, *Haplothrips soror* Schmutz, 1913: 1036, *Haplothrips sororcula* Schmutz, 1913: 1036, *Anthothrips dozieri* Watson, 1918: 71, *Haplothrips mahensis* Bagnall, 1921: 267

ลำตัว ขนาดใหญ่ ลำตัวสีน้ำตาลเข้ม (Fig. 2-A) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.20– 1.50 มิลลิเมตร (n=20) เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่ เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.00 – 1.05 มิลลิเมตร

หัว ส่วนหัวมีความยาวมากกว่าความกว้าง เส้นขนด้านหลังตาเดี่ยวอยู่บริเวณขอบของตารวม และมีความยาวเท่าขนาดความกว้างของตารวม ส่วนปากอยู่ในระนาบเดียวกันกับเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยว (Fig. 2-B) มีหนวด 8 ปล้อง หนวดปล้องที่ 3-4 สีเหลือง หนวดปล้องที่ 5-6 มีสีเหลืองที่บริเวณโคนและมีสีน้ำตาลอ่อนที่ส่วนปลาย หนวดปล้องที่ 3 และ 4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึก 2 และ 4 เส้นตามลำดับ

อก ออกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีเส้นขนขนาดใหญ่และยาว 5 คู่ ฐานอกปล้องแรกเจริญดี แผ่นแข็งด้านล่างของอกปล้องที่สอง (mesopresternum) มีรูปร่างคล้ายเรือ และมีร่องแคบลึกบริเวณตรงกลางของส่วนอก (Fig. 2-C) ด้านล่างของอกปล้องสุดท้ายไม่มีเส้นเชื่อมระหว่างอกคู่กลางกับอกคู่สุดท้าย ปลายขาคู่หน้ามีฟันแหลมที่บริเวณส่วนปลาย ปีกคู่หน้ามีสีซีดแต่มีสีเข้มที่บริเวณฐานปีกปีกคู่หน้าประกอบด้วยเส้นขนที่ตั้งเป็นคู่กัน 8 เส้น แผ่นแข็งด้านล่างโคนปีกเป็นรูปสามเหลี่ยมขามีสีน้ำตาลเข้ม

ท้อง ส่วนท้องมีเส้นขนขนาดใหญ่ที่บริเวณแผ่นแข็งด้านหลังปล้องท้องยกเว้นปล้องท้องปล้องที่ 9 แผ่นแข็งปล้องท้องปล้องที่ 2-7 มีเส้นขนรูปโค้งปล้องละ 2 คู่ ในขณะที่ปล้องท้องปล้องที่ 9 มีเส้นขนตรงยาวเท่ากับ ความยาวของปล้องท้องปล้องที่ 10 ปลายส่วนท้องแคบกว่าส่วนหัว (Fig. 2-D)

เพศผู้ มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมียปลายขาคู่หน้ามีลักษณะเป็นฟัน (tasal tooth) แตกต่างกันตามขนาดของลำตัว เส้นขนคู่ที่ 2 บนแผ่นแข็งด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 9 สั้นและแข็ง แผ่นแข็งด้านล่างปล้องท้องปล้องที่ 8 ไม่ปรากฏบริเวณที่มีรู (pore plate)

ความสำคัญ เพลี้ยไฟท่อ (gold-tipped tubular thrips) จัดอยู่ในกลุ่มของเพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips* มีลักษณะเด่นที่บริเวณปล้องหนวดปล้องที่ 3 ที่มีขนาดใหญ่แต่สั้น และมีเส้นขนรับ

ความรู้สึกร้อยละ 2 เส้น เพลี้ยไฟสกุลนี้มักพบมากในพืชตระกูลทานตะวัน มีรายงานทั่วโลกมากกว่า 245 ชนิด จึงสามารถกล่าวได้ว่าเพลี้ยไฟสกุลนี้จัดอยู่ใน 1 ใน 3 สกุลของเพลี้ยไฟที่พบมากที่สุด เพลี้ยไฟสกุล *Haplothrips* มักพบทำลายในไม้ดอก รวมถึงดอกหญ้า นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการเป็นตัวห้ำของไรศัตรูพืชอีกด้วย (Minaei and Mound, 2008)

พืชอาหาร มะม่วง มะละกอ มังคุด เงาะ น้อยหน่า กระถ่อน มะยงชิด แก้วมังกร ดีปลี อโวคาโด หอม มันฝรั่ง ข้าวโพด หน่อไม้ฝรั่ง ชา หญ้าหวาน กระเจี๊ยบ ถั่วลิสง ถั่วฝักยาว โหระพา กระเพรา บัว ดาวเรือง ทานตะวัน ปอเทือง บานไม่รู้โรย หองอนไก่

เขตการแพร่กระจาย เพลี้ยไฟท่อมมีต้นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ปัจจุบันสามารถพบได้ทั่วโลก และพบมากในประเทศเขตร้อน

เพลี้ยไฟ *Podothrips* sp.

ลำตัว ขนาดใหญ่ ลำตัวสีน้ำตาล (Fig. 3-A) เพศเมียขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.20–1.30 มิลลิเมตร เพศเมีย มีปีกขนาดใหญ่ เพศผู้ขนาดลำตัวยาวเฉลี่ย 1.00 –1.20 มิลลิเมตร

หัว ส่วนหัวมีความยาวมากกว่าความกว้าง ส่วนแก้มบนและแคบลงทางด้านล่าง มีเส้นจางๆ ด้านหลังของตารวม ปลายเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยวมีลักษณะคล้ายลูกตุ้ม และยาวไม่ถึงขอบด้านหลังของตารวม ส่วนปากไม่ได้อยู่ในระนาบเดียวกันกับเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยว (Fig. 3-B) มีหนวด 8 ปล้อง ปล้องหนวดปล้องที่ 3-4 มีขนาดใหญ่ สีเหลือง ปล้องหนวดปล้องที่ 6-8 สีน้ำตาลอ่อนหนวดปล้องที่ 3-4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึก 1 และ 2 เส้น ตามลำดับ

อก ออกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ ฐานอกด้านล่างยาวเป็นสองเท่าของขอบอกด้านบน (Fig. 3-C) มีเส้นขนขนาดใหญ่ที่บริเวณมุมบนและมุมล่างของส่วนอกรวม 4 เส้น และมีขนาดใหญ่กว่าเส้นขนบนบริเวณขอบปล้องอก สันหลังอกปล้องกลางมีเส้นแบ่งกึ่งกลางอย่างชัดเจน สันหลังอกปล้องสุดท้ายไม่มีลวดลายแบบร่างแห เส้นขนบนสันหลังอกปล้องสุดท้ายมีขนาดเล็ก ปีกคู่หน้ามีเส้นขนเรียงบริเวณขอบปีก 1 แถว แผ่นแข็งด้านล่างโคนปีกเป็นรูปประฆัง ปลายขาคู่หน้ามีตะขอโค้งและยาวยื่นออกมาจากปลายขา (Fig. 3-D) ปลายขาทุกคู่มีสีเหลือง

ท้อง ปล้องท้องปล้องที่ 2 -7 จะมีเส้นขนรูปตัว S 2 คู่ไว้ใช้สำหรับเก็บขนบริเวณปีก ปล้องท้องปล้องที่ 9 มีเส้นขนแหลมความยาวเท่ากับปล้องท้องปล้องที่ 10 และความยาวของปล้องท้องปล้องที่ 10 สั้นกว่าความกว้างของส่วนหัว เส้นขนด้านข้างปล้องท้องปล้องที่ 10 ยาวกว่าเส้นขนที่บริเวณปลายส่วนท้อง

เพศผู้ มีรูปร่างคล้ายเพศเมียแต่มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเส้นขนคู่ที่ 2 บนแผ่นแข็งด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 9 สั้นและแข็งแผ่นแข็งด้านล่างปล้องท้องปล้องที่ 8 ไม่ปรากฏบริเวณที่มีรู (pore plate)

ความสำคัญ เพลี้ยไฟสกุล *Podothrips* มีรายงานมากกว่า 30 ชนิดซึ่งส่วนใหญ่จะพบในแถบทวีปออสเตรเลีย (Ritchie, 1974) ทั้งนี้ชนิด *P. lucasseni* มีลักษณะเด่นที่บริเวณแผ่นแข็งได้ส่วนนอกแบ่งเป็น 3 ส่วนอย่างชัดเจน นอกจากนี้เพลี้ยไฟสกุล *Podothrips* นั้นมีความคล้ายคลึงกับเพลี้ยไฟ

สกุล *Haplothrips* แต่จะมีความแตกต่างกันที่บริเวณขอบบนของอกปล้องแรกด้านล่าง และมีความแตกต่างจากเพลี้ยไฟสกุล *Karnyothrips* ที่บริเวณปลายขาคู่หน้าจะมีลักษณะเป็นตะขอ

พืชอาหาร บานไม่รู้โรย ไล่ไก่

เขตการแพร่กระจาย พบในประเทศเขตร้อนในทวีปเอเชีย

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของเพลี้ยไฟไทร *G. ficorum* เพลี้ยไฟท่อ *H. gowdeyi* และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. โดยการศึกษาความสัมพันธ์กับประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ (Molecular phylogenetics of Thysanoptera) และใช้โปรแกรม Neighbor joining/UPGMA แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (sequence divergence) พบว่า เพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิดมีความแตกต่างกันทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางอนุชีววิทยา โดยเพลี้ยไฟชนิดเดียวกันที่อยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกันจะมีความแปรปรวนของลำดับพันธุกรรมเล็กน้อย (Fig.4) การศึกษานี้ทำให้ทราบถึงชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อยที่เป็นศัตรูสำคัญของพืชไร่ พืชสวน ไม้ดอกไม้ประดับในประเทศไทย และใช้เป็นข้อมูลประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟที่ติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้าและส่งออก และสามารถนำเทคนิควิธีการศึกษาไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟหรือแมลงชนิดอื่นๆ โดยการศึกษาลักษณะทางอนุชีววิทยามีข้อได้เปรียบที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างแมลงได้ทุกระยะทั้งระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว โดยไม่ต้องอาศัยเวลาในการเลี้ยงตัวอย่างแมลงนั้นๆ ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ตัวเต็มวัยในการจำแนกชนิด อีกทั้งยังสามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงทั้งในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างทันต่อเหตุการณ์ช่วยลดระยะเวลาการกักเก็บสินค้าเพื่อตรวจสอบ และสามารถใช้เป็นเทคนิคตรวจสอบชนิดแมลงศัตรูพืชที่ติดมากับสินค้านำเข้าได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทยโดยการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกพืชในภูมิภาคของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2563 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 361 ตัวอย่างและสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae ได้ 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟไทร *Gynaikothrips ficorum* (Marchal) 34 ตัวอย่าง เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) 325 ตัวอย่าง และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. 2 ตัวอย่าง ทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะการทำลายเขตการแพร่กระจายโดยเพลี้ยไฟจะเข้าทำลายทั้งยอดอ่อน ดอก ใบอ่อนและใบแก่ของพืช ทั้งนี้ได้ดำเนินการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน COI (Cytochrome oxidase subunit I) ของเพลี้ยไฟที่เก็บรวบรวมได้ สามารถสรุปได้ว่าเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera 3

ชนิดที่พบในประเทศไทยมีความแตกต่างกันทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิดและถ่ายภาพลักษณะสำคัญทางอนุกรมวิธานของเพร็ลีย์ไฟอันดับย่อย Tubulifera นำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑสถานแมลง กรมวิชาการเกษตร สำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานประกอบการจัดทำรายชื่อชนิดแมลงศัตรูพืชรองรับปัญหาด้านการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร นำตัวอย่างเพร็ลีย์ไฟจัดเก็บในพิพิธภัณฑสถานแมลงพร้อมนำข้อมูลที่รวบรวมได้จัดทำฐานข้อมูลพิพิธภัณฑสถานแมลง กรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาด้านอื่นๆ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูเพื่อประกอบในงานสำคัญด้านการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร ตลอดจนใช้ในด้านการกักกันพืช ซึ่งเป็นไปตามมาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measure: SPS Agreement) ขององค์การการค้าโลก (WTO) ที่ประเทศสมาชิกรวมทั้งประเทศไทยจะต้องใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชเพื่อปกป้องสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม (อรุณี, 2543) ทั้งนี้สามารถใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยาที่ได้เรียนรู้จากการศึกษาทดลองจำแนกชนิดแมลงต่างๆ ได้ และสามารถถ่ายทอดเทคนิคให้กับบุคลากรที่เกี่ยวข้องกับการปฏิบัติงานได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพร็ลีย์ไฟ. 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.

- Minaei, K. and L. A. Mound. 2008. The Thysanoptera Haplothripini (Phlaeothripidae) of Iran. *Journal of Natural History* 42: 2617–2658.
- Okajima, S. 2006. *The Insects of Japan 2: The Suborder Tubulifera (Thysanoptera)*. The Entomological Society of Japan, Touka Shobo Co. Ltd., Fukuoka. 720 p.
- 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.
- Ritchie, J. M. 1974. A revision of the grass-living genus *Podothrips* (Thysanoptera: Phlaeothripidae). *Journal of Entomology, B* 43: 261–282.
- 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.

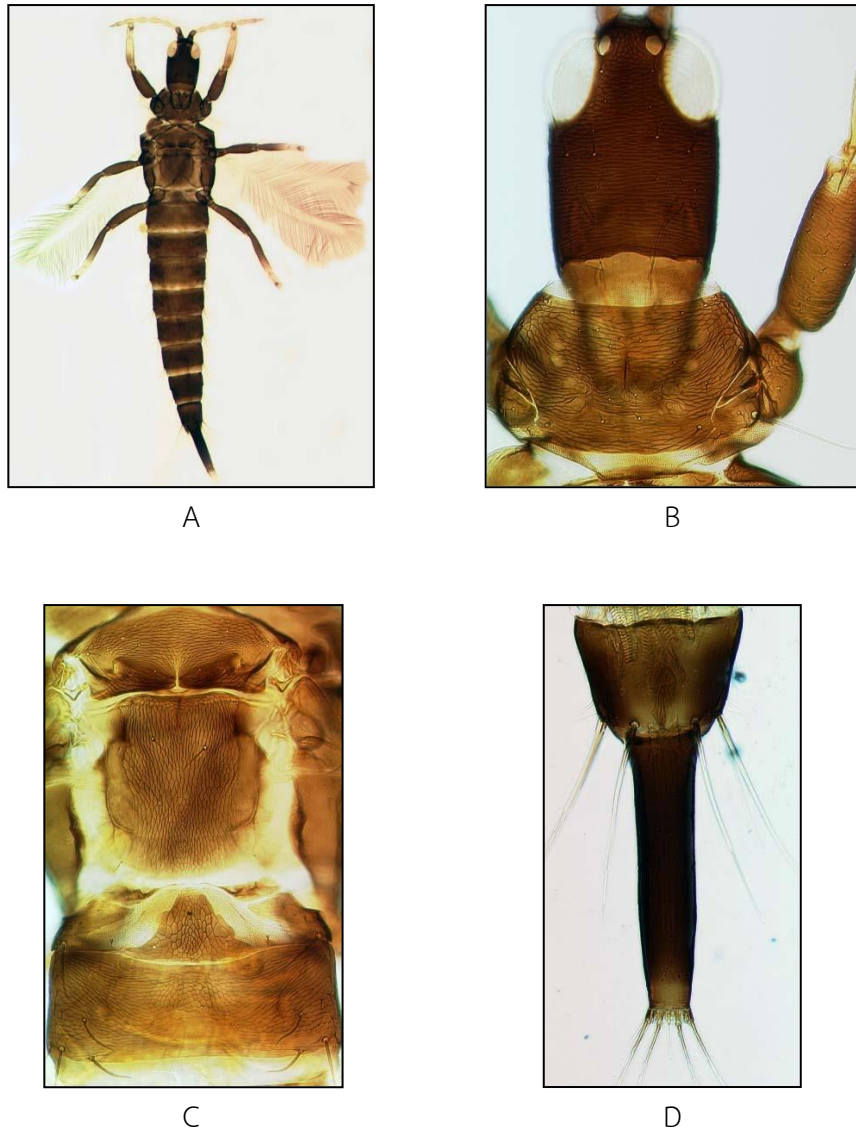


Figure 1 Morphology of Cuban laurel thrips; *Gynaikothrips ficorum* (Marchal, 1980)

A. Slide permanent

B. Head-Pronotum

C. Metanotum

D. Tergites IX-X (tube)

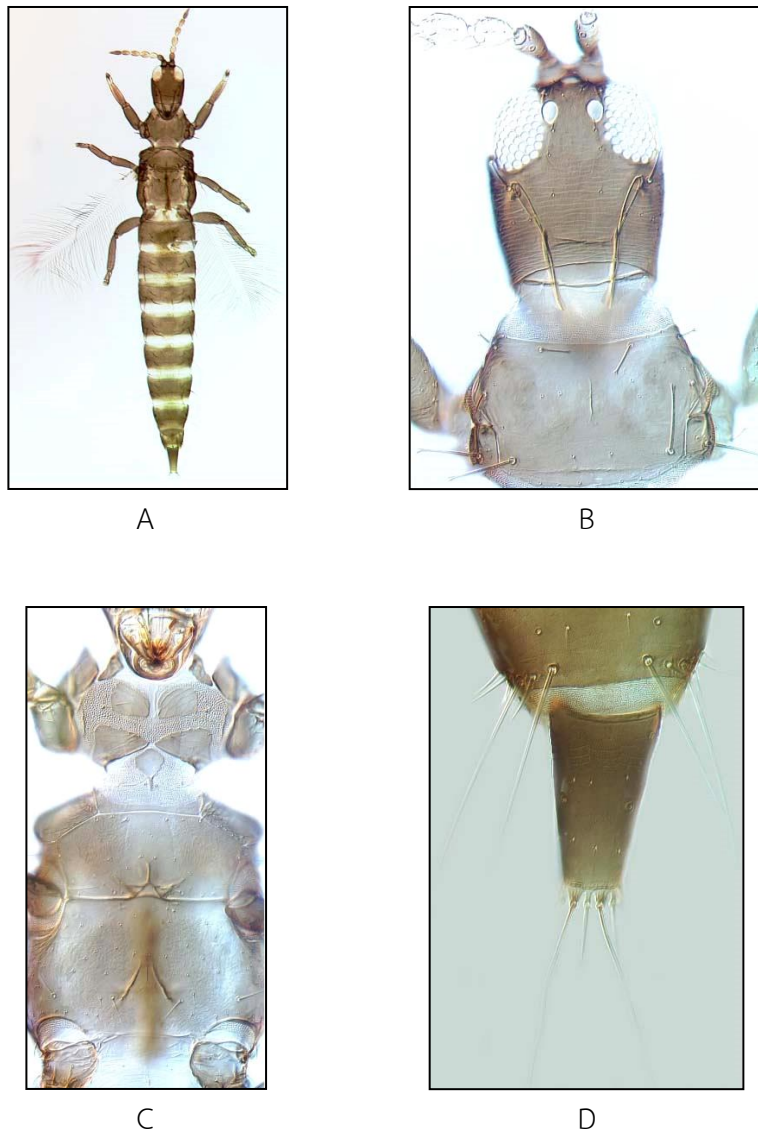


Figure 2 Morphology of Gold-tipped tubular thrips; *Haplothrips gowdeyi* (Franklin, 1908)

A. Slide permanent

B. Head-Pronotum

C. Mesopresternum

D. Tergites IX-X (tube)

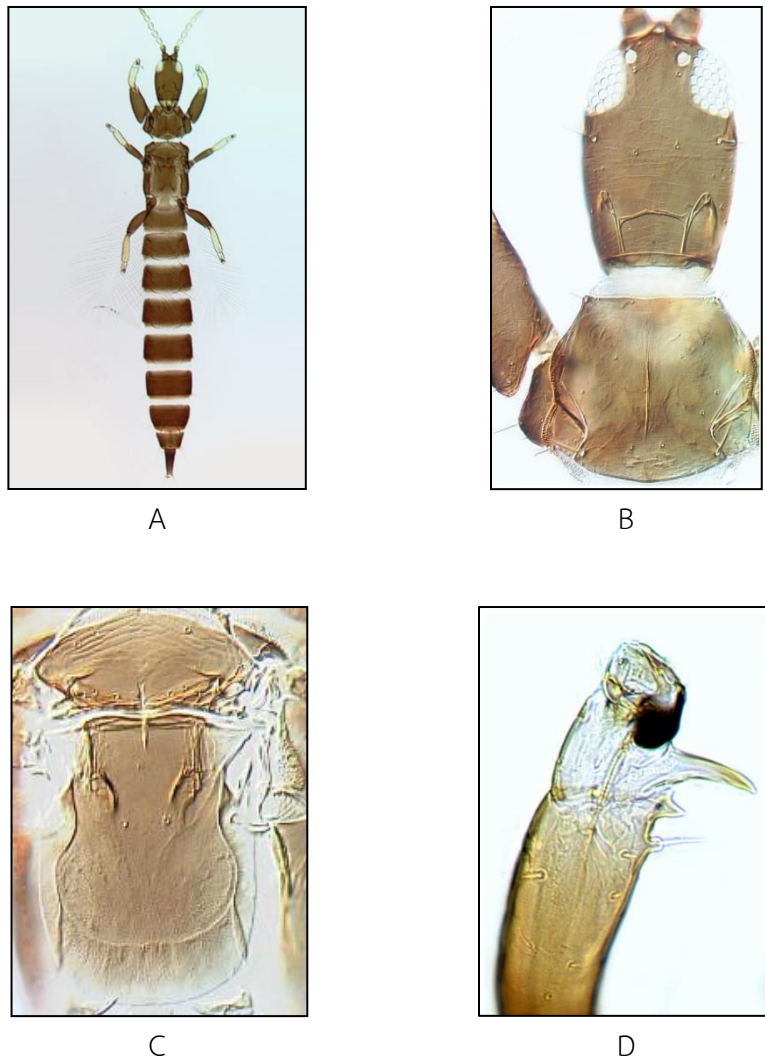


Figure 3 Morphology of *Podothrips* sp.

A. Slide permanent

B. Head-Pronotum

C. Metanotum

D. Fore tibia and tarsus

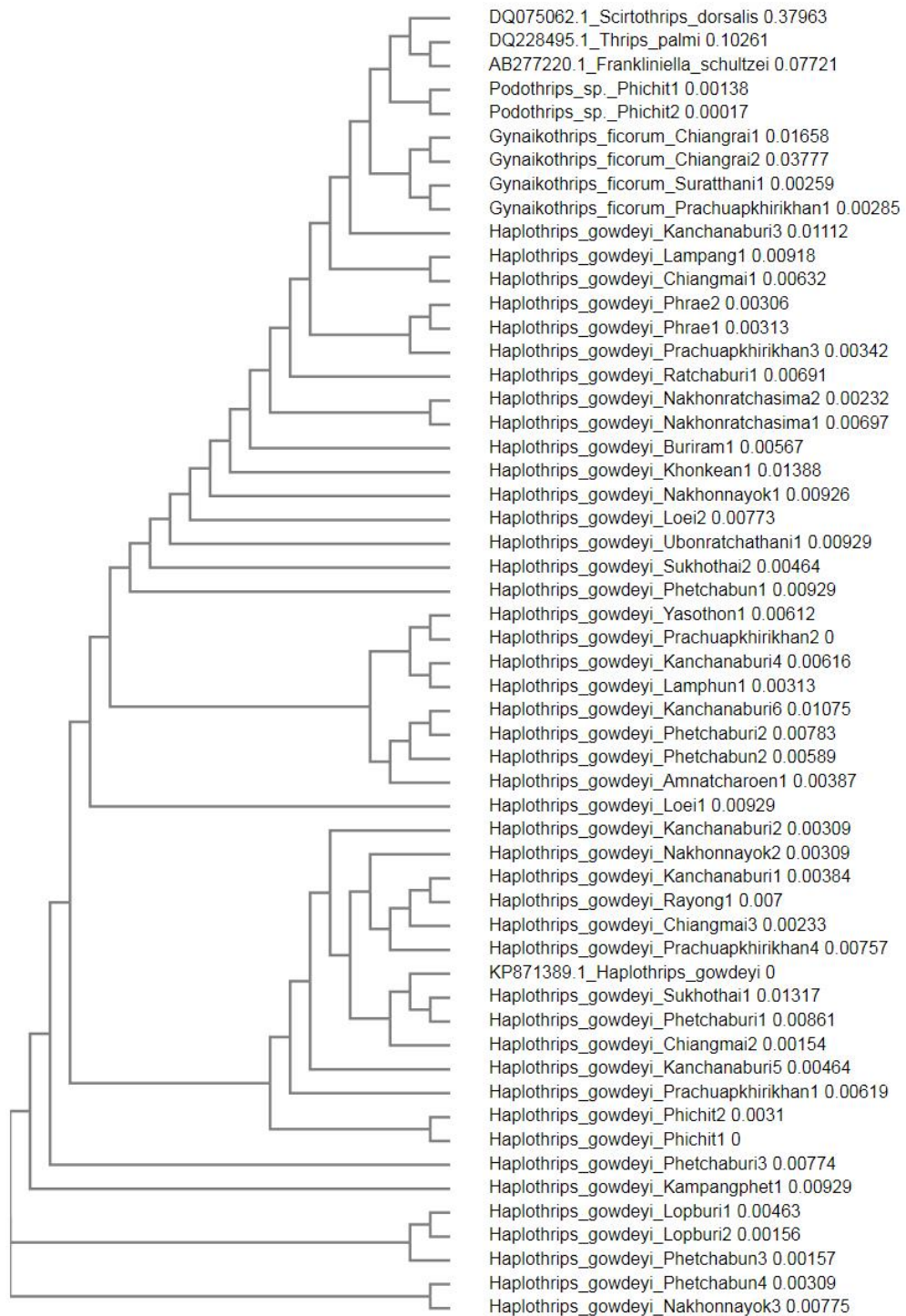


Figure 4 Phylogenetic trees showing the relationship among three thrips populations Which collected from the other crops in Thailand comparing with *Scirtothrips dorsalis*, *Thrips palmi* and *Frankliniella schultzei*

Table 1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020.

Province	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips samples	Location
<i>Gynaikothrips ficorum</i> (Marchal, 1980)					
Chiang Rai	Mae sai	Pong pha	Chrysanthemum	5	N 20° 23' 0" E 99° 55' 11"
Chiang Rai	Mae sai	Mae sai	Chrysanthemum	9	N 14° 22' 24" E 99° 58' 38"
Surat Thani	Ban na san	Kwan su pan	Olive	10	N 8° 52' 23" E 99° 23' 37"
Prachuap Khiri Khan	Kui bu ri	Sam ka thai	Banyan	10	N 120° 11' 21" E 99° 51' 3"
Total				34	
<i>Haplothrips gowdeyi</i> (Franklin, 1908)					
Phrae	Den chai	Sai yoi	Cockscomb	6	N 18° 4' 28" E 99° 59' 48.8"
Phrae	Long	Boh lek long	Globe Amaranth	12	N 18° 1' 27.4" E 99° 43' 9.9"
Lampang	Mae tah	Mae tah	Mango	6	N 18° 10' 22.6" E 99° 33' 27.1"
Lamphun	Ban hong	Ban hong	Spring onion	4	N 18° 19' 269" E 98° 48' 292"
Chiang Mai	San sai	Mae fhak	Potato	4	N 19° 2' 46.2" E 98° 57' 60"

Table 1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020. (Continue)

Province	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips samples	Location
Chiang Mai	Sa meong	Sa meong Nua	Basil	8	N 18° 57' 51.1" E 98° 43' 32.1"
Chiang Mai	Sa meong	Sa meong Nua	Papaya	15	N 18° 57' 100" E 98° 44' 51.7"
Phichit	Muang	Rong chang	Lotus	2	N 16° 27' 45" E 100° 17' 1"
Phichit	Muang	Rong chang	Gardenia	5	N 16° 29' 6" E 100° 17' 1"
Sukhothai	Srisachanalai	Tha chai	Mango	5	N 17° 24' 35" E 99° 48' 14"
Sukhothai	Srisachanalai	Tha chai	Marigold	5	N 16° 28' 55" E 99° 44' 14"
Kamphaeng Phet	Sai ngam	Ma ha chai	Lotus	3	N 17° 24' 41" E 99° 48' 21"
Phetchabun	Khao kho	Sa daoh pong	Rambutan	8	N 16° 35' 22" E 100° 57' 46"
Phetchabun	Khao kho	Nong mae na	Avocado	18	N 16° 35' 22" E 100° 35' 46"

Table 1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020. (Continue)

Province	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips samples	Location
Phetchabun	Lom sak	Nam chun	Sweet basil	2	N 16° 42' 54" E 101° 10' 51"
Phetchabun	Lom sak	Nam chun	Yard long bean	2	N 16° 42' 50" E 101° 11' 45"
Loei	Phu rua	Pla pah	Tea tree	4	N 17° 17' 56" E 101° 24' 39"
Loei	Chaing khan	Bu hong	Custard apple	14	N 17° 53' 49" E 101° 42' 54"
Khon Kaen	Muang	Si la	Peanut	8	N 16° 29' 6" E 102° 49' 50"
Nakhon Ratchasima	Wang nam kheaw	Wang mhee	Sweet basil	10	N 14° 23' 26" E 101° 42' 33"
Nakhon Ratchasima	Wang nam kheaw	Thai sa ma kee	Marigold	8	N 14° 22' 24" E 101° 52' 44"
Yasothon	Pah tiew	Kra jai	Sunflower	9	N 15° 87' 8" E 104° 19' 38"
Amnat Charoen	Muang	Bong	Sunn hemp	9	N 15° 52' 26" E 104° 39' 24"
Ubon Ratchathani	Warin cham lhab	Bung wai	Marigold	6	N 15° 9' 5" E 104° 45' 50"

Table 1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020. (Continued)

Province	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips samples	Location
Buriram	Nang rong	Nong sa nho	Marigold	10	N 14° 44' 7" E 102° 55' 6"
Nakhon Nayok	Muang	Sri nawa	Santol	8	N 14° 15' 5" E 101° 16' 41"
Nakhon Nayok	Muang	Sri nawa	Golden dragon	6	N 14° 13' 35" E 101° 16' 9"
Nakhon Nayok	Muang	Sarika	Mangosteen	7	N 14° 17' 16" E 101° 13' 48"
Lopburi	Chai ba dan	Tha din dam	Asparagus	6	N 15° 7' 20" E 101° 13' 49"
Lopburi	Chai ba dan	Tha din dam	Asparagus	7	N 15° 7' 20" E 101° 8' 20"
Phetchaburi	Cha am	Nong sala	Marigold	6	N 12° 53' 50.4" E 99° 59' 20.7"
Phetchaburi	Cha am	Nong sala	Marigold	12	N 12° 53' 50.4" E 99° 65' 41.3"
Phetchaburi	Tha yang	Nong jok	Sunn hemp	9	N 12° 58' 00.5" E 99° 58' 52.5"

Table 1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020. (Continue)

13	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips sample	Location
Prachuap Khiri Khan	Muang	Aow noi	Papaya	3	N 11° 55' 00.5" E 99° 47' 59.6"
Prachuap Khiri Khan	Hua hin	Thab tai	Dragon fruit	4	N 12° 32' 26.0" E 99° 49' 38.8"
Prachuap Khiri Khan	Muang	Bo nok	Mango	15	N 11° 59' 21.6" E 99° 45' 35.2"
Prachuap Khiri Khan	Pran buri	Nong ta tam	Mango	13	N 12° 25' 13.6" E 99° 49' 9.2"
Ratchaburi	Muang	Rang bua	Papaya	3	N 13° 32' 01.1" E 99° 33' 35.5"
Kanchanaburi	Muang	Chong sa dao	Dragon fruit	2	N 14° 12' 26.3" E 99° 12' 13.9"
Kanchanaburi	Muang	Chong sa dao	Dragon fruit	8	N 14° 12' 42.3" E 99° 16' 21"
Kanchanaburi	Dan ma kham tia	Dan ma kham tia	Corn	8	N 13° 50' 08.1" E 99° 19' 09.7"
Kanchanaburi	Tha muang	Thung thong	Roselle	3	N 13° 53' 53.2" E 99° 38' 50.2"
Kanchanaburi	Tha maka	Tha mai	Asparagus	9	N 13° 55' 3.24" E 99° 47' 52.39"

Table 1 Location and number of thrips samples collected from the other crops during October 2017 – September 2020. (Continue)

Province	District	Sub-district	Host Plants	Number of thrips sample	Location
Kanchanaburi	Sai yok	Singh	Long pepper	6	N 14° 05' 108" E 99° 96' 40.0"
Rayong	Pluak dang	Mab yang pon	Stevia	7	N 13° 1' 20.7" E 101° 6' 77.6"
Total				325	
<i>Podothrips sp.</i>					
Phichit	Muang	Rong chang	Winter jasmine	1	N 16° 26' 7" E 100° 17' 1"
Phichit	Muang	Rong chang	Globe Amaranth	1	N 16° 26' 9" E 100° 21' 3"
Total				2	

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา
Chaetomium cupreum และ *Ch. globosum*
 DNA Barcoding for *Chaetomium cupreum* and
Ch. globosum Identification

ชวินทร ดวงสอดา^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} สุณีรัตน์ สีมะเต็อ^{1/}
 อมรรักษ์ คัดใจเดียว^{1/} มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{3/}

^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

Abstract

The fungal identification based on genealogical concordance has been applied to classify and identify fungal, especially in many cryptic and complex species. The DNA data of genes obtained from fungi had been analyzed for the identification and also applied as barcodes of certain species of fungi. Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture is a responsible agency to verify the fungal species in the bioproduct, which to be registered. This will benefit users of biological control products. This study was conducted during October 2018 - September 2020 in order to obtain the DNA barcodes of *Chaetomium cupreum* and *Ch. globosum* for Thailand. The *Chaetomium* was isolated from soil surround roots and plant with additional isolates selected from culture collection of Plant Pathology Research Group. The morphological characters had been observed to identify the *Chaetomium* isolates, which could be identified into three groups. The first group was found to have the similarity morphology to *Ch. cupreum*, the characters of the second group was agreed with *Ch. globosum* and the third group could be identified at genus level as *Chaetomium* sp. The representative from each group were selected for further identification using molecular data compare

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-12-61

with the type sequences of *Chaetomiaceae*. The phylogenetic reconstruction obtained from Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) presented the monophyletic and congruent topology. The results showed that the first group was identity to *Arcopilus cupreus*, the current name of *Ch. cupreum*. The second group was identity to *Ch. globosum*, and the third group could be identified as *Ovatospora brasiliensis*, the current name of *Ch. brasiliensis*. The DNA barcodes of five loci namely, the Internal Transcribed Spacer (ITS), the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α), the Large Subunit (LSU, 28S), Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2) and β -Tubulin 2 (TUB2) had been obtained from *A. cupreus* (syn. *Ch. cupreum*), *Ch. globosum* and *O. brasiliensis* (syn. *Ch. brasiliensis*). The isolates and DNA barcodes of *A. cupreus*, *Ch. globosum* and *O. brasiliensis* have been curated and databased in culture collection of Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture for the identification.

Keywords : *Chaetomium cupreum*, *C. globosum*, DNA barcoding

บทคัดย่อ

ปัจจุบันข้อมูลและวิธีการทางชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทมากในงานอนุกรมวิธานเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อราโดยเฉพาะกรณีที่ไม่สามารถชี้ขาดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานรับผิดชอบตรวจสอบความถูกต้องของชนิดสายพันธุ์เชื้อราที่ระบุในสารชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดโรคพืช ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์ที่สามารถใช้สารชีวภัณฑ์ได้ตรงชนิด การศึกษาครั้งนี้ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 เพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Chaetomium cupreum* และ *Ch. globosum* ในประเทศไทย เก็บและรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *Chaetomium* จากตัวอย่างดิน พืช และจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช เมื่อจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Ch. cupreum* กลุ่มที่ 2 มีลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Ch. globosum* และ กลุ่มที่ 3 มีลักษณะพ้องกับเชื้อราเชื้อราในสกุล *Chaetomium* แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เมื่อจำแนกชนิดด้วยวิธี phylogenetic reconstruction โดยเปรียบเทียบกับ type sequence ของเชื้อรา *Chaetomiaceae* พบว่า topology ที่ได้จาก Maximum Likelihood (ML) และ Bayesian inference (BI) มีความสอดคล้องกัน และเป็น monophyletic พบว่า เชื้อรากลุ่มที่ 1 คือ *Arcopilus cupreus* ซึ่งเป็นชื่อปัจจุบันของ *Ch. cupreum* เชื้อรากลุ่มที่ 2 คือ *Ch. globosum* และ เชื้อรากลุ่มที่ 3 คือ *Ovatospora brasiliensis* ซึ่งเป็นชื่อปัจจุบันของ *Ch. brasiliensis* จากการศึกษาครั้งนี้ได้ดีเอ็นเอ

บาร์โค้ดของเชื้อรา *A. cupreus* (syn. *Ch. cupreum*), *Ch. globosum* และ *O. brasiliensis* (syn. *Ch. brasiliensis*) จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS), the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α), the Large Subunit (LSU, 28S), Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2) และ β -Tubulin 2 (TUB2) ไอโซเลทของเชื้อราและดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะเก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา

คำหลัก : *Chaetomium cupreum* *C. globosum* บาร์โค้ด

คำนำ

ปัจจุบันการนำจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ (antagonist) มาใช้ประโยชน์ และเริ่มมีบทบาทและความสำคัญทางเศรษฐกิจด้านการเกษตร เชื้อราหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และสามารถนำมาใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ (biocontrol agent) นี้เองมาจากคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น เชื้อรา *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013; Kindermann *et al.*, 1998; Mbarga *et al.*, 2012) และ เชื้อรา *Chaetomium* (Sordariomycetes, Sordariales) (Soytong, 1990; Soytong, 2001) รวมถึงสารที่เชื้อราปฏิปักษ์บางชนิดสร้างขึ้นมีผลดีต่อพืชโดยช่วยในการเจริญเติบโต (plant growth) รวมถึงกระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (plant defense responses) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคพืชโดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียแก่พืช เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยช่วยลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช (Yeh and Sinclair, 1980)

เชื้อราใน genus *Chaetomium* (Sordariomycetes, Sordariales) มีมากกว่า 400 ชนิด (Rodríguez *et al.*, 2002; Wang and Zheng 2005a, b; Wang *et al.*, 2014) เป็นเชื้อราที่สามารถพบและแยกได้โดยทั่วไปจากรากพืชและดิน ในประเทศไทยมีรายงานว่าพบเชื้อราปฏิปักษ์ชนิดนี้ประมาณ 20 ชนิด (Gené and Guarro, 1996; Petcharat and Soytong, 1991; Somrithipol, 2004; Somrithipol *et al.*, 2004; Soytong, 1991; Udagawa, 1973) การจัดจำแนกเชื้อรา *Chaetomium* สามารถทำได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Doveri, 2013) เช่น ลักษณะและตำแหน่งของ ascomata setae รูปร่างลักษณะและขนาดของ ascospores (von Arx *et al.*, 1986; Doveri, 2013) แต่ในปัจจุบันมีการจัดจำแนกและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Chaetomium* ใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรมกันมากขึ้น (Lee and Hanlin, 1999; Untereiner *et al.*, 2001; Greif *et al.*, 2009; Asgari and Zare, 2011; Pornsuriya *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014) แต่เนื่องจากการศึกษาส่วนใหญ่ใช้จำนวนตัวอย่างที่จำกัด ทำให้ผลการศึกษาความแตกต่างรวมถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ เชื้อรา *Chaetomium* ที่ไม่มีความชัดเจน ทำให้การจัดจำแนกเชื้อรา *Chaetomium* ด้วยลักษณะทางพันธุกรรมมีความคลุมเครือ (Wang *et al.*, 2014) Wang *et al.*

(2014) ใช้ข้อมูลของดีเอ็นเอจากยีน 5 ตำแหน่งคือ the Large Subunit (LSU), the Internal Transcribed spacer (ITS), β -tubulin, translation elongation factor (TEF1- α) และ the large subunit of RNA polymerase II (RPB1) เพื่อแยกความแตกต่างของ *Ch. indicum* พบว่ามีเชื้อรา *Chaetomium* จำนวน 6 ชนิด ภายใต้ชื่อ *Ch. indicum* (Wang et al., 2014)

Pornsuriya et al. (2008) แยกเชื้อรา *Chaetomium* หลายชนิด จากดินในพื้นที่เพาะปลูก สับปะรดในจังหวัดพัทลุง ได้แก่ *Ch. aureum*, *Ch. bostrychodes*, *Ch. carinthiacum*, *Ch. cochliodes*, *Ch. cupreum*, *Ch. flavigenum*, *Ch. gracile*, *Ch. perlucidum* และ *Ch. succineum* ซึ่งเชื้อราเหล่านี้มีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน ต่อมา มีรายงานว่า เชื้อรา *Ch. siamense* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับเชื้อรา *Ch. cupreum* มาก แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบกับลักษณะทางพันธุกรรม กลับพบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน (Pornsuriya et al., 2011) และพบข้อบ่งชี้ว่าเชื้อรา *Ch. cupreum* ที่รายงานพบในประเทศไทยมีความหลากหลาย แต่ความหลากหลายนี้ไม่สามารถจำแนกได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์ ITS เพียงตำแหน่งเดียว และมีแนวโน้มเป็น complex species ที่อาจมีมากกว่า 1 ชนิดภายใต้ชื่อ *Ch. cupreum* เช่นเดียวกับ *Ch. globosum* (Pornsuriya et al., 2011)

Chaetomium cupreum และ *Ch. globosum* ถูกเลือกจากจำนวนหลายชนิดของเชื้อรา *Chaetomium* ที่มีการใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี และมีการส่งเสริมให้ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยทั้งทางรัฐและเอกชน รวมถึงมีการผลิตเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* ในเชิงพาณิชย์ ปัจจุบันหลายบริษัทได้แสดงความประสงค์ขอขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* เป็นสารชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ การตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* ที่นำไปใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากส่งผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกันและกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืช แต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา genus *Chaetomium* ชนิด มีความคล้ายคลึงกันมากและลักษณะความแตกต่างที่พบไม่เพียงพอทำให้เกิดข้อจำกัดต่อการจัดจำแนก อีกทั้งการจัดจำแนกนั้นต้องอาศัยความเชี่ยวชาญและชำนาญเป็นอย่างยิ่ง จึงต้องมีการพิจารณาลักษณะทางด้านพันธุกรรมมาร่วมวิเคราะห์ เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและการจัดจำแนกที่ถูกต้อง

ในปัจจุบันการจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถบ่งชี้ชนิดของเชื้อรา *Chaetomium* ที่ชัดเจนได้ในระดับ genus แต่ในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ เนื่องจากลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาเชื้อราใน genus ของเชื้อราทั้งสองชนิดนั้นมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย จึงทำให้ยากต่อการจำแนกในระดับสปีชีส์ต้องมีการพิจารณาลักษณะทางด้านพันธุกรรมมาร่วมวิเคราะห์ เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและการจัดจำแนกที่ถูกต้อง กรมวิชาการ-เกษตร เป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบในการตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ที่ขอขึ้นทะเบียน ดังนั้นจึงดำเนินการวิจัยเพื่อจำแนกชนิดที่ถูกต้องของเชื้อรา *Chaetomium* และเพื่อให้ได้ข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา ที่นำมาขึ้นทะเบียน

สารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้การตรวจสอบเพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร รวมถึงประสิทธิภาพและความยั่งยืนในการใช้สารชีวภัณฑ์ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช อีกทั้งข้อมูลของลักษณะทางด้านพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษา สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อนำไปประยุกต์ในการตรวจสอบเชื้อราดังกล่าวในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร และเพื่อใช้เปรียบเทียบหรือศึกษาความหลากหลายและการวิวัฒนาการต่อไป

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อให้ได้เชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* มาตรฐานที่ได้รับการจำแนกชนิดอย่างถูกต้อง และเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* ในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร

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 สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบบิดผ่าตัด 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 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)

Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2)

FRPB2-5F: GAYGAYMGWGATCAYTTYGG (Liu *et al.*, 2000)

FRPB2-7cR: CCCATRGCTTGYYTRCCCAT (Liu *et al.*, 2000)

β -Tubulin 2 (TUB2)

T1: AACATGCGTGAGATTGTAAGT (O'Donnell and Cigelnik 1997)

Bt2b: ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC (Glass and Donaldson 1995)

6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012)

วิธีการ

1. ศึกษาข้อมูลของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum*

รวบรวมข้อมูลสถานะของอนุกรมวิธานของรา *Chaetomium* ให้เป็นปัจจุบัน ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง การจัดจำแนกชนิดของ *Chaetomium* โดยใช้ข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุล

2. เก็บและรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum*

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบราก ตัวอย่างพืช เพื่อแยกหาเชื้อรา *Chaetomium* ด้วยวิธี alcohol and heat treatment และตัวอย่างเชื้อรา *Chaetomium* ที่นำมาใช้ในการวิจัยบางไอโซเลท นำมาจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

แยกตัวอย่างของเชื้อราเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการสกัด DNA และเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยจัดเก็บใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัย-พัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ เพื่อใช้ในการศึกษาหรือเป็นตัวอย่างอ้างอิงต่อไป

3. ศึกษา และจำแนกชนิดเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะข้อมูลสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

นำเชื้อราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโคนี้ด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) ศึกษา และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆของราที่วัดขนาดไว้

จำแนกชนิดเชื้อรา

เปรียบเทียบลักษณะของรา *Chaetomium* ที่ศึกษากับคู่มือของ von Arx *et al.* (1986); Doveri (2013) และ Wang *et al.* (2014; 2016a; 2016b)

4. จำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตัดหรือเขี่ยเส้นใยรวมถึง conidia ของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และทำการสกัดตามวิธีของ Dungsard *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ -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)

Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2)

FRPB2-5F: GAYGAYMGWGATCAYTTYGG (Lie et al., 1990)

FRPB2-7cR: CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT (Lie et al., 1990)

β -Tubulin 2 (TUB2)

T1: AACATGCGTGAGATTGTAAGT (O'Donnell and Cigelnik 1997)

Bt2b: ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC (Glass and Donaldson 1995)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง ITS EF1- α LSU rpb2 และ TUB2 ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่คุณผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เตรียม 1% agarose gel และผสม SERVA HiSens Stain G ในอัตราส่วน 1:50,000 ผสมผลิตภัณฑ์ PCR 5 ไมโครลิตร ด้วย loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท MacroGen Korea เพื่อทำ purification และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021.0.3 และบันทึกข้อมูลในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence) แต่ละตำแหน่งมาจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ร่วมกับ type sequences ของแต่ละตำแหน่งได้แก่ LSU, ITS, TUB2, rpb2 และ TEF1 จากรายงานศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อราวงศ์ *Chaetomiaceae* (Pornsuriya et al., 2008; Doveri, 2013; Wang et al., 2014; 2016a; 2016b) และตรวจสอบการจัดเรียงของชุดข้อมูล (alignment) ด้วยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MAFFT X (Kumar et al., 2018) ใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) เพื่อกรองส่วนที่เป็น ambiguous sequence จากนั้นจัดทำ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง LSU, ITS, TUB2, rpb2 และ TEF1 บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดของรา *Chaetomium* โดยวิเคราะห์จาก combined dataset ของ LSU-ITS-TUB2-rpb2-TEF1 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)

การบันทึกข้อมูล

เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราใน Culture Collection ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) ข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ consensus sequences) จะถูกเก็บบันทึกและใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการตรวจสอบสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป จัดเก็บดีเอ็นเอต้นแบบไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การจำแนกชนิดเชื้อรา *Chaetomium*

การเก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบราก และตัวอย่างพืช นำมาแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ รวมถึงเชื้อราจาก culture collection เมื่อศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบเชื้อราที่มีลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Chaetomium* จำนวน 12 ไอโซเลท จากการจำแนกชนิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ ได้แก่ การเจริญของรากับอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใตกล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope พบว่าเชื้อราทั้ง 12 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม (Table 3) ได้แก่

1. ลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Ch. cupreum* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อราไอโซเลท M0069 และ M0774 ที่แยกได้จากดิน จาก อ.เมือง จ. เพชรบุรี
2. ลักษณะพ้องกับเชื้อรา *Ch. globosum* จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ C0501, C0502, M0234, M0235, M0236, M0747, M0999, M1000 และ M1001
3. ลักษณะพ้องกับเชื้อราในสกุล *Chaetomium* แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ M0224

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Ch. cupreum* และ *Ch. globosum* โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

นำเชื้อรากลุ่มที่ 1 จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อรากลุ่มที่ 2 คัดเลือกตัวแทน จำนวน 7 ไอโซเลท และเชื้อรากลุ่มที่ 3 จำนวน 1 ไอโซเลท รวมจำนวน 12 ไอโซเลท มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation เมื่อเชื้อราเจริญจนมีขนาดโคโลนีประมาณ 6 เซนติเมตร จึงดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นดำเนินการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของยีนตำแหน่ง LSU, ITS, TUB2, rpb2 และ TEF1 ด้วยไพรเมอร์ของแต่ละตำแหน่ง ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing)

จัดทำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021.0.3 จากนั้นจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ร่วมกับ type sequences ของแต่ละตำแหน่งได้แก่ LSU, ITS, TUB2, rpb2 และ TEF1 จากรายงานศึกษาอนุกรมวิธานของเชื้อราวงศ์ *Chaetomiaceae* (Pornsuriya *et al.*, 2008; Doveri, 2013; Wang *et al.*, 2014; 2016a; 2016b) (Table 4) จำแนกชนิดของรา *Chaetomium* โดยวิเคราะห์จาก combined dataset ของ ITS-LSU-rpb2-TEF1-TUB2 ของ 140 taxa โดย *Microascus trigonosporus* เป็น outgroup ทำการวิเคราะห์รวม 3,581 bases/taxa มีข้อมูลของแต่ละ partition ดังนี้ ITS = 629 bases, LSU = 520 bases, rpb2 = 650, TEF1 = 866 bases และ TUB2 = 916 bases

เชื้อราในวงศ์ *Chaetomiaceae* ได้มีการศึกษาและจัดจำแนกด้วยวิธีการทางอนุกรมวิธานตามมาตรฐานสากลโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานร่วมกับข้อมูลพันธุกรรม จากข้อมูล MycoBank พบว่า วงศ์ *Chaetomiaceae* ประกอบไปด้วยเชื้อรากว่า 55 สกุล (MycoBank, 2020) ได้แก่ *Achaetomiella*, *Achaetomium*, *Acrophialophora*, *Allocanariomyces*, *Amesia*, *Aporothielavia*, *Arcopilus*, *Arxotrichum*, *Batnamyces*, *Bolacotricha*, *Bommerella*, *Botryotrichum*, *Brachychaeta*, *Canariomyces*, *Carteria*, *Chaetomidium*, *Chaetomiopsis*, *Chaetomiotricha*, *Chaetomium*, *Chrysanthotrichum*, *Chrysocorona*, *Cladochaete*, *Collariella*, *Condenascus*, *Corynascella*, *Corynascus*, *Crassicarpon*, *Dichotomopilus*, *Emilmuelleria*, *Erythrocarpon*, *Erythrocarpum*, *Farrowia*, *Floropilus*, *Humicola*, *Hyalosphaerella*, *Melanogone*, *Microthielavia*, *Myceliophthora*, *Mycothermus*, *Mycothermus*, *Ovatospora*, *Parachaetomium*, *Parathielavia*, *Parvabulbium*,

Pseudothielavia, *Remersonia*, *Setiferotherca*, *Stellatospora*, *Stolonocarpus*, *Subramaniula*, *Taifanglania*, *Thermothelomyces*, *Thermothielavioides*, *Trichocladium* และ *Vanhallia*

เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction พบว่า topology ที่ได้จาก ML และ BI มีความสอดคล้องกัน และเป็น monophyletic (Figure 7) โดย phylogram ที่ได้จาก ML พิจารณา ค่า bootstrap support values ($\geq 70\%$) ที่วิเคราะห์จาก 1,000 ซ้ำ และ BI ได้จากค่าเฉลี่ยของ 20,000 converged trees ดังนั้นผลการจัดจำแนกด้วยข้อมูลพันธุกรรมของเชื้อรา *Chaetomium* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อราไอโซเลท M0069 และ M0774 พบว่าอยู่ใน clade ของ genus *Arcopilus* สามารถจำแนกได้เป็น *Arcopilus cupreus* เชื้อราไอโซเลท M0234 M0235 M0236 M0747 M0999 M1000 และ M1001 สามารถจำแนกได้เป็น *Ch. globosum* และ เชื้อราไอโซเลท M0224 สามารถจำแนกได้เป็น *Ovatospora brasiliensis*
อนุกรมวิธานและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *A. cupreus*, *Ch. globosum* และ *O. brasiliensis* มีดังนี้

Chaetomium cupreum L.M. Ames, Mycologia 41 (6): 642 (1949)

Synonymy:

≡ *Chaetomium trilaterale* var. *cupreum* (L.M. Ames) J.C. Cooke, Mycologia 65 (5): 1218 (1973)

≡ *Arcopilus cupreus* (L.M. Ames) X. Wei Wang & Samson, Studies in Mycology 84: 217 (2016)

Current Name: *Arcopilus cupreus* (L.M. Ames) X. Wei Wang & Samson, Studies in Mycology 84: 217 (2016)

Classification

Kingdom	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
Class	<i>Sordariomycetes</i>
Subclass	<i>Sordariomycetidae</i>
Order	<i>Sordariales</i>
Family	<i>Chaetomiaceae</i>
Genus	<i>Arcopilus</i>
Species	<i>cupreus</i>

ลักษณะของเชื้อ โคลนีของเชื้อราและ ascomata มีสีชมพูถึงแดง ascomata รูปร่างคล้ายไข่ ขนาด 79.7-142.7 x 94.7-151.5 μm เส้นของ ascomatal ลักษณะ arcuate ปลายแบบ circinate หรือขด

มีผนังชั้น asci รูปร่างแบบกระบอกมีสปอร์อยู่ภายในจำนวน 8 ascospores ต่อ ascus สปอร์มีรูปร่างแบบ reniform ขนาด 4.7-6.7 x 6.710.0 μm มี apical germ pore 1 รูอยู่ด้านบนสปอร์ (Figure 8)

Accession No.: M0069 และ M0774

หมายเหตุ - ชื่อวิทยาศาสตร์ปัจจุบันของ *Ch. cupreum* คือ *A. cupreus* (L.M. Ames) X. Wei Wang & Samson, *Studies in Mycology* 84: 217 (2016)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>TTGTGGACGCTACCTTTAACGTTGCTTCGGCGGGCGGCCGCTCCCTGGAAAGCCCCTGTGGCCGCCGGGGCTGCGAGCCC
CCCCGGCCCCCTCGCGGGGGCGCCCGCGGAGGATACCAACTCTTGATTATTTAGGCCTCTGAGTCTTCTGTAAGTAAG
TCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCATCAAG
CCCCAGGCTTGTGTTGGGACCTGCGGCTGCCGAGGCCCTGAAATCCAGTGCGGGTTCGCTGTCACCCCGAGCGTAGTAGCAA
TATCTCGCTCAGGGCGTGTGCGGGCACCGCCGTTAAAAGCTGCCTTCTGGCAACACCCAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
```

the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α)

```
>GAGAAGGTTAGTCTACAGTTCTATCTCTATTCTCATGATCTGGGAGTCCCCTCAGTCAGCATCGCATCACAAATCCCTCCAT
CGCCGCATCATTTCCGCCCATCTCCCGCATTTTCGCTGGGCTGCCTTTGTGGCTCTACCCCTCCCTTATCAAGCGGGGCGAGAA
AACCTGATAGCAATTTTTTTGTGGACCGCTTACCCCGCCCTCCCATCCCCGCCACATCTTAGGTGCCAAGACACAGGGCTGAC
AGCAGATCACAGGAAGCCGCTGAGCTCGCAAGGCTCCTTCAAGTATGCGTGGTCTTGTACAAGCTCAAGCCGAGCGTGAGC
GTGGTATCACCATGATATCGCCCTCTGGAAGTTTCGAGACCCCGAGTACTATGTCACCGTCATCGGTACGTTTTCGCGCCACTCCA
GCGCGATGCCCATAGCATCCTGTCTGGCGCACAGCTAACAGTTGATTCTTGCAGATGCCCGGCGCATCG-
TGACTTCATCAAGAACATGATCA
```

the Large Subunit (LSU, 28S)

```
>GGGCTCCGCCCTAGGCTTCGTCACTGACCTCCACGGCCGCTACTCCTCAGGGCATCGTTTCTACCCTGAGGGCGGGTATGGGT
GGGACGCTTAGCGCCATCCATTTTCAGGGCTAGTACATTCGGCAGGTGAGTTGTTACACAGTCTTAGCGGATTCGACTTCCAT
GGCCACCGTCTGCTGTAAGATGTAACGCCTTTTGTGGTGTCTGATGAGCGTCCACTCCGGCACCTTAACCCCGGTTCCGGT
TCATCCCGCATCGCCAGTTCTGCTTACCAAAAATGGCCCACTAGTGTGGTACATTGGAATGCCACGTTCAATTAAGTAACAAGG
GCTTCTTACATATTTAAAGTTTGAGAATGGATGAAGGCTAAAAGCGCCCCGAGTCCCTAATCATTCGCTTTACCTCATAAACTG
AAGACAACACTGCTATCCTGAGGGAACTTCGGCGGTAACAGCTACTAGATGGTTCGATTAGTCTTTCCGCCCATGCTCAGATT
TGACGATCGATTTGCAGTCAAGAACGCTGCGAGCCTCCACCAGATTTCTCTGGCTTACCCTATCCAAGCATAGTTCACCATC
TTTCGGGTCCAAGGCTTAACGCTCCTACTCAAATCCATCCGAAAACATCAGGATCGGTGATGATGCGCCGAAGCTCTCACCTACG
TTCATTTTACATTACGCGTGGGGTTTTACACCCAAACACTCGCGCAAAACCTTGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGTGCT
GGTGACCATTACGCCAGCATCCTTGAGATGCGCGAACCTCGTCCCCGCGAGGGCATTGCACCCAGGGCTATAACTCCCGGA
GGAGCTACGTTCCCTGGGCTTTATCCCCCGGAGAACCAGTGTGGCTGAGCCGGGCGAGTGCACCGGTGAGAACACCGGA
TGATCAGCCCCGGCGAAGTCTGGTCAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTACGCTGCTATTTAACCTCTTTTCAAGTGCTTTTCA
TCTTTCGATCACTCTACTTGTGCGTATCGGTCTCTGGCCGGTATTTAGCTTTAGAAGAAATTTACCTCCCATTTTGGAGCAGCATC
```

CCAAACTACTCGACTCGTGAAGGAGCTTTACACAGGCTAGGCATCCAACCTATACGGGGCTCTACCCTCTATGGCGCCCCGTCC
AGGGGACTCAGAAGGTGCCGCGCTAAAGCTTCTCTGCAAATTACAACCT

partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2)

>TCGTCTCGCTGGTGCAGGGCTGCGGAGGAAGAAGCGTCATCTCGTTTGAAGTCTCGCTGGTTCGGGACATTCGCGATCGCGAGTT
CAAGATCTTCTCGGATGCGGGACGCGTCATGCGGCCGCTCTTACCCTGGAGCAGGAGGACAATGGTTTCGAGTGGTGTGGAGAAG
GGCCAGCTGATCCTCAACAAGGAGCACATTACGCGGCTCGAGGCGGACAAGGAGCTGGGCAAGTACCACCCCGACTACTGGGGCT
GGAAAGGTCTCCTTAAGTCGGGGGCCATCGAGTACCTGGATGCCGAGGAGGAAGAGACGGCCATGATCTGCATGACGCCCGAGGA
TCTCGACATGTACCGCTGAGCAAGATGGGCTTACGCGTGCAGCACCCTCTGGTCAAGGCAATAACCGGATCAGGACAAAAGACGA
ACCCGACGACGCACATGTACACGCACTGCGAGATCCACCCAGCATGCTGCTCGGCATCTGCGCGAGCATATTCCCTTCCCCGAC
CACAACCA

β-Tubulin 2 (TUB2)

>TTCTCTCCCCCGCATTCTTCGCCGAGGGTCCAAGACGCGTCTGGGCTGCATTTTGGGGGCCCTGAAATTACCCACACACT
GCGACGACCTCCGGCTTCAGAGCCTCCCCGACCTACGCCCGACCCGACACCCGCGATGACGCTGTTGGATGGATGAAACCGCA
TGCTGACTAGTTCTTCGTGTACAGGTCCACCTCCAGACCCGCAATGCGTAAGTCGATTGACTCGAGCTGTGCGACCGACCAGG
TGATGCGGTGTACTGACACGCACTCTCCAGGTAACCAATCGGTGCCGCTTCTGGTATGTTTAACTGCCGGATAATCCAACG
TCGGTCCAGGAGGCATTCAAGATTAACCTTCTACAGGCAGACCATCTCCGGCGAGCACGGCTTGACAGCAATGGCGTGTATGTG
ACTGTCGCCAGTCCAACCTCGGTTAACCCACGCTCACCCGCTATTAGGTACAACGGCACCTCGGAGCTCCAGCTCGAGCGCATG
AACGTCTATTTCAACGAGGTGAGTTGATTGCGAGGACCCGGCTCAACAGTAGAGTTCTGCTTGTGACGGCATCTTTTCTGCAG
GCCTCCGGCAACAAGTATGTCCCCGTGCCGCTCTGGTGCATCTGGAGCCCGGACCATGGACCGCGTCCGCGCCGCCCCCTTCG
GCCAG

Chaetomium globosum Kunze ex Fr., *Systema Mycologicum* 3: 255 (1829)

Synonymy:

- =*Chaetomium globosum* Kunze, *Mykologische Hefte* 1: 15, tab. 1, fig. 9 (1817)
- =*Chaetomium globosum* var. *affine* Tschudy (?)
- =*Chaetomium kunzeanum* var. *chlorina* Sacc. (?)
- =*Chaetomium affine* Corda, *Icones fungorum hucusque cognitorum* 4: 37, tab. 8, fig. 101 (1840)
- =*Chaetomium olivaceum* Cooke & Ellis, *Grevillea* 6 (39): 96 (1878)
- =*Chaetomium kunzeanum* Zopf (1881)
- =*Chaetomium spirale* Zopf, *Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Germanicae Naturae Curiosorum* 42 (5): 275 (1881)
- =*Chaetomium cochlioides* Palliser (1910)
- =*Chaetomium cochliodes* Palliser, *North American Flora* 3 (1): 61 (1910)
- =*Chaetomidium barbatum* Traaen, *Nytt Magazin for Naturvidenskapene* 52: 19 (1914)
- =*Chaetomium subterraneum* Swift & Povah, *Mycologia* 21 (4): 210 (1929)
- =*Chaetomium ochraceum* Tschudy, *American Journal of Botany* 24: 472 (1937)
- =*Chaetomium fibripilium* L.M. Ames, *Mycologia* 42 (5): 642 (1950)

- =*Chaetomium mollipilium* L.M. Ames, *Mycologia* 42 (5): 644 (1950)
 =*Chaetomium lusitanicum* M.R.M. Gomes, *Estudos e Informação*: 3 (1953)
 =*Chaetomium subglobosum* Sergeeva, *Not. syst. Pl. non-vasc.*: 172 (1960)
 =*Chaetomium rectum* Sergeeva, *Not. syst. Pl. non-vasc.*: 143 (1961)
 =*Chaetomium spiculipilium* L.M. Ames, *A monograph of the Chaetomiaceae*:
 37 (1963)

Classification

Kingdom	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
Class	<i>Sordariomycetes</i>
Subclass	<i>Sordariomycetidae</i>
Order	<i>Sordariales</i>
Family	<i>Chaetomiaceae</i>
Genus	<i>Chaetomium</i>
Species	<i>globosum</i>

ลักษณะของเชื้อ โคลนินของเชื้อราไม่มีสีเขียวอ่อนถึงเขียวมะกอกเข้ม ascomata ลักษณะกลม จนถึงรูปร่างคล้ายไข่ ความสูง 210-300 μm เส้นผ่าศูนย์กลาง 145-220 μm เริ่มแรก ascomata ไม่มีสี แต่สะท้อนต่อแสงได้ สปอร์อยู่เป็นกลุ่มบน ascomata ascomatal มีลักษณะ translucent ยาว flexuous และ บาง (Figure 9) asci อาจพบได้ไม่บ่อยเนื่องจากลักษณะนี้จะปรากฏและคงอยู่ไม่นาน สปอร์มีสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างแบบ biapiculate ขนาด 9.5-11(-11.5) \times 7.5-8.5(-9) μm มี apical germ pore 1 รูอยู่ด้านบนสปอร์ (Wang *et al.*, 2016b)

Accession No.: M0234, M0235, M0236, M0747, M0999, M1000, M1001, C0501 และ C0502

หมายเหตุ - *Chaetomium globosum* เป็น species complex ประกอบไปด้วยอย่างน้อย 12 ชนิด (Wang *et al.*, 2016b) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อรา *Ch. globosum* ที่ทำการศึกษาคือ *Ch. globosum sensu stricto* (true *Ch. globosum*)

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>CAGAGTTGCAAACTCCCTAAACCATTGTGAACGTTACCTATACCGTTGCTTCGGCGGGCGGCCCGGGGTTACCCCCGGGCG
 CCCCTGGGCCCCACCGCGGGCGCCCGCGGAGGTACCAAACCTTTGATAATTTATGGCCTCTCTGAGTCTTCTGTAAGTGAATAAG
 TCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
 AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCATCAAG
 CCCCCGGGCTTGTGTTGGGACCTGCGGCTGCCGAGGCCCTGAAAAGCAGTGGCGGGCTCGCTGTGCGACCGAGCGTAGTAGCA
 TACATCTCGTCTGGTGCGCCCGGGTTCGGCCGTTAAACCACCTTTTAAACCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGACCC
 GCTGAACT

the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α)

>GATTGCGCTATTCTCATCATCGCCTCTGGTACTGGTACTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCAGCTC
 TGCTCGCTACACCTGGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGCCGCTACCAG
 GAGATCATCAAGGAGACCTCCAACCTTCATCAAGAAGTCCGGTACAACCCCAAGTCCGTTGCTTCCCTATCTCCGGCTTCCA
 CGGCGACAACATGCTTGAGCCACCACCAACGCTCCTTGGTACAAGGCTGGGAGAAGGAGGCCAAGGGGGTGC AAGTCACT
 GGCAAGACCCCTCTCGAGGCCATCGACTCCATCGAGCCCCCAAGCGTCTACCGACAAGCCGCTCCGTCTTCCCTCCAGGATGT
 GTACAAGATCGGTGGTATCGGAACGGTCCCTGTGCGCGTATCGAGACTGGTATCTGAAGCCCGGTATGGTGTGTCACCTTCGCCC
 CTTCAACGTCACCACGGAAGTCAAGTCCGTGAGATGCACCACGAGCAGTACCGAAGGTGTTCCCGCGACAACGTTGGTTTC
 AACGTCAAGAAGCTCTCCGTCAAGGATATTCGCCGTGGCAACGTCGCTGGCGACTCCAAGAACGACCCGCCATGGGTGCTGCGT
 CGTTCGACGCTCAGGTCAATTGTCCTGAACCACCCCGCCAGGTCCGTGCTGGTACGCCCCCGTCTCGACTGCCACACGGCCAC
 ATTGCTGCAAGTTCGCGGAGCTCCAGCAGAAGATCGATCGCCGTACCGCAAGTCTGTTGAAGACTCGCCAAGTTCATCAAGTC
 TGGCGATGCCGCATCGTCAAGATGATCCCTCCAAGCCATGTGCGTTGAGT

the Large Subunit (LSU, 28S)

>GGGCTCCGCCCTAGGCTTCGTCACCTCCACGCGCCCTACTCCTCAGGGCATCGTTTCTACCCTGAGGGCGGGGTATGGGT
 GGGACGCTTGAGCGCCATCCATTTTTCAGGGCTAGTACATTCGGCAGGTGAGTTGTTACACAGTCCTTAGCGGATTCGACTTCCAT
 GGCCACCGTCTGCTGTCAAGATGTAACGCTTTTGTGGTGTCTGATGAGCGTCCACTCCGGCACCTTAACCCCGGTTCCGT
 TCATCCCGCATCGCCAGTTCGCTTACCAAAAATGGCCACTAGTGTGGTACATTCGAATGCCACGTTCAATTAAGTAACAAGG
 GCTTCTACATATTTAAAGTTTGAAGTGGATGAAGGCTAAAAAGCGCCCCGAGTCCCTAATCATTGCTTTACCTCATAAACTG
 AAGACAACACTGCTATCCTGAGGAAACTTCGGCGGTAAACGCTACTAGATGGTTCGATTAGTCTTTTCGCCCCATGCTCAGATT
 TGACGATCGATTTGACGTCAGAACCGCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCTCTGGCTTACCCTATCCAAGCATAGTTCACCATC
 TTTCCGGTCCAAGGTTAACGCTCCTACTCAAATCCATCCGAAAACATCAGGATCGGTGATGATGCGCCGAAGCTCTCACCTACG
 TTCATTTTATTACGCGTGGGGTTTTACACCCAAACACTCGCGCAAAACCTTGACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGTTCGCT
 GGTGACCATTACGCCAGCATCCTTGAGATGCGGAACTCGGTCCCGCGAGGGCATTGCACCCAGGGCTATAACTCCCGGA
 GGAGCTACGTTCCCTGGGCCTTTATCCCCCGCGAGAACCGATGCTGGCCTGAGCCGGGAGAGTGCACCCGGTGAAGAACCCGGA
 TGATCAGCCCGCGCAAGTCTGGTCAAGCGCTTCCCTTCAACAATTTACGTCGATTTTAAACCTCTTTTCAAAGTGTCTTTCA
 TCTTCGATCACTTACTGTGCGTATCGGTCTCTGGCCGATTTAGCTTTAGAAGAAATTTACCTCCATTTTGAAGCAGCATTC
 CCAAATACTCGACTCGTGAAGGAGCTTTACACAGGCTAGGCATCCAATAACGCGGCTCTCACCTCTATGGCGCCCCGTTCC
 AGGGGACTCAGAAGGTGCCGCGCTAAAGCTTCTCTGCAAATTACAAC

partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2)

>CGCTGGTTCAGGGGCTGCGGAGAAAGAACGTTATCTCGTTTGGAGTTTCGCTGTTAGAGACATCCGCGACCGTGAGTTCAAGAT
 CTTTTAGATGCGGGTGGGTGATGAGGCCGCTGTTACGGTGGAGCAAGAACCGAATGGCGAGAGCGGCGCTGAGATGGGCGCA
 CTGATCCTGAACAAGGATCATATTGGGCGCTGAAGATGGACGCAGAGCTGGGCAAATACCACCCGACTACTGGGGTGGCAAG
 GCCTGTTGAAGTCGGGCGCTATTGAGTATCTGATGCTGAGGAGGAGGAGACGGTCATGATCTGCATGACCCCCAGGATCTTAT
 CAGTTCGGTCCCGCAAGATGGGAAGGATCGAGCCGGACAACCTCCGGGTTGGGCAATAACCGGATCAAGACGAAACCAATCCGA
 CAACTCACATGTACAGCACTGCGAGATCCATCCGAGCATGCTCCTCGGCATCTGCGCAAGCATCATCCCTTTCTGATCATAAC
 CAATCGCCAGGAACACATAACAGTCCGCCATGGGCAAGCAGGCGATGGG

β-Tubulin 2 (TUB2)

>GGCCTCTGAACACTACCCCACTCATCGGGACGACCCTCATTTCCACAGCTCCTGACGGATAGCAACACGACGATGATGCGAAGCTTG
 ATGATGCTGACTGCTTTTTTCGACTATAGTTCCACCTCCAGACCGGCCAGTGCGTAAGTTGGACCGAATTGAACATTACGACCGAC
 CGGCCGCGCAGGATAACTGACATGGAGCTCTCTAGGGTAACCAAATCGGTGCCGCTTTCTGGTACGTCCAAGCAAAGCAAACACTC
 TTGGCTGATGACAATCGAGACTGACTTCTTTTCAGGCAGACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCAATGGCGTGTATGTGGG
 CATGACAGTTCCCAACCGATAAATCCCCGCTCACCGCTTCGATAGGTACAACGGCACCTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGTATGAACG
 TGTAATTCAACGAGGTCAGTCGGGTCAAATAATTTTACACGACCGAGTGATGGCGTGCTCATAGTATTATACAGGCTTCCGGCAAC
 AAGTATGTTCTCGCGCTGTCTCTCGACTTGGAGCCCGCACCATGGATGCCGTCCGTGCCGCCCCCTTCGGCCAGCTTCTCCG

Ovatospora brasiliensis (Bat. & Pontual) X. Wei Wang & Samson, *Studies in Mycology*
 84: 207 (2016)

Synonymy:

=*Chaetomium brasiliense* Bat. & Pontual, *Boletim da Secretaria de Agricultura
 Indústria e Comércio do Estado de Pernambuco* 15: 70 (1948)

=*Chaetomium alba-arenulum* L.M. Ames, *A monograph of the Chaetomiaceae*: 10
 (1963)

=*Chaetomium congoense* L.M. Ames, *A monograph of the Chaetomiaceae*: 18 (1963)

=*Chaetomium fuscum* Basu (?)

=*Chaetomium alba-avenulum* L.M. Ames (1963)

Classification

Kingdom	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
Class	<i>Sordariomycetes</i>
Subclass	<i>Sordariomycetidae</i>
Order	<i>Sordariales</i>
Family	<i>Chaetomiaceae</i>
Genus	<i>Ovatospora</i>
Species	<i>brasiliensis</i>

ลักษณะของเชื้อ โคลนีของเชื้อราไม่มีสีเทาอ่อนถึงเทาเข้ม ascomata ลักษณะกลม หรือกลมแบน
 เล็กน้อย ความสูง 85-135 µm เส้นผ่าศูนย์กลาง 75-110 µm เริ่มแรก ascomata ไม่มีสี แต่สะท้อน
 ต่อแสงได้ สปอร์อยู่เป็นกลุ่มบน ascomata ascomatal มีสีน้ำตาล เป็นแบบ septate (Figure 10)
 asci แบบ cylindrical ascospores มีสีน้ำตาลเขียว รูปร่างคล้ายไข่ ลักษณะ bilaterally flattened
 ขนาด (6.5 –) 7 – 7.5(– 8) × (5.5–) 6–6.5(–7) × (4.5–)5–5.5(–6) µm มี apical germ pore 1 รู
 อยู่ด้านบนสปอร์ (Wang *et al.*, 2016a)

Accession No.: M0224

หมายเหตุ - *Ovatospora brasiliensis* เป็น type species ของเชื้อราสกุล *Ovatospora* แต่เดิมชื่อราชนิดนี้เคยจำแนกเป็น *Ch. brasiliensis*

- การเขียนชื่อวิทยาศาสตร์ในแต่ละระดับของการจัดจำแนกด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic ranks) เป็นไปตามข้อแนะนำที่พึงปฏิบัติตาม the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Thine *et al.*, 2020)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>AAAGAGTTGCAAAACTCCCTAAACCATTGTGAACCTACCTTCAACCGTTGCTTCGGCGGGTTGGCACCGGGTCTCCCGGCGCCCCG
GCCCCCTCGCGGGCGGCCCGGAGGTACCTAACTCTTGAACATTGTATGGCCTCTCTGAGTCTTCTGACTGAATAAGTCAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
TCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCATCAAGCCCCGGGCTTG
TGTTGGGACCTGCGGCTGCCGAGGCCCTGAAATGCAGTGGCGGGCTCGCTGTACACCGAGCGTAGTAGCATTATCTCGCTCTGG
GCGTGCTGCGTGTCCCGGCCGTAACGACCTTACACCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAGACCCGCTGAAC
```

the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α)

```
>GGCCGACTGCGCCATTCTCATCATTGCCGCTGGTACTGGTACTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCAC
GCTCTGCTCGCTACACCCTCGGTGTGAAGCAGCTCATCGTCCGATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCCGAGGACCGCTA
CAACGAGATCATCAAGGAGACCTCCAACCTTCATCAAGAAGTTCGGCTACAACCCCAAGGCTGTTGCCTTCGTCCTCCATCTCGGGTT
TCCATGGCGACAACATGCTTGGAGCCACTACCAACGCTCCCTGGTACAAGGGCTGGTCCCGGAGAGCGGCTCCAACAAGTTCTCC
GGCAAGACCTCCTTGGAGCCATCGACTCGATCGAGCCCCCAAGCGTCCCACCGACAAGCCCTCCGTCTTCCCTCCAGGACGT
GTACAAGATTGGCGGTATCGGCACTGTCCCCGTGGCCGTATCGAGACTGGTGTCTCAAGCCCGCATGGTTGTACCTTCGCTC
CCTCCAACGTCACCACTGAAGTCAAGTCCGTCCGATGCACCACGAG
```

the Large Subunit (LSU, 28S)

```
>ATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTG
GCCTCGGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTAGGCGCGGCTCCTTCTGAGTGCCTGGAACGGGACGCCACAGAGGGTGA
GAGCCCCGTATAGTTGGAAGCCTAGCCTGTGTAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAATGGGAGGTA
AATTTCTTCTAAAGCTAAATACCGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGG
TTAAATAGCACGTGAAATTTGTAAGGGAAGCGCTTGTGACCAGACTTGCGCCGGGCTGATCATCCGGAGTTCTCTCCGGTGAC
TCTGCCCGGCTCAGGCCAGCATCGGTTCTCGCGGGGGATAAAGGCTCGGGAACGTAGCTCCTCCGGGAGTGTATAGCCCGG
GCGTAATGCCCTCGCGGGGACCGAGGTTCCGCGCATCTGC
```

partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2)

```
>CGTCTCGCTTGTCCAGAACCTTCGCCGAAGAACGTCATTTCTTCGAGGTTTCGCTGGTCCGCGATATCCGCGATCGCGAGTTC
AAGATTTTTCGGACGCTGGGCGGTGATGAGGCCGCTACACCGTGGAGCAGGAAGAGAATGGCGAGAACGACGTCGAGAAGG
GCCAGCTCATCTACCAAGAAGCACATCGAGAACCTGGAGCGGGACAAGGAGCTCGGCAAATACACCCCGATTACTGGGGTTG
GCCAGGCTCCTGAGATCGGGTGCATTGAGTACCTCGATGCCGAGGAGGAAGAGACGGCCATGATCTGCATGACCCAGAGGAT
CTCGACATGTACCGCTTGCCTAAGTGGCTTCTCCGCTCGGACAACCTTGGAGTGGGCAACAACCGGATCAGGACCAAGATGAA
TCCGACAACCTCACATGTACACACTGTGAGATTACCCAGCATGTTGCTCGGTATCTGTGCGAGCATTATTCCTTTCCCGACC
ACAACCA
```

β-Tubulin 2 (TUB2)

```
>CGCGTCGGGGAAGCTACTTTTTTTCTCGGTTCCCTGGATCTACCCACACTCTCGGGATGTGGCCGTTCCACACCCGACCTTC
CTGACCGACAGTGAAGGGGACGGCACCCTCGACGACGCGAAGGGCATGATGCTGACTTTACTTTCTCTACAGGTTCCAC
TCCAGACCGGCAATGCGTAAGTGGACGAACATCGCCACGGGCGAACGATGGCGTGGTATGGGGTGGACTGACATTGAGCTTTC
CAGGGTAACCAAAATTGGTGCCGCTTTTGGTATGTTTGAATCCGGAAATCAAGATCCGTTTGATCCAAGGTCATCGAGACTGACT
CTCCATTACAGGCAGACCATCTCCGGGAGCAGGCCTCGATAGCAACGGCGTGTATGTGACTGTGCGGATCCCCGACTCGGTTAT
TCCCTCGCTACCACCGCCACAGGTACAATGGAACCTCTGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGAGTGG
GATTGAATACATACCGACGAGATTTTGGTATGGGAGGGTGTACTGACCGCCACTCCGCTCCAGGCTTCCGGCAACAAGTATGTCCC
TCGCGCCGCTCTGGTTCGACTTGAGCCCGGCACCATGGACGCTGTCCGTGCCGGCCCTTCGGCCAGC
```

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาครั้งนี้ ได้ชนิดที่ถูกต้อง รายละเอียดลักษณะทางสัณฐานวิทยา และดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อรา *Arcopilus cupreus* (syn. *Chaetomium cupreum*) *Ch. globosum* และ *Ovatospora brasiliensis* (syn. *Ch. brasiliensis*) จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS), the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α), the Large Subunit (LSU, 28S), Partial RNA polymerase II second largest subunit (rpb2) และ β -Tubulin 2 (TUB2) และยังได้ไอโซเลทของเชื้อรา *A. cupreus*, *Ch. globosum* และ *O. brasiliensis* เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการตรวจสอบชนิดที่ถูกต้องของเชื้อรา *Trichoderma* และ *Chaetomium* ที่มีการขอขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์เชื้อราโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร อีกทั้งข้อมูลชนิดที่ถูกต้องลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาเป็นประโยชน์ทางการศึกษาในหน่วยงานราชการ เช่น กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สถาบันการศึกษา และหน่วยงานเอกชน ซึ่งจะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Chaetomium* ในประเทศไทย รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลและองค์ความรู้เพื่อใช้ในการต่อยอดงานวิจัยวิจัย เช่น การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะเพื่อการตรวจสอบชนิดที่แม่นยำและรวดเร็ว

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะใช้เป็นฐานข้อมูล และองค์ความรู้เพื่อใช้ในการต่อยอดงานวิจัย โดยข้อมูลและผลที่ได้จากการวิจัย จะทำให้ได้วิธีการจัดจำแนก และชนิดที่ถูกต้องรวมทั้งข้อมูลลักษณะทางด้านพันธุกรรม เช่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานของเชื้อรา *A. cupreus*, *Ch. globosum* และ *O. brasiliensis* เพื่อใช้เปรียบเทียบและตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเชื้อราในสารชีวภัณฑ์ที่นำมาขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร โดยจะช่วยลดความเสี่ยงในการใช้ชนิดของสารชีวภัณฑ์ที่ไม่ถูกต้องหรือไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผลประสิทธิภาพและความยั่งยืนของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสมาชิก กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- Asgari, B. and R. Zare. 2011. The genus *Chaetomium* in Iran, a phylogenetic study including six new species. *Mycologia* 103: 863-882.
- Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- Di-Pietro, A., R. Kung, M. Gutrella and F.J. Schwinn. 1991. Parameters influencing the efficacy of *Chaetomium globosum* in controlling *Pythium ultimum* damping-off of sugar beet. *Journal of Plant Disease and Protection* 98: 565-573.
- 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.
- Doveri, F. 2013. An additional update on the genus *Chaetomium* with descriptions of two coprophilous species, new to Italy. *Mycosphere* 4: 820-846.
- Druzhinina, I.S., C.P. Kubicek, M. Komon-Zelazowska, T.B. Mulaw and J. Bissett. 2010. The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC evolutionary biology* 10: 94-94.
- Gené, J. and J. Guarro. 1996. A new *Chaetomium* from Thailand. *Mycological Research* 100: 1005-1009.
- Glass, N.L. and G.C. Donaldson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved gene from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.
- Greif, M.D., A.M. Stchigel and S.M. Huhndorf. 2009. A re-evaluation of genus *Chaetomium* based on molecular and morphological characters. *Mycologia* 101: 554-564.
- 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.

- 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.
- Kindermann, J., Y. El-Ayouti, G.J. Samuels and C.P. Kubicek. 1998. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the Internal Transcribed Spacer region 1 of the rDNA cluster. *Fungal Genetics and Biology* 24: 298-309.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Lee, S. and R.T. Hanlin. 1999. Phylogenetic relationships of *Chaetomium* and similar genera based on ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 91: 434-442.
- Liu, K.L., A. Porras-Alfaro, C.R. Kuske, S.A. Eichorst and G. Xie. 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 1523-1533.
- Liu, Y.J., S. Whelen and B.D. Hall. 2000. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16:1799-1808.
- Mbarga, J.B., G.M. Ten Hoopen, J. Kuate, A. Adiobo, M.E.L. Ngonkeu, Z. Ambang, A. Akoa, P.R. Tondje and B.A.D. Begoude. 2012. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. *Crop Protection* 36: 18-22.
- Mycobank. 2020. *Chaetomiaceae*. (online). Available. <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search> (February 18, 2021).
- Nylander, J.A., J.C. Wilgenbusch, D.L. Warren 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.
- O'Donnell, K and E. Cigelnik. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103–116. doi.10.1006/mpev.1996.0376.

- 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.
- Petchanart, V. and K. Soyong. 1991. *Chaetomium* in soil under para rubber. Songklanakarin. *Journal of Science and Technology* 13: 129-132.
- Pornsuriya, C., K. Soyong, S. Poeaim, S. Kanokmedhakul, P. Khumkomkhet, F. Lin, H.K. Wang and K.D. Hyde. 2011. *Chaetomium siamense* sp. nov., a soil isolate from Thailand, produces a new chaetoviridin, G. *Mycotaxon* 115: 19-27.
- Pornsuriya, C., F.C. Lin, S. Kanokmedhakul and K. Soyong. 2008. New record of *Chaetomium* species isolated from soil under pineapple plantation in Thailand. *Journal of Agriculture Technology* 4: 91-103.
- Rodríguez, K., A. Stchigel and J. Guarro. 2002. Three new species of *Chaetomium* from soil. *Mycologia* 94: 116-126.
- Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Samuels, G.J., S.L. Dodd, W. Gams, L.A. Castlebury and O. Petrini. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94: 146-170.
- Samuels, G.J., S.L. Dodd, B. Lu, O. Petrini, H.J. Schroers and I.S. Druzhinina. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology* 56: 67-133.
- de los Santos-Villalobos, S. D.A., Guzmán-Ortiz, M.A. Gómez-Lim, J.P. Délano-Frier, S. de-Folter, P. Sánchez-García and J.J. Peña-Cabriales. 2013. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). *Biological Control* 64: 37-44.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313.
- Somrithipol, S. 2004. Coprophilus fungi. pp.119-128. In : E.B.G Jones, M. Tanticharoen and K.D. Hyde, eds. *Thai fungal diversity*. BIOTEC, Thailand.
- Somrithipol, S., N.L. Hywel-Jones and E.B.G. Jones. 2004. Seed fungi. pp. 129-140. In : E.B.G Jones, M. Tanticharoen and K.D. Hyde, eds. *Thai fungal diversity*. BIOTEC, Thailand.

- Soytong, K. 1990. A taxonomic study of *Chaetomium* spp. in Thailand. Page 55. In : 4th International Mycological Congress Abstract 1990, August 28-September 3, Regensburg, Germany.
- Soytong, K. 1991. Species of *Chaetomium* in Thailand soils. *Thai Phytopathology* 11: 3-4.
- Soytong, K., S. Kanokmedhakul, V. Kukongviriyapa and M. Isobe. 2001. Application of *Chaetomium* species (Ketomium) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: A review article. *Fungal Diversity* 7: 1-15.
- 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.
- Thines, M., T. Aoki, P.W. Crous, K.D. Hyde, R. Lücking, E. Malosso, T. W. May, A.N. Miller, S.A. Redhead, A.M. Yurkov and D.L. Hawksworth. 2020. Setting scientific names at all taxonomic ranks in italics facilitates their quick recognition in scientific papers. *I MA Fungus* 11: 1-5.
- Udagawa, S. 1973. Three new species *Chaetomium* species from Thailand soil. *Report of the Tottori Mycological Institute* 10: 429-435.
- Untereiner, W.A., V. Debois and F.A. Naveau. 2001. Molecular systematics of the ascomycetes genus *Farrowia* (*Chaetomiaceae*). *Canadian Journal of Botany* 79: 321-333.
- 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.
- von Arx, J.A., J. Guarro and M.J. Figueras. 1986. The Ascomycetes genus *Chaetomium*. *Beih Nova Hedwigia* 84: 1-162.
- Wang, X.W., J. Houbraken, J.Z. Groenewald, M. Meijer, B. Andersen, K.F. Nielsen, P.W. Crous and R.A. Samson. 2016a. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Studies in Mycology* 84: 145-224.
- Wang, X.W., L. Lombard, J.Z. Groenewald, J. Li, S.I.R. Videira, R.A. Samson, X.Z. Liu and P.W. Crous. 2016b. Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. *Persoonia* 36: 83-133.

- Wang, X.W., X.L. Wang, F.J. Liu, X.M. Zhao, J. Li and L. Cai. 2014. Phylogenetic assessment of *Chaetomium indicum* and allied species, with the introduction of three new species and epitypification of *C. funicola* and *C. indicum*. *Mycological Progress* 13: 719-732.
- Wang, X.W. and R.Y. Zheng. 2005a. *Chaetomium acropullum* sp. nov. (*Chaetomiaceae*, *Ascomycota*), a new psychrotolerant mesophilic species from China. *Nova Hedwigia* 80: 413-417.
- Wang, X.W. and R.Y. Zheng. 2005b. *Chaetomium ampulliellum* sp. nov. (*Chaetomiaceae*, *Ascomycota*) and similar species from China. *Nova Hedwigia* 81: 247-255.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp.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.
- Yeh, C.C. and J.B. Sinclair. 1980. Effect of *Chaetomium cuprerum* on seed germination and antagonism to other seedborne fungi of soybean. *Plant Disease* 64: 468-470. *Mycological Research* 98: 531-534.

Table 1 List of specimens obtained from study.

Voucher No.	Group	Taxa	Sources	Locations
M0069	1	<i>Chaetomium cupreum</i>	soil surround roots	Mueang, Phetchaburi
M0774	1	<i>Ch. cupreum</i>	soil surround roots	Mueang, Phetchaburi
M0234	2	<i>Ch. globosum</i>	<i>Citrullus lanatus</i>	Kaset Sombun, Chaiyaphum
C0501	2	<i>Ch. globosum</i>	<i>Citrullus lanatus</i>	Kaset Sombun, Chaiyaphum
M0235	2	<i>Ch. globosum</i>	<i>Cucumis sativus</i>	incubated seeds
M0236	2	<i>Ch. globosum</i>	<i>Cucumis sativus</i>	incubated seeds
M0747	2	<i>Ch. globosum</i>	<i>Paris polyphylla</i>	Mae Rim, Chiangmai
M0999	2	<i>Ch. globosum</i>	soil surround roots	Mae Rim, Chiangmai
M1000	2	<i>Ch. globosum</i>	soil surround roots	Pan, Chiangrai
C0502	2	<i>Ch. globosum</i>	soil surround roots	Pan, Chiangrai
M1001	2	<i>Ch. globosum</i>	soil surround roots	Wiang Pa Pao, Chiangrai
M0224	3	<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Kaset Sombun, Chaiyaphum

Table 2 List of *Chaetomiaceae* included in this study.

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
<i>Achaetomium</i>								
<i>ACh. globosum</i>	CBS 332.67		Rhizosphere, Lucknow, India	KX976570	KX976695	KX976793	KM655479	KX976911
<i>Ac. luteum</i>	CBS 618.68		Cucurbita rhizosphere, Delhi, India	KX976571	KX976696	KX976794	-	KX976912
	CBS 544.83		Rosa stem, Lahore, Pakistan	KX976572	KX976697	KX976795	-	KX976913
<i>Ac. macrosporum</i>	CBS 152.97		Leaf litter, Uttar Pradesh, India	KX976573	KX976698	KX976796	-	KX976914
	CBS 532.94		Mangrove mud, Japan	KX976574	KX976699	KX976797	-	KX976915
<i>Ac. strumarium</i>	CBS 333.67		Soil, Lucknow, India	AY681204	AY681170	KC503254	KC503252	AY681238
<i>Amesia</i> gen. nov.								
<i>Am. atrobrunnea</i>	CBS 379.66	<i>Ch. atrobrunneum</i>	Mouldy mattress, Solomon Islands	JX280771	JX280666	KX976798	-	KX976916
	CBS 250.75		Air, Uttar Pradesh, India	KX976575	KX976700	KX976799	-	KX976917
<i>Am. cymbiformis</i>	CBS 175.84	<i>Ch. cymbiforme</i>	Tent rope, Solomon Islands	KX976576	KX976701	KX976800	-	KX976918
<i>Am. nigricolor</i>	CBS 600.66	<i>Ch. nigricolor</i>	Vegetable detritus, India	KX976578	KX976703	KX976802	KM655454	KX976920
<i>Am. gelasinospora</i>	CBS 673.80	<i>Ch. gelasinosporum</i>	Soil, Qus, Egypt	KX976580	KX976705	KX976804	-	KX976922
<i>Arcopilus</i>								
<i>A. aureus</i>	LC11932	<i>Ch. aureum</i>	<i>Saccharum officinarum</i> , China	MN215718	MN215556	MN255399	-	MN329889
<i>A. cupreus</i>	CBS 560.80	<i>Ch. cupreum</i>	Dung of moose, Mietta Hot Springs, Canada	KX976584	KX976709	KX976808	-	KX976926
	LC13497		<i>Saccharum officinarum</i> , China	MN215731	MN215569	MN255412	-	MN329902
	M0069		Soil, Phetchaburi, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M0774		Soil, Phetchaburi, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
<i>A. fusiformis</i>	CBS 484.85	<i>Ch. fusiforme</i>	Dung of rodent, Newberry Mts., Nevada, USA	KX976585	KX976710	KX976809	-	KX976927
<i>A. flavigenus</i>	CBS 337.67	<i>Ch. flavigenum</i>	Soil, Johannesburg, South Africa	KX976587	KX976712	KX976811	-	KX976929
<i>A. turgidopilosus</i>	CBS 169.52	<i>Ch. turgidopilosum</i>	Top of storage tent, USA	KX976588	KX976713	KX976812	-	KX976930
<i>Botryotrichum</i>								
<i>B. atrogriseum</i>	CBS 130.28		Dung of rabbit, The Netherlands	KX976589	KX976714	KX976813	-	KX976931

Table 2 List of *Chaetomiaceae* included in this study. (Continued)

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
<i>Botryotrichum</i>								
<i>B. atrogriseum</i>	CBS 604.69		Corn field soil, Waterloo, Ontario, Canada	KX976590	KX976715	KX976814	-	KX976932
<i>B. murorum</i>	CBS 163.52	<i>Ch. murorum</i>	Great Smoky Mts., Tennessee, USA	KX976591	KX976716	KX976815	-	KX976933
	CBS 173.68		<i>Homo sapiens</i> , Netherlands	KX976592	KX976717	KX976816	-	KX976934
<i>B. peruvianum</i>	CBS 460.90		Dung of herbivore, Massanella, Spain	KX976623	KX976720	KX976819	-	KX976937
	CBS 421.93		Air, La Habana, Cuba	KX976596	KX976721	KX976820	-	KX976938
<i>B. piluliferum</i>	CBS 654.79		Pastry, Enschede, Netherlands	KX976597	KX976722	KX976821	-	KX976939
<i>B. spirotrichum</i>	CBS 211.55	<i>Emilmuelleria spirotricha</i>	Dung of deer, California, USA	KX976601	KX976726	KX976825	-	KX976943
	CBS 828.71		Dung of donkey, Algeria	KX976602	KX976727	KX976826	-	KX976944
<i>Chaetomium sensu stricto</i>**								
<i>Ch. afropilosum</i>	CBS 145.38	-		KT214574	KT214605	KT214675	KT214713	KT214751
<i>Ch. angustispirale</i>	CBS 137.58		Russia	JN209862	MH869263	KF001824	KF001734	JN256141
<i>Ch. capillare</i>	CBS 128489		USA	KT214583	KT214614	KT214686	KT214724	KT214760
<i>Ch. cervicicola</i>	CBS 128492		USA	KT214558	KT214592	KT214662	KT214697	KT214735
<i>Ch. citrinum</i>	CBS 693.82		Japan	KT214587	KT214617	KT214691	KT214730	KT214764
<i>Ch. coarctatum</i>	CBS 162.62		Russia	JN209863	MH869715	KF001802	KF001712	JN256142
<i>Ch. contagiosum</i>	CBS 128494		USA	KT214555	KT214589	KT214659	KT214694	KT214732
<i>Ch. cucumericola</i>	CBS 378.71		Turkey	KT214579	KT214610	KT214680	KT214718	KT214756
	CBS 126777		Iran	HM365247	MH875677	KT214681	KT214719	KT214757
<i>Ch. elatum</i>	CBS 142034	<i>Ch. pannosum</i> , <i>Ch. tenuissimum</i>	Denmark	KX976612	KX976733	KX976832	-	KX976954
	CBS 910.70	<i>Ch. ramipilosum</i>	Germany	KC109757	KC109757	KF001821	KF001731	KC109775
	CBS 374.66	<i>Ch. virgecephalum</i>	USA	KC109758	MH870466	KF001820	KF001730	KC109776
<i>Ch. fimeti</i>	CBS 139034	<i>Thielavia fimeti</i> , <i>T. californica</i>	Germany	KT214559	KT214593	KT214663	KT214698	KT214736
	CBS 168.71		Canada	KT214560	FJ666358	FJ666389	KT214699	KT214737

Table 2 List of *Chaetomiaceae* included in this study. (Continued)

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
<i>Chaetomium sensu stricto</i>**								
<i>Ch. globosporum</i>	CBS 108.83		India	KC109750	JX280708	KF001825	KF001735	KC109768
<i>Ch. globosum</i>	CBS 160.62		Germany	KT214565	KT214596	KT214666	KT214704	KT214742
	CBS 132.30	<i>Ch. subterraneum</i>	USA	KC109755	KC109755	KF001792	KF001702	KC109773
	CBS 147.60	<i>Ch. mollipilium</i>	USA	JN209909	MH869475	KF001793	KF001703	JN256179
	CBS 164.62	<i>Ch. rectum</i>	Poland	JN209920	MH869717	KF001796	KF001706	JN256190
	CBS 371.66	<i>Ch. cruentum</i>	USA	JN209871	JN209871	KF001795	KF001705	JN256148
	MUCL 39526	<i>Ch. globosum</i> var. <i>flavoviride</i>	Hungary	JN209875	JN209875	KF001800	KF001710	JN256152
	MUCL 39527	<i>Ch. globosum</i> var. <i>griseum</i>	Hungary	JN209899	JN209899	KF001799	KF001709	JN256173
	CBS 149.60	<i>Ch. subglobosum</i>	Russia	JN209930	MH869477	KF001808	KF001718	JN256200
	CBS 155.52	<i>Ch. cochliodes</i>	USA	KC109754	MH868494	KF001811	KF001721	KC109772
	CBS 373.66	<i>Ch. cochliodes</i>	USA	KC109756	MH870465	KF001809	KF001719	KC109774
	M0234		<i>Citrullus lanatus</i> , Chaiyaphum, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M0235		incubated seeds of <i>Cucumis sativus</i> , Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M0236		incubated seeds of <i>Cucumis sativus</i> , Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M0747		<i>Paris polyphylla</i> , Chiangmai, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M0999		soil, Mae Rim, Chiangmai, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M1000		soil, Pan, Chiangrai, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
	M1001		soil, Wiang Pa Pao, Chiangrai, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
<i>Ch. graminiforme</i>	CBS 506.84		Canada	KT214584	KT214615	KT214687	KT214725	KT214761
<i>Ch. grande</i>	CBS 126780		Iran	HM365253	MH875679	KT214657	KT214692	HM365273
	CGMCC 3.9414		China	KC109749	KC109749	KF001826	KF001736	KC109767
<i>Ch. interruptum</i>	CBS 126660		Iran	HM365246	MH875650	KT214665	KT214703	KT214741
<i>Ch. madrasense</i>	CBS 315.74		India	KC109751	KC109751	KF001831	KF001741	KC109769

Table 2 List of *Chaetomiaceae* included in this study. (Continued)

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
<i>Chaetomium sensu stricto**</i>								
<i>Ch. madrasense</i>	CBS 113.83	<i>Ch. ascotrichoides</i>	Argentina	KC109752	KC109752	KF001832	KF001742	KC109770
	CBS 110.83	<i>Ch. gibberosporum</i>	Israel	KC109753	MH873286	KF001833	KF001743	KC109771
<i>Ch. megalocarpum</i>	CBS 149.59	<i>Ch. atosporum</i>	Greece	KC109744	KC109744	KF001828	KF001738	KC109762
<i>Ch. novozelandicum</i>	CBS 124555		New Zealand	KT214576	KT214607	KT214677	KT214715	KT214753
	CBS 128484		USA	KT214578	KT214609	KT214679	KT214717	KT214755
<i>Ch. nozdrenkoe</i>	CBS 163.62	<i>Ch. difforme</i>	Russia	KT214556	KT214590	KT214660	KT214695	KT214733
	CBS 809.68		Germany	KT214557	KT214591	KT214661	KT214696	KT214734
<i>Ch. pilosum</i>	CBS 335.67	<i>Chaetomidium pilosum</i>	Australia	KT214586	FJ666356	FJ666387	KT214729	KT214763
<i>Ch. pseudocochliodes</i>	CGMCC 3.9441		China	JN209925	JN209925	KF001816	KF001726	JN256195
	CGMCC 3.9469		China	JN209926	JN209926	KF001815	KF001725	JN256196
<i>Ch. pseudoglobosum</i>	CBS 574.71			KT214573	KT214604	KT214674	KT214712	KT214750
<i>Ch. rectangulare</i>	CBS 126778		Iran	HM365239	HM365239	KT214688	KT214726	HM365285
	CGMCC 3.9409		China	JN209873	JN209873	KF001822	KF001732	JN256150
<i>Ch. spirochaete</i>	CBS 730.84		USA	JN209921	MH873518	KF001819	KF001729	JN256191
<i>Ch. subaffine</i>	CBS 637.91		USSR	JN209929	MH873969	KF001817	KF001727	JN256199
<i>Ch. subfimetii</i>	CBS 370.66	<i>Chaetomidium subfimetii</i>	Wales	KT214562	FJ666354	FJ666385	KT214701	KT214739
	CBS 169.71		USA	KT214563	FJ666357	FJ666388	KT214702	KT214740
<i>Ch. tectifimetii</i>	CBS 142032		Dust, USA	KX976640	KX976737	KX976836	-	KX976982
<i>Ch. telluricola</i>	CBS 151.59		United Kingdom	KT214582	KT214613	KT214685	KT214723	KT214759
<i>Ch. tenue</i>	CBS 139.38			KT214568	KT214599	KT214669	KT214707	KT214745
	CBS 140.38			KT214570	KT214601	KT214671	KT214709	KT214747
<i>Ch. umbonatum</i>	CBS 293.83		Canada	KT214575	KT214606	KT214676	KT214714	KT214752
<i>Ch. undulatum</i>	CBS 126775		Iran	HM365251	MH875675	KT214682	KT214720	HM365279

Table 2 List of *Chaetomiaceae* included in this study. (Continued)

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
<i>Chaetomium sensu stricto</i>**								
<i>Ch. unguicola</i>	CBS 128446		USA	KT214567	KT214598	KT214668	KT214706	KT214744
<i>Collariella</i>								
<i>Col. bostrychodes</i>	CBS 163.73	<i>Ch. bostrychodes</i>	Dung of antelope, East Africa	KX976641	KX976738	KX976837	-	KX976983
	CBS 586.83		Soil, Germany	KX976642	KX976739	KX976838	-	KX976984
<i>Col. causiformis</i>	CBS 792.83	<i>Ch. causiform</i>	Sweatband of helmet liner, Solomon Islands	KX976646	KX976741	KX976840	-	KX976988
<i>Col. carteri</i>	CBS 128.85		Air, British Columbia, Canada	KX976647	KX976742	KX976841	-	KX976989
<i>Col. gracilis</i>	CBS 146.60	<i>Ch. gracile</i>	Soil, Tsu, Mie, Japan	KX976648	KX976743	KX976842	-	KX976990
<i>Col. quadrangulata</i>	CBS 142.58	<i>Ch. quadrangulatum</i>	Soil, French Polynesia	KX976650	KX976745	KX976844	-	KX976992
	CBS 152.59		Dung of rabbit, Derbyshire, Chatsworth Park, England	KX976651	KX976746	KX976845	-	KX976993
<i>Col. robusta</i>	CBS 551.83	<i>Ch. robustum</i>	Litter, Portland Parish, Jamaica	KX976652	KX976747	KX976846	-	KX976994
<i>Col. virescens</i>	CBS 148.68	<i>Ch. virescens</i>	Agricultural soil, Lahore, Pakistan	KX976654	KX976749	KX976848	-	KX976996
<i>Corynascella</i>								
<i>Cor. humicola</i>	CBS 337.72		Soil, Piedmont, North Carolina, USA	KX976656	KX976751	KX976850	-	KX976998
<i>Cor. inaequalis</i>	CBS 331.75	<i>T. inaequalis</i>	Soil, Kirovograd, Ukraine	KP204017	-	MK919363	KP204015	MK919420
<i>Dichotomopilus</i>								
<i>D. dolichotrichus</i>	CBS 162.48	<i>Ch. dolichotrichum</i>	Great Smoky Mts., USA	HM449049	HM449063	KX976852	KC485023	JF772462
<i>D. erectus</i>	CBS 140.56	<i>Ch. erectum</i>	Petroselinum sativum, USA	HM449044	HM449058	KX976854	KC485018	JF772458
<i>D. funicola</i>	CBS 159.52	<i>Ch. funicola</i>	Germany	GU563369	GU563354	KX976856	KC485013	JF772461
<i>D. fusus</i>	CBS 372.66	<i>Ch. fusum</i>	Leaf litter, Bataan, Costa Rica	KX976660	KX976754	KX976859	KM655466	KX977002
<i>D. indicus</i>	CGMCC 3.14184	<i>Ch. indicum</i>	Rhizosphere of Panax notoginseng, Yunnan, China	GU563367	GU563360	KX976861	KC485005	JF772453
<i>D. pratensis</i>	CBS 133396	<i>Ch. pratense</i>	Soil, Huangnan, Qinghai Province	GU563372	GU563357	KX976866	KC485017	JF772450
<i>D. pseudoerectus</i>	CBS 252.75		Air, Uttar Pradesh, India	KX976667	KX976761	KX976869	-	KX977009
<i>D. pseudofunicola</i>	CBS 142033		Dust, USA	KX976668	KX976762	KX976870	-	KX977010

Table 2 List of *Chaetomiaceae* included in this study. (Continued)

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
<i>Dichotomopilus</i>								
<i>D. ramosissimus</i>	CGMCC 3.14183	<i>Ch. ramosissimum</i>	Rhizosphere of Panax Notoginseng, Yunnan, China	GU563371	GU563361	KX976871	KC485021	JF772452
<i>D. reflexus</i>	CBS 157.49	<i>Ch. reflexum</i>	Germinating seed, Toledo, Ohio, USA	HM449051	HM449055	KX976873	KC485027	JF772460
<i>D. subfunicola</i>	CGMCC 3.12892	<i>Ch. subfunicola</i>	Soil, Shihezi, Xinjiang Autonomous Region	JX867125	JX867125	KX976875	KC485014	JX867122
<i>D. variostiolatus</i>	CBS 179.84	<i>Ch. variostiolatum</i>	Tarpaulin, New Guinea	KX976672	KX976766	KX976879	-	KX977014
<i>Humicola</i>								
<i>H. fuscoatra</i>	CBS 118.14		Soil, Norway	KX976675	KX976769	KX976882	KM655463	KX977017
<i>H. olivacea</i>	CBS 142031		Dust, USA	KX976676	KX976770	KX976883	-	KX977018
<i>Melanocarpus</i>								
<i>Me. albomyces</i>	ATCC 16460		Chicken nest straw, Nevada, USA	KX976679	KX976773	KX976886	-	KX977021
<i>Me. tardus</i>	CBS 541.76		Cotton jacket, Switzerland	KX976681	KX976775	KX976888	-	KX977023
<i>Myceliophthora</i>								
<i>My. lutea</i>	CBS 145.77		Hay, Newmarket, UK	HQ871775	KM655351	HQ871816	HQ871722	KX977026
<i>My. sepedonium</i>	CBS 111.69	<i>T. sepedonium</i>	Soil, Allahabad, India	HQ871751	KX976777	HQ871827	HQ871734	KX977027
<i>Ovatospora</i>								
<i>O. brasiliensis</i>	CBS 140.50	<i>Ch. brasiliense</i>	Moist jute cloth, Calcutta, India	KX976683	KX976781	KX976896	KM655468	KX977031
	M0224		<i>Citrus maxima</i> , Chaiyaphum, Thailand	this study	this study	this study	this study	this study
<i>O. medusarum</i>	CBS 148.67	<i>Ch. medusarum</i>	Soil, Zaire	KX976684	KX976782	KX976897	-	KX977032
<i>O. mollicella</i>	CBS 583.83	<i>Ch. mollicellum</i>	Dung of spotted skunk, Washington, USA	KX976685	KX976783	KX976898	-	KX977033
<i>O. pseudomollicella</i>	CBS 251.75		Air, Uttar Pradesh, India	KX976686	KX976784	KX976899	-	KX977034
<i>O. senegalensis</i>	CBS 728.84	<i>Ch. senegalense</i>	Plant remains, Senegal	KX976687	KX976785	KX976900	-	KX977035
<i>O. unipora</i>	CBS 109.83	<i>Ch. uniporum</i>	Soil, Egypt	KX976689	KX976787	KX976902	-	KX977037
<i>Subramaniula</i>								
<i>S. anamorphosa</i>	CBS 137114	<i>Ch. anamorphosum</i>	Peritonitis of Homo sapiens, Kuwait	KP862598	KP970641	KP900667	KP900687	KP900704

Table 2 List of *Chaetomiaceae* included in this study. (Continued)

Taxa	Voucher Number	Previous name	Locations	GenBank Number				
				ITS	LSU	rpb2	tef1	tub2
<i>Subramaniula</i>								
<i>S. asteroides</i>	CBS 123294		Keratitis of Homo sapiens, USA	HQ906667	JX280731	KP900666	KP900686	KP900703
<i>S. cristata</i>	CBS 156.52	<i>Ch. cristatum</i>	Dung of rabbit, Virginia, USA	KX976690	KX976788	KX976903	KP900674	KX977038
<i>S. cuniculorum</i>	CBS 800.83	<i>Ch. cuniculorum</i>	Soil, Spain	KX976692	KX976790	KX976905	-	KX977040
<i>S. fuispora</i>	CBS 166.61	<i>Ch. fuisporum</i>	Adelaide, Australia	MH869571	NR160087	-	-	-
	CBS 199.84		Dung of marmot, Alberta, Canada	KP862601	KP970645	KP900653	KP900691	KP900707
<i>S. flavipila</i>	CBS 446.66	<i>Ch. irregulare</i>	Dead leaves, Bulgaria	KP862600	KP970647	KP900669	KP900689	KP900706
<i>S. obscura</i>	CBS 132916		Tinea pedis of Homo sapiens, Kuwait	KP862595	KP970653	KP900662	KP900681	KP900700
<i>S. thielavioides</i>	CBS 122.78		Dung of nilgai, Delhi Zoo, India	KP862597	KP970654	KP900670	KP900685	KP900708
<i>Thielavia</i>								
<i>Hyalosphaerella fragilis</i>	CBS 456.73	<i>T. fragilis</i>	Rhizosphere of Pennisetum	KX976693	KX976791	KX976907	-	KX977042
<i>Parathielavia appendiculata</i>	CBS 731.68	<i>T. appendiculata</i>	Dung of rabbit, Wales	KM655330	KM655369	KX976906	KM655460	KX977041
<i>Pa. hyrcaniae</i>	CBS 353.62	<i>T. hyrcaniae</i>	Sand dune soil, Iran	KM655329	KM655368	KX976908	KM655459	KX977043
<i>Pa. kuwaitensis</i>	CBS 945.72	<i>T. kuwaitensis</i>	Desert soil, Kuwait	KM655332	KM655371	KX976909	KM655462	KX977044
		<i>T. terricola, Ch.</i>						
<i>Pseudothielavia terricola</i>	CBS 165.88	<i>terricola</i>	Barren soil, North Carolina, USA	KX976694	KX976792	KX976910	-	KX977045
Outgroup								
<i>Microascus trigonosporus</i>	CBS 218.31		USA	LM652443	HG380436	DQ470908	HG380359	LM652655



Figure 1 Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of dataset of ITS-LSU-rpb2-TEF1-TUB2 gene regions. Bootstrap support values ($\geq 70\%$) from 1,000 replicates above nodes

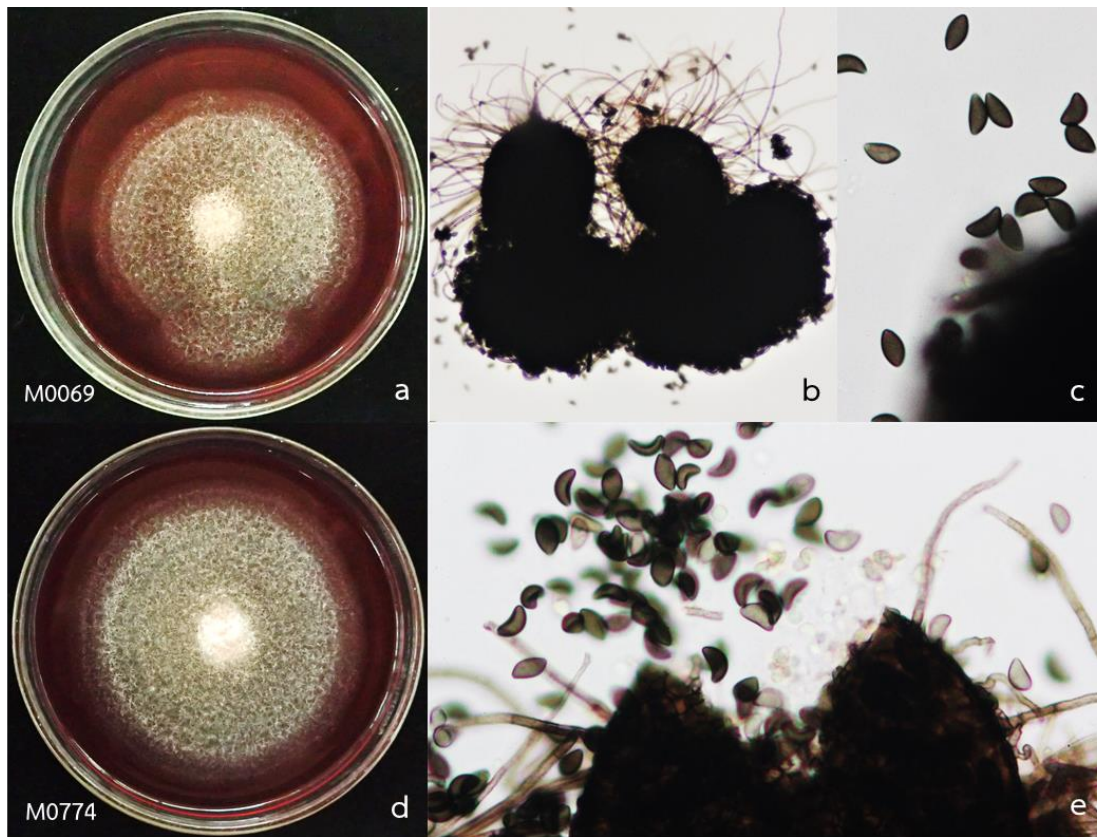


Figure 2 *Arcopilus cupreus* (syn. *Chaetomium cupreum*)

- a, d. colonies of *A. cupreus* on PDA, presented the red pigment into media;
- b. ascomata subglobose with brown walls (20x)
- c, e. brown ascospores

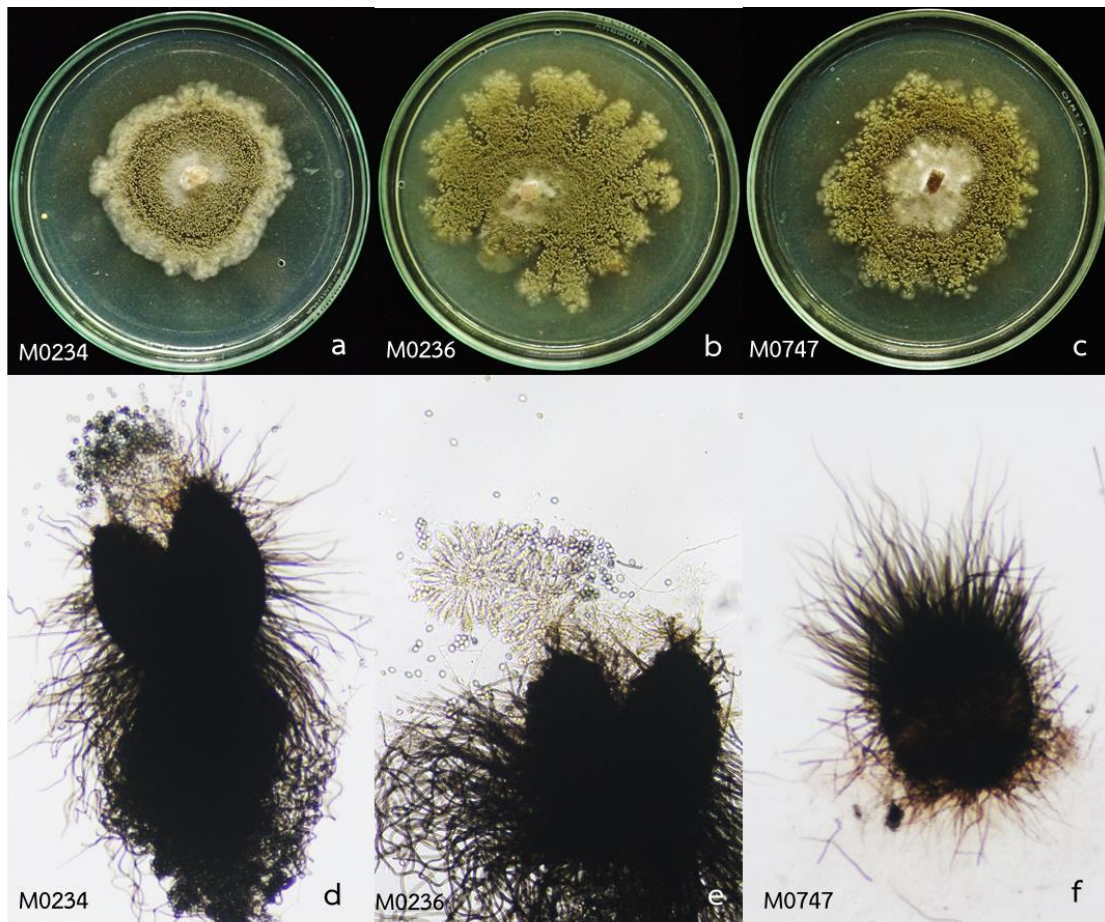


Figure 3 *Chaetomium globosum*

a-c. colonies of *Ch. globosum* on PDA;

d-f. ascomata superficial, slightly dark olivaceous buff or green (20x)

e. presented asci with 8 brown ascospores inside (20x)

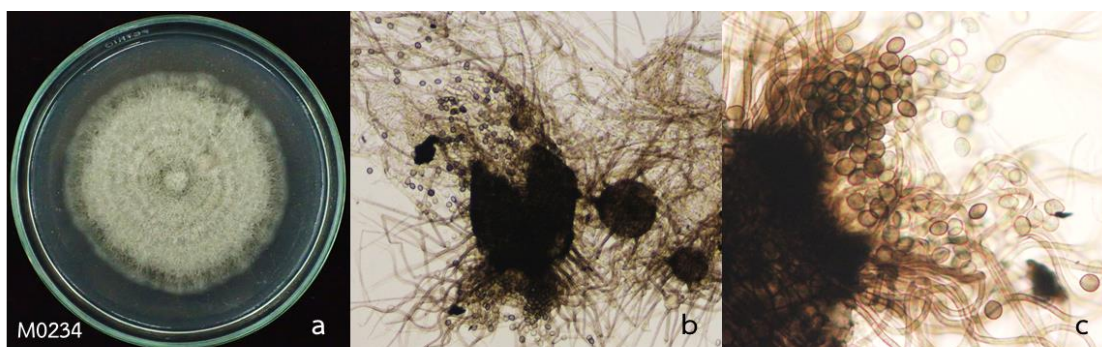


Figure 4 *Ovatospora brasiliensis* (syn. *Chaetomium brasiliensis*)

a. colonies of *O. brasiliensis* on PDA;

b. ascomata pale olivaceous grey to mouse grey (10x)

c. ascospores olivaceous brown when mature, ovate (40x)

การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของเชื้อราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืช
DNA Barcoding of Plant Pathogenic *Curvularia*

มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} ชนินทร ดวงสอาด^{1/}
 สุณิรัตน์ สีมะเดื่อ^{1/} อมรรักษ์ คัดใจเดียว^{1/}
^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/}ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Plant disease samples caused by *Curvularia* had been collected from various located in Kanchanaburi, Krabi, Chanthaburi, Chachoengsao, Chumphon, Chiang Rai, Chiang Mai, Chonburi, Nakhon Nayok, Nakhon Pathom, Nakhon Ratchasima, Prachuap Khiri Khan, Phitsanulok, Phayao, Phetchabun, Ratchaburi, Lampang, Sukhotai, Surin, Sakaeo and Surat Thani provinces during October 2018 to September 2019. The causal agents of leaf spot and blight diseases were isolated from specimens of plants by tissue transplanting technique. The fifty-five isolates, which were obtained from 39 specimens, were identified based on morphological and molecular data of Internal Transcribed Spacer (ITS), translation elongation factor 1-alpha (tef1) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene regions. The result showed that 47 isolates were identified as *Curvularia* 15 isolates. The taxa in this species is *C. akaiensis*, *C. dactyloctenicola*, *C. eragrostidis*, *C. geniculata*, *C. lunata*, *C. oryzae* and *C. pseudobrachyspora*. All specimens from this study have been curated as pest reference in plant disease collection herbarium at Plant Pathology Research Group, Plant Research and Development, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand.

Keywords : Leaf spot, leaf blight, *Curvularia*

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-14-62

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Curvularia* ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 - กันยายน 2562 จากจังหวัดกาญจนบุรี กระบี่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ชลบุรี นครนายก นครปฐม นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก พะเยา เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลำปาง สุโขทัย สุรินทร์ สระแก้ว และสุราษฎร์ธานี จำนวน 39 ตัวอย่าง แยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้จากตัวอย่างโรคพืชด้วยวิธี tissue transplanting ได้เชื้อรา *Curvularia* spp. จำนวน 47 ไอโซเลต จำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลซีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) translation elongation factor 1 - alpha (tef1) และ glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) ของเชื้อรา *Curvularia* จำนวน 15 ไอโซเลต สามารถจำแนกชนิดได้ดังนี้ *C. akaiensis* *C. dactyloctenicola* *C. eragrostidis* *C. geniculata* *C. lunata* *C. oryzae* และ *C. pseudobrachyspora* ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาจัดทำเป็นตัวอย่างแห้งเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

คำหลัก : โรคใบจุด โรคใบไหม้ เคอร์วูลาเรีย

คำนำ

เชื้อรา *Curvularia* Boedijn (1933) เป็นระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *Cochliobolus* Drechsler (1934) จัดอยู่ใน Kingdom fungi Phylum Ascomycota Class Dothideomycetes Order Pleosporales Family Pleosporaceae (Mycobank, 2019) พบแพร่กระจายทั่วไปและเป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน กัญชง ข้าวโพด และข้าว เป็นต้น (จิตรา และคณะ, 2557; วรณิภา และคณะ, 2555; เลขา และคณะ, 2544)

Cui and Sun (2012) รายงานพบเชื้อรา *Curvularia lunata* เป็นสาเหตุโรคใบจุดของบัวเป็นครั้งแรก ในเมือง Pingxiang ประเทศจีน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้บัวแห้งตายถึง 60 เปอร์เซ็นต์และส่งผลกระทบต่อผลผลิตทำให้ผลผลิตลดลงถึง 10-15 เปอร์เซ็นต์ โดยอาการของโรคเริ่มแรกมีลักษณะเป็นจุดสีม่วงแกมน้ำตาลเกิดขึ้นบนใบบัว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-3 เซนติเมตร ต่อมาบริเวณตรงกลางแผลจะเปลี่ยนเป็นสีเทาถึงขาวและขอบแผลจะเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ นอกจากนี้มีรายงานพบหญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum* cv. Alamo) มีลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลและอาการ necrotic root ซึ่งพบเป็นครั้งแรกใน Knoxville รัฐ Tennessee ประเทศสหรัฐอเมริกา แยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้จากหญ้าที่แสดงลักษณะอาการของโรค เชื้อที่แยกได้มีลักษณะโคโคนีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ สร้าง stromata สีดำ conidiophores มีสีน้ำตาลดำ ไม่แตกกิ่งก้าน มีผนังกัน polytretic sympodial และ geniculate สร้างโคนิเดียที่บริเวณปลาย โคนิเดียมีลักษณะสีน้ำตาลดำ รูปร่าง cymbiform มีผนังกัน 3-4 septate เซลล์บริเวณส่วนกลางของโคนิเดียประมาณ 1-

2 เซลล์ มีขนาดใหญ่กว่าบริเวณปลาย ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อรา *Curvularia lunata* var. *aeria* (*Cochliobolus lunatus*) (Fajolu et al., 2012)

ในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *Curvularia* ทั้งในด้านการสำรวจและความหลากหลายของเชื้อราชนิดนี้ทั้งในดินและในพืช โดยนิยม (2542) ทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราดินและเชื้อราโรคพืชในดินปลูกพืชไร่ในจังหวัดสกลนครพบว่าสามารถแยกเชื้อรา *C. eragrostidis* ได้จากดินปลูกมันสำปะหลัง และดินปอแก้ว ในปี 2553 พีระวรรณ และคณะ ทำการสำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อเชื้อราสกุล *Curvularia* โดยเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการไหม้และใบจุด มาทำการแยกเชื้อสาเหตุโรค พบว่าสามารถแยกได้เชื้อรา *Curvularia* ทั้งหมด 45 ไอโซเลต โดยแยกเชื้อสาเหตุได้จากพืชที่เป็นโรคต่างๆ ดังนี้ โรคใบจุดข้าวโพด โรคเมล็ดต่างข้าว โรคใบจุด โรคใบไหม้เยอบีร่า โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สบู่ดำ โรคใบไหม้วัชพืชหญ้าหาง โรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน โรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนดอกไม้สกุลหวาย โรคจุดบนกล้วยไม้สกุลอออยเดียม โรคใบแกลดติโอลัส โรคใบไหม้ลิ้นมังกรใบจุดบานชื่น และ ฝักจุดกระเจี๊ยบแดงเช่นเดียวกับเลขา และคณะ (2544) ศึกษาเชื้อราโรคพืชและเชื้อราอื่นๆ บนข้าวโพด ข้าว และหญ้าโดยวิธี tissue transplanting พบเชื้อราจำนวน 19 ชนิด ซึ่ง 1 ใน 19 ชนิดนี้พบทั้งเชื้อราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาของ สมศิริ และ ศศิวิมล (2011) ได้ทำการสำรวจโรคที่สำคัญของดอกกล้วยไม้ตัดดอกหวายเอี้ยสกุลที่ผลิตเป็นการค้า (*Dendrobium* 'Earsakul') พบโรคสำคัญที่ดอก คือ โรคเกสรดำและโรคดอกสนิม โดยพบเชื้อราที่แยกได้จากโรคเกสรดำ ได้แก่ *Alternaria alternata* *Curvularia lunata* *Drechslera* sp. *Nigrospora* sp. *Fusarium* sp. และ *Cladosporium* sp. และเชื้อราแยกได้จากโรคดอกสนิม ได้แก่ เชื้อรา *A. alternata* *Curvularia eragrostidis* *C. lunata* *Nigrospora* sp. และ *Drechslera* sp. นำเชื้อราที่แยกได้ไปทดสอบการเกิดโรคกับดอกกล้วยไม้ พบว่า เชื้อสาเหตุของโรคเกสรดำ คือ *C. lunata* และเชื้อราสาเหตุของโรคดอกสนิม คือ *A. alternata* และ *C. eragrostidis*

Kittimorakul et al. (2013) ทำการสำรวจโรคใบไหม้และใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างโรค 277 ตัวอย่าง จาก 11 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้ 197 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกเป็น *Curvularia* 149 ไอโซเลต และ *Colletotrichum* 48 ไอโซเลต แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของปัญหาโรคใบจุดในระยะต้นกล้าของปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้ Sunpapoa and Kittimorakul (2014) รายงานเชื้อรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยแยกเชื้อราสาเหตุของโรคจากต้นกล้าปาล์มที่มีอายุ 3-4 เดือนที่แสดงลักษณะอาการของโรคใบจุด และนำเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้มาศึกษาลักษณะสัณฐานของเชื้อราและวิธีทางอนุชีวโมเลกุลร่วมด้วย

วรัญญู และ นิวัฒน์ (2559) รายงานโรคของกล้าไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre ex Laness) พบว่ามีเชื้อรา *Curvularia* sp. มีความเกี่ยวข้องต่อการเกิดโรคใบจุดของกล้าไม้พะยุง นอกจากนี้พบมีรายงานการก่อโรคในพืชแล้วพบมีรายงานการศึกษาเชื้อรา *Curvularia* ที่แยกได้

จากวัชพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ หญ้าหัวหมู หญ้าปากควาย หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนกา หญ้าตีนนก หญ้าตีนติด หญ้าโขง หญ้าขจรจบดอกเล็ก น้ำนมราชสีห์ ผักขม ผักเบี้ยหิน และผักยาง (จิตรรา, 2547)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาในข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Curvularia* เป็นสาเหตุของโรคพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดและการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีบางงานวิจัยที่นำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลร่วมด้วย แต่การจัดจำแนกเชื้อรา *Curvularia* ยังมีความสับสน และมีปัญหาเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนกนั้นมีความคล้ายคลึงกันในระดับ species และมีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *Bipolaris* ซึ่งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้มีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นเชื้อรา *Cochliobolus* Drechsler (1934) เหมือนกัน Jeon *et al.* (2015) ได้นำข้อมูลทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา *Curvularia* โดยเลือกใช้ multi loci sequences (rDNA internal transcribed spacer (ITS), large ribosomal subunit (28S) และ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)) เพื่อจำแนกและจัดกลุ่มของเชื้อรา *Curvularia spicifera* นอกจากนี้ Sun *et al.* (2003) ได้ทำการแยกเชื้อรา *Curvularia geniculata* group โดยใช้ Brn1 gene sequences จำแนกชนิดและเพื่อยืนยันความแตกต่างของเชื้อราในกลุ่มนี้ เชื้อรา *C. geniculata* group ประกอบไปด้วย *Curvularia affinis* *C. fallax* และ *C. senegalensis* เชื้อราทั้ง 3 ชนิดนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อรา *C. geniculata* มาก หากใช้ข้อมูลด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวคงไม่เพียงพอต่อการยืนยันผลความแตกต่างจึงจำเป็นต้องมีข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลช่วยยืนยันผลความแตกต่างเพื่อความถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น ดังนั้น การศึกษาและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Curvularia* จึงจำเป็นต้องใช้ทั้งข้อมูลด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับข้อมูลด้านชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันผลการจัดจำแนกที่ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น และข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่ได้สามารถนำไปศึกษาต่อทางด้านวิวัฒนาการของเชื้อราชนิดนี้ เพื่อเป็นข้อมูลในการสืบค้นและเป็นแหล่งอ้างอิงในการทำงานวิจัยต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ มีด กรรไกร กรรไกรตัดกิ่ง ถุงพลาสติก กระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษบันทึก ปากกาเคมี และเครื่องระบุพิกัด
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่
 - ตู้เยี่ยเชื้อ
 - หม้อนึ่งความดัน
 - ตู้อบฆ่าเชื้อ
 - Microcentrifuge
 - Thermal cyclers
 - Vortex

- Tissue Lyser
 - Gel electrophoresis
 - เครื่องถ่ายภาพเจล
 - microwave micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร และ
 - Dry heat block
 - กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อมกล้องถ่ายภาพ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บีกเกอร์ กระจกบอทวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ สไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์
 4. เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคืบ ใบมีดผ่าตัด ด้ามมีด
 5. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), ½Potato Dextrose Agar (½PDA) และ Potato Dextrose Agar (PDA)
 6. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และเอธิลแอลกอฮอล์75%
 7. สารเคมี ได้แก่
 - Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)
 - High fidelity Phusion® DNA Polymerase (New England Biolabs)
 - 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)
- ITS1: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA (White *et al.*, 1990)
- ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)
- V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)
- the translation elongation factor 1-alpha (tef1)
- EF1-983F: GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT (Rehner and Buckley, 2005)
- EF1-2218R: ATGACACCRACRGCRACRGTYTG (Rehner and Buckley, 2005)
- glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)
- gpd1: CAACGGCTTCGGTCGCATTG (Berbee *et al.*, 1999)
- gpd2: GCCAAGCAGTTGGTTGTGC (Berbee *et al.*, 1999)

8. อุปกรณ์ทำตัวอย่างแห้ง ได้แก่ กระจาดหนังสือพิมพ์ ไม้ทับตัวอย่าง กระจาดฟาง และช่องกระจาดสำหรับใส่ตัวอย่าง

วิธีการ

1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia*

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* โดยเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรคห่อตัวอย่างด้วยกระจาด บันทึกรายละเอียดของอาการเก็บตัวอย่าง วันที่ พิกัด สถานที่ ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค เก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชในพิพิธภัณฑสถานโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ศึกษาและจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือทำ moist chamber โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 2-5 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือโคนิเดียใช้เข็มเย็บส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บางๆ และตรวจดูลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะต่างๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมามาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แขนในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซบบนกระจาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-7 วัน หากพบเส้นใยของเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืชให้ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์และเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อศึกษาต่อไป

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลักษณะและสีของโคนิเดีย ลักษณะรูปร่าง ขนาด สี ของก้านชูสปอร์ (conidiophores) โคนิเดีย (conidia) และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound และถ่ายภาพ จากนั้นนำข้อมูลขนาดโครงสร้างต่างๆ ที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ย และจำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อราที่ศึกษากับคู่มือของ Ellis (1971, 1976) Manamgoda *et al.* (2014) และ Seifert *et al.* (2011) นอกจากนี้สามารถใช้ข้อมูลบางส่วนจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องซึ่งได้มีการศึกษาและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Curvularia* เพื่อประกอบการวิเคราะห์ต่อไป

3. การจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยและโคนิเดียของรา *Curvularia* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

ITS1: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA (White *et al.*, 1990)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

EF1-983F: GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT (Rehner and Buckley, 2005)

EF1-2218R: ATGACACCRACRGCRCRGTYTG (Rehner and Buckley, 2005)

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

gpd1: CAACGGCTTCGGTTCGCATTG (Berbee *et al.*, 1999)

gpd2: GCCAAGCAGTTGGTTGTGC (Berbee *et al.*, 1999)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง ITS tef1 และ GAPDH ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ด้วย loading dye 1 ไมโครลิตร และ SERVA HiSens Stain G ในอัตราส่วน 1:50,000 ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยังบริษัท 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) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) ที่ได้จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูลมาจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Kato and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียงของชุดข้อมูล (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำ dataset ของแต่ละตำแหน่ง และ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง ITS TEF1 และ GAPDH บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ .nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

การเก็บรักษา

การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ที่อุณหภูมิตั้งที่ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) ที่อุณหภูมิตั้งที่ -40 องศาเซลเซียส กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บันทึกข้อมูล

เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการศึกษา เชื้อราที่แยกได้ เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิตั้งที่ 15 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอต้นแบบจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิตั้งที่ -40 องศาเซลเซียส กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ consensus sequences) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* (Figure 1) จากจังหวัดกาญจนบุรี กระบี่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ชลบุรี นครนายก นครปฐม นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก พะเยา เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลำปาง สุโขทัย สุรินทร์ สระแก้ว และสุราษฎร์ธานี จำนวน 39 ตัวอย่าง (Table 1)

แยกเชื้อรา *Curvularia* ได้จำนวน 47 ไอโซเลต จากนั้นนำเชื้อรา *Curvularia* ที่แยกได้จากตัวอย่างโรคพืชมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน โดยศึกษาลักษณะของโคโลนี ขนาด และสี ลักษณะของเส้นใย ลักษณะของก้านชูสปอร์ และลักษณะของโคนิเดียเปรียบเทียบกับเอกสารการจำแนกเชื้อรา Dematiaceous hyphomycetes และ more Dematiaceous hyphomycetes ของ Ellis M.B. (1971, 1976) และ The Genera of Hyphomycetes ของ Seifert *et al.* (2011) เลือกรหัสเชื้อรา *Curvularia* จำนวน 15 ไอโซเลต มาสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Curvularia* โดยทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเทคนิค PCR และทำการวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction ด้วย sequences ของตำแหน่ง ITS tef1 และ GAPDH นำข้อมูลที่ได้ไปดำเนินการวิเคราะห์ผลโดยเทียบกับ type sequences สามารถจำแนกเชื้อรา

Curvularia ได้ 7 ชนิด ได้แก่ *C. akaiensis* *C. dactyloctenicola* *C. eragrostidis* *C. geniculata* *C. lunata* *C. oryzae* และ *C. pseudobrachyspora*

การจำแนกอนุกรมวิธาน *Curvularia* โดยมีรายละเอียดต่างๆ ดังต่อไปนี้

Scientific Classification

Kingdom:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Class:	Dothideomycetes
Subclass:	Pleosporomycetidae
Order:	Pleosporales
Family:	Pleosporaceae
Genus:	<i>Curvularia</i>

Curvularia akaiensis Sivanesan

ชื่อโรค ใบจุด

พืชอาศัยที่พบ ข้าวโพด (*Zea mays*)

พืชอาศัยอื่น หญ้า

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี นครปฐม นครราชสีมา พิษณุโลก สุโขทัย สระแก้ว

ลักษณะอาการของโรค จุดขนาดเล็กกระจายทั่วไปข้าวโพด บริเวณกลางแผลจะมีสีน้ำตาลเนื่องจากเนื้อเยื่อถูกเชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลาย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีสีเทา ด้านใต้ของอาหารสีน้ำตาลถึงดำ ก้านชูสปอร์มีลักษณะเกิดแบบเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม สีน้ำตาล ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล บริเวณส่วนปลายหักแบบ geniculate โคนินเดี่ยวมีรูปร่างตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย รูปคล้ายกระบอง ผนังเรียบ มีผนังชั้น 3 ชั้น มี 4 เซลล์ เซลล์ที่สามจากฐานมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่นๆ มีสีน้ำตาลเข้ม เซลล์หัวและท้ายมีสีอ่อน มีขนาด 22.00–26.5 × 7.3–14.5 ไมโครเมตร จากการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากลักษณะอาการใบจุดของข้าวโพดสอดคล้องกับงานวิจัยของ เลขา และคณะ (2544)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>TGTCTTTTGCACACTTGTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACCAGGACCACATGATAAACCTTTTTATG
CAGTTGCAATCAGCGTCAGTACAACAAAATGTAAATCATTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTCAAGCTTTGCTTGGT
GTTGGCGCTCTTGTCTTTGCTCCGCCAAAGACTCGCCTTAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGCAGC
GCAGCACATTTTTGC
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>TGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCCCTGCTTGCCTACACCCTCGGTGT
 CAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGATCGTTACCAGGAAATCATCA
 AGGAGACCTCCAACCTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTTCGTCCCCATCTCCGGTTTC
 AACGGAGACAACATGATTGAGGCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGACCA
 AGTCCACTGGTAAGACCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACGCTCCCGTCCGTCTACCGACAAGCCTCT
 CCGCCTTCCCCTCCAGGATGTCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCTCGTCCGTCTGTCGAGACCGGT
 ATCATCAAGCCCGGTATGGTCGTACCTTCGCCCCGCTGGTGTACCCTGAGGTCAAGTCCGTGAGATGC
 ACCACGAGCAGCTTACTGAGGGTGTCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGA
 GATCCGTGTTAAGTGGTGGTACTCCAAGAACGACCCCCCAAGGGTTCGAGTCTTCAACGCCAG
 GTCATCGTCCTCAACCACCCCGGTGAGGTCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCTTGACTGCCACACTGCCACAT
 TGCCTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAAA

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

>CCGTATCGTCTTCCGCAATGCGTACGTGTTCTGGATCCATTGATCCATTGTGTATCAAGGCTAATCAAGGCG
 CGCAGCATCGAGCACAACGACGTCGAGATTGTCGCCGTCAACGACCCCTTCATCGAGCCCCACTACGCTGTAA
 GCATCCCCGACACAGATTCTACTGTCTGAGCAATGCGTGTAATATCCACATAGGCATACATGCTCAAGTATG
 ACAGCACACACGGCCAGTTCAAGGGCGACATCAAGGTTGACGGCAACAACCTGACCGTCAACGGCAAGACCGT
 CCGCTTCCACATGGAGAAGGACCCCGCAACATCCCATGGAGCGAGACCGGCGTTACTACGTCGTTGAGTCT
 ACCGGTGTCTTACCACCACCGAGAAGGCCAAGGCTCACTTGAAGGGTGGAGCCAAGAAGGTTGTCATCTCTG
 CTCCTCCGCCGATGCCCCATGTTGTCATGGGTGTCAACCACGAGACCTACAAGTCTGACATTGAGGTGCTC
 TCCAACGCCTCCTG

Curvularia dactyloctenicola Y. Marín, Senwana & Crous, sp. nov.

ชื่อโรค ไบจุด

พืชอาศัยที่พบ หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium* sp.)

พืชอาศัยอื่น หญ้า (*Dactyloctenium aegyptium*) (Marin-Felix *et al.*, 2017)

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี

ลักษณะอาการของโรค เริ่มแรกมีจุดสีน้ำตาลแดง จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และมีสีเหลืองรอบๆ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูคล้ายคอตตอน มีสีเทา ใต้โคลนมี ลำดำ สร้างก้านชูสปอร์แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม ตั้งตรง หรือ งอ บางครั้งพบบริเวณปลายหักแบบ geniculate บริเวณปลายก้านชูสปอร์มีสีอ่อน โคนิเดียมีรูปร่างโค้งงอ บางครั้งพบรูปร่างรีหรือรูปไข่ ผันเรียบ สีน้ำตาลอ่อน มี 3-4 เซลล์ มีขนาด 21.0-27.5 x 7.3-9.0 ไมโครเมตร จากการศึกษารูปร่างนี้

แยกได้จากหญ้าปากควายที่มีลักษณะอาการใบจุดสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marin-Felix *et al.* (2017) รายงานแยกเชื้อราชนิดนี้จากใบจุดหญ้า (*Dactyloctenium aegyptium*)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>AGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAATACAATATGAAGGCTGTCCGCAGCTGGAGTAT
TTTATTACCCTTGTCTTTTGCACACTTGTGTTTCTGGGCGGGTTCGCTCGCCACCAGGACCACCAAATAAAC
CTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTACAAACAATGTAAATCATTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTG
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTT
TGCTTGGTGTGGGCGTTTTGTCTTTGGTCGCCCAAAGACTCGCCTTAAAGTGATTGGCAGCCGGCCTTTCTG
GTTTCGCAGCGCAGCACATTTTTGCGCTTGCCATCAGCAAAACGGCAATCCATCAAGCCTCCTTCTCACGTTTG
ACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAG
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
>CATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCTCTGCT
CGCCTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGAG
CGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACCTCCAACCTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTT
CGTCCCCATCTCCGGTTTCAACGGAGACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTTGG
GAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCC
GTCCTACCGACAAGCCCCTCCGCCTTCCCCTCCAGGATGTCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTCCCCGTG
GGTCGTGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCCGGTATGGTCGTACCTTCGCCCCGCTGGTGTCAACACTGAAG
TCAAGTCCGTGAGATGCACCACGAGCAGCTCACCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTGGCTTCAACGTCAA
GAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTGCGTAAACGTTGCCGGTACTCCAAGAACGACCCCCCAAGGGTTGCG
GAGTCCTTCAACGCCAGGTATCGTCTCAACCACCCGGTCAGGTCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCTTG
ACTGCCACACTGCCACATTGCTTGAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGAAAGTCT
GTTGAGAACTCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCTCCAAGCCCATGTG
CGTTGAGGCTTTCCTGACTACCCTCCTCTCGGTCGTTTC
```

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

```
>TGGCCGTATCGTCTTCCGCAATGCGTAGGTGCCCTTGAATCCATTGATTGAGCGTGTATCGAAGCTAATCGAA
GCTCGCAGCATCGAGACAACGACGTCGAGATTGTCGCCGTGAACGACCCCTTCATCGAGCCCCACTACGCTG
TAAGCATCCCCAGCACAGAATCCTTCCGTCAGAGCGATGCTTTGCATCATTGATTCCATCCTGGCATGATCCAT
TGGCGGAACAGTACAAGCTAACATGTCCATAGGCATACATGCTCAAGTATGACAGCACACACGGCCAGTTCAAG
GGCGACATCAAGGTTGACGGCAACAACCTGACTGTCAACGGCAAGACCGTCCGCTTCCACATGGAGAAGGACC
CCGCCAACATCCCATGGAGCGAGACCGGCGCTTACTACGTCGTTGAGTCCACTGGTGTCTTACCACCACCGA
GAAGGCCAAGGCTCACTTGAAGGGTGGAGCCAAGAAGGTTGTCATCTGCTCCCTCCGCCGATGCCCTATG
TTCGTCATGGGTGTCAACCACGAGACCTACAAGTCTGACATTGAGGTCCTCTCCAACGCCTCCTGC
```


Curvularia eragrostidis (P. Henn) J.A. Meyer

ชื่อพ้อง \equiv *Brachysporium eragrostidis* Henn., Annales du Musée du Congo 2(3): 230 (1908)

\equiv *Spondylocladium maculans* C.K. Bancr. (1913)

ชื่อโรค ดอกจุดสนิมกล้วยไม้

พืชอาศัยที่พบ กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.)

พืชอาศัยอื่น อคะเว (*Agave*) สับปะรด (*Ananas*) พืชตระกูลถั่ว (*Arachis*) มะพร้าว (*Cocos*) หญ้าปล้อง (*Digitaria*) กลอย (*Dioscorea*) ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis*) หญ้า (*Eragrostis*) พืชอวบน้ำ (*Furcraea*) ยางพารา (*Hevea*) ผักบุ้ง (*Ipomoea*) หญ้าลีนงู (*Oldenlandia*) คำเตี้ย (*Polygala*) อ้อย (*Saccharum*) งา (*Sesamum*) ข้าวฟ่าง (*Sorghum*) หญ้า (*Sporobolus*) ข้าวโพด (*Zea*) ดิน (Soil) (Ellis, 1971)

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี นครปฐม นครนายก

ลักษณะอาการของโรค เริ่มแรกจะเกิดจุดขนาดเล็ก มีสีเหลืองแกมน้ำตาลสีจะคล้ายๆ สนิม ต่อมาจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นแผลมีลักษณะค่อนข้างกลม มีขนาดตั้งแต่ 0.1- 0.3 มิลลิเมตร บริเวณกลางแผลจะมีสีน้ำตาลเนื่องจากเนื้อเยื่อถูกเชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลาย มักพบบนกลีบดอกกล้วยไม้ (Figure 2A)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคลนีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูคล้ายกำมะหยี่ มีสีเทาเข้มถึงน้ำตาลดำ ได้อาหารร่วนมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ สร้างก้านชูสปอร์แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม มีลักษณะตั้งตรงหรือโค้งงอ บริเวณส่วนปลายของก้านชูสปอร์ทักแบบ geniculate ผนังเรียบ มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม บริเวณปลายก้านชูสปอร์มีสีอ่อน โคนิเดียมรูปร่างคล้ายถังเบียร์ (barrel shaped) ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล มีผนังกัน 3 เส้น มี 4 เซลล์ เซลล์ที่อยู่บริเวณตรงกลางโป่งออก มีสีน้ำตาลเข้ม เซลล์บริเวณปลายทั้ง 2 ข้างมีสีอ่อนและผนังกันที่อยู่กึ่งกลางของโคนิเดียมมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำมองเห็นชัดเจนซึ่งเป็นลักษณะเด่นของราชชนิดนี้และมักพบโคนิเดียมเกิดเป็นกลุ่มอยู่บริเวณปลายก้านชูสปอร์ มีขนาด 18.7-35.5 x 11.0-18.6 ไมโครเมตร (Figure 2B, C) จากการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สอดคล้องกับงานวิจัยของพีระวรรณและคณะ (2553) รายงานแยกราชชนิดนี้ได้จากโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวายและมีรายงานพบเชื้อราชชนิดนี้ได้ทั้งในดินและพืชหลายชนิด ได้แก่ อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เป็นต้น (นิยม, 2542; Domsch *et al.*, 1993)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>AACAAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAAATATGAAGGCTGCAACCGCCAGTTTT
GGCGGGGAAGCTGAATTATTTTACCCATGTCTTTTGCCTTGTGTTTCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCAC
CAGGACCACACCATAAACCTTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTATAACAAATGTAATCATTTACAACCT
```

TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAA
 TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTC
 ATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTGTCTTTGGCTTTTGCCAAAGACTCGCCTTAAAACG
 ATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATTTTTGCGCTTGCAACTAGCTAAAGAGGCCAGCAATC
 CATCAAGACCTTCTTCTCACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>CTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCCATTCTCATCATTGCCGCCGTTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTC
 CAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCCCTGCTTGCCTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTTGCCATCA
 ACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGAGCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACCTCCAACTTCATCAA
 GAAGGTGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTTCGTGCCATCTCCGTTTTCAACGGAGACAACATGATTGAG
 GCTTCCACCAACTGCCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCTCC
 TCGAGGCCATCGATGCCATCGACCCTCCCGTCCGTCTACCGACAAGCCCCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATGTT
 TACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCTCGTCCGTCTGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCCGGTATGGTCG
 TCACCTTCGCCCCGCTGGTGTCAACACTGAAGTCAAGTCCGTGAGATGCACCACGAGCAGCTTACTGAGGG
 TGTCCCCGGTGACAACGTTGGCTTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTGCTGGTAACGTTGCC
 GGTGACTCCAAGAACGACCCCCCAAGGGTTGCGAGTCTTCAACGCCAGGTCATCGTCTCAACCACCCTG
 GTCAGGTCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCTCTGACTGCCACACTGCCACATTGCCTGCAAGTTCTCTGAGCTC
 CTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAGAACTCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTG
 CCATCGTCAAGATGGTCCCTCCAAGCCATGTGCGTTGAGGCTTTCACTGACTACCCTCCTCTCGGTCGTTTC
 GCCGTCCGTGACATGCGTCAAACGT

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

>GTTGTGCCACGAATTTGCCAAGCAGKTGGTTGTGCAGGAGGCGTTGGAGAGCACCTCAATGTCGACTTGTA
 GGTCTCGTGGTTGACGCCATGACGAACATGGGGGCATCAGCGGAGGGAGCAGAAATGACAACCTTCTTGCT
 CCGCCCTTCAAGTGGGCCTTGGCCTTCTCGGTGGTGGTGAAGACACCGGTGGACTCAACGACGTAGTAAGCGC
 CGGTCTCGCCCCATGGGATGTTGGCGGGTCTTCTCCATGTGGAAGCGGATGGTCTTGCCATTGACGGTCAG
 GTTGTGGCGTCGACCTTATCTCACCCTTGAAGTGGCCGTGTGTGCTGTCATACTTGAGCATGTATGCCTATG
 TAGATGTCAGCCTATACTCGTCTCCAGAGAATGATGCTGGGGCGTCAAGATGAAGCAAATGGCGCAGGCCAT
 TGCTCTGACTGTACGATTCTATGCTGGGGATGCTTACAGCGTAGTGGGGCTCGATGAAAGGGTCGTTTACGGC
 GACGATATCGACATCGTTGTGCTCAATGCTGCGAACTGTTGTTAGTTTTGATCCACATTGGATCAATGGGTTGA
 GGAGCACCTACGATTGCGGAAGACGATACGGCCAATGCAMCAAAAACCCGTTGGAT

Curvularia geniculata (Tracy & Earle) Boedijn

ชื่อพ้อง *Helminthosporium geniculatum* Tracy & Earle (1896)

Cochliobolus geniculatus R.R. Nelson (1964)

Pseudocochliobolus geniculatus (R.R. Nelson) Tsuda, Ueyama & Nishih (1978)

ชื่อโรค ไบจุด

พืชอาศัยที่พบ หญ้า (Tifdwarf grass)

พืชอาศัยอื่น ข้าวโพด (*Zea*) หญ้าแห้วหมู (*Cyperus rotundus*) หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium*) หญ้านกสีชมพู (*Echinochloa colana*) (กัญญา, 2545; จิตรา, 2547; Ellis, 1971)

แหล่งที่พบ ชลบุรี

ลักษณะอาการของโรค พบเป็นสาเหตุของโรคไบจุด ใบไหม้ มีลักษณะอาการจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กกระจายบนใบข้าวโพด หญ้า หากอาการรุนแรงแผลจุดจะรวมกันเป็นแผลไหม้ (Figure 3A) มีรายงานพบได้ทั่วไปและเป็นสาเหตุโรคจุดในพืชหลายชนิด เช่น โรคไบจุดใบ และไหม้ข้าวโพด (กัญญา 2545; Ellis, 1971)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.7 ซม. เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีลักษณะฟูเล็กน้อย มีสีน้ำตาลปนเขียวมะกอก ก้านชูสปอร์ มีลักษณะตั้งตรง ผนังเรียบ มีสีน้ำตาลเข้ม บริเวณปลายหักแบบ geniculate โคนีเดีย มีลักษณะคล้ายกระสวย โค้งงอเล็กน้อย ผนังเรียบ มีผนังกัน 3-4 เส้น มีขนาด 8.7-12.3 x 19.6-30.5 ไมโครเมตร (Figure 3B, C) สอดคล้องกับรายงานของกัญญา (2545) และ จิตรา (2547) รายงานพบในข้าวโพด หญ้าแห้วหมู หญ้าปากควาย หญ้านกสีชมพู จังหวัดนครปฐม และนนทบุรี

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>AGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTGATATAGAGTCTTGATGGAGTGCCGTCTCTTTT
GCTGATTGCAAGCGCAAAAATGTGCTGCGCTGCGAAACAGTAGGCCGGCTGCCAATCGTTTTAAGGCGAGTC
TTTGACAAAACCAAAGACAAAAACGCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGG
CATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATCACTGAATTCTGCAATTCACA
CTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATGAT
TTACATTTGTTGACTGACGCTGATTGCAACTGCATAAAAAAGTTTATCATGTGGTCCTGGAGGCGGGCGAAC
CCGCCAGGAAACAACAAGTGCGCAAAAGACAAGGGTAATAAAATACTCCAGCCTTGCCGCTGTTGGCGGTG
CAGCCTTCATATGTTTATTGTGTAATGATCCCTCCGAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTT
CCTCTAAATGACCGAGTTTGACGAACCTTCCGGCTTGGGGTGGTGGTCCCAACCTCCCCGAGCCAGTCCGAAC
GCCTCACTGAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAGGGGGGRRGAAAAA
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>TTCTCATCATTGCCGCCGTTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACG
 CCCTGCTTGCTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCT
 GAGGAGCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACCTCCAATTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACG
 TTCCCTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAACGGAGACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCTGGTACAAG
 GGTGGGAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCTTCTCGAGGCCATCGATGCCATCGATGCC
 CCGTCCGTCCTACCGACAAGCCCCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATGTCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTC
 CCCGTCGGTCGTGTGAGACCGGTGTCAAGCCCAGTATGGTGTGTCACCTTCGCCCCGCTGGTGTACCA
 CTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCGGCTTCAA
 CGTCAAGAACGTCTCCGTCGAAGGATCCGTCGTGGTAACGTTGCCGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCAAG
 GGTGCGAGTCCTTCAACGCCAGGTCATCGTCTCAACCACCCCGTCCAGGTCGGTGGTGTGTTACGCCCCAG
 TCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCCTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGA
 AAGTCTGTTGAGAACTCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCTCCAAGCC
 CATGTGCGTTGAGGCTTCACTGACTACCCTCCTTGGTCTGTTTCGCCGTCCGTGACATGCGTC

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

>GTTGGAGAGAACCTCAATGTCAGACTTGTAGGTCTCGTGGTTGACACCCATGACGAACATGGGGGCATCGGC
 GGAGGGAGCAGAGATGACAACCTTCTTGCTCCACCCTTCAAGTGAAGCCTTGGCCTTCTCAGTGGTGGTGAAG
 ACACCGGTGGACTCAACGACGTAGTAAGCGCCAGTCTCGTCCATGGGATGTTGGCGGGTCTTCTCCATGT
 GGAAGCGGACGGTCTTGCCGTTGACAGTCAGGTTGTTGCCGTCAACCTTGATGTCGCCCTTGAAGTGGCCGTG
 TGTGCTGTCATACTTGAGCATGTAGGCCTATGTAGATATTAGCACGTGCTGCTCTGCCAATGGATGATTTCAA
 GTTTCAGGATGATGCGAAGCATTTCCTTGACAGTAGGAATCTGTGTCGGGGATGCTTACAGCGTAGTGGGGCTC
 GATGAAGGGGTCGTTACGGCGACAATCTCGACGTCGTTGTGCTCGATGCTGCGAGCTACGATTAGCTTTAATA
 CGCACTGGATCAATGGATTCGAGAAGACCTACGCATTGCGGAAGACGATACGGCCAATGC

Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn*ชื่อพ้อง**

≡ *Acrethecium lunata* Wakker, De ziekten van her suikerriet op Java, die niet door dieren veroorzaakt worden worden: 196 (1898)

= *Helminyosporium curvulum* Sacc., Atti della Accademia Scientifica Veneto-Trentino-Istria 10: 89 (1916)

= *Helmisporium curvulum* Sacc., (1916)

ชื่อโรค โรคเมล็ดต่างข้าว (*Oryza sativa*)

พืชอาศัยที่พบ เมล็ดข้าว (*Oryza sativa*) ข้าวโพด (*Zea mays*) หญ้าสนามกอล์ฟ (Tifdwarf grass) หญ้า-นวลน้อย (*Zoysia* sp.) แก้วมังกร (*Hylocereus undatus*) มะพร้าว (*Cocos nucifera*) ขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) มะละกอ (*Carica papaya*)

พืชอาศัยอื่นๆ พบได้ทั่วไปทั้งในพืชและดิน เช่น ข้าวโพด (*Zea mays*) เมล็ดข้าว (*Oryza sativa*) ข้าวฟ่าง (*Sorghum* sp.) สบู่ดำ (*Jatropha curcas*) หน้าวัว (*Anthurium* spp.) เยอบีร่า (*Gerbera* sp.) หลู่ฮ้าง (*Euphorbia heterophylla*) กล้วยไม้สกุลหวายเอี้ย (*Dendrobium*) ถั่วดำ (*Vigna mungo*) เป็นต้น (นิยม, 2542; สมศิริ และ ศศิวิมล, 2011; Ellis, 1971; Lal et al., 2013)

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร ชลบุรี เชียงราย เชียงใหม่ นครปฐม นครราชสีมา พะเยา พิษณุโลก เพชรบูรณ์ เพชรบุรี ราชบุรี ลพบุรี ลำปาง ลำพูน สุโขทัย สุราษฎร์ธานี สุรินทร์

ลักษณะอาการของโรค มักพบในระยะข้าวออกรวงโดยจะพบจุดสีน้ำตาลหรือดำ หรือสีน้ำตาลปนดำ บางครั้งอาจพบสีน้ำตาลปนสีชมพูอ่อนๆ บนเมล็ดที่อยู่บนรวงข้าว (Figure 4A) นอกจากนี้ *C. lunata* แล้วพบมีเชื้อราหลายชนิดเข้าทำลายและทำให้เกิดโรคนี้อีก ซึ่งทำให้พบอาการที่แตกต่างกันออกไป

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูเล็กน้อยคล้ายกำมะหยี่ มีสีตาลเข้มถึงดำ ใต้อาหารร่วนมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ก้านชูสปอร์เกิดแบบเดี่ยว มีลักษณะตั้งตรงหรือหักไปมา ผันเรียบ มีสีน้ำตาล บริเวณปลายก้านชูสปอร์มีสีน้ำตาลอ่อน โคนินเดียวมีลักษณะโค้งเล็กน้อย รูปร่างคล้ายครีวของค์ ผันเรียบ มีผนังกัน 3 เส้น มี 4 เซลล์ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาล บริเวณปลายเซลล์มีสีน้ำตาลอ่อน มีขนาด 18.0-31.7 x 8.3-15.9 ไมโครเมตร (Figure 4B, C) การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกเชื้อราจากลักษณะอาการใบจุดข้าวโพด เมล็ดต่างข้าว และหญ้าสนามกอล์ฟ สอดคล้องกับรายงานของพีระวรรณ และคณะ (2553) ที่ทำการศึกษาและแยกราชชนิดนี้ได้จากโรคใบจุดข้าวโพด โรคเมล็ดต่างข้าว โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สบู่ดำ โรคใบจุดหน้าวัว โรคใบไหม้เยอบีร่า และโรคใบไหม้หญ้า หลู่ฮ้าง สมศิริ และ ศศิวิมล (2011) รายงานแยกราชชนิดนี้ได้จากโรคเกสรดำในดอก กล้วยไม้สกุลหวายเอี้ยสกุลที่ผลิตเป็นการค้า นอกจากนี้พบเชื้อราชชนิดนี้ในดินปลูกอ้อย ปอ มันสำปะหลัง และพบเป็นราเอนโดไฟท์ในใบ *Globba* sp. (นิยม, 2542; Kokaew, 2011)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>TTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAACGTGAGAAGGAGGCTTGATGGATTGCCGTTTTGCTGATG
GCAAGCGCAAAAATGTGCTGCGCTGCGAAACCAGAAAGGCCGGCTGCCAATCACTTTAAGGCGAGTCTTTGGG
CGACCAAAGACAAAACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTT
TGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACGTATC
GCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATGATTTACATTGT
TTGTAAGTACGCTGATTGCAACTGCATAAAAAGGTTTATTTGGTGGTCTGGTGGCGAGCGAACCCGCCAGG
AAACAACAAGTGCAGAAAAGACAAGGGTAATAAAATACTCCAGCTGCGGACAGCCTTCATATTGTATTGTGTAAT
TGATCCCTCCGAGGTTACCTACGGAGACCTTGTACGACTTTTACTTCCTCTAAATGACCGAGTTTGACGAA
CTTTCCGGCTTGGGGTGGTTCGTTGCCAACCTCCCCGAGCCAGTCCGAACGCCTCACTGAGCCATTCAATCGGT
AGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAACGGG
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>TTCTCATCATTGCCGCCGTTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACG
 CTCTGCTCGCTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCT
 GAGGAGCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACCTCCAACCTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACG
 TTCCCTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAACGGAGACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCTGGTACAAG
 GTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCTCCTTGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCC
 CTGTCCGTCCTACCGACAAGCCCCTCCGCTTCCCCTCCAGGATGTCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTC
 CCCGTCGGTCGTGTGCGAGACCGGTATCATCAAGCCCAGGATGGTCGTCACCTTCGCCCCGCTGGTGTACCA
 CTGAAGTCAAGTCCGTGCGAGATGCACCACGAGCAGCTCACCGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTGGGCTTCAA
 CGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTCGTGGTAACGTTGCCGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCAAG
 GGTTGCGAGTCCTTCAACGCCCAGGTCATCGTCTCAACCACCCCGGTCAGGTCGGTGCCGGTTACGCACCAG
 TCCTTGACTGCCACACTGCCACATTGCTTGAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGA
 AAGTCTGTTGAGAACTCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCTCCAAGCC
 CATGTGCGTTGAGGCTTTCCTGACTACCCTCCTCTCGGTGCTTTCGCCGTCCGTGAC

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

>GGCGTTGGAGAGGACCTCAATGTCAGACTTGTAGGTCTCGTGGTTGACACCCATGACGAACATAGGGGCATC
 GGGCGAGGGAGCAGAGATGACAACCTTCTGGCTCCACCCTCAAGTGAGCCTTGGCCTTCTCGGTGGTGGTG
 AAGACACCAGTGGACTCAACAACGTAGTAAGCGCCGGTCTCGCTCCATGGGATGTTGGCGGGGTCCTTCTCCA
 TGTGGAAGCGGACGGTCTTGCCGTTGACAGTCAGGTTGTTGCCGTCAACCTTGATGTCGCCCTTGAAGTGGCC
 GTGTGTGCTGTCATACTTGAGCATGTATGCCTATGGACATGTTAGCTTGTACTGTTCCGCCAATGGATCATGCC
 AGGATGGAATCAATGATGCAAAGCATCGCTCTGACGGAAGGATTCTGTGCTGGGGATGCTTACAGCGTAGTGG
 GGCTCGATGAAGGGGTCGTTACGGCGACAATCTCGACGTCGTTGTGCTCGATGCTGCGAGCTTCGATTAGCT
 TCGATACACGCTGAATCAATGGATTCAAGGGCACCTACGCATTGCGGAAGACGATACGGCCAATGCGACCGAA
 AGCCGTTG

***Curvularia oryzae* Bugnicourt**

ชื่อพ้อง -

ชื่อโรค ใบจุดปาล์มน้ำมัน

พืชอาศัยที่พบ ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis*)พืชอาศัยอื่นๆ กล้วยไม้ดิน (*Curculigo*) ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) ข้าว (*Oryza sativa*)หญ้ารัดเชียง (*Fimbristylis miliacea*) อากาศ (air) (Ellis, 1971; de Luna *et al.*, 2002)

แหล่งที่พบ กระบี่ สุราษฎร์ธานี

ลักษณะอาการของโรค มักพบอาการบนใบอ่อนและช่วงที่ใบเริ่มคลี่ โดยระยะแรกจะเกิดเป็นจุดเล็ก ๆ ต่อมาแผลขยายขนาดใหญ่ขึ้นรูปร่างเป็นวงกลมหรือรี มีสีน้ำตาล บริเวณขอบแผลมีสีเหลือง

ล้อมรอบ (Figure 5A) หากอาการรุนแรงจะทำให้เกิดใบไหม้ มักพบอาการรุนแรงในปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้ามากกว่าต้นที่ให้ผลผลิตแล้ว

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โคลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูคล้ายกำมะหยี่ มีสีตาลเข้มถึงดำ ใต้อาหารวุ้นมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ก้านชูสปอร์เกิดแบบเดี่ยว ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล โคนีเดียวมีลักษณะตั้งตรงหรือโค้งเล็กน้อย รูปร่างคล้ายถังเบียร์ (barrel shaped) ผนังเรียบ มีผนังชั้น 3 เส้น และมี 4 เซลล์ มีสีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลปนดำ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาลเข้ม บริเวณปลายเซลล์ทั้ง 2 ข้างมีสีน้ำตาลอ่อน มีขนาด 24.0-40.7 × 13.3-22.7 ไมโครเมตร (Figure 5B, C) การศึกษาในครั้งนี้แยกได้ลักษณะอาการใบจุดและใบไหม้ของปาล์มน้ำมันสอดคล้องกับการวิจัยของ Sunpapoa and Kittimorakul (2014) ที่ทำการศึกษารอคโรคใบจุดปาล์มน้ำมันและรายงานรา *C. oryzae* เป็นเชื้อราของสาเหตุโรคนี้ มักพบมากในต้นปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้า และพบที่ใบอ่อนมากกว่าใบแก่ นอกจากนี้มีรายงานราชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรคเมล็ดพันธุ์ข้าว และแยกได้จากหญ้ารัดเขียด (*Fimbristylis miliacea*) ในประเทศฟิลิปปินส์ (De Luna *et al.*, 2002)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
>GCGTTCGGACTGGCTCGGGGAGGTTGGCAACGACCACCCCAAGCCGAAAGTTCGTCAAACCTCGGTCATTTA
GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAAGAAATATGAAG
GCTGACTGCGGCTGCGCTTCACGGCCAGTTTGCTGAGGCTGAATTATTTTTTCACCCATGTCTTTTGCGCACTT
GTTGTTTCTGGGCGGGTTCGCTCGCCACCAGGACCACCCATAAACCTTTTTATCTGTAGTTGCAATCAGCGT
CAGTAACAAGTAAATAATCATTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
GAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGG
TATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTGTCTT
TGGCTACAGCCAAAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGAGCGCAGCACATTTTTG
CGTTGCAACCAGCAAAGAGGTTGGCAATCCATCAAGTCTTACTTTCTCACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATACCCCG
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
>CAGTGAAAGCCTCAACGCACATGGGCTTGGAGGGAACCATCTTGACGATGGCGGCGTCACCAGACTTGATGA
ACTTGGGGGAGTTCTCAACAGACTTTCGGGTACGGCGGTGATCTTCTCGAGGAGCTCAGAGAACTTGAGGC
AATGTGGCAGTGTGGCAGTCGAGGACTGGTGCFTAACCGGCACCGACCTGACCAGGGTGGTTGAGGACGATG
ACCTGGGCGTTGAAAGAGTCGAGCCCTTGGGGGGTGTCTTGGTGTACCCGGCAACGTTACCACGACGGA
TCTCCTTGACGGAGACGTTCTTGACGTTGAAGCCGACGTTGTACCCGGGACACCCTCGGTGAGCTGCTCGTG
GTGCATCTCGACGGACTTGACTTCAGTGGTACACCAGCGGGGGCGAAGGTGACGACCATAACCGCCTTGATG
ACACCAGTCTCGACACGACCGACGGGGACCGTGCCAATACCACCAATCTTGTACACATCCTGGAGGGGAAGAC
GGAGAGGCTTGTGGTAGGACGGCTGGGGGGTGCATGGCATCGATGGCCTCGAGGAGGGTCTTACCAGTGGC
CTTGGCCTTGGTCTCCTTCTCCAGCCCTTGTACCAGGGGACGTTGGTGGAGGCCTCAATCATGTTGTCTCCGT
```

TGAAACCGGAGATGGGGACGAAGGGAACGTGCTTGGGGTTGTAGCCGACCTTCTTGATGAAGTTGGAGGTCTC
 CTTGATGATCTCCTGGTAACGGTCCTCAGACCACTTGGTAGTGTCCATCTTGTGATGGCAACGATGAGCTGCT
 TGACACCGAGGGTGTAGGCAAGCAGAGCGTGCTCACGAGTCTGGCCATCCTTGGAGATACCAGCCTCGAACTC
 ACCAGTACCGG

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

>CACAACGACGTGCACATTGTGCGCGTAAACGACCCCTTCATCGAGCCCCACTACGCTGTAAGCACTCCCCAAG
 ACACCGCAAGACCATCACCAGACCAAGGCTTCCCATCATTGCTTCTGATGCCCTGGCATCAACCATTGG
 CAGAGGAGCAGGGGCTAACATGCACATAGGCATACATGCTCAAGTATGACAGCACACACGGCCAGTTCAAGGG
 TGACATCAAGGTTGACGGCAACAACCTTGACCGTCAACGGCAAGACCATCCGCTTCCACATGGAGAAGGACCCC
 GCCAACATCCCATGGAGCGAGACCGGCGCCTACTACGTCGTTGAGTCCACTGGTGTCTTACCACCACCGAGA
 AGGCCAAGGCTCACTTGAAGGGCGGAGCTAAGAAGGTGTCATCTCTGCTCCCTCCGCTGACGCCCCCATGTT
 CGTCATGGGTTCAACCACGAGACCTACAAGTCGGACATTGAGGTGCTC

Curvularia pseudobrachyspora Y. Marín, Cheew. & Crous, sp. nov.

ชื่อห้อง -

ชื่อโรค ใบจุด

พืชอาศัยที่พบ หญ้าตีนกา (*Eleusine indica*)

พืชอาศัยอื่นๆ -

แหล่งที่พบ นครปฐม เพชรบุรี

ลักษณะอาการของโรค เริ่มแรกมีจุดรูปร่างหรือรูปไข่สีน้ำตาลแดง จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส บริเวณขอบมีสีเทาอ่อน บริเวณอื่นๆ มีสีเขียวมะกอก ใต้โคลนินมีสีเขียวมะกอกถึงดำ สร้างก้านชูสปอร์แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม ตั้งตรง หรือ กอ บางครั้งพบบริเวณปลายหักแบบ geniculate มีผนังกัน โคนินเดี่ยวรูปร่างโค้งงอ บางครั้งพบรูปร่างรีถึงรูปไข่ ผนังเรียบ สีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม มี 2-3 เซลล์ มีขนาด 20.0-27.5 x 8.3-13.7 ไมโครเมตร จากการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากหญ้าตีนกาที่มีลักษณะอาการใบจุดสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marin-Felix *et al.* (2017) รายงานแยกเชื้อราชนิดนี้จากใบจุดหญ้าตีนกา

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

>CGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAATTAATATGAAGGCTTCGGCTGGA
 TTATTTTTATCACCTTGTCTTTTGCACACTTGTGTTTCTGGGCGGGTTCGCCCGCCACCAGGACCACACCA
 TAAACCTTTTTTATGAGTTGCAATCAGCGTCAGTATAACAAATGTAATCATTACAACTTTCAACAACGGAT
 CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA
 TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCCTC
 AAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTGTCTTTGGCCTCGCCAAAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCG

GCCTACTGGTTTCGCAGCGCAGCACATTTTTGCGCTTGCAATCAGCAAAAAGGACGGCAATCCATCAAGACTAC
ATTTTTACGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

>TCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCCCTGC
TTGCTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGA
GCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAAACCTCCAACCTCATCAAGAAGGTGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCT
TCGTCCCCATCTCCGTTTTCAACGGAGACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCATGGTACAAGGGTTGG
GAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCC
GTCCTACCGACAAGCCCCTCCGCTTCTCTCCAGGATGTCTACAAGATTGGCGGTATTGGCACGGTCCCGTCC
GGTCGTGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCCGGTATGGTCGTCACCTTCGCCCCGCTGGTGTACCACCGAAG
TCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACTGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTGGCTTCAACGTCAA
GAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTCGTGGTAACGTTGCCGGTGACTCCAAGAGCGACCCTCCAAGGGCTGC
GAGTCTTTCAACGCCAGGTTCATCGTCCTCAACCACCTGGTCAGGTCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCTTGA
CTGCCACACTGCCACATTGCTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCGTACCCGAAAGTCT
GTTGAGAAGTCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGCGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTCCCTCTAAGCCCATGTG
CGTTGAGGCCTTACTGACTACCTCCTCTCGGTCGTT

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

>GCCGTATCGTCTTCCGCAATGCGTAGGTGCCCTTGAATCCATTGATTCCGTGTATATCAATGCTAACGGTAGCC
CGCAGCATCGAGCACAAACGACGTCGAGATCGTCGCCGTAAACGACCCTTTCATTGAGCCCCACTACGCTGTAAGC
ATCCCCCAGTACAGACTCGTTTTGACGGTCAGAGCAATGGCTTGTCATCACTTGCTTTGGCCCGACGCCTCGGCAT
CATTATTGGTAGAGCAGTGCAGGCTAACATCTACATAGGCATACATGCTCAAGTATGACAGCACACACGGCCAG
TTCAAGGGCGACATCAAGGTTGACGGCAACAACCTGACTGTCAACGGCAAGACTGTCCGCTTCCACATGGAGAAG
GACCCCGCCAACATCCCATTGGAGCGAGACCGGCGCCTACTACGTCGTTGAGTCCACCGGTGTCTTACCACCACC
GAGAAGGCCAAGGCTCACTTGAAGGGTGGAGCCAAGAAGTTGTCATCTCTGCTCCTTCCGCCGATGCCCCATG
TTCGTCATGGGTGTCAACCACGAGACCTACAAGTCCGACATTGAGGTGCTCTCCAACGCCTCTTGC

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* ระหว่างเดือนกันยายน 2561 - กันยายน 2562 จากจังหวัดกาญจนบุรี กระบี่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ชลบุรี นครนายก นครปฐม นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลำปาง สุโขทัย สุรินทร์ สระแก้ว และสุราษฎร์ธานี จำนวน 39 ตัวอย่าง แยกเชื้อรา *Curvularia* ได้จำนวน 47 ไอโซเลต เลือกเชื้อรา *Curvularia* จำนวน 15 ไอโซเลตมาสกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง ITS *tef1* และ *GAPDH* ของ ทำการวิเคราะห์ ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence วิเคราะห์ และจำแนกชนิดได้จำนวน 7 ชนิด ดังนี้ *C. akaiensis* *C. dactyloctenicola* *C. eragrostidis* *C. geniculata* *C. lunata* *C. oryzae* และ

C. pseudobrachyspora ข้อมูลและรายละเอียดที่ได้ทำการจัดจำแนกชนิดของรา *Curvularia* สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชและสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการ นอกจากนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงประกอบการศึกษา งานวิจัย ในสถาบันการศึกษา หน่วยงานรัฐ และหน่วยงานเอกชน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำหรับความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูลในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กัญญา เจริญไทย. 2545. เชื้อรา *Dematiaceous Hyphomycetes* บนข้าว ข้าวโพด วัชพืชใบแคบ และดินบริเวณราก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 163 หน้า.
- คณิงนิจ บุศราคำ. 2545. โรคของกล้วยไม้ดิน ราเอนโดไฟท์บนใบและราก และราดินบริเวณรอบราก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 245 หน้า.
- จิตรา เกาะแก้ว. 2547. ความหลากหลายของเชื้อราบนวัชพืชที่เป็นโรคในแปลงผักและแนวทางการนำมาใช้ควบคุมวัชพืชทางชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 150 หน้า.
- นิยม สุดเพระ. 2542. ความหลากหลายของราดินและราโรคพืชในดินปลูกพืชไร่ จังหวัดสกลนคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 321 หน้า.
- พีระวรรณ พัฒนวิภาส ทศนาพร ทศคร และ ธารทิพย์ ภาสบุตร. 2553. สำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อรา *Curvularia* spp. หน้า 1782-1793. ใน : ผลงานวิจัยและพัฒนา ปี 2553. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- เลขา มาโนช กัญญา เจริญไทย คณิงนิจ บุศราคำ พรพิมล อธิปัญญาคม อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และ อรุมา เจียมจิตต์. 2544. เชื้อราโรคพืช รา endophyte และราดินในประเทศไทย. หน้า 502-510. ใน : การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมศิริ แสงโชติ และศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์. 2011. โรคที่สำคัญของดอกกล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวายเอียสกุลที่ผลิตเป็นการค้า. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร 42:1(พิเศษ): 315-318.
- วรัญญู ชัยรพ และ นิวัธ เสนามะมือง. 2559. โรคของลำไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre ex Laness) และเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับโรคใบจุดกลมสีน้ำตาล. เกษตร 44 ฉบับพิเศษ 1: 977-982.

- วรรณนิภา มธุรส พัฒน ทวีโภค จุฬารัตน์กำเนิดเพชร อุดมศักดิ์เลิศสุชาตวนิช และ รัตนนุช จันทร์เพ็ญ. 2555. หน้า 1144-1150. ใน : การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน, นครปฐม.
- Berbee, M. L., M. Pirseyedi and S. Hubbard. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91(6): 964-977.
- Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- Cui, R. Q. and X. T. Sun. 2012. First report of *Curvularia lunata* causing leaf spot on lotus in China. *The American Phytopathological Society* 96(7): 1068.
- 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.
- Domsh, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 1993. *Compendium of soil fungi*. Vol. 2. 2nd ed Academic Press, London. 405 p.
- 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.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 608 p.
- Ellis, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 507 p.
- Fajolu, O. L., A. L. Vu, M. M. Dee, J. Zale, K. D. Gwinn and B. H. Ownley. 2012. First report of leaf spot and necrotic root on switchgrass caused by *Curvularia lunata* var. *aeria* in the United States. *Plant Disease* 96(9): 1372-1373.
- Ferreira, A. P. S., D. B. Pinho, A. R. Machado and O. L. Pereira. 2014. First report of *Curvularia eragrostidis* causing postharvest rot on pineapple in Brazil. *Plant Pathology* 98(9): 1277.
- Gurung, S., B. N. Mahto, S. Gyawali and T. B. Adhikari. 2013. Phenotypic and molecular diversity of *Cochliobolus sativus* populations from wheat. *Plant Disease*. 97: 62-73.
- Jeon, S. J., T. T. T. Nguyen and H. B. Lee. 2015. Phylogenetic Status of an Unrecorded Species of *Curvularia*, *C. spicifera*, Based on Current Classification System of *Curvularia* and *Bipolaris* Group Using Multi Loci. *Mycobiology* 43(3): 210-217.

- Kokaew, J. 2011. *Diversity and bioactivities of endophytic fungi from Thai forests*. Ph.D.Thesis, Kasetsart University. 202 p.
- Kumar, J., P. Schäfer, R. Hüchelhoven, G. Langen, H. Baltruschat, E. Stein, S. Nagarajan and KH. Kogel. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control double dagger. *Molecular Plant Pathology* 3(4): 185-195.
- Lal, M., S. Kumar, M. Ali, A Khan, V. Singh and S. Murti. 2013. Host range, susceptibility period of *Curvularia lunata* causing leaf spot of black gram and germplasm screening. *Agriways* 1(2): 142-146.
- Luna L.Z., A.K. Watson T.C. Paulitz. 2002. Reaction of Rice (*Oryza sativa*) Cultivars to Penetration and Infection by *Curvularia tuberculata* and *C. oryzae*. *Plant disease* 86(5): 470-476
- Manamgoda, D.S., L. Cai, A.H. Bahkali, E. Chukeatirote and K.D. Hyde. 2011. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity* 51(1): 3-42.
- Manamgoda, D. S., L. Cai, E. H. C. McKenzie, E. Chukeatirote and K. D. Hyde. 2012. Two new *Curvularia* species from northern Thailand. *Sydowia* 64: 255-266.
- Manamgoda, D. S., L. Cai, E. H. C. McKenzie, P.W. Crous, H. Madrid, E.i Chukeatirote, R. G. Shivas, Y. P. Tan and K. D. Hyde. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity* 56: 131-144.
- Manamgoda D.S., A.H. Madri, A.Y. Rossman, L.A. Castleburyd, E. Chukeatirote and K.D. Hyde. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79: 221-288.
- Manoch, L., O. Jeamjitt, K. Jaroenthai and C. Sringiew. 2002. Plant pathogenic fungi from rice kernel and other host plant. p. 99. In Abstracts of the 1th International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease. 5-8 Nov. 2002. Chiang Mai, Thailand.
- Marin-Felix, Y., C. Senwana, R. Cheewangkoon and P.W. Crous. 2017. New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. *Mycosphere* 8(9): 1555-1573.
- Mycobank, 2019. *Curvularia*. (Online). Available. <https://www.mycobank.org> (February 19, 2019)
- Rehner, S.A., E. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97: 84-89.

- Rehner, S. A. (2001) Primers for Elongation Factor 1-alpha (EF1-alpha). <http://ocid.nacse.org/research/deephyphae/EF1primer.pdf>.
- Seifert, K., G. Morgan-Jones, W. Gams and B. Kendrick. 2011. *The Genera of Hyphomycetes*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. 997 p.
- Sun, G., S. Oide, E. Tanaka, K. Shimizu, C. Tanaka and M. Tsuda. 2003. Species separation in *Curvularia* “geniculata” group inferred from Brn1 gene sequences. *Mycoscience* 44: 239–244.
- Sunpapoa, A. and J. Kittimorakul. 2014. Disease note: identification of *Curvularia oryzae* as cause of leaf spot disease on oil palm seedling in nurseries of Thailand. *Phytoparasitica* 42: 529-533.
- Torres, D. P., M. A. Silva and G. Q. Furtado. 2015. Infection process of *Curvularia gladioli* on *Gladiolus* leaves. *Tropical Plant Pathology* 40(6): 382-387.
- Ullstrup A.J. 1972. The impacts of the southern corn leaf blight epidemics of 1970–1971. *Annual Reviews of Phytopathology* 10: 37–50.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In : M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego.

Table 1 Plant disease samples collected from various locations.

Plant disease samples	Location
<i>Dendrobium</i> spp.	Nong Lan sub district, Tha Maka district, Kanchanaburi Province Nara Phirom sub district, Bang Len sub district, Nakhon Pathom Province Khlung Yai sub district, Ongkharak district, Nakhon Nayok
<i>Hylocercus megalanthus</i>	Na Yai Am district, Chanthaburi Province
<i>Oryza sativa</i>	KhaoKho sub district, KhaoKho district, Petchabun Province Khaokawrsrisomboon subdistrict, Thung Saliam district, Sukhothai Province Bu Ruesi sub district, Mueang Surin district, Surin Province
<i>Zea mays</i>	Prathan sub district, Tha Maka district, Kanchanaburi Province Wang Khanai sub district, Tha Muang district, Kanchanaburi Nong Han sub district, San Sai district, Chiang Mai Province Tha ton sub district, Mae Ai district, Chiang Mai Province Mae Khao Tom sub district, Mueang Chiang Rai district, Chiang Rai Province Pak Chong district, Nakhonratchasima Province Kamphaeng Saen sub district, Kamphaeng Saen district, Nakhon Pathom Province Thung Bua sub district, Kamphaeng Saen district, Nakhon Pathom Province Plakrad sub district, Bangrakam district, Phitsanulok Province Matong sub district, Phrom Phiram district, Phitsanulok Province Thap Phrik sub district, Aranyaprathet district, Sa kaeo Province Pak Khwae sub district, Mueang Sukhothai district, Sukhothai Province
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Mueang Prachuap Khiri Khan district, Prachuap Khiri Khan Province
<i>Elaeis guineensis</i>	Khaokram sub district, Mueang Krabi district, Krabi Province Pakasai Sub district, Nuea Khlung district, Krabi Province Khan Thuli sub district, Tha Chana district, Surat Thani Province Klongnoi sub district, Mueang Surat Thani, Surat Thani
<i>Dactyloctenium aegyptium</i>	Tha Muang district, Kanchanaburi Province
<i>Eleusine indica</i>	Kamphaeng Saen district, Nakhon Pathom Province Kaeng Krachan district, Petchaburi Province

Table 1 Plant disease samples collected from various locations. (Continue)

Plant disease samples	Location
<i>Zoysia</i> sp.	Hom Sin sub district, Bang Pakong district, Chachoengsao Province Chonburi Province (Tifdwarf grass)
<i>Cocos nucifera</i>	Sawi district, Chumphon Province Wang Yen sub district, Bang Phae district, Ratchaburi Province Khan Thuli sub district, Tha Chana district, Surat Thani Province
<i>Carica papaya</i>	Dok Kham Tai district, Phayao Province

**Figure 1** Plant disease samples caused by *Curvularia*



Figure 2 *Curvularia eragrostidis*. A. Rusty spot on *Dendrobium* sp.; B. Conidiophore and conidia; C. Conidia

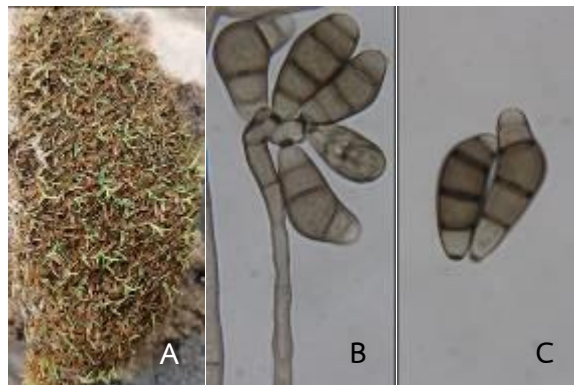


Figure 3 *Curvularia geniculata*. A. Leaf blight on grass; B. Conidiophore and conidia; C. Conidia



Figure 4 *Curvularia lunata*. A. Brown spot symptom on rice; B. Conidiophore and conidia; C. Conidia

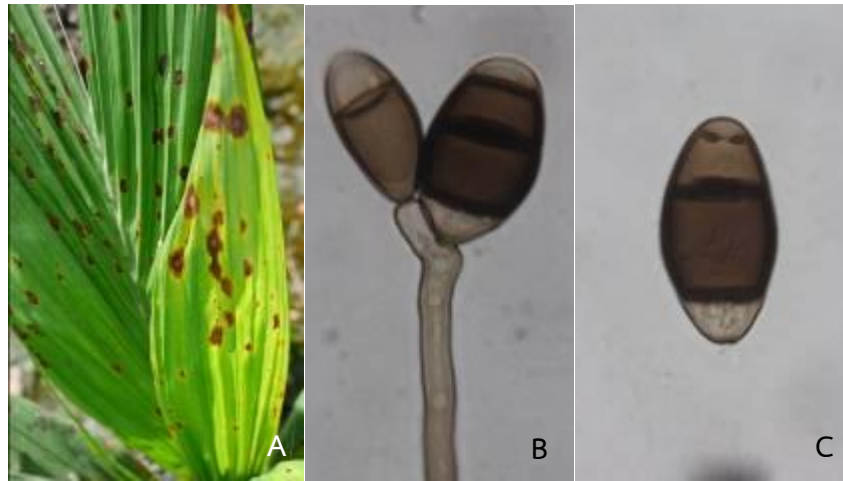


Figure 5 *Curvularia oryzae*. A. Leaf spot symptom on oil palm; B. Conidiophore and conidia; C. Conidia

การศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini (Diptera: Tephritidae)

ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Molecular Identification of fruit fly in Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae)
using DNA Barcode

ยุวรินทร์ บุญทบ จารุวัฒน์ แท้กุล ชัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนธิริ สุนัดดา เขาวลิต
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

รวบรวมแมลงวันผลไม้ด้วยกับดัก wet bucket trap พร้อมสารฟีโรโมนล่อแมลงวันผลไม้ 2 ประเภท ได้แก่ Methyl Eugenol และ Cue lure จากพื้นที่ทำการเกษตร ในภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทำการจำแนกแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini พบแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini จำนวน 2 สกุล ได้แก่ *Bactrocera* และ *Zeugodacus* และสามารถจำแนกแมลงวันผลไม้ได้ 4 ชนิด คือ *B. carambolae*, *B. dorsalis*, *Z. isolata* และ *Z. tau* ศึกษา DNA Barcode ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยยีน *cox1* จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากที่ได้จากแมลงวันผลไม้ที่มีความถูกต้องอยู่ระหว่าง 99 -100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นรวมได้ DNA barcode ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ได้ทั้งหมด 40 ตัวอย่าง และนำ DNA Barcode ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini ไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมในปีต่อไป

คำหลัก: แมลงวันผลไม้, Dacini ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-15-62

คำนำ

แมลงวันผลไม้หรือแมลงวันทอง (Fruit Flies) เป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญมากสำหรับผลไม้และพืชผักในเขต tropical และ subtropical โดยเฉพาะในประเทศไทยนั้นพบตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้เข้าทำลายผลไม้และผักชนิดต่างๆ โดยการวางไข่ กับผลไม้ที่มีเปลือกบาง หรืออ่อนนุ่ม จากนั้นตัวหนอนจะเจริญเติบโตอยู่ภายในผลทำให้ผลไม้เน่าเสียก่อนการเก็บเกี่ยว ทั่วโลกพบแมลงวันผลไม้มากมายหลากหลายชนิด และด้วยความสามารถในการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้เอง ทั่วโลกจึงจัดให้แมลงวันผลไม้ เป็นแมลงศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอันดับต้นๆ ของโลก แมลงวันผลไม้ที่เป็นศัตรูที่มีความสำคัญได้แก่แมลงวันผลไม้ใน Tribe Dacini ซึ่งเป็นกลุ่มที่ทำความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตทางการเกษตร จากการสำรวจพบว่าทั่วโลกมีแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini มากกว่า 700 ชนิด (Krosch *et al.*, 2012) แต่ในทวีปเอเชียพบว่ามีแมลงวันผลไม้ใน Tribe Dacini นั้น มีการเข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตรเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ในสกุล *Dacus* Fabricius, สกุล *Bactrocera* Macquart และสกุล *Zeugodacus* Hendel

ปัจจุบันประเทศไทยมีการศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini แต่พบว่าแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini นั้นมีลักษณะทางสัณฐานภายนอกใกล้เคียงกันมาก เป็นกลุ่มที่มีความซับซ้อน (complex) ซึ่งมีความยากในการจัดจำแนกเป็นอย่างยิ่งหากใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกเป็นตัวตรวจวินิจฉัยชนิด (ยูวรินทร์ และคณะ, 2551) โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Zeugodacus tau* และ *Bactrocera dorsalis* complex นั้น ก่อให้เกิดความสับสนแก่นักอนุกรมวิธานเป็นอย่างมาก และยังมีแมลงวันผลไม้ใน Tribe Dacini อีกหลายชนิดที่แม้จะเป็นเป็นชนิดเดียวกัน แต่มีความแปรผันทางรูปร่างลักษณะภายนอก ซึ่งยากต่อการตัดสินใจว่าเป็นความแปรผันทางสัณฐานภายในสปีชีส์เดียวกัน หรือ เป็นความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ (Cameron *et al.*, 2010; Hernández-Ortiz *et al.*, 2012; Schutze *et al.*, 2012)

แมลงวันผลไม้ Tribe Dacini นั้นก่อให้เกิดความเสียหายต่อการเกษตรในทวีปเอเชียเป็นอย่างยิ่ง (White & Elson-Harris, 1992) และจากความเสียหายที่เกิดขึ้นจากแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini นั้น ทำให้มีการศึกษาชนิดของแมลงวันผลไม้ การแพร่กระจาย และชนิดของพืชอาหารกันอย่างกว้างขวาง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการควบคุม กำจัด แต่ในปัจจุบันการศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงวันผลไม้ในประเทศไทยนั้นจะใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกเท่านั้น และ การศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้จึงเป็นงานที่ต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญของนักอนุกรมวิธาน ซึ่งความน่าเชื่อถือในการตรวจวินิจฉัยนั้นยังไม่มีความเป็นสากล ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีต่างๆ ที่น่าเชื่อถือและมีการยอมรับในระดับสากลมาร่วมใช้ในการจัดจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมาศึกษา DNA Barcode ของแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini เพื่อใช้ในจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาขั้นสูงขึ้นไปอีก เช่น โครงสร้างพันธุกรรม Genetic structure) และพันธุศาสตร์ประชากร (Population genetic) ของแมลงวันผลไม้

Tribe Dacini อีกทั้งยังสามารถนำข้อมูลด้าน DNA Barcode ที่ได้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาชนิดของแมลงวันผลไม้ที่มีในประเทศไทยให้มีมาตรฐานทัดเทียมสากล และใช้ข้อมูลเหล่านี้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำเข้าส่งออกพืช ผักของไทยอีกด้วย

วิธีดำเนินการ

1. วิธีการดำเนินการวิจัยสำหรับการศึกษาลำดับพันธุกรรม

1.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตาม Boontop *et al.*, 2017 ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้านขวาจำนวนสามข้างของแมลงวันผลไม้ (25 mg) มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (ตัวอย่างแมลงที่เหลื่อเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen)) จากนั้นเติม Lysis BufferGL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Proteinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วยพาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง แล้วเติม Lysis BufferG3 ปริมาณ 200 ไมโครลิตรและบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และเขย่าให้สม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) ปริมาณ 210 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน ISOLATE II Genomic DNA tube ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที ปั่นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลื่อจากการปั่นเหวี่ยง) เติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลื่อจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer GW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งของเหลวที่เหลื่อจากการตกตะกอน และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีอีกครั้ง ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) 1.5 ไมโครลิตร และเติม Elution Buffer G ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีจากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้ในวิธีการต่อไป

1.2 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยยีน co1 โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ดังนี้

Primer Name	Sequence	Base
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25
HCO2198	TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	26

ทำปฏิกิริยา PCR โดยกรรมวิธีดังนี้

		1 reaction (µl)
Buffer	5X Buffer	5
Tag	MyTag; Cat No. BIO-21114	0.1
Water	H ₂ O	15.9
Primer Forward	LCO1490	1
Primer Reverse	HCO2198	1
DNA		2
Total		25

นำดีเอ็นเอต้นแบบพร้อมด้วย Master Mixed ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial-denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย denaturing annealing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 30 วินาที และ extension 72 °C นาน 30 วินาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 35 รอบ) จากนั้น Final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที

1.3 ตรวจสอบ PCR product โดยการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยการให้ประจุของสารที่มีประจุแยกออกจากกัน ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยหยุด ผลิตภัณฑ์ PCR ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2 % และให้ PCR product เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 45 นาที

1.4 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่าง PCR product ของแมลงวันผลไม้ที่ได้ไปทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์โดย Molecular Genetics Research Facility ของ Queensland University of Technology, Australia

1.5 นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *Cox1* ที่ผ่านการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5

1.6 บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ มาตรวจสอบชนิด กับ Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมจากทั่วโลกอีกครั้งเพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในการศึกษาจะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑสถานแมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชนอกจากนี้ยังสามารถนำ ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอที่ได้มาศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมต่อได้อีก

2. การศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมของแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini

2.1 การเตรียมตัวอย่าง โดยเตรียมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จากแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ชนิดต่างๆที่ได้จากการสำรวจ จากภาคต่างๆ ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย (6 ภาค) และภาคละ 2 จังหวัดเป็นอย่างน้อย โดย ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากรนั้นเพื่อความน่าเชื่อถือ ควรใช้ตัวอย่างจากพื้นที่เดียวกัน อย่างน้อย ละ 5 - 10 ตัวอย่างต่อหนึ่งพื้นที่

2.2 การข้อมูลของดีเอ็นเอที่ผ่านการถอดรหัส (Sequence Alignment) นำ sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ FASTAไฟล์ มาจัดเรียง (alignment) ด้วยโปรแกรม the MEGA version 4 (Kumar et al., 2008)

2.3 การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูล (Genetic structure) ด้วยการ ใช้ โปรแกรม Arlequin มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (gene diversity) ด้วยการ ศึกษา FST ร่วมกับ Tamura and Nei model evolution (Φ ST) (Excoffier et al., 1992).

2.4 จากนั้น นำข้อมูลที่ได้มาศึกษา โครงสร้างของ Haplotype และการกระจายตัวของ Haplotype ของแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ด้วย โปรแกรม NETWORK Version 4.6.1.1 (Bandelt et al., 1999) โดยเลือกใช้ parameter เป็น Median joining networks ร่วมกับ maximum parsimony

2.5 จัดเก็บตัวอย่างที่ใช้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบ สากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง (แมลงวันผลไม้ทุกชนิดที่รายงานไว้ต้อง เก็บรักษาตัวอย่างจริงไว้เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง)

2.6 ทำการบันทึกข้อมูล และจัดทำรายงาน

การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกข้อมูล DNA barcode ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- 2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง
- 3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของแมลงวันผลไม้ พร้อมทั้งรายละเอียดของพืชอาหารที่พบแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย เช่น ชนิดพืช ชื่อวิทยาศาสตร์

สถานที่ทำการทดลอง

- 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ของภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้
- 2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บรวบรวมแมลงวันผลไม้ด้วยกับดัก wet bucket trap พร้อมสารฟีโรโมนล่อแมลงวันผลไม้ 2 ประเภท ได้แก่ Methyl Eugenol และ Cue lure ในพื้นที่ทำการเกษตรภาคตะวันออก ในจังหวัด จันทบุรี และระยอง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในจังหวัดอุบลราชธานี มหาสารคาม และ กาฬสินธุ์ จากนั้นจำแนกแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ออกจากแมลงวันผลไม้ Tribe อื่น ๆ พบ แมลงวันผลไม้ 2 สกุล คือ *Bactrocera* และ *Zeugodacus* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *B. carambolae*, *B. dorsalis*, *Z. isolata* และ *Z. tau* (Figure 1) ศึกษา DNA barcode ด้วยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยยีน *cox1* และตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีการเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 1.5% อะกาโรสเจล ในสารละลาย 0.5X TBE buffer จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จาก PCR product ของแมลงวันผลไม้ที่มีความถูกต้องอยู่ระหว่าง 99 - 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 1-4) รวมได้ DNA barcode ของแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini 4 ชนิด จำนวน ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ทั้งหมดรวม 40 ตัวอย่าง เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมของ แมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ในปีต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บรวบรวมตัวจากแมลงวันผลไม้จากกับดักถังเปียก bucket trap พร้อมด้วยสารล่อ คือ ฟีโรโมน 2 ประเภทได้ แก่ Methyl eugenol และ Cue lure รวมทั้งเก็บผัก ผลไม้ที่ถูกทำลาย โดยตัวอ่อนมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจากบริเวณภาคกลางและภาคใต้ นั้น ได้ DNA barcode จากแมลงวันผลไม้ในเผ่า Dacini ได้ 4 ชนิด คือ *B. carambolae*, *B. dorsalis*, *Z. isolata* และ *Z. tau* จำนวน 40 ตัวอย่าง

คำขอบคุณ

ข้าราชการ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมาบริการ ของกลุ่มงาน อนุกรมวิธานแมลงในการช่วยเหลือเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ จึงทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จ และ ลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ยุวรินทร์ บุญทาบ ศิริณี พูนไชยศรี ชลิตา อุณหวุฒิ ลักขณา บำรุงศรี และสิทธิศิริโรตม แก้วสวัสดิ์.

การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ในประเทศไทย. รายงานการประชุม ประจำปี 2554. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 1899 หน้า

Boontop, Y., Schutze, M. K., Clarke, A. R., Cameron, S. L., & Krosch, M. N. (2017).

Population structure in *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) across

Thailand and the Thai/Malay peninsula: natural barriers to a great disperser. *Biological Journal of the Linnean Society*, 1-16.

Cameron, E.C., Sved, J.A. & Gilchrist, A.S. 2010. Pest fruit fly (Diptera: Tephritidae) in northwestern Australia: one species or two? *Bulletin of Entomological Research* 100: 197-206.

Krosch, M.N., Schutze, M., Armstrong, K.F., Graham, G.C., Yeates, D.K. & Clarke, A.R. (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

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.

White, I.M. & Elson-Harris, M.M. (1992) *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*. CAB International. 19, 2496-2497.

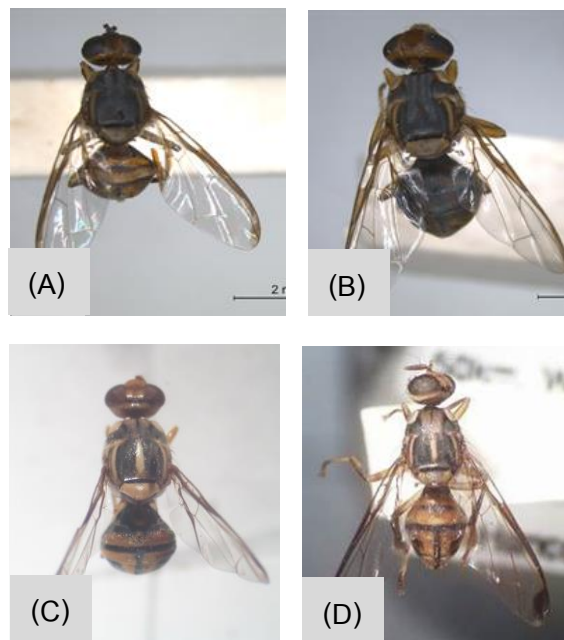


Figure 1 Fruit fly in Tribe Dacini for DNA extraction

(A) *Bactrocera carambolae* (B) *Bactrocera dorsalis*

(C) *Zeugodacus isolata* (D) *Zeugodacus tau*

Table 1 DNA barcode of *Bactrocera carambolae*.

No.	Scientific name	DNA barcode
1	<i>B. carambolae</i>	GGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCAACCAGGAGCTTTAATCG GTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCACGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATA CCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCAT TTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGT ATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACG GAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCA GTAAATTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTAT TCGTTTGAGCAGTTGATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATT ACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGACCTGCCGGAGGAGGAGACCCTA TTCTTTACCAACATTTATTTGATTTTTGGTCACCTGGAAGTTTAA
2	<i>B. carambolae</i>	GGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCAACCAGGAGCTTTAATCG GTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATA CCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATGGCAT TTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGT ATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACG GAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCA GTAAATTCATTACAACAGTAATTAATATGCGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTAT TCGTTTGAGCAGTAGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATT ACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGACCTGCCGGAGGAGGAGACCCTA TTCTTTACCAACATTTATTTGATTTTTGGTCACCTGGAAGTTTAA
3	<i>B. carambolae</i>	GATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCAACCAGGAGCTTTAATCGGT GACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACC AATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTGTTCCTTTAATATTAGGGGCTCCCGATATAGCATTT CCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTAT AGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGA GGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGACCGAATACCTCTATTC GTTTGAGCAGTAGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTAC TATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGACCTGCCGGAGGAGGAGACCCTATT CTTTACCAACATTTATTTGATTTTTGGTCACCTGGAAGTTTAA
4	<i>B. carambolae</i>	GATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCAACCAGGAGCTTTAATCGGT GACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACC AATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTGTTCCTTTAATATTAGGGGCTCCCGATATAGCATTT CCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTAT AGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACACGGA GGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGACCGAATACCTCTATTC GTTTGAGCAGTAGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTAC TATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGACCTGCCGGAGGAGGAGACCCTATT CTTTACCAACATTTATTTGATTTTTGGTCACCTGGAAGTTTAA
5	<i>B. carambolae</i>	AGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTCAACCAGGAGCTTTAATCG GGTACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTAT ACCAATTATAATTGGTGGATTGGAAATTGACTGTTCCTTTAATATTAGGGGCTCCCGATATAGCA TTTCCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAG TATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAACAGTTTACCCACCCCTATCATCTGTTATTGCACAC GGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGCAGGTATTTCTCAATTTTAGGAGC AGTAAATTCATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTA TTCTTTGAGCAGTTGATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATT TACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGACCTGCCGGAGGAGGAGACCCT ATTCTTTACCAACATTTATTTGATTTTTGGTCACCTGGAAGTTTAA

Table 2 DNA barcode of *Bactrocera dorsalis*.

No.	Scientific name	DNA barcode
1	<i>B. dorsalis</i>	GAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGG TGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATAC CAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATT TCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTA TAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCTATCATCTGTTATTGCACACGG AGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCCTCAATTTTAGGAGCAG TAAATTTCAATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATT CGTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGCTATTA CTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGACCTGCGGAGGAGGAGATCCTAT TCTTTACCAACATTTATTTGATTTTTTGGTCACCTGAAGTTTAA
2	<i>B. dorsalis</i>	GAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGG TGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATAC CAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCCGATATAGCATT CCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACaTTACTATTAGTAAGAAGTA TAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCTATCATCTGTTATTGCACACGG AGGAGCTTCaGTTGACCTAgCTATTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTCAATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATT GTTTGAGCAGTTGTATTAACaGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTAC TATATTACTAACAGACCGAAA
3	<i>B. dorsalis</i>	CTCGGAGCCTGAGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCC CAGGAGCTTTAATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAAT TTTCTTTATAGTTATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAG CTCCCGATATAGCATTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTA CTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCTATCAT CTGTTATTGCACACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTC TCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTCAATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTG ATCGAATACCTCTATTGTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTT TTAGCAGGGGCTATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGACCTGCCG GAGGAGGAGATCCTATTCTTTACCAACATTTATTTGATTTTTTGGTCACCTGAAGTTTAA
4	<i>B. dorsalis</i>	GGCAGGAATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTA ATCGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGT TATACCAATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCCCCGATATA GCATTTCCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAG AAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCTATCATCTGTTATTGCA CACGGAGGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCCTCAATTTTAGG AGCAGTAAATTTCAATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCT CTATTGTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGC TATTACTATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGACCTGCCGAGGAGGAGAT CCTATTCTTTACCAACATTTATTTGATTTTTTGGTCAC
5	<i>B. dorsalis</i>	AATAGTAGGAACATCCCTTAGAATTTTAGTCCGAGCTGAACTCGGTACCCAGGAGCTTTAATCGGT GACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACC AATTATAAATGGTGGATTGGAAATTGACTTGTTCCTTTAATATTAGGAGCCCCGATATAGCATT CCACGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCCCTTACATTACTATTAGTAAGAAGTAT AGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCACCCTATCATCTGTTATTGCACACGG GGAGCTTCAGTTGACCTAGCTATTTTTCACTTCACTTAGCGGGTATTTCCTCAATTTTAGGAGCAGT AAATTTCAATTACAACAGTAATTAATATACGATCGACAGGAATCACCTTTGATCGAATACCTCTATT GTTTGAGCAGTTGTATTAACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTTTTAGCAGGGGCTATTAC TATATTACTAACAGACCGAACTTAAATACTTCTTTTTTGACCTGCCGAGGAGGAGATCCTATT CTTTACCAACATTTATTTGATTTTTTGGTCACCT

Table 3 DNA barcode of *Zeugodacus cucurbitae*.

No.	Scientific name	DNA barcode
1	<i>Z. cucurbitae</i>	CGGAGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGCTGGGTCACCCA GGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTT TTTTCATAGTGATACCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTACCCTAATACTAGGAGC GCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTAC TTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAAGCTGTTTATCCTCCCTTTTCATC AATTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCAT CAATTTTAGGGCCGTAATTTTCACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGA CCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTACCTGTGT TAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAATTTAAACACCTCTTTCTCGACCCGGCTGG TGGTGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCCTGGAA
2	<i>Z. cucurbitae</i>	TGGAGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGCTGGGTCACCCA GGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTT TTTTCATAGTGATACCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTACCCTAATACTAGGAGC GCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTAC TTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAAGCTGTTTATCCTCCCTTTTCATC AATTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCAT CAATTTTAGGGCCGTAATTTTCACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGA CCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTACCTGTAT TAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAATTTAAACACCTCTTTCTCGACCCGGCTGG TGGTGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCCTGGAA
3	<i>Z. cucurbitae</i>	TGGAGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGCTGGGTCACCCA GGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTT TTTTCATAGTGATACCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTACCCTAATACTAGGAGC GCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTAC TTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAAGCTGTTTATCCTCCCTTTTCATC AATTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCAT CAATTTTAGGGCCGTAATTTTCACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGA CCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTACCTGTGT TAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAATTTAAACACCTCTTTCTCGACCCGGCTGG TGGTGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCCTGGAA
4	<i>Z. cucurbitae</i>	TCGGAGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGCTGGGTCACCC AGGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTT TTTTTCATAGTGATACCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTACCCTAATACTAGGAG CGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTA CTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAAGCTGTTTATCCTCCCTTTTCAT CAATTTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTCA TCAATTTTAGGGCCGTAATTTTCACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTG ACCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTACCTGTGT TTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAATTTAAACACCTCTTTCTCGACCCGGCTGG GTGGTGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCCTGAAGTTT
5	<i>Z. cucurbitae</i>	TGGAGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTTAGAATCTTAGTCCGAGCAGAAGCTGGGTCACCCA GGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTT TTTTCATAGTGATACCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTACCCTAATACTAGGAGC GCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTAC TTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAAGCTGTTTATCCTCCCTTTTCATC AATTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCAT CAATTTTAGGGCCGTAATTTTCACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGA CCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTACCTGTGT TAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAATTTAAACACCTCTTTCTCGACCCGGCTGG TGGTGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCACCC

Table 4 DNA barcode of *Zeugodacus tau*.

No.	Scientific name	DNA barcode
1	<i>Z. tau</i>	CGGAGCTTGAGCAGGTATAGTAGGAACATCTCTTAGAATTTTAGTTCGAGCAGAAGTACAGGACCCCA GGAGCTTTAATTGGAGATGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATAATTT TTTTTCATGGTAATGCCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTACCTCTAATATTAGGAGC ACCAGATATAGCGTTCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTAC TTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCCTTTTCATC AATTATCGCCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCAT CAATTTTAGGGCTGTAATTTTCACTACTACAGTAATTAATATACGATCAACAGGGATTACATTTGA CCGAATACCTTTATTCGTTTGGAGCTGTAGTATTACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTCTCCAGTAT TAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAACTTAAATACATCTTTCTCGACCCAGCTGG TGGTGGGGATCCTATTTTATACCAACACTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCGGAAGTTT
2	<i>Z. tau</i>	TCGGAGCTTGAGCAGGTATAGTAGGAACATCTCTTAGAATTTTAGTTCGAGCAGAAGTACAGGACCC AGGAGCTTTAATTGGAGATGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATAAATT TTTTTCATGGTAATGCCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTACCTCTAATATTAGGAG CACCAGATATAGCGTTCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTA CTTTTAGTGAGCAGTATGGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCCTTTTCAT CAATTTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTCA TCAATTTTAGGGCTGTAATTTTCACTACTACAGTAATTAATATACGATCAACAGGGATTACATTTG ACCGAATACCTTTATTCGTTTGGAGCTGTAGTATTACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTCTCCAGTA TTAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAACTTAAATACATCTTTCTCGACCCAGCTG GTGGTGGGGATCCTATTTTATACCAACACTTATTTTGATTTTTTGGTCACC
3	<i>Z. tau</i>	AGCTTGAGCAGGTATAGTAGGAACATCTCTTAGAATTTTAGTTCGAGCAGAAGTACAGGACCCAGGA GCTTTAATTGGAGATGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATAATTTTTT CATGGTAATGCCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTACCTCTAATATTAGGAGCACCA GATATAGCGTTCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTACTTTT AGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCCTTTTCATCAATT ATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCATCAAT TTTAGGGCTGTAATTTTCACTACTACAGTAATTAATATACGATCAACAGGGATTACATTTGACCGA ATACCTTTATTCGTTTGGAGCTGTAGTATTACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTCTCCAGTATTAGC TGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAACTTAAATACATCTTTCTCGACCCAGCTGGTGGT GGGGATCCTATTTTATACCAACACTTATTTTGATTTTTTGGTCACC
4	<i>Z. tau</i>	CGGAGCTAGAGCAGGTATAGTAGGAACATCTCTTAGAATTTTAGTTCGAGCAGAAGTACAGGACCCCA GGAGCTTTAATTGGAGATGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATAAATT TTTTTCATGGTAATGCCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTACCTCTAATATTAGGAGC CCAGATATAGCGTTCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTAC TTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCCTTTTCATC AATTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCAT CAATTTTAGGGCTGTAATTTTCACTACTACAGTAATTAATATACGATCAACAGGGATTACATTTGA CCGAATACCTTTATTCGTTTGGAGCTGTAGTATTACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTCTCCAGTAT TAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAACTTAAATACATCTTTCTCGACCCAGCTGG TGGTGGGGATCCTATTTTATACCAACACTTATTTTGATTTTTTGGTCACC
5	<i>Z. tau</i>	GGAGCTTGAGCAGGTATAGTAGGAACATCTCTTAGAATTTTAGTTCGAGCAGAAGTACAGGACCCCA GAGCTTTAATTGGAGATGACCAAATCTATAATGTAATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATAAATTT TTTTTCATGGTAATGCCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTACCTCTAATATTAGGAGCA CCAGATATAGCGTTCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTCTTACATTAC TTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCCTTTTCATC AATTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCATC AATTTTAGGGCTGTAATTTTCACTACTACAGTAATTAATATACGATCAACAGGGATTACATTTGAC CGAATACCTTTATTCGTTTGGAGCTGTAGTATTACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTCTCCAGTATT AGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAACTTAAACACATCTTTCTCGACCCAGCTGGT GGTGGGGATCCTATTTTATACCAACACTTATTTTGATTTTTTGGTCACCCGGAAGTTT

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae
(Thysanoptera:Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย
DNA Barcoding for Identification of Thirps in Subfamily Thripinae
(Thysanoptera: Thripidae) in Asparagus in the Middle part of Thailand

อิทธิพล บรรณาการ เกศสุตา สนศิริ สิทธิศิโรตม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึงเดือนกันยายน 2563 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟได้ 95 ตัวอย่าง และจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 2 ชนิด คือ เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood) และเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny บันทึกลักษณะสำคัญทางสัณฐานวิทยา ดำเนินการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของเพลี้ยไฟทั้ง 2 ชนิด พบว่าอยู่ในอันดับ Thysanoptera อันดับย่อย Terebrantia วงศ์ Thripidae วงศ์ย่อย Thripinae การทดลองเรื่องนี้ยังไม่สิ้นสุดต้องดำเนินการต่อในปี 2564

คำสำคัญ : เพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae อนุกรมวิธาน อนุชีววิทยา หน่อไม้ฝรั่ง

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-16-63

คำนำ

หน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกเพื่อการส่งออกเป็นสำคัญ ให้ผลตอบแทนต่อเกษตรกรสูง เป็นพืชที่ใช้พื้นที่ปลูกน้อย ส่วนใหญ่นิยมปลูกในแถบภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี และนครปฐม และภาคอีสาน ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา กาฬสินธุ์ และมหาสารคาม เพราะมีอากาศที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของหน่อไม้ฝรั่ง จากการศึกษาที่หน่อไม้ฝรั่งเป็นพืชส่งออกสำคัญไปยังประเทศญี่ปุ่น จึงได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกหน่อไม้ฝรั่งเป็นวงกว้างเพื่อสร้างรายได้ให้กับครัวเรือน แต่การปลูกหน่อไม้ฝรั่งนั้นนอกจากจะประสบปัญหาของโรคแล้ว ยังพบปัญหาการทำลายของแมลง เช่น หนอนกระทุ้งหอม หนอนกระทุ้งผัก เป็นต้น แต่แมลงขนาดเล็กที่เป็นศัตรูสำคัญที่ทำลายผลผลิตของหน่อไม้ฝรั่งอีกทั้งยังสามารถติดไปกับสินค้าได้คือ เพลี้ยไฟ ปัจจุบันนอกจากเพลี้ยไฟหน่อไม้ฝรั่ง *Chirothrips spiniceps* Hood และเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* Hood จะลงทำลายหน่อไม้ฝรั่งแล้ว ยังมีเพลี้ยไฟหลายชนิดที่ระบาดและลงทำลายหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลาง (ศิริณี, 2544) จากการศึกษาที่มีผู้ประกอบการธุรกิจการปลูกหน่อไม้ฝรั่งเป็นจำนวนมาก ประกอบกับตลาดทั้งในและต่างประเทศ มีความต้องการหน่อไม้ฝรั่งในปริมาณสูงได้กลายเป็นปัจจัยสำคัญในการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อชนิดของศัตรูพืชที่พบในหน่อไม้ฝรั่ง จึงอาจเกิดพิษตกค้างในผลผลิตมากขึ้น การศึกษาชนิดและลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟจะทำให้ทราบถึงชนิดที่แน่นอนของเพลี้ยไฟที่ระบาดในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งนั้นๆ ทั้งนี้จะทำให้ชนิดที่ถูกต้องและเหมาะสมแก่การป้องกันกำจัด สามารถวิเคราะห์ชนิดของเพลี้ยไฟศัตรูพืชในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการทดสอบประสิทธิภาพวัตถุอันตรายทางการเกษตรได้อีกด้วย นอกจากนี้การศึกษาลำดับพันธุกรรมจะทำให้ทราบถึงความแปรปรวนของยีน เพลี้ยไฟในพื้นที่ภาคกลางว่ามีความแตกต่างหรือใกล้เคียงกันอย่างไร การศึกษานี้จะได้ข้อมูลซึ่งไม่มีหน่วยงานอื่นในประเทศทำวิจัยเชิงลึกเช่นนี้ อีกทั้งยังเป็นการวิเคราะห์ชนิดเพลี้ยไฟศัตรูพืชโดยวิธีใหม่ที่ทันสมัย สามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษให้กับนักวิชาการทั่วไป บริษัทเอกชน และผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร ทั้งนี้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟที่พบในหน่อไม้ฝรั่งที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถนำมาศึกษา phylogeny กับเพลี้ยไฟที่ทำลายพืชอื่นๆ ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ปากคืบ พู่กัน ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ถังรักษาความเย็น ฯลฯ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ 50-100%, AGA, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10%, โคลฟออย แคนาดาบัลซัม เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร และตู้อบสไลด์ถาวร 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 เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์อันดับย่อย Thripinae

วิธีการ

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแหล่งปลูกหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย เช่น นนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสาคร ราชบุรี กาญจนบุรี เป็นต้น เพื่อศึกษาจำนวนชนิดของเพลี้ยไฟในหน่อไม้ฝรั่ง โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืช เช่น ใบ ดอก และหน่อ เป็นต้น ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้ฟู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA (Alcohol 60%: Glycerine: Acetic acid อัตราส่วน 10:1:1) สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและแอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ และนำตัวเต็มวัยไปทำสไลด์ถาวรตามวิธีการของ ศิริณี (2544) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดองตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง จัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิด (key) ของเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้ จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล

การศึกษาลำดับพันธุกรรม

นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่ได้จำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้ stereo microscope (ตัวอย่างกลุ่มเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ทำสไลด์ถาวร) ที่เก็บรวบรวมได้จากแต่ละพื้นที่ไปศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

วิธีการหาลำดับเบส COI ปรับปรุงจากวิธีการศึกษาของ 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)

การศึกษา ยีน 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 10mM dNTPs, 5 U/μl Amplitaq, 25 mM MgCl₂, 10X PCR buffer, 20mM sense and antisense primer ขึ้นตอนและอุณหภูมิของขั้นตอนการทำ PCR (Biomethra Thermo Cycler) คือ

Initial denaturation	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) เพื่อหาความจำเพาะเจาะจง ของเปลี้ยไฟภายในแหล่งเดียวกันและระหว่างแหล่งที่เก็บตัวอย่าง รวมถึงเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และศึกษาความใกล้เคียงกันของเปลี้ยไฟแต่ละชนิด

การบันทึกข้อมูล

- พืชอาศัย สถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันเดือนปีที่เก็บตัวอย่าง

เวลาและสถานที่

- เดือน ตุลาคม 2562 ถึง เดือน กันยายน 2563
- แปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง ห้องปฏิบัติการกลาง
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเปลี้ยไฟในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่ง ในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี และสมุทรสงคราม บันทึกรายละเอียดของเปลี้ยไฟที่รวบรวมได้ เช่น พืชอาหาร สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บลงในขวดดองเปลี้ยไฟที่บรรจุน้ำยา AGA

และแอลกอฮอล์ 95% นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยซึ่งปรับปรุงมาจาก Palmer *et al.* (1989) และ ศิริณี (2544) ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟได้ 95 ตัวอย่าง และจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 2 ชนิด คือ เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood) และเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera อันดับย่อย Terebrantia วงศ์ Thripidae วงศ์ย่อย Thripinae โดยมีลักษณะทางอนุกรมวิธานดังนี้

***Scirtothrips dorsalis* (Hood, 1919)**

ลำตัวขนาดเล็กเฉลี่ย 0.6-0.8 มิลลิเมตร ลำตัวสีเหลืองอ่อน เพศผู้และเพศเมียมีขนาดลำตัวใกล้เคียงกัน ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว หนวดมี 8 ปล้อง หนวดปล้องแรกสีขาว ปล้องที่ 2-3 สีเทา และปล้องที่ 5-8 มีสีน้ำตาล เส้นขนภายในตาเดี่ยวอยู่ด้านในของตาเดี่ยวที่เรียงตัวกันเป็นรูปสามเหลี่ยม มีขนรอบตาเดี่ยว 3 คู่ ออกปล้องแรกมีลวดลายเป็นเส้นขวางเรียงชิดกัน ขอบล่างของออกปล้องแรกปรากฏเส้นขน 4 คู่ เส้นขนคู่ที่ 2 มีความยาวมากกว่าขนคู่อื่น ด้านล่างของสันหลังออกปล้องสุดท้ายมีเส้นเรียงขนานกันจนถึงบริเวณกลางสันหลังออกปล้องสุดท้าย ไม่ปรากฏรูรับความรู้สึก (campaniform sensilla) ปีกคู่หน้าสีเทาและมีการเรียงตัวของเส้นปีกบริเวณโคนปีก 3 เส้น และเส้นขนบริเวณปลายปีกแผ่กว้าง ปล้องท้องปล้องที่ 3-6 มีแถบดำบริเวณกลางปล้องท้อง และด้านข้างของปล้องท้องปล้องที่ 2-8 ปรากฏเส้นขนขนาดเล็กเรียงตัว (microtrichia) เส้นขนรูปหัวใจที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8 พัฒนาตัวสมบูรณ์ มีเส้นขนละเอียดเรียงตัวถึงบริเวณกลางปล้องท้อง ปล้องท้องปล้องที่ 9 ไม่ปรากฏเส้นขนขนาดเล็ก (Figure 3.16.1)

***Thrips palmi* (Karny, 1925)**

ลำตัวขนาดเล็กเฉลี่ย 1-1.2 มิลลิเมตร ลำตัวสีเหลืองอ่อน เพศผู้มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมีย เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่ ส่วนหัวกว้างกว่าความยาว หนวดสีน้ำตาลอ่อน 8 ปล้อง ส่วนปลายของปล้องหนวดปล้องที่ 3 และ 4 เรียวและมีสีน้ำตาลอ่อนที่บริเวณโคนปล้องหนวดมีสีเทาเข้มที่ส่วนปลาย และเป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึกรูปส้อม ปล้องหนวดปล้องที่ 6 ถึง 8 มีสีน้ำตาล ปล้องหนวดปล้องที่ 8 ยาวกว่าปล้องที่ 7 มีขนบริเวณตาเดี่ยว 3 คู่ ขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3 อยู่ด้านบนนอกของตาเดี่ยวที่เรียงตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม ขนตาเดี่ยวบริเวณท้ายส่วนหัวยาวกว่าขนตาเดี่ยวคู่ที่ 3 ส่วนของออกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีขนยาวตั้งอยู่บริเวณมุมขอบล่างของออกปล้องแรก 2 คู่ และมีขนบริเวณส่วนท้ายออกปล้องแรก 3 คู่ สันหลังออกปล้องสุดท้ายมีลวดลายเป็นเส้นตรงไม่ต่อเนื่อง แต่มุ่งสู่ส่วนท้ายของสันหลังออกปล้องสุดท้าย เส้นขนยาว 2 เส้นปรากฏด้านล่างของขอบบนสันหลังออกปล้องสุดท้ายและมีรูรับความรู้สึก ปีกคู่หน้าขาว โปร่งแสง และมีการเรียงตัวของเส้นปีกบริเวณโคนปีก 3 เส้นและเส้นปีกรองที่ส่วนปลายประมาณ 15 เส้น ขามีสีเดียวกับลำตัว ส่วนของปลายขามี 2 ปล้อง ปล้องท้องปล้องที่ 2 มีขนด้านข้าง 2 คู่ ส่วนท้องด้านบนของลำตัวปล้องที่ 6 ถึง 8 มีกลุ่มขนเรียงตัวกันเป็นเส้น ปล้องละ 1 คู่ ตำแหน่งการเรียงตัวอยู่ด้านล่างรูหายใจที่บริเวณขอบด้านบนนอกของส่วนท้อง เส้นขนรูปหัวใจที่ด้านล่างของขอบท้องปล้องที่ 8

พัฒนาสมบูรณ์เป็นเส้นขนยาว ส่วนท้องด้านล่างของลำตัวปล้องที่ 3 ถึง 7 ปรากฏเส้นขนคู่ที่ 3 อยู่ตรงกลางส่วนท้อง (Fig. 3.16.2)

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* และเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* โดยการศึกษาความสัมพันธ์กับประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพลี้ยไฟ (Molecular phylogenetics of Thysanoptera) และใช้โปรแกรม neighbor joining/UPGMA แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (sequence divergence) พบว่า เพลี้ยไฟพริก และเพลี้ยไฟฝ้าย อยู่ในกลุ่มเพลี้ยไฟวงศ์ Thripidae วงศ์ย่อย Thripinae การศึกษานี้ทำให้ทราบถึงชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อยที่เป็นศัตรูสำคัญของหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟหรือแมลงชนิดอื่นๆ โดยมีข้อได้เปรียบที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างแมลงได้ทุกระยะทั้งระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยเวลาในการเลี้ยงตัวอย่างแมลงนั้นๆ ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ตัวเต็มวัยในการจำแนกชนิด อีกทั้งยังสามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงทั้งในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างทันต่อเหตุการณ์ ช่วยลดระยะเวลาการกักเก็บสินค้าเพื่อตรวจสอบ และสามารถป้องกันชนิดแมลงศัตรูพืชสำคัญที่ติดมากับสินค้านำเข้าได้ทันต่อเหตุการณ์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและชนิดของเพลี้ยไฟวงศ์ย่อย Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) ที่พบในหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทยโดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งในเขตภาคกลางของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึงเดือนกันยายน 2563 นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟได้ 95 ตัวอย่าง และจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 2 ชนิด คือ เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* (Hood) และเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny บันทึกลักษณะสำคัญทางสัณฐานวิทยา ดำเนินการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของเพลี้ยไฟทั้ง 2 ชนิด พบว่าอยู่ในอันดับ Thysanoptera อันดับย่อย Terebrantia วงศ์ Thripidae วงศ์ย่อย Thripinae การทดลองเรื่องนี้ยังไม่สิ้นสุดต้องดำเนินการต่อในปี 2564

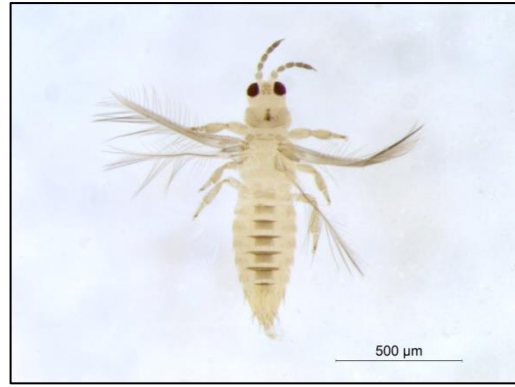
เอกสารอ้างอิง

- ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 75 หน้า.
- 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.
- 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 Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for Reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.



Adult



Slide permanent



Antenna



Head-Pronotum



Metanotum

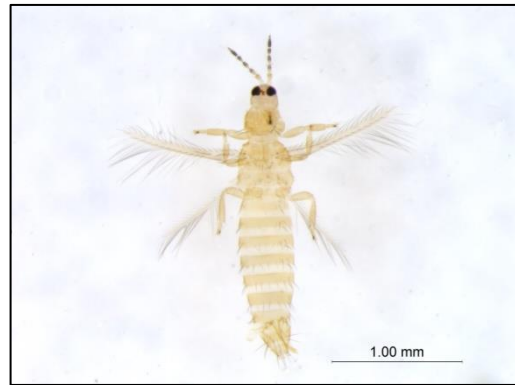


Tergite III-VI

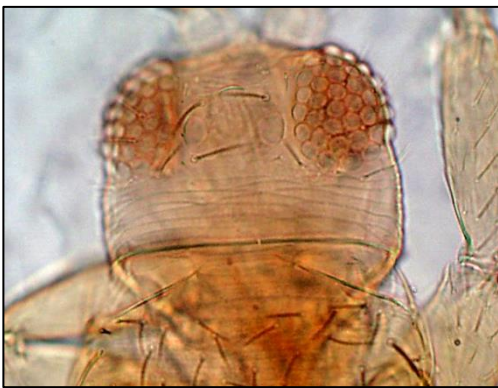
Figure 3.16.1 Morphology of Chili thrips; *Scirtothrips dorsalis* (Hood)



Adult



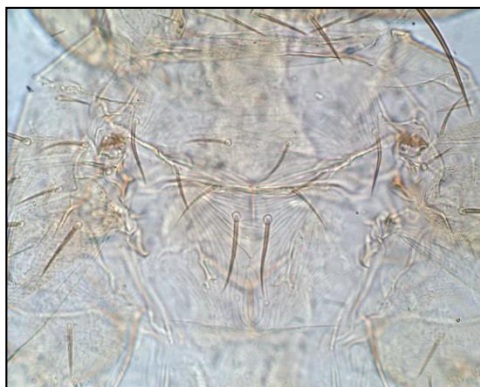
Slide permanent



Head



Pronotum



Metanotum



Tergites VIII

Figure 3.16.2 Morphology of Cotton thrips; *Thrips palmi* (Karny)

Table 3.16.1 Location and number of thrips samples collected from asparagus crops in the Middle part of Thailand during October 2019 – September 2020.

Province	District	Sub-district	Number of thrips samples	Location
<i>Scirtothrips dorsalis</i> (Hood)				
Phetchaburi	Tha yang	Kao ka pook	16	N 12° 44' 49.9" E 99° 42' 23.2"
Kanchanaburi	Tha maka	Tha mai	15	N 13° 54' 24.31" E 104° 39' 24"
Kanchanaburi	Tha maka	Tha mai	18	N 13° 55' 41.7" E 99° 47' 46.02"
Kanchanaburi	Tha maka	Tha mai	11	N 13° 44' 50.3" E 99° 39' 22"
Kanchanaburi	Tha maka	Tha mai	6	N 13° 55' 10.07" E 99° 47' 34.58"
Kanchanaburi	Tha maka	Tha maka	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"
Total			83	
<i>Thrips palmi</i> (Karny)				
Kanchanaburi	Tha maka	Tha mai	6	N 13° 54' 24.31" E 104° 39' 24"
Kanchanaburi	Tha maka	Tha maka	2	N 13° 55' 41.7" E 99° 47' 46.02"
Kanchanaburi	Tha muang	Thung thong	4	N 13° 58' 54.5" E 99° 38' 50.81"
Total			12	

การจัดการวัชพืชประเภทใบกว้าง : หญ้ายางหนุช (*Euphorbia graminea* Jacq.)
 หญ้ายอดหนอน (*Spigelia anthelmia* L.) และเอื้องชมพู
 (*Persicaria capitata* (Buch.- Ham. ex D.Don)

The Management of Broadleaf Weed: *Euphorbia graminea* Jacq.,
Spigelia anthelmia L. and *Persicaria capitata* (Buch. - Ham. ex D.Don)

ธัญชนก จงรักไทย อัญศยา พรพมา เอกรัตน์ ธนุทอง
 กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The management of *Spigelia anthelmia* L.; *Euphorbia graminea* Jacq. and *Persicaria capitata* (Buch. - Ham. ex D.Don) by mulching, temperature and spray pre-emergence herbicides. Experiments were conducted between October 2018 - September 2020. The mulching materials, including plastics covering plots, straw, raw husk, rice husk ash, and cat-tail leaves and trees were compared with not using mulch. *S. anthelmia* could be germination in every process. Plastics covering plots and cat-tail leaves and trees could be best control but not significantly. The germination was between 2.3 - 25.8 percent. *E. graminea* in plastics covering could be completed control seed germinations. *P. capitata* in every process could be good-completed control seed germinations but not significantly. The germination was between 0.0-3.5 percent. Effect of temperature on seed germination by heating the plant material and the three weed seeds at temperatures of 40, 50, 60, 70 and 80 degrees Celsius, it was found that the heat did not inhibit the germination of *S. anthelmia* and *E. graminea*. Percentage of seed germination was not statistically different from the heat treatment. Percentage of seed germination was between 32.0 - 49.3 and 7.6 - 18.4 percent, respectively. For *P. capitata* seed, that was heated at 70 and 80 degrees Celsius had the least germination. The germination was between 1.1 - 9.8 percent, which was lower than no-heat treatment. Effects of pre-emergence herbicides were acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone,

รหัสการทดลอง 03-27-60-01-00-00-06-62

diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, s-fluorfen, and pendimethalin compared with no herbicide spray, it was found that at 60 day after spraying, diclosulam could be best control *S. anthermia*, with dry weight of 1.30 grams per pot. Less than no herbicide spray in statistically. Bromacil could be best control *E. gramine*, with dry weight 0.74 grams per pot. Less than no herbicide spray in statistically. Amicarbazone, bromacil, diclosulam and oxyfluorfen could be best control *P. capitata*, without dry weight.

Keyword : germinations of seed, mulching materials, herbicide, temperatures, *Spigelia anthermia* L.; *Euphorbia gramineae* Jacq., *Persicaria capitata* (Buch. - Ham. ex D. Don)

บทคัดย่อ

การจัดการหญ้ายอดหนอน หญ้ายางนงนุช และเอื้องชมพู โดยใช้วัสดุคลุมดิน อุณหภูมิ และสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอก ทำการทดลองระหว่าง ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 การใช้วัสดุคลุมดิน ได้แก่ พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤๅษี เปรียบเทียบกับการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน พบการงอกของหญ้ายอดหนอนทุกกรรมวิธี โดยการใช้พลาสติกคลุมแปลง และใบและต้นธูปฤๅษี สามารถควบคุมการงอกของหญ้ายอดหนอนได้ดีที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 2.3 - 25.8 เปอร์เซ็นต์ หญ้ายางนงนุช การใช้พลาสติกคลุมแปลง สามารถควบคุมการงอกได้ดีสมบูรณ์ และเอื้องชมพู ทุกกรรมวิธีสามารถควบคุมการงอกได้ดีถึงสมบูรณ์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 0.0-3.5 เปอร์เซ็นต์ ผลของอุณหภูมิต่อความงอกของเมล็ด โดยทำให้ความร้อนด้วยการอบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชทั้งสามชนิด ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่า ความร้อนไม่สามารถยับยั้งความงอกของเมล็ดหญ้ายอดหนอน และหญ้ายางนงนุชได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอกไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการไม่ให้ความร้อน โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 32.0 - 49.3 และ 7.6 - 18.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมล็ดเอื้องชมพู ที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีความงอกน้อยสุด โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 1.1 - 9.8 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าการไม่ให้ความร้อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลของการพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอก ได้แก่ acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil เปรียบเทียบกับการไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช พบว่า ที่ระยะ 60 หลังพ่นสาร การพ่นสาร diclosulam สามารถควบคุมหญ้ายอดหนอนได้ดี โดยมีน้ำหนักแห้ง 1.30 กรัมต่อกระถาง น้อยกว่าการไม่พ่นสารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การพ่นสาร bromacil สามารถควบคุมหญ้ายางนงนุชได้ดี

โดยมีน้ำหนักแห้ง 0.74 กรัมต่อกระถาง น้อยกว่าการไม่พ่นสารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการพ่นสาร amicarbazon, bromacil, diclosulam และ oxyfluorfen สามารถควบคุมเอื้องชมพูได้ดี มีน้ำหนักแห้ง 0.00 กรัมต่อกระถาง

คำหลัก : การงอกของเมล็ด วัสดุคลุมดิน สารกำจัดวัชพืช หญ้ายางนงนุช หญ้ายอดหนอน อุณหภูมิเอื้องชมพู

คำนำ

หญ้ายางนงนุช (*Euphorbia graminea* Jacq.) หญ้ายอดหนอน (*Spigelia anthelmia* L.) และเอื้องชมพู (*Persicaria capitata* (Buch.- Ham. ex D.Don) เป็นพืชต่างถิ่นที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย และสามารถสร้างหน่วยขยายพันธุ์ได้ โดยหญ้ายางนงนุชสามารถออกดอกได้ตลอดปี ทำให้สามารถสร้างเมล็ดและงอกเป็นต้นใหม่ได้เป็นจำนวนมากในแต่ละปี (ศิริพร, 2557) หญ้ายอดหนอน เป็นพืชฤดูเดียว แต่สามารถงอก และออกดอกได้ตลอดทั้งปี เช่นเดียวกับหญ้ายางนงนุช ส่วนเอื้องชมพู เจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศเย็น โดยเฉพาะทางเหนือของประเทศไทย (อัญศยา และคณะ, 2558) ทั้งนี้ หญ้ายอดหนอน และเอื้องชมพู พบมีรายงานเป็นวัชพืชแล้วในต่างประเทศ (Mohamad *et al.*, 1987; CABI, 2012) และพบว่าเอื้องชมพูต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชหลายชนิด (Foo *et al.*, 2010)

การป้องกันกำจัดวัชพืชนั้นมีหลายวิธี โดยกลุ่มวิจัยวัชพืช (2555) รายงานว่า การควบคุมวัชพืชในการปลูกพืชอาจทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีอาจให้ผลการกำจัดวัชพืชได้มากน้อยต่างกัน แล้วแต่ความเหมาะสมของสภาพพื้นที่และความพร้อมของผู้ปฏิบัติที่จะใช้วิธีการไหน หรืออาจนำเอาหลายๆ วิธีการมาประยุกต์ใช้ร่วมกันตามความเหมาะสม วิธีการควบคุมวัชพืชอาจแยกได้เป็น 2 วิธีการ ดังนี้ วิธีการแรกคือ การควบคุมวัชพืชโดยไม่ใช้สารกำจัดวัชพืช เช่น การใช้วัสดุคลุมดินเพื่อสร้างสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการงอก และการเจริญเติบโตของวัชพืช ทำให้ลดปัญหาวัชพืชได้ เช่น เพ็ญศรี และจรัญ (2553) ได้ศึกษาวัสดุคลุมดินเพื่อกำจัดวัชพืชในกวาวเครือขาว พบว่าน้ำหนักแห้งของวัชพืชแปลงที่กำจัดวัชพืชด้วยแรงงาน มีน้อยที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้พลาสติกสีดำเทา และแผ่นซีวมวล วิธีการที่สองคือ การควบคุมวัชพืชโดยใช้สารเคมี ซึ่งสามารถแยกได้ 2 ประเภท คือ สารกำจัดวัชพืชประเภทใช้ก่อนวัชพืชงอก และประเภทใช้หลังวัชพืชงอก โดยสารกำจัดวัชพืชประเภทใช้ก่อนวัชพืชงอกที่นิยมใช้ เช่น acetochlor, alachlor, atrazine, diuron, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin เป็นต้น และสารกำจัดวัชพืชประเภทใช้หลังวัชพืชงอกที่นิยมใช้ เช่น glyphosate, glufosinate-ammonium และ paraquat เป็นต้น (กลุ่มวิจัยวัชพืช, 2555)

เนื่องจากพืชทั้งสามชนิดเป็นพืชต่างถิ่น ประเทศไทยจึงยังไม่มีวิธีในการจัดการ ดังนั้นหากในระยะแรกที่มีการสำรวจพบซึ่งยังมีปริมาณน้อย แล้วมีวิธีการจัดการที่เหมาะสมเตรียมไว้ จะช่วยให้ประหยัดทรัพยากรในการจัดการ รวมทั้งป้องกันการระบาดที่จะตามมาในอนาคตได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) กล้องถ่ายภาพแบบดิจิทัล
- 2) กระดาษสี่เหลี่ยมขนาด 30 x 30 นิ้ว
- 3) กระดาษสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 30 นิ้ว
- 4) พลาสติกคลุมแปลง
- 5) ฟางข้าว
- 6) แกลบดิบ
- 7) แกลบเผา
- 8) ใบและต้นธูปฤๅษี
- 9) ตู้อบ
- 10) สารกำจัดวัชพืช
- 11) สมุดบันทึก

วิธีการ

1. ผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ด

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระบะ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

- กรรมวิธีที่ 1 พลาสติกคลุมแปลง
- กรรมวิธีที่ 2 ฟางข้าว
- กรรมวิธีที่ 3 แกลบดิบ
- กรรมวิธีที่ 4 แกลบเผา
- กรรมวิธีที่ 5 ใบและต้นธูปฤๅษี
- กรรมวิธีที่ 6 ไม่ใช้วัสดุคลุมดิน

เตรียมกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 30 x 30 นิ้ว ใส่ดินร่วนเป็นวัสดุปลูก จากนั้นหยอดเมล็ดหญ้างวงนงนุช 100 เมล็ดต่อกระบะแล้วทำการคลุมด้วยวัสดุต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 1 เดือน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความงอก (\%)} = (\text{จำนวนเมล็ดที่งอก} / \text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่หว่าน}) \times 100$$

สำหรับหญ้างวงนงนุช และเอื้องชมพู ทำการทดลองเช่นเดียวกับหญ้างวงนงนุช

2. ผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดในวัสดุปลูก

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอก โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระบะ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

- กรรมวิธีที่ 1 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (40 °C)
- กรรมวิธีที่ 2 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (50 °C)
- กรรมวิธีที่ 3 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (60 °C)

กรรมวิธีที่ 4 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (70 °C)

กรรมวิธีที่ 5 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (80 °C)

กรรมวิธีที่ 6 ไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช (control)

นำเมล็ดหญ้ายางนงนุชที่แก่ และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด ผสมในวัสดุปลูก 1 กิโลกรัม นำไปอบที่อุณหภูมิต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชที่อบเรียบร้อยแล้ว ใส่ในกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 30 นิ้ว รดน้ำเพื่อให้ความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 30 วัน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความงอก (\%)} = (\text{จำนวนเมล็ดที่งอก} / \text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่หว่าน}) \times 100$$

สำหรับหญ้ายอดหนอน และเอื้องชมพู ทำการทดลองเช่นเดียวกับหญ้ายางนงนุช

3. การทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอก

วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ RCB จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 3 กระถาง 19 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์/ไร่)
1. acetochlor 50% W/V EC	200
2. alachlor 48% W/V EC	312
3. amicarbazone 70% WG	119
4. atrazine 90% WG	315
5. bromacil 80% WP	320
6. clomazone 48% W/V EC	96
7. diclosulam 84% WG	12.6
8. diuron 80% WP	320
9. isoxaflutole 75% WG	11.25
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20
11. metolachlor 72% W/V EC	252
12. metribuzin 70% WP	84
13. oxadiazon 25% W/V EC	80
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5
16. s-metolachlor 96% EC	153.6
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120
18. sulflufenacil 70% WG	10.5
19. ไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช	-

เตรียมกระถางขนาด 12 นิ้ว ใส่ดินร่วนเป็นวัสดุปลูก จากนั้นหว่านเมล็ด 50 เมล็ดต่อกระถาง แล้วทำการพ่นสารกำจัดวัชพืชตามกรรมวิธีที่กำหนดหลังหว่านเมล็ด 1-2 วัน และเก็บข้อมูล ที่ระยะ 7, 15, 30, 45 และ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช (น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเก็บข้อมูลจำนวน 1 กระถาง/ครั้ง/กรรมวิธี/ซ้ำ) โดยบันทึกข้อมูลดังนี้

- 1) บันทึกความสูง และจำนวนใบหลังพ่นสารกำจัดวัชพืช
- 2) บันทึกจำนวนต้นที่มีชีวิตรอด (ต้นวัชพืชที่ยังมีสีเขียว) และลักษณะอาการที่ปรากฏ
- 3) บันทึกน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง ที่ระยะ 30 และ 60 วันหลังพ่นสาร โดยดึงต้นออกจากกระถาง ล้างทำความสะอาดราก นำไปชั่งน้ำหนักสด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกว่าต้นแห้ง และนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง

เวลาและสถานที่

ระหว่าง ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 (ระยะเวลา 2 ปี) ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ด

หญ้ายอดหนอน บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่าการไม่ใช้วัสดุคลุมดินหญ้ายอดหนอนงอกในวันที่ 4 หลังหว่านเมล็ด ในขณะที่การใช้พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤๅษี เมล็ดงอกในวันที่ 5 หลังหว่านเมล็ด และตลอดระยะเวลาที่บันทึกข้อมูล พบว่าการใช้แกลบดิบ และไม่ใช้วัสดุคลุมดิน มีการงอกของเมล็ดใกล้เคียงกัน และเมื่อครบ 30 วันหลังหว่านเมล็ด พบว่าการใช้พลาสติกคลุมแปลง และใบและต้นธูปฤๅษี สามารถควบคุมการงอกได้ดีที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 2.3 - 25.8 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าและแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ฟางข้าว แกลบดิบ และไม่ใช้วัสดุคลุมดิน ในขณะที่การใช้ฟางข้าว และแกลบดิบ ควบคุมการงอกได้ไม่แตกต่างจากการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 63.1 - 89.5 เปอร์เซ็นต์ (Table 1 และ Figure 1)

หญ้ายางนงนุช บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่าการใช้พลาสติกคลุมแปลง ไม่พบเมล็ดหญ้ายางนงนุชงอกตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง ส่วนการใช้ฟางข้าว พบเมล็ดงอกในวันที่ 7 หลังหว่านเมล็ด และการใช้แกลบดิบ แกลบเผา ใบและต้นธูปฤๅษี และไม่ใช้วัสดุคลุมดิน พบเมล็ดงอกในวันที่ 5 หลังหว่านเมล็ด และตลอดระยะเวลาที่ทดลอง พบว่าการใช้แกลบดิบ และไม่ใช้วัสดุคลุมดิน มีการงอกของเมล็ดใกล้เคียงกัน และเมื่อครบ 30 วันหลังหว่านเมล็ด พบว่าการใช้พลาสติกคลุมแปลง สามารถควบคุมการงอกได้ดีที่สุด โดยไม่พบการงอกของหญ้ายางนงนุช แตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ ในขณะที่การใช้ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา ใบและต้นธูปฤๅษี ควบคุมการงอกได้ไม่แตกต่างจากการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 31.4 - 52.7 เปอร์เซ็นต์ (Table 1 และ Figure 2)

เอื้องชมพู เนื่องจากเอื้องชมพูงอกและเจริญเติบโตค่อนข้างช้า จึงบันทึกข้อมูลเป็นเวลา 60 วัน พบว่าการใช้พลาสติกคลุมแปลง และฟางข้าว ไม่พบการงอกตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง ส่วนการใช้แกลบดิบ แกลบเผา ใบและต้นธูปฤๅษี และการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน พบเมล็ดงอกในวันที่ 20, 23, 21 และ 7 หลังหว่านเมล็ด และการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน พบการงอกมากกว่าสองเมล็ดในวันที่ 8, 9, 10, 13 และ 15 วันหลังหว่านเมล็ด และหลังวันที่ 15 พบว่าเมล็ดงอกน้อยกว่าสองเมล็ดเช่นเดียวกับการใช้พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤๅษี และเมื่อครบ 60 วันหลังหว่านเมล็ด พบว่า การใช้พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤๅษี พบการงอกน้อยที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 0.0-3.5 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน ที่มีความงอก 34.8 เปอร์เซ็นต์ (Table 1 และ Figure 3)

ทั้งนี้ผลการทดลองการใช้พลาสติกคลุมแปลงสามารถควบคุมการงอกของเมล็ดวัชพืชทั้งสามชนิดได้ดีที่สุด สอดคล้องกับ เพ็ญศรี และจรรย์ (2553) ที่รายงานว่า การศึกษาวัสดุคลุมดินเพื่อกำจัดวัชพืชในกวาวเครือขาว พบว่า น้ำหนักแห้งของวัชพืชแปลงที่กำจัดวัชพืชด้วยแรงงานมีน้อยที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการใช้พลาสติกสีดำเทา และแผ่นชีวมวล

ผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดในวัสดุปลูก

หญ้ายอดหนอน บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีเมล็ดหญ้ายอดหนอนงอกในวันที่ 7 หลังหว่านเมล็ด และงอกใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง และเมื่อครบ 30 วันหลังหว่านเมล็ด พบว่าการอบวัสดุปลูกและเมล็ดหญ้ายอดหนอน ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีความงอกไม่แตกต่างกับการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดหญ้ายอดหนอน โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 32.0 - 49.3 เปอร์เซ็นต์ (Table 2 และ Figure 4)

หญ้ายางนงนุช บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีเมล็ดหญ้ายางนงนุชงอกในวันที่ 5 หลังหว่านเมล็ด และงอกใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง และเมื่อครบ 30 วันหลังหว่านเมล็ด พบว่าการอบวัสดุปลูกและเมล็ดหญ้ายางนงนุช ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีความงอกไม่แตกต่างกับการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดหญ้ายางนงนุช โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 7.6 - 18.4 เปอร์เซ็นต์ (Table 2 และ Figure 5)

เอื้องชมพู เนื่องจากเอื้องชมพูงอกและเจริญเติบโตค่อนข้างช้า จึงบันทึกข้อมูลเป็นเวลา 60 วัน พบว่า การอบวัสดุปลูกและเมล็ดเอื้องชมพู ที่อุณหภูมิ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส และการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดเอื้องชมพู เมล็ดงอกในวันที่ 12 หลังหว่านเมล็ด ในขณะที่การอบวัสดุปลูกและเมล็ดเอื้องชมพู ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เมล็ดงอกในวันที่ 13 หลังหว่านเมล็ด และทุกกรรมวิธีเมล็ดงอกใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง และเมื่อครบ 60 วันหลังหว่านเมล็ด พบว่าการอบวัสดุปลูกและเมล็ดเอื้องชมพู ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีความงอกน้อยสุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 1.1 - 9.8 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดเอื้องชมพู ที่มีความงอก 23.3 เปอร์เซ็นต์ (Table 2 และ Figure 6)

จากผลการทดลอง การอบวัสดุปลูกและเมล็ดนาน 24 โมง พบว่าหญ้ายอดหนอน และหญ้ายางนงนุช ทุกกรรมวิธีไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ด ในขณะที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส สามารถควบคุมการงอกของเมล็ดเอื้องชมพูได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมล็ดวัชพืชแต่ละชนิดทนต่ออุณหภูมิได้แตกต่างกัน และระยะเวลาที่ใช้อบวัสดุปลูกและเมล็ดอาจยังไม่เพียงพอต่อการฆ่าเมล็ดวัชพืช อาจต้องใช้ระยะเวลาในการอบนานขึ้น เช่น Egley (1990) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอกและรอดชีวิตของเมล็ดวัชพืช 8 ชนิด พบว่าในดินแห้ง (ความชื้น 2%) เมล็ดมีความทนทานอุณหภูมิสูงได้ถึง 60 องศาเซลเซียส แต่ไม่เกิน 7 วัน ในขณะที่เมล็ดส่วนใหญ่ถูกฆ่าตายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส หลังจาก 7 วัน

การทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอก

วางแผนการทดลองแบบ RCB 3 ซ้ำ มี 19 กรรมวิธี ทำการพ่นสารกำจัดวัชพืชหลังหว่านเมล็ด 1 วัน ได้ผลการทดลองดังนี้

หญ้ายอดหนอน พบว่า ที่ระยะ 7 วันหลังพ่นสาร หญ้ายอดหนอนกำลังเริ่มงอก จึงยังไม่นับจำนวนต้นที่มีชีวิตรอด และที่ระยะ 15 วันหลังพ่นสาร พบการงอกของหญ้ายอดหนอนทุกกรรมวิธี โดยที่ระยะ 15 และ 30 วันหลังพ่นสาร พบว่า ทุกกรรมวิธีมีจำนวนต้นที่รอดชีวิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 3.1 – 29.3 และ 3.0 – 31.1 ต้นต่อกระถาง ตามลำดับ ที่ระยะ 45 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีจำนวนต้นน้อยที่สุด คือ 1.5 ต้นต่อกระถาง ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone, sulflufenacil และ กรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ที่มีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 7.5 – 29.2 ต้นต่อกระถาง และที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีจำนวนต้นน้อยที่สุดคือ 1.5 ต้นต่อกระถาง ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone, sulflufenacil และ กรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ที่มีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 7.3 – 27.2 ต้นต่อกระถาง (Table 3 และ Figure 7 และ 8) ทำการวัดความสูง นับจำนวนใบ ชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของหญ้ายอดหนอน ที่ระยะ 30 วันหลังพ่นสาร พบว่า ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงอยู่ระหว่าง 2.6 – 6.6 เซนติเมตร มีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 3.8 – 9.0 ใบต่อต้น มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.15 – 10.56 และ 0.04 – 1.83 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ (Table 4) และที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร พบว่า หญ้ายอดหนอนมีจำนวนใบ และน้ำหนักสด ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 5.4 – 26.0 ใบต่อต้น และมีน้ำหนักสดอยู่ระหว่าง 5.87 – 115.11 กรัมต่อกระถาง ความสูง พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร diclosulam มีความสูงน้อยที่สุดคือ 4.4 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร amicarbazone, bromacil, diuron, imazethapyr, metribuzin,

pendimethalin และ sulfentrazone ที่มีความสูงอยู่ระหว่าง 11.7 – 19.8 เซนติเมตร และน้ำหนักแห้ง พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร diclosulam มีน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดคือ 1.30 กรัมต่อกระถาง ไม่แตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีพ่นสาร acetochlor,alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor และ sulfentrazone ที่มีน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 2.29 – 21.87 กรัมต่อกระถาง (Table 5)

หญ้ายางงนุช พบว่า ที่ระยะ 7 วันหลังพ่นสาร มี 2 กรรมวิธีที่หญ้ายางงนุชไม่ออกคือ กรรมวิธีพ่นสาร sulfentrazone และกรรมวิธีพ่นสาร sulflufenacil ส่วนกรรมวิธีพ่นสาร clomazone หญ้ายางงนุชที่ออกมามีใบและลำต้นเป็นสีขาว ในขณะที่กรรมวิธีอื่นๆ หญ้ายางงนุชงอก มีใบและลำต้นปกติ และที่ระยะ 15 วันหลังพ่นสาร พบการงอกทุกกรรมวิธี และการนับจำนวนต้นที่มีรอดชีวิตที่ระยะ 15, 30 และ 45 วันหลังพ่นสาร พบว่า ทุกกรรมวิธีมีจำนวนต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 2.0 – 28.1, 7.1 – 33.3 และ 1.5 – 35.3 ต้นต่อกระถาง ตามลำดับ และที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil หญ้ายางงนุชมีจำนวนต้นน้อยที่สุดคือ 1.7 ต้นต่อกระถาง ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor,alachlor, amicarbazone, atrazine, clomazone, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone, sulflufenacil และ กรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ที่มีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 11.2 - 33.0 ต้นต่อกระถาง (Table 6 และ Figure 9 และ 10) ทำการวัดความสูง นับจำนวนใบ ซึ่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของหญ้ายางงนุชที่ระยะ 30 วันหลังพ่นสาร พบว่า ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงอยู่ระหว่าง 1.4 – 6.4 เซนติเมตร มีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 3.6 – 13.4 ใบต่อต้น มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.20 – 23.46 และ 0.02 – 3.2 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ (Table 7) และที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร พบว่า หญ้ายางงนุชมีความสูง และจำนวนใบ ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงอยู่ระหว่าง 5.9 – 19.7 เซนติเมตร และมีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 10.6 – 32.2 ใบต่อต้น ส่วนน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งน้อยที่สุดคือ 4.09 และ 0.74 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor,alachlor, amicarbazone, atrazine, clomazone, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, s-metolachlor, sulfentrazone, sulflufenacil และกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ที่มีน้ำหนักสดอยู่ระหว่าง 19.01 – 72.77 กรัมต่อกระถาง และมีน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 2.91 – 15.73 กรัมต่อกระถาง (Table 8)

เอื้องชมพู พบว่า ที่ระยะ 7 วันหลังพ่นสาร ยังไม่พบการงอกของเอื้องชมพู และเริ่มออกที่ระยะ 13 วันหลังพ่นสาร โดยที่ระยะ 15 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสารalachlor, diclosulam, metolachlor, oxyfluorfen และ s-metolachlor มีจำนวนต้นรอดชีวิตน้อยที่สุดคือ 0.0 ต้นต่อกระถาง ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor, amicarbazone, atrazine,

bromacil, clomazone, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metribuzin, oxadiazon, pendimethalin, sulfentrazone และ sulflufenacil ที่มีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 0.1 – 3.2 ต้นต่อกระถาง ที่ระยะ 30 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร oxyfluorfen มีจำนวนต้นรอดชีวิตน้อยสุด คือ 0.0 ต้นต่อกระถาง ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil ที่มีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 0.4 – 8.3 ต้นต่อกระถาง ที่ระยะ 45 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร oxyfluorfen มีจำนวนต้นรอดชีวิตน้อยสุด คือ 0.0 ต้นต่อกระถาง ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, diclosulam, isoxaflutole metolachlor, metribuzin, oxadiazon, pendimethalin, s-metolachlor และ sulflufenacil ที่มีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 0.6 – 10.6 ต้นต่อกระถาง และที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร diclosulam และ oxyfluorfen มีจำนวนต้นรอดชีวิตน้อยสุด คือ 0.0 ต้นต่อกระถาง ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil มีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 0.5 – 10.4 ต้นต่อกระถาง (Table 9 และ Figure 11)

เนื่องจากที่ระยะ 30 วันหลังพ่นสาร ต้นเอื้องชมพูมีขนาดเล็กจึงเก็บข้อมูลเฉพาะที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร ได้ผลการทดลองดังนี้ ความสูง พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร diclosulam และ oxyfluorfen มีความสูงน้อยสุด คือ 0.0 เซนติเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, pendimethalin, s-metolachlor, sulflufenacil และกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ที่มีความสูงอยู่ระหว่าง 0.2 – 1.8 เซนติเมตร จำนวนใบ พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร diclosulam และ oxyfluorfen มีจำนวนใบน้อยสุด คือ 0.0 ใบต่อต้น ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, pendimethalin, s-metolachlor, sulflufenacil และ sulfentrazone ที่มีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 0.3 – 8.7 ใบต่อต้น ส่วนน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่า ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.00 – 6.43 และ 0.00 – 0.94 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ (Table 10) จากผลการทดลอง พบว่าจำนวนต้นที่รอดชีวิตไม่แตกต่างจากกรรมวิธีพ่นสาร เนื่องจากหากต้นวัชพืชยังมีสีเขียวอยู่จะนับว่ามีชีวิตรอดด้วย แต่เมื่อนำไปชั่งน้ำหนักแห้งจะเห็นถึงความแตกต่างเนื่องจากกรรมวิธีที่พ่นสารและสามารถควบคุมได้จะมีน้ำหนักแห้งน้อยกว่ากรรมวิธีอื่น อย่างไรก็ตามสารกำจัดวัชพืชแต่ละชนิดจะให้ผลการควบคุมวัชพืชที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น คุณสมบัติของสาร กลไกการทำงานยาพิษและชนิดวัชพืช เป็นต้น

เช่น สารกำจัดวัชพืช atrazine ใช้ควบคุมวัชพืชใบเลี้ยงคู่เป็นส่วนใหญ่ และวงศ์หญ้าบางชนิด และ metribuzin ใช้ควบคุมวัชพืชอายุฤดูเดียวใบเลี้ยงคู่ได้ดีกว่าวงศ์หญ้า เป็นต้น (รังสิต, 2547)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การใช้วัสดุคลุมดิน ได้แก่ พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤๅษี เปรียบเทียบกับการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน พบการงอกของหญ้ายอดหนอนทุกกรรมวิธี โดยการใช้พลาสติกคลุมแปลง และใบและต้นธูปฤๅษี สามารถควบคุมการงอกของหญ้ายอดหนอนได้ดีที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 2.3 - 25.8 เปอร์เซ็นต์ หญ้ายางนงนุช การใช้พลาสติกคลุมแปลง สามารถควบคุมการงอกได้ดีที่สุด โดยไม่พบการงอกของหญ้ายางนงนุช แตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ และเอื้องชมพู การใช้พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤๅษี พบการงอกน้อยที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 0.0-3.5 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองการใช้พลาสติกคลุมแปลงสามารถควบคุมการงอกของเมล็ดวัชพืชทั้งสามชนิดได้ดี นอกจากนี้ยังมีวัสดุคลุมดินอื่นๆ ที่สามารถใช้เป็นวัสดุคลุมดินได้ โดยเฉพาะใบและต้นธูปฤๅษี แต่การใช้ต้องตัดในช่วงที่ยังไม่ออกดอก เพื่อป้องกันธูปฤๅษีแพร่กระจายไปยังพื้นที่อื่น

การอบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชทั้งสามชนิด โดยใช้อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช หญ้ายอดหนอน และหญ้ายางนงนุช การอบวัสดุปลูกและเมล็ดที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีความงอกไม่แตกต่างกับการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ด โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 32.0 - 49.3 และ 7.6 - 18.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเอื้องชมพู การอบวัสดุปลูกและเมล็ดที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีความงอกน้อยสุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 1.1 - 9.8 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองทุกกรรมวิธีที่อบวัสดุปลูกและเมล็ดหญ้ายอดหนอน และหญ้ายางนงนุช ไม่แตกต่างกับการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช แสดงว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่อบดังกล่าวไม่ได้ผล ดังนั้น จึงควรใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น หรือใช้ระยะเวลาอบนานขึ้น ซึ่งจำเป็นต้องมีการทดลองต่อไปในอนาคต

การพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอก ได้แก่ acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil เปรียบเทียบกับไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช จำนวนต้นที่รอดชีวิตของหญ้ายอดหนอน หญ้ายางนงนุช และเอื้องชมพู ในกรรมวิธีพ่นสาร มีจำนวนต้นที่รอดชีวิตไม่แตกต่างจากกรรมวิธีพ่นสาร แต่เมื่อพิจารณาน้ำหนักแห้งประกอบมีสารกำจัดวัชพืชบางชนิดที่สามารถควบคุมวัชพืชทั้งสามชนิดได้ดี โดยที่ระยะ 60 หลังพ่นสาร การพ่นสาร diclosulam สามารถควบคุมหญ้ายอดหนอนได้ดี โดยมีน้ำหนักแห้ง 1.30 กรัมต่อกระถาง การพ่นสาร bromacil สามารถควบคุมหญ้ายางนงนุชได้ดี โดยมีน้ำหนักแห้ง 0.74 กรัมต่อกระถาง และการพ่นสาร amicarbazone, bromacil, diclosulam และ oxyfluorfen สามารถควบคุมเอื้องชมพูได้ดี มีน้ำหนักแห้ง 0.00 กรัมต่อกระถาง โดยการพ่นสาร

amicarbazone และ bromacil ที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร ต้นเอื้องชมพูออกแต่มีขนาดเล็กมากจึงมีน้ำหนักแห้ง 0.00 กรัมต่อกระถาง เช่นกัน ทั้งนี้จะเห็นว่าหลังพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอกยังไม่สามารถควบคุมวัชพืชทั้งสามชนิดได้สมบูรณ์ยังมีต้นที่งอกขึ้นมาที่หลัง ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปควรมีการศึกษาการควบคุมวัชพืชโดยใช้สารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นหลังวัชพืชงอก เพื่อเป็นทางเลือกในการกำจัดวัชพืชต่อไปในอนาคต

การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำได้ข้อมูลการใช้วัสดุคลุมดิน การอบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช และประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอกใน หลัอย่างงนงนุช หลัายอดหนอน และเอื้องชมพู ไปใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์หาแนวทางป้องกัน และการจัดการ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ พนักงานและจ้างเหมา ของกลุ่มวิจัยวัชพืช ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยวัชพืช. 2555. *คำแนะนำการควบคุมวัชพืช และการใช้สารกำจัดวัชพืชปี 2554*. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. 144 หน้า.
- เพ็ญศรี นันทสมสรอายุ และจรรย์ ดิษฐโชยวงศ์. 2553. ศึกษาวัสดุคลุมดินที่มีผลต่อการควบคุมวัชพืชใน กวาวเครือขาว. หน้า 2,182-2,191. ใน : *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่มที่ 3*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- รังสิต สุวรรณเขตนิคม. 2547. *สารป้องกันกำจัดวัชพืช : พื้นฐานและวิธีการใช้*. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 467 หน้า.
- ศิริพร ชิงสนธิพร. 2557. *เฝ้าระวังพืชต่างถิ่นที่รุกราน: กกกระจุกและหญ้ายางงนงนุช*. เอกสารแจก (แผ่นพับ) เปิดบ้านงานวิจัยวิชาการเกษตร ระหว่างวันที่ 29 – 31 พฤษภาคม 2557. กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- อัญญา สุริยะวงศ์ระการ ศิริพร ชิงสนธิพร ธัญชนก จงรักไทย และ กาญจนา พฤษพันธ์. 2559. ศึกษาชนิดวัชพืชต่างถิ่นในพื้นที่เกษตรที่สูงภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ. ใน : *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2558 เล่ม 4*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- CAB International 2012. *Invasive Species Compendium . Datasheets > Polygonum capitatum*. (Online). Available. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/116446> (July 10, 2014).

- Egley, G. H. 1990. High-Temperature Effects on Germination and Survival of Weed Seeds in Soil. *Weed Science*. Vol. 38, No. 4/5. 429-435 p.
- Foo, C. L., K.C. Harrington and M.B. Mackay. 2010. *Herbicide tolerance of three ornamental ground cover species: Polygonum capitatum, Sedum mexicanum and Soleirolia soleirolii*. Seventeenth Australasian Weeds Conference. 303-306 p.
- Mohamad Soerjani A.J., G.H. Kostermans and T. Gembong. 1987. *Weeds of rice in Indonesia*. BALAI PUSTAKA. Jakarta Pusat, Indonesia. 716 p.

Table 1 Effect of mulching materials on seed germination in *S. anthermia*, *E. gramineae* and *P. capitata*.

Treatments	Seed germination (%)		
	<i>S. anthermia</i>	<i>E. gramineae</i>	<i>P. capitata</i>
Mulching Film	2.3 a ^{1/}	0.0 a	0.0 a
Straw	63.1 cd	31.4 b	0.0 a
Rice Husk	89.5 d	52.7 b	3.5 a
Rice Husk Ash	39.7 bc	37.8 b	0.4 a
Cat-tail	25.8 ab	38.2 b	0.2 a
Control	87.8 d	51.2 b	34.8 b
C.V. (%)	22.8	26.5	88.8

^{1/} Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by DMRT

Table 2 Effect of temperature on seed germination in *S. anthermia*, *E. gramineae* and *P. capitata*.

Treatments	Seed germination (%)		
	<i>S. anthermia</i>	<i>E. gramineae</i>	<i>P. capitata</i>
40 °C	32.7 ^{ns}	7.6 ^{ns}	18.7 bc ^{1/}
50 °C	34.8	11.6	15.9 bc
60 °C	35.7	9.4	19.9 bc
70 °C	44.2	18.4	9.8 ab
80 °C	32.0	9.1	1.1 a
Control	49.3	11.6	23.25 c
C.V. (%)	25.64	91.87	34.8

^{1/} Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by DMRT

^{ns} Average are not significantly different at 5% level by ANOVA

Table 3 Effect of pre-emergence herbicides for number of plants survived of *S. anthermia*.

Treatments	Rate (g ai/rai)	Number of plants survived (plants/plot)			
		15 DAA*	30 DAA	45 DAA	60 DAA
1. acetochlor 50% W/V EC	200	25.1 ^{ns}	28.0 ^{ns}	29.2 ab ^{1/}	29.3 b
2. alachlor 48% W/V EC	312	29.3	31.1	33.0 b	32.2 b
3. amicarbazone 70% WG	119	8.7	8.7	7.7 ab	7.3 ab
4. atrazine 90% WG	315	12.9	13.4	11.5 ab	11.2 ab
5. bromacil 80% WP	320	3.1	3.0	1.5 a	1.5 a
6. clomazone 48% W/V EC	96	13.7	14.8	15.7 ab	15.2 ab
7. diclosulam 84% WG	12.6	20.8	24.9	23.3 ab	19.2 ab
8. diuron 80% WP	320	18.2	20.0	19.2 ab	19.2 ab
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	20.7	22.3	20.8 ab	20.3 ab
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	24.7	25.2	23.8 ab	23.8 ab
11. metolachlor 72% W/V EC	252	25.2	26.7	28.5 ab	27.2 ab
12. metribuzin 70% WP	84	17.3	16.7	16.3 ab	12.2 ab
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	23.9	26.0	26.2 ab	26.5 ab
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	17.9	20.0	22.5 ab	19.7 ab
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	19.6	20.1	18.8 ab	13.8 ab
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	20.1	21.1	21.0 ab	20.5 ab
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	6.9	7.9	7.5 ab	7.3 ab
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	11.3	12.3	12.5 ab	12.3 ab
19. control	-	25.0	26.2	27.5 ab	26.8 ab
C.V. (%)		50.57	49.19	51.93	49.20

^{1/} Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by DMRT

^{ns} Average are not significantly different at 5% level by ANOVA *DAA = Days after application

Table 4 Effect of pre-emergence herbicides for height, number of leaves, fresh and dry weight of *S. anthelmia* at 30 days after application.

Treatments	Rate (g ai/rai)	30 DAA*			
		Height (cm.)	Number of leaves /plant	Fresh weight/plot (g)	Dry weight/plot (g)
1. acetochlor 50% W/V EC	200	6.6 ^{ns}	7.5 ^{ns}	5.74 ^{ns}	1.00 ^{ns}
2. alachlor 48% W/V EC	312	6.0	7.8	10.56	1.83
3. amicarbazone 70% WG	119	4.4	5.3	2.63	0.49
4. atrazine 90% WG	315	5.9	7.7	6.48	1.03
5. bromacil 80% WP	320	2.9	3.8	0.15	0.04
6. clomazone 48% W/V EC	96	6.3	7.8	6.46	1.05
7. diclosulam 84% WG	12.6	2.9	4.9	3.13	0.54
8. diuron 80% WP	320	5.1	7.2	4.77	0.84
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	5.5	8.5	4.76	0.87
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	4.8	6.4	5.41	1.04
11. metolachlor 72% W/V EC	252	5.8	7.5	7.45	1.26
12. metribuzin 70% WP	84	4.6	6.4	4.76	0.84
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	5.9	7.4	9.26	1.51
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	5.2	6.7	3.24	0.60
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	4.5	7.0	5.79	0.89
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	6.0	8.5	6.36	1.02
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	4.7	7.6	4.47	0.63
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	5.1	9.0	3.37	0.63
19. control	-	6.1	7.2	7.59	1.37
C.V. (%)		37.50	25.40	102.97	95.81

^{ns} Average are not significantly different at 5% level by ANOVA *DAA = Days after application

Table 5 Effect of pre-emergence herbicides for height, number of leaves, fresh and dry weight of *S. anthelmia* at 60 days after application.

Treatments	Rate (g ai/rai)	60 DAA*			
		Height (cm.)	Number of leaves/plant	Fresh weight/plot (g)	Dry weight/plot (g)
1. acetochlor 50% W/V EC	200	21.4 b ^{1/}	11.0 ^{ns}	70.45 ^{ns}	15.15 abc
2. alachlor 48% W/V EC	312	21.6 b	10.8	79.00	16.93 abc
3. amicarbazone 70% WG	119	19.2 ab	26.0	43.54	8.53 abc
4. atrazine 90% WG	315	24.9 b	23.2	73.49	14.52 abc
5. bromacil 80% WP	320	12.6 ab	25.4	10.87	2.29 ab
6. clomazone 48% W/V EC	96	23.5 b	15.9	71.38	16.04 abc
7. diclosulam 84% WG	12.6	4.4 a	5.4	5.87	1.30 a
8. diuron 80% WP	320	19.8 ab	16.9	53.59	11.71 abc
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	20.9 b	12.8	47.77	12.35 abc
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	17.7 ab	11.5	52.52	11.28 abc
11. metolachlor 72% W/V EC	252	21.8 b	12.3	78.62	16.94 abc
12. metribuzin 70% WP	84	15.9 ab	15.1	31.41	6.73 abc
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	23.2 b	14.1	89.91	18.30 abc
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	21.5 b	21.6	68.78	14.89 abc
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	12.7 ab	15.5	43.63	8.75 abc
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	26.1 b	16.0	106.45	21.87 abc
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	11.7 ab	11.0	60.01	11.03 abc
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	27.8 b	25.7	115.11	23.40 bc
19. control	-	25.3 b	12.7	101.05	24.66 c
C.V. (%)		26.72	44.11	58.66	52.97

^{1/} Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by DMRT

^{ns} Average are not significantly different at 5% level by ANOVA

*DAA = Days after application

Table 6 Effect of pre-emergence herbicides for number of plants survived of *E. gramineae*.

Treatments	Rate (g ai/rai)	Number of plants survived (plants/plot)			
		15 DAA*	30 DAA	45 DAA	60 DAA
1. acetochlor 50% W/V EC	200	23.2 ^{ns}	31.7 ^{ns}	31.7 ^{ns}	30.8 ab ^{1/}
2. alachlor 48% W/V EC	312	10.7	20.8	20.2	21.7 ab
3. amicarbazone 70% WG	119	12.2	17.5	13.5	14.0 ab
4. atrazine 90% WG	315	6.1	16.6	18.0	18.3 ab
5. bromacil 80% WP	320	2.0	7.1	1.5	1.7 a
6. clomazone 48% W/V EC	96	13.5	21.6	23.2	22.8 ab
7. diclosulam 84% WG	12.6	10.1	13.8	11.5	11.2 ab
8. diuron 80% WP	320	12.4	21.9	23.3	22.7 ab
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	13.1	23.1	21.2	20.8 ab
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	18.1	23.6	22.7	22.3 ab
11. metolachlor 72% W/V EC	252	28.1	33.3	35.3	36.3 b
12. metribuzin 70% WP	84	13.0	27.1	24.3	20.2 ab
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	21.2	30.5	31.2	32.5 ab
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	9.2	15.9	14.2	14.7 ab
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	20.0	29.2	29.2	29.2 ab
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	17.9	30.9	30.8	30.5 ab
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	5.9	16.6	15.0	17.0 ab
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	4.1	12.4	14.2	14.5 ab
19. control	-	25.4	31.8	32.7	33.0 ab
C.V. (%)		69.45	44.80	53.56	51.00

^{1/} Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by DMRT

^{ns} Average are not significantly different at 5% level by ANOVA

*DAA = Days after application

Table 7 Effect of pre-emergence herbicides for height, number of leaves, fresh and dry weight of *E. gramineae* at 30 days after application.

Treatments	Rate (g ai/rai)	30 DAA*			
		Height (cm.)	Number of leaves /plant	Fresh weight/plot (g)	Dry weight/plot (g)
1. acetochlor 50% W/V EC	200	5.1 ^{ns}	8.5 ^{ns}	10.83 ^{ns}	2.10 ^{ns}
2. alachlor 48% W/V EC	312	2.5	6.3	3.21	0.62
3. amicarbazone 70% WG	119	2.3	4.8	4.02	0.87
4. atrazine 90% WG	315	2.6	7.1	4.04	0.75
5. bromacil 80% WP	320	1.4	3.6	0.20	0.02
6. clomazone 48% W/V EC	96	3.6	8.8	7.88	1.37
7. diclosulam 84% WG	12.6	3.1	7.0	7.72	1.40
8. diuron 80% WP	320	3.4	8.9	6.32	1.07
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	3.8	8.2	6.84	1.38
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	4.5	8.3	8.17	1.51
11. metolachlor 72% W/V EC	252	5.7	10.3	19.00	3.20
12. metribuzin 70% WP	84	3.3	6.8	8.26	1.61
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	5.0	9.4	9.97	2.80
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	2.4	6.3	2.28	0.50
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	4.3	9.6	11.04	1.60
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	4.2	9.1	10.61	1.92
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	2.1	5.4	2.44	0.44
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	1.5	4.4	0.50	0.11
19. control	-	6.4	13.4	23.46	2.92
C.V. (%)		61.38	45.56	101.64	108.07

^{ns} Average are not significantly different at 5% level by ANOVA

*DAA = Days after application

Table 8 Effect of pre-emergence herbicides for height, number of leaves, fresh and dry weight of *E. graminea* at 60 days after application.

Treatments	Rate (g ai/rai)	60 DAA*			
		Height (cm.)	Number of leaves/plant	Fresh weight/plot (g)	Dry weight/plot (g)
1. acetochlor 50% W/V EC	200	18.3 ^{ns}	23.6 ^{ns}	52.38 ab ^{1/}	11.91 ab
2. alachlor 48% W/V EC	312	15.2	26.3	39.34 ab	7.85 ab
3. amicarbazone 70% WG	119	8.4	10.6	28.87 ab	6.16 ab
4. atrazine 90% WG	315	15.2	30.6	53.05 ab	8.96 ab
5. bromacil 80% WP	320	5.9	24.5	4.09 a	0.74 a
6. clomazone 48% W/V EC	96	14.1	23.2	35.86 ab	8.53 ab
7. diclosulam 84% WG	12.6	10.0	18.1	19.01 ab	2.91 ab
8. diuron 80% WP	320	15.7	27.8	45.84 ab	9.80 ab
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	13.6	28.1	35.58 ab	7.49 ab
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	15.7	25.5	39.54 ab	8.43 ab
11. metolachlor 72% W/V EC	252	17.0	22.5	54.63 ab	10.28 ab
12. metribuzin 70% WP	84	13.4	24.1	30.48 ab	6.01 ab
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	17.1	25.0	59.35 ab	11.84 ab
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	10.5	20.8	24.81 ab	4.95 ab
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	16.7	31.5	98.54 b	19.06 b
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	19.7	25.7	63.60 ab	12.27 ab
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	13.2	25.3	21.71 ab	5.90 ab
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	18.0	32.2	38.51 ab	7.27 ab
19. control	-	19.7	27.7	72.77 ab	15.73 ab
C.V. (%)		33.83	44.60	60.81	61.85

^{1/} Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by DMRT

^{ns} Average are not significantly different at 5% level by ANOVA

*DAA = Days after application

Table 9 Effect of pre-emergence herbicides for number of plants survived of *P. capitata*.

Treatments	Rate (g ai/rai)	Number of plants survived (plants/plot)			
		15 DAA*	30 DAA	45 DAA	60 DAA
1. acetocho 50% W/V EC	200	0.1 a ^{1/}	3.0 ab	9.2 abc	7.3 ab
2. alachlor 48% W/V EC	312	0.0 a	2.4 a	8.1 abc	2.9 ab
3. amicarbazone 70% WG	119	1.3 ab	3.2 ab	3.6 ab	0.8 a
4. atrazine 90% WG	315	1.0 ab	6.4 ab	10.5 abc	4.4 ab
5. bromacil 80% WP	320	3.2 ab	1.9 a	0.6 a	0.5 a
6. clomazone 48% W/V EC	96	2.6 ab	7.5 ab	12.3 bc	8.7 ab
7. diclosulam 84% WG	12.6	0.0 a	3.9 ab	4.0 ab	0.0 a
8. diuron 80% WP	320	0.9 ab	5.6 ab	11.9 bc	6.7 ab
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	1.5 ab	6.5 ab	10.6 abc	7.8 ab
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	0.8 a	6.2 ab	12.0 bc	5.6 ab
11. metolachlor 72% W/V EC	252	0.0 a	2.2 a	7.1 abc	6.4 ab
12. metribuzin 70% WP	84	1.9 ab	3.9 ab	6.0 ab	3.1 ab
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	0.1 a	0.4 a	5.4 ab	7.1 ab
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	0.1 a	3.8 ab	7.5 abc	5.6 ab
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	0.0 a	3.0 ab	6.6 ab	3.9 ab
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	2.7 ab	7.9 ab	13.3 bc	10.4 ab
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	1.7 ab	8.3 ab	8.6 abc	2.9 ab
19. control	-	5.1 b	11.8 b	17.6 c	12.6 b
C.V. (%)		114.67	64.21	42.70	73.94

^{1/} Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by DMRT

* DAA = Days after application

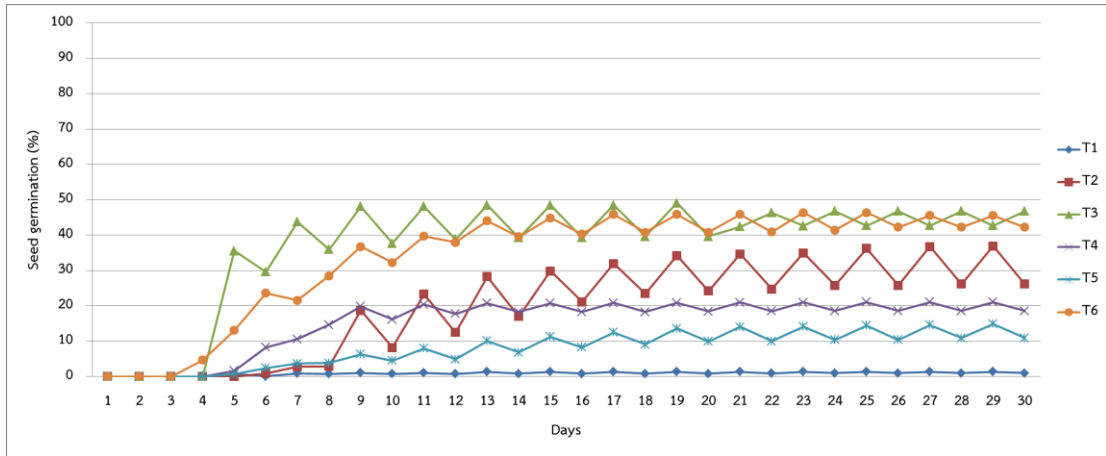
Table 10 Effect of pre-emergence herbicides for height, number of leaves, fresh and dry weight of *P. capitata* at 60 days after application.

Treatments	Rate (g ai/rai)	60 DAA*			
		Height (cm.)	Number of leaves/plot	Fresh weight/plot (g)	Dry weight/plot (g)
1. acetochlor 50% W/V EC	200	0.6 ab ^{1/}	4.2 ab	0.93 ^{ns}	0.14 ^{ns}
2. alachlor 48% W/V EC	312	0.6 ab	4.1 ab	0.22	0.03
3. amicarbazone 70% WG	119	0.2 ab	0.5 ab	0.00	0.00
4. atrazine 90% WG	315	1.2 ab	8.4 ab	1.02	0.16
5. bromacil 80% WP	320	0.2 ab	0.3 a	0.00	0.00
6. clomazone 48% W/V EC	96	1.3 ab	8.1ab	2.68	0.47
7. diclosulam 84% WG	12.6	0.0 a	0.0 a	0.00	0.00
8. diuron 80% WP	320	0.7 ab	4.9 ab	0.46	0.08
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	0.6 ab	3.9 ab	0.46	0.08
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	0.7 ab	3.9 ab	0.31	0.05
11. metolachlor 72% W/V EC	252	0.4 ab	2.8ab	0.18	0.02
12. metribuzin 70% WP	84	0.6 ab	2.9 ab	0.11	0.02
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	0.6 ab	4.3 ab	0.48	0.07
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	0.0 a	0.0 a	0.00	0.00
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	0.7 ab	4.1 ab	0.52	0.08
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	0.5 ab	3.4 ab	0.10	0.02
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	2.0 b	8.7 ab	5.67	0.93
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	0.6 ab	4.4 ab	0.21	0.04
19. control	-	1.8 ab	9.4 b	6.43	0.94
C.V. (%)		86.14	70.67	252.56	234.62

^{1/} Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by DMRT

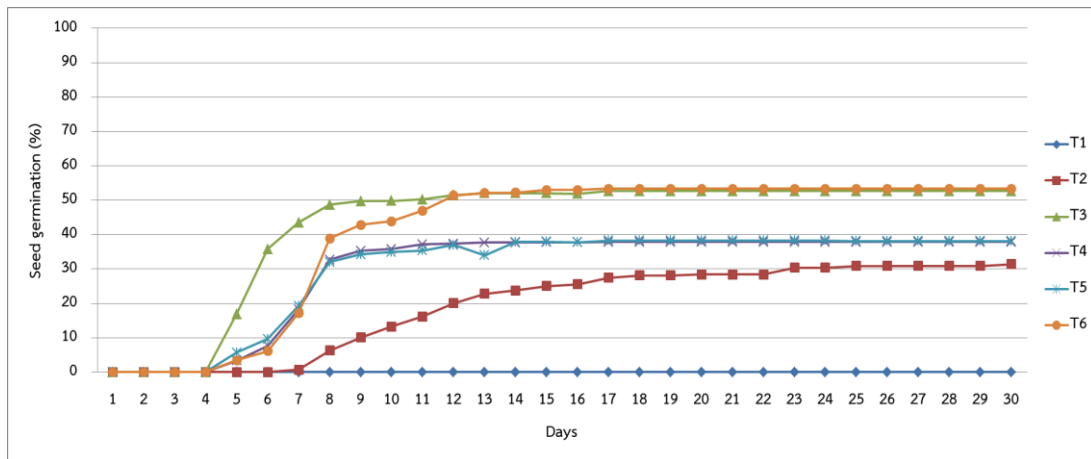
^{ns} Average are not significantly different at 5% level by ANOVA

*DAA = Days after application



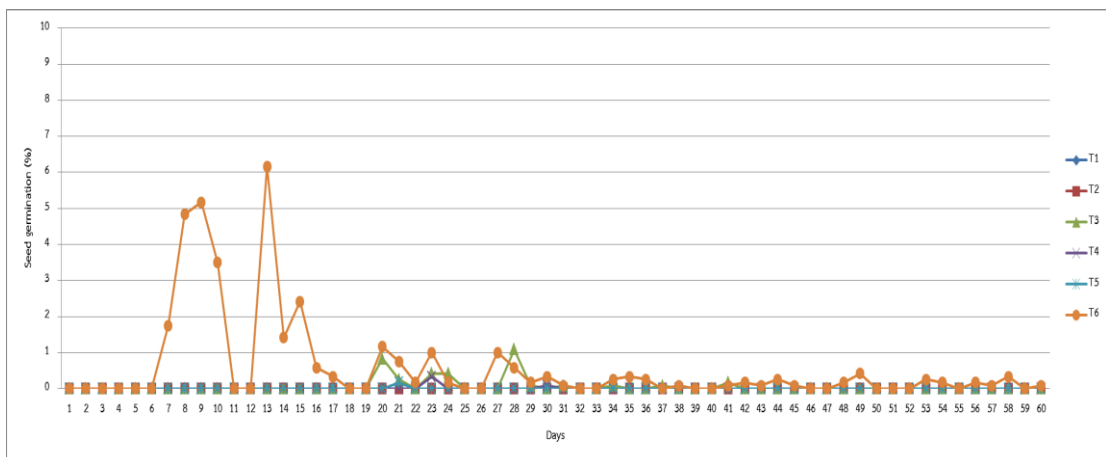
Note T1 = Mulching Film, T2 = Straw, T3 = Rice Husk, T4 = Rice Husk Ash, T5 = Cat-tail, T6 = Control

Figure 1 Effect of mulching materials on seed germination in *S. anthelmia*.



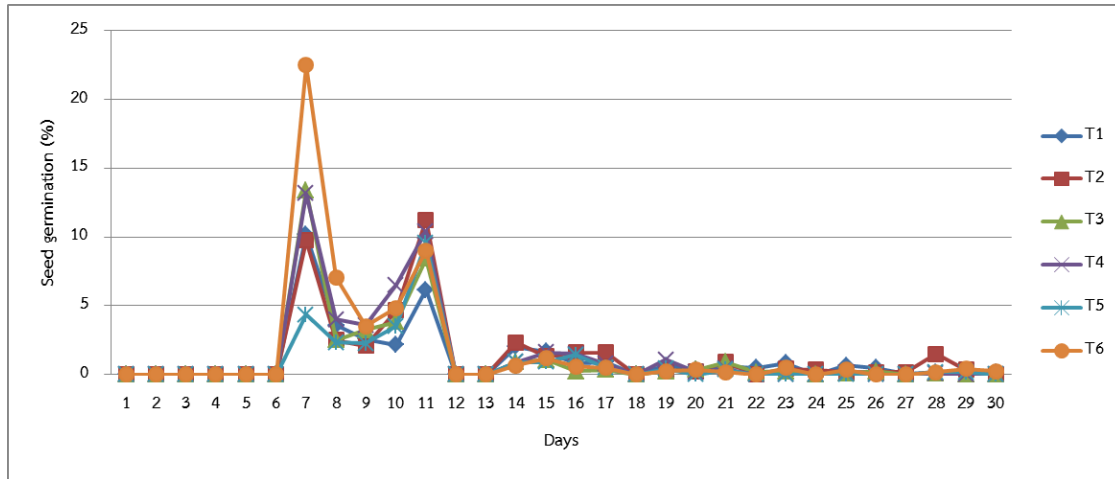
Note T1 = Mulching Film, T2 = Straw, T3 = Rice Husk, T4 = Rice Husk Ash, T5 = Cat-tail, T6 = Control

Figure 2 Effect of mulching materials on seed germination in *E. graminea*.



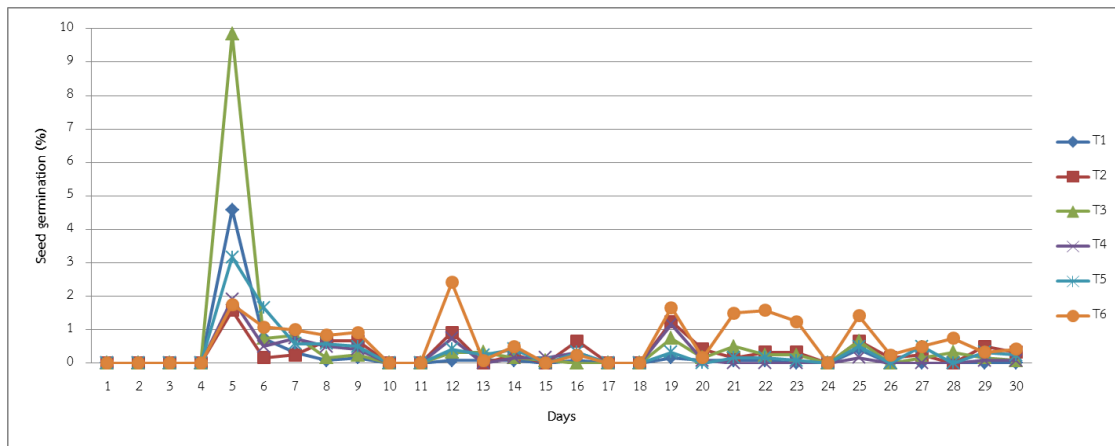
Note T1 = Mulching Film, T2 = Straw, T3 = Rice Husk, T4 = Rice Husk Ash, T5 = Cat-tail, T6 = Control

Figure 3 Effect of mulching materials on seed germination in *P. capitata*.



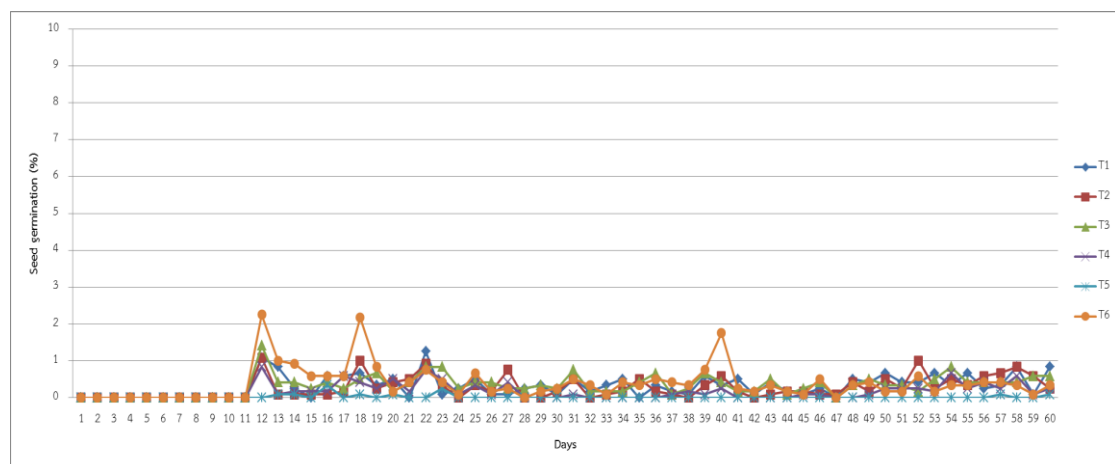
Note T1 = 40 °C, T2 = 50 °C, T3 = 60 °C, T4 = 70 °C, T5 = 80 °C, T6 = 0 °C

Figure 4 Effect of temperature on seed germination in *S. anthelmia*.



Note T1 = 40 °C, T2 = 50 °C, T3 = 60 °C, T4 = 70 °C, T5 = 80 °C, T6 = 0 °C

Figure 5 Effect of temperature on seed germination in *E. graminae*.



Note T1 = 40 °C, T2 = 50 °C, T3 = 60 °C, T4 = 70 °C, T5 = 80 °C, T6 = 0 °C

Figure 6 Effect of temperature on seed germination in *P. capitata*.

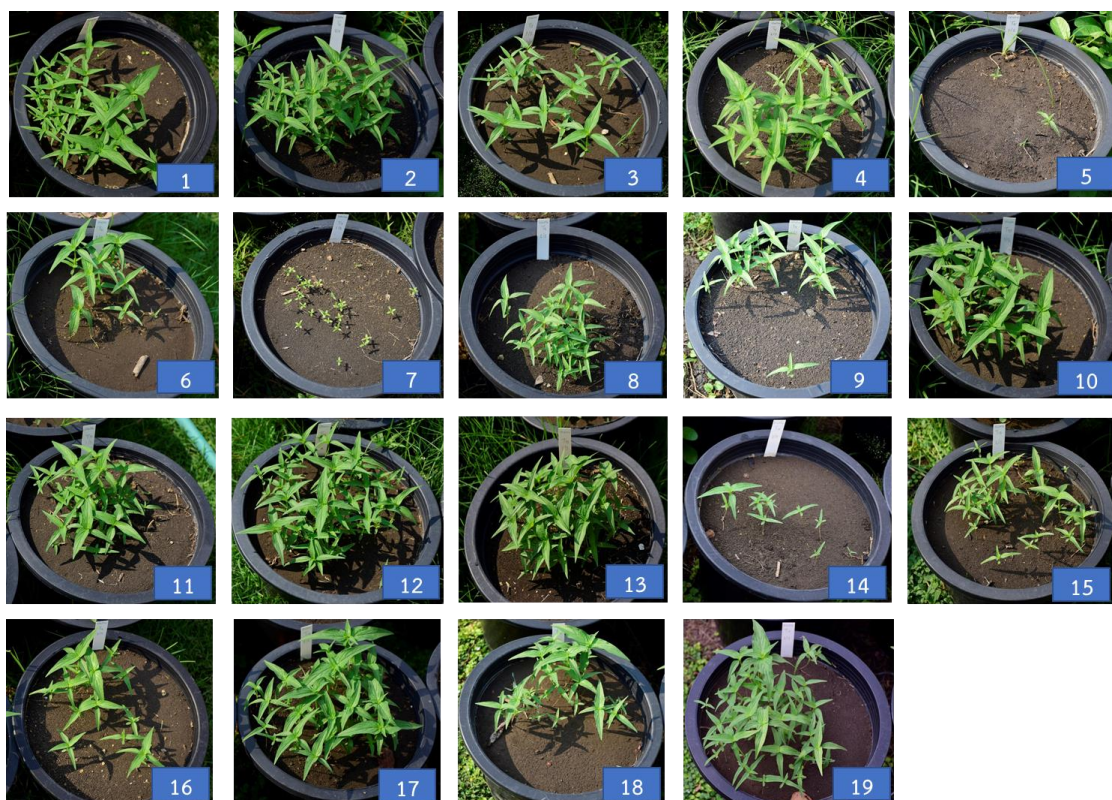


Figure 7 *S. anthelmia* at 30 days after application.

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1) acetochlor 50% W/V EC | 2) alachlor 48% W/V EC |
| 3) amicarbazone 70% WG | 4) atrazine 90% WG |
| 5) bromacil 80% WP | 6) clomazone 48% W/V EC |
| 7) diclosulam 84% WG | 8) diuron 80% WP |
| 9) isoxaflutole 75% WG | 10) imazethapyr 5.3% W/V EC |
| 11) metolachlor 72% W/V EC | 12) metribuzin 70% WP |
| 13) oxadiazon 25% W/V EC | 14) oxyfluorfen 23.5% W/V EC |
| 15) pendimethalin 33% W/V EC | 16) s-metolachlor 96% EC |
| 17) sulfentrazone 48% W/V EC | 18) sulflufenacil 70% WG |
| 19) control | |



Figure 8 *S. anthelmia* at 60 days after application.

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1) acetocho 50% W/V EC | 2) alachlor 48% W/V EC |
| 3) amicarbazone 70% WG | 4) atrazine 90% WG |
| 5) bromacil 80% WP | 6) clomazone 48% W/V EC |
| 7) diclosulam 84% WG | 8) diuron 80% WP |
| 9) isoxaflutole 75% WG | 10) imazethapyr 5.3% W/V EC |
| 11) metolachlor 72% W/V EC | 12) metribuzin 70% WP |
| 13) oxadiazon 25% W/V EC | 14) oxyfluorfen 23.5% W/V EC |
| 15) pendimethalin 33% W/V EC | 16) s-metolachlor 96% EC |
| 17) sulfentrazone 48% W/V EC | 18) sulflufenacil 70% WG |
| 19) control | |



Figure 9 *E. gramineae* at 30 days after application.

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1) acetochlor 50% W/V EC | 2) alachlor 48% W/V EC |
| 3) amicarbazone 70% WG | 4) atrazine 90% WG |
| 5) bromacil 80% WP | 6) clomazone 48% W/V EC |
| 7) diclosulam 84% WG | 8) diuron 80% WP |
| 9) isoxaflutole 75% WG | 10) imazethapyr 5.3% W/V EC |
| 11) metolachlor 72% W/V EC | 12) metribuzin 70% WP |
| 13) oxadiazon 25% W/V EC | 14) oxyfluorfen 23.5% W/V EC |
| 15) pendimethalin 33% W/V EC | 16) s-metolachlor 96% EC |
| 17) sulfentrazone 48% W/V EC | 18) sulflufenacil 70% WG |
| 19) control | |



Figure 10 *E. gramineae* at 60 days after application.

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1) acetochlor 50% W/V EC | 2) alachlor 48% W/V EC |
| 3) amicarbazone 70% WG | 4) atrazine 90% WG |
| 5) bromacil 80% WP | 6) clomazone 48% W/V EC |
| 7) diclosulam 84% WG | 8) diuron 80% WP |
| 9) isoxaflutole 75% WG | 10) imazethapyr 5.3% W/V EC |
| 11) metolachlor 72% W/V EC | 12) metribuzin 70% WP |
| 13) oxadiazon 25% W/V EC | 14) oxyfluorfen 23.5% W/V EC |
| 15) pendimethalin 33% W/V EC | 16) s-metolachlor 96% EC |
| 17) sulfentrazone 48% W/V EC | 18) sulflufenacil 70% WG |
| 19) control | |

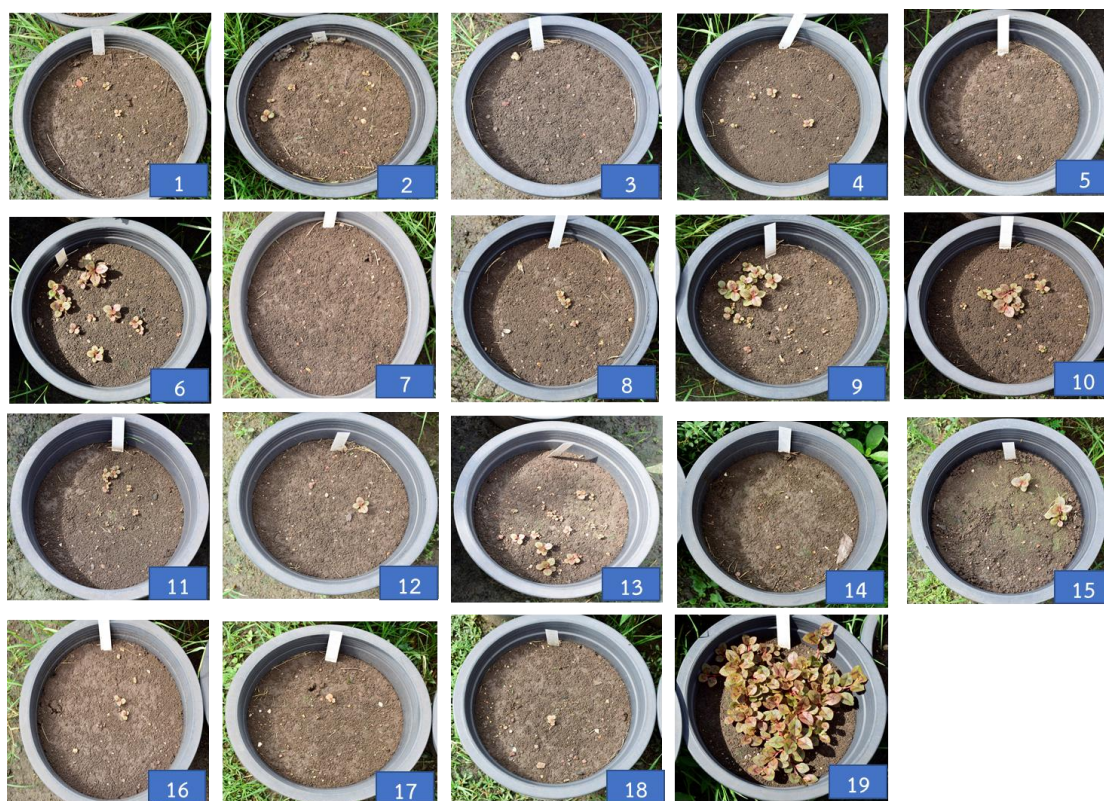


Figure 11 *P. capitata* at 60 days after application.

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1) acetocho 50% W/V EC | 2) alachlor 48% W/V EC |
| 3) amicarbazone 70% WG | 4) atrazine 90% WG |
| 5) bromacil 80% WP | 6) clomazone 48% W/V EC |
| 7) diclosulam 84% WG | 8) diuron 80% WP |
| 9) isoxaflutole 75% WG | 10) imazethapyr 5.3% W/V EC |
| 11) metolachlor 72% W/V EC | 12) metribuzin 70% WP |
| 13) oxadiazon 25% W/V EC | 14) oxyfluorfen 23.5% W/V EC |
| 15) pendimethalin 33% W/V EC | 16) s-metolachlor 96% EC |
| 17) sulfentrazone 48% W/V EC | 18) sulflufenacil 70% WG |
| 19) control | |

การจัดการกกกระจุก (*Cyperus entrianus* Boeckl.)

The Management of Deep-Rooted Sedge (*Cyperus entrianus* Boeckl.)

เอกรัตน์ ธนทอง ฉัญชนก จงรักไทย อัญศยา พรพมา จริญญา ปิ่นสุภา
กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Most of noxious weeds in any country are mainly invasive alien plants which cause various impact on agriculture, environment and biodiversity. Which studies prevention and disposal guidelines alien plants. This is to find ways to control management to reduce the occurrence of invasive alien plants in Thailand in the future. Therefore, study aims to study a method for Deep-Rooted Sedge (*Cyperus entrianus* Boeckl.) management: mulching, using temperature, and using a pre-emergence herbicides were conducted at net house in Weed research group, during October 2018 to September 2020. The results of the experiment showed that the use of mulching: Straw, Rice Husk, Mulching Film, Leave and Leaf sheath of Bulrush. It was most effective in controlling seed germination in Deep-Rooted Sedge. The difference was statistically significant with Rice Husk and no mulching. While the use of temperature Baking media and seeds in temperature 40, 45, 50, 55 and 60 °C can't control seed germination in Deep-Rooted Sedge. For the use of pre-emergence herbicides. The application of acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, diclosulam, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone and sulflufenacil at 200, 312, 119, 315, 320, 12.6, 20, 252, 84, 35.25, 214.5, 153.6, 120 และ 10.5 g ai/rai respectively. It was most effective in controlling seed germination in Deep-Rooted Sedge. With good control efficiency until 90 days after application.

Keywords : alien plant, deep-rooted sedge, non-chemical weed management, chemical weed management

รหัสการทดลอง 03-27-60-01-00-00-07-62

บทคัดย่อ

วัชพืชร้ายแรงในแต่ละประเทศ มักเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศนั้นๆ และมักเป็นพืชต่างถิ่นที่รุกราน ซึ่งการศึกษาแนวทางการป้องกันกำจัดวัชพืชต่างถิ่น เป็นการหาแนวทางในการจัดการ ควบคุม เพื่อลดการเกิดวัชพืชร้ายแรงในประเทศไทยในอนาคต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการจัดการกกระจุกในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ การใช้วัสดุคลุมดิน การใช้อุณหภูมิต่ำ และการใช้สารกำจัดวัชพืช ดำเนินการทดลองในเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 ถึง กันยายน 2563 ผลการทดลองพบว่า การใช้วัสดุคลุมดิน ได้แก่ ฟางข้าว แกลบดิบ พลาสติกคลุมแปลง ใบและต้นรูปฤๅษี มีประสิทธิภาพในการควบคุมการงอกของเมล็ดกกระจุกได้ดี แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้แกลบเผาและการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน ในขณะที่การใช้อุณหภูมิต่ำ โดยการอบวัสดุปลูกและเมล็ดกกระจุก ที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส นั้นไม่สามารถใช้ควบคุมการงอกของเมล็ดกกระจุกได้ ซึ่งกกระจุกสามารถงอกได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดกกระจุก สำหรับการใส่สารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอกนั้น สารที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการงอกของเมล็ดกกระจุก ได้แก่ acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, diclosulam, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil อัตรา 200, 312, 119, 315, 320, 12.6, 20, 252, 84, 35.25, 214.5, 153.6, 120 และ 10.5 กรัม สารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามลำดับ โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมได้ดี จนถึงระยะ 90 วันหลังพ่นสาร

คำหลัก : พืชต่างถิ่น กกระจุก การจัดการโดยไม่ใช้สารกำจัดวัชพืช การจัดการโดยใช้สารกำจัดวัชพืช

คำนำ

วัชพืชร้ายแรงในแต่ละประเทศ มักเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศนั้นๆ และมักเป็นพืชต่างถิ่นที่ถูกชักนำเข้าไปในถิ่นใหม่ สามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ได้ดี เจริญเติบโตได้รวดเร็ว ขยายพันธุ์ได้ดี สร้างหน่วยขยายพันธุ์ได้มากในเวลารวดเร็ว และมักมีการพักตัวเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม (Muenscher, 1980) จากการสำรวจพืชสกุลกก (*Cyperus* L.) โดยศิริพร และคณะ (2558) พบกที่ที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย คือ กกระจุก (*Cyperus entrieanus* Boeckeler) ในพื้นที่ก่อสร้างในกรุงเทพมหานคร โดย Gonzalez and DallaRosa (2007) รายงานว่า กกระจุกเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้ พบในแถบตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา รัฐ Texas, Louisiana, Florida, Georgia จัดเป็นพืชที่รุกรานใน South Carolina และ Texas (Invasive Plant Atlas of the United State, 2021) อัมศยาและคณะ (2561) รายงานว่า ในประเทศไทยพบการแพร่กระจายของกกระจุกในพื้นที่ 2 จังหวัด คือ จังหวัดสมุทรปราการ และ นนทบุรี โดยกกระจุกไม่สามารถงอกได้ในห้องปฏิบัติการ แต่งอกได้ในสภาพเรือนทดลองมีการงอก 32 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาการเจริญเติบโต และการสร้างเมล็ด พบว่า มีความสูงอยู่ระหว่าง 26.2-30.7 เซนติเมตร จำนวนหน่ออยู่

ระหว่าง 9-4 หน่อต่อต้น ช่อดอกอ่อนอยู่ระหว่าง 1-2 ช่อต่อต้น ช่อดอกแก่อยู่ระหว่าง 1-4 ช่อต่อต้น จำนวนเมล็ดต่ออยู่ระหว่าง 35,333-115,977 เมล็ดต่อต้น และมีวงจรรชีวิต 72 วัน และการศึกษาคุณสมบัติทางอัลลีโลพาธิเบียดต้นในห้องปฏิบัติการ พบว่า ราก ใบ ก้านช่อดอก และช่อดอกของกกระจุก สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและลำต้นของไมยราบยักษ์ได้ โดยใบของกกระจุก 0.5 กรัม สามารถยับยั้งการเจริญของลำต้นไมยราบยักษ์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาชีววิทยาและการแพร่กระจายของกกระจุกดังกล่าว ทำให้ทราบถึงการเจริญเติบโต ความสามารถในการขยายพันธุ์ การงอกของเมล็ด คุณสมบัติการเป็นพืชรุกรานในประเทศไทย และการแพร่ระบาดของกกระจุก หากแต่ยังขาดแนวทางการป้องกันและการจัดการกกระจุก ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงวิธีการจัดการต่างๆ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการจัดการกกระจุกในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ การใช้วัสดุคลุมดิน การใช้อุณหภูมิจากการใช้สารกำจัดวัชพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เมล็ดกกระจุก
- กล้องถ่ายภาพแบบดิจิทัล
- เครื่องชั่งไฟฟ้า
- ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
- พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา ใบและต้นธูปฤๅษี
- สารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอก
- วัสดุและอุปกรณ์อื่นๆ เช่น กระจกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว กระจกสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 30 นิ้ว และขนาด 30 x 30 นิ้ว ดินปลูก ไม้บรรทัด ถังกระดาษ และป้ายแสดงกรรมวิธี

วิธีการ

1. ผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ดกกระจุก

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 6 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระจก ประกอบด้วย

- กรรมวิธีที่ 1 พลาสติกคลุมแปลง
- กรรมวิธีที่ 2 ฟางข้าว
- กรรมวิธีที่ 3 แกลบดิบ
- กรรมวิธีที่ 4 แกลบเผา
- กรรมวิธีที่ 5 ใบและต้นธูปฤๅษี
- กรรมวิธีที่ 6 ไม่ใช้วัสดุคลุมดิน

เตรียมกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 30 x 30 นิ้ว ใส่ดินร่วนเป็นวัสดุปลูก จากนั้นโรยเมล็ดกกระจุกจำนวน 100 เมล็ดต่อกระบะ แล้วคลุมด้วยวัสดุต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด รดน้ำให้ความชื้นทุกวัน

บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดตงอกทุกวัน นาน 3 เดือน หรือจนกว่าเมล็ดตงอกหมด และนำไปคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความงอก (\%)} = (\text{จำนวนเมล็ดที่งอก} / \text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่โรย}) \times 100$$

2. ผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดกกกระจุกในวัสดุปลูก

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 6 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระถาง ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 อบรมวัสดุปลูกและเมล็ดกกกระจุก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 อบรมวัสดุปลูกและเมล็ดกกกระจุก ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 3 อบรมวัสดุปลูกและเมล็ดกกกระจุก ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 4 อบรมวัสดุปลูกและเมล็ดกกกระจุก ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 5 อบรมวัสดุปลูกและเมล็ดกกกระจุก ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 6 ไม่อบรมวัสดุปลูกและเมล็ดกกกระจุก

นำเมล็ดกกกระจุกที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด ผสมในวัสดุปลูกน้ำหนัก 1 กิโลกรัม แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำวัสดุปลูกและเมล็ดกกกระจุกที่อบเรียบร้อยแล้ว ใส่ในกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 30 นิ้ว รดน้ำให้ความชื้นทุกวัน บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดตงอกทุกวัน นาน 3 เดือน หรือจนกว่าเมล็ดตงอกหมด และนำไปคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความงอก (\%)} = (\text{จำนวนเมล็ดที่งอก} / \text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่โรย}) \times 100$$

3. ทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอกต่อการงอกของเมล็ดกกกระจุก

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 19 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 3 กระถาง ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1	acetochlor 50% W/V EC	อัตรา 200	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 2	alachlor 48% W/V EC	อัตรา 312	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 3	amicarbazone 70% WG	อัตรา 119	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 4	atrazine 90% WG	อัตรา 315	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 5	bromacil 80% WP	อัตรา 320	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 6	clomazone 48% W/V EC	อัตรา 96	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 7	diclosulam 84% WG	อัตรา 12.6	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 8	diuron 80% WP	อัตรา 320	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 9	isoxaflutole 75% WG	อัตรา 11.25	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 10	imazethapyr 5.3% W/V EC	อัตรา 20	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 11	metolachlor 72% W/V EC	อัตรา 252	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 12	metribuzin 70% WP	อัตรา 84	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 13	oxadiazon 25% W/V EC	อัตรา 80	ก.(ai)/ไร่

กรรมวิธีที่ 14	oxyfluorfen 23.5% W/V EC	อัตรา	35.25	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 15	pendimethalin 33% W/V EC	อัตรา	214.5	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 16	s-metolachlor 96% EC	อัตรา	153.6	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 17	sulfentrazone 48% W/V EC	อัตรา	120	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 18	sulflufenacil 70% WG	อัตรา	10.5	ก.(ai)/ไร่
กรรมวิธีที่ 19	ไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช			

เตรียมกระถางขนาด 12 นิ้ว ใส่ดินร่วนเป็นวัสดุปลูก จากนั้นโรยเมล็ดกกระจุก จำนวน 100 เมล็ดต่อกระถาง แล้วพ่นสารกำจัดวัชพืชตามกรรมวิธีที่กำหนดหลังโรยเมล็ด 1 วัน รดน้ำให้ ความชื้นทุกวัน และบันทึกข้อมูล ดังนี้ 1) จำนวนต้นที่มีชีวิตรอด (ต้นกกระจุกที่ยังมีสีเขียว) และ ลักษณะอาการที่ปรากฏ ที่ระยะ 15, 30, 45, 60 และ 90 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช และ 2) ความ สูง จำนวนใบ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของกกระจุก ที่ระยะ 60 และ 90 วัน หลังพ่นสารกำจัด วัชพืช (เก็บข้อมูลจำนวน 1 กระถาง/ครั้ง/ซ้ำ/กรรมวิธี/)

เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่างเดือน ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563 ณ ห้องปฏิบัติการและ เรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ดกกระจุก

จากการศึกษาผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ดกกระจุกตามกรรมวิธีที่กำหนด โดยคลุมด้วยพลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา ใบ-ต้นธูปฤๅษี และไม่ใช้วัสดุคลุมดิน (ชุดควบคุม) พบว่า การใช้ฟางข้าว แกลบดิบ พลาสติกคลุมแปลง ใบและต้นธูปฤๅษี สามารถควบคุม การงอกได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกกระจุกสามารถงอกได้เพียง 0.05 0.05 0.00 และ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การใช้แกลบเผา กกระจุกสามารถงอกได้ 0.94 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการไม่ใช้วัสดุคลุมดินที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 32.41 เปอร์เซ็นต์ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การใช้พลาสติกคลุมแปลง ใบและต้นธูปฤๅษีไม่พบการ งอกของเมล็ดกกระจุก ในขณะที่การใช้แกลบเผา กกระจุกสามารถงอกได้เล็กน้อย ทั้งนี้อาจ เนื่องมาจากกกระจุกไม่สามารถงอกและแทงทะลุผ่านพลาสติกคลุมแปลงขึ้นมาได้ เช่นเดียวกับที่ Stall (2009) รายงานว่า การใช้พลาสติกทาดำคลุมดินช่วยป้องกันวัชพืช ลดการใช้ปุ๋ย และเพิ่ม ผลผลิตของมะเขือเปราะที่ปลูกในรัฐฟลอริดาได้ และยังสอดคล้องกับที่ เพ็ญศรีและจรรย์ (2553) ได้ทำการศึกษาวัดคลุมดินที่มีผลต่อการควบคุมวัชพืชในกวาวเครือขาว ซึ่งพบว่าการคลุมแปลงด้วย พลาสติกสีดำเทา มีจำนวนวัชพืชที่พบน้อยที่สุดเพียง 14 ชนิด ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีที่ไม่มีการกำจัด วัชพืชที่พบวัชพืชถึง 30 ชนิด สำหรับการใช้ใบและต้นธูปฤๅษีที่ไม่พบการงอกนั้นอาจเป็นไปได้ว่า ในส่วนของใบและต้นธูปฤๅษีมีสารที่มีคุณสมบัติเป็นอัลลีโลเคมีคอล (allelochemicals) หรือสาร

อัลลีโลพาธิก (allelopathic substance) (Einhellig, 1987) ซึ่งสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของพืชได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ เกล่ายุคล (2547) ที่พบว่าสารสกัดจากธูปฤๅษีที่ความเข้มข้น 5000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของพืชได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ของพืชควบคุม โดยยับยั้งการเจริญของหงอนไก่ป่า ก้านจ้ำขาวดอกใหญ่ ถั่วผี ไมยราบเครือ และผักกาดขาวปลี ซึ่งสามารถยับยั้งการงอกของผักกาดขาวปลีได้อย่างสมบูรณ์ (Table 1 และ Figure 1)

ผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดกกระจุกในวัสดุปลูก

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดกกระจุกตามกรรมวิธีที่กำหนด โดยอบวัสดุปลูกและเมล็ดกกระจุก ที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 60 องศาเซลเซียส และไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดกกระจุก (ชุดควบคุม) พบว่ากรรมวิธีอบวัสดุปลูกและเมล็ดกกระจุกที่อุณหภูมิต่างๆ กกระจุกสามารถงอกได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดกกระจุก (ชุดควบคุม) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 3.70 3.95 5.00 6.95 6.42 และ 5.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความงอกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น แต่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์ความงอกกลับลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิช่วยกระตุ้นการงอกของเมล็ดกกระจุกได้ เช่นเดียวกับที่ Shilla *et al.* (2017) รายงานว่าการใช้อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดพืชได้หลายชนิด และยังสอดคล้องกับที่ กชกรและคณะ (2561) ได้ทำการศึกษาวิธีการกระตุ้นการงอกของเมล็ดวัชพืชบริเวณนาข้าว ซึ่งพบว่าการใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดหญ้าร้างนกกและกะเม็งได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 2 และ Figure 2)

ทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอกต่อการงอกของเมล็ดกกระจุก

จากการทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอก ได้แก่ acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil อัตรา 200, 312, 119, 315, 320, 96, 12.6, 320, 11.25, 20, 252, 84, 80, 35.25, 214.5, 153.6, 120 และ 10.5 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามลำดับ หลังโรยเมล็ด 1 วัน ขณะดินมีความชื้น เปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช พบว่า ที่ระยะ 15 วันหลังพ่นสาร จำนวนต้นของกกระจุกในทุกกรรมวิธีที่พ่นสารกำจัดวัชพืช มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนต้นน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ซึ่งกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช alachlor, bromacil, diclosulam, metribuzin, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil ไม่พบการงอกของเมล็ดกกระจุก แต่เมื่อเข้าสู่ระยะ 30 วันหลังพ่นสาร กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช isoxaflutole กลับมีจำนวนต้นเพิ่มขึ้นจนมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ในขณะที่กรรมวิธีอื่นๆ ยังคงมีจำนวนต้นน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่

พ่นสารกำจัดวัชพืช แสดงให้เห็นว่าสารกำจัดวัชพืช isoxaflutole มีประสิทธิภาพในการควบคุมการงอกของเมล็ดกกระจุกได้ไม่ถึงระยะ 30 วันหลังพ่นสาร เมื่อเทียบกับสารกำจัดวัชพืชชนิดอื่นๆ จากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะ 60 และ 90 วันหลังพ่นสาร กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืชทุกกรรมวิธี ยังคงมีจำนวนต้นน้อยกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ยกเว้นกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช diuron และ isoxaflutole ที่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช แสดงให้เห็นว่าสารกำจัดวัชพืช diuron มีประสิทธิภาพในการควบคุมการงอกของเมล็ดกกระจุกได้ไม่ถึงระยะ 60 วันหลังพ่นสาร สำหรับสารกำจัดวัชพืช isoxaflutole นั้น ประสิทธิภาพในการควบคุมลดลงตั้งแต่วะยะ 30 วันหลังพ่นสาร จึงส่งผลให้จำนวนต้นของกกระจุกที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากจำนวนต้นกกระจุกของทุกระยะ ชี้ให้เห็นว่า กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช diclosulam, sulfentrazone และ sulflufenacil มีจำนวนต้นน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ แต่ก็ยังคงมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช acetochlor, alachlor, amicarbazone, bromacil, metribuzin, oxyfluorfen, pendimethalin และ s-metolachlor (Table 3)

การสุ่มวัดการเจริญเติบโตของกกระจุก ที่ระยะ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช พบว่าจำนวนใบของกกระจุกในกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช bromacil, diclosulam และ sulflufenacil มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนใบน้อยกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, clomazone, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ในขณะที่ความสูง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของกกระจุกในทุกกรรมวิธีที่พ่นสารและกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 4 และ Figure 3) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากภาพรวมของการเจริญเติบโต ชี้ให้เห็นว่า กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช bromacil, diclosulam และ sulflufenacil มีการเจริญเติบโตน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่นๆ เนื่องมาจากการพ่นสารกำจัดวัชพืชดังกล่าวไม่พบจำนวนต้นของกกระจุกในระยะ 60 วันหลังพ่นสาร

สำหรับการสุ่มวัดการเจริญเติบโตของกกระจุก ที่ระยะ 90 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช พบว่าความสูงของกกระจุกในกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช diclosulam มีค่าน้อยที่สุด แตกต่างจากกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืชอื่นๆ และกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ในขณะที่จำนวนใบนั้น กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช diclosulam, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนใบน้อยกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, clomazone, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin และ กรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช สำหรับน้ำหนักสด พบว่า กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช acetochlor, alachlor, amicarbazone, bromacil, diclosulam, diuron, isoxaflutole,

imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักสดน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช atrazine, clomazone และ กรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช แต่เมื่อพิจารณาที่น้ำหนักแห้ง กลับพบว่ากรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืชทุกกรรมวิธีมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักแห้งน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ยกเว้นกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช clomazone ที่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช (Table 5 และ Figure 4) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากภาพรวมของจำนวนต้น และการเจริญเติบโต แสดงให้เห็นว่า สารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอกที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการงอกของเมล็ดกกระจุกได้ดี คือ acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, diclosulam, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil อัตรา 200, 312, 119, 315, 320, 12.6, 20, 252, 84, 35.25, 214.5, 153.6, 120 และ 10.5 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามลำดับ โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมได้ดี จนถึงระยะ 90 วันหลังพ่นสาร เช่นเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอกที่สามารถควบคุมวัชพืชประเภทกกในพืชปลูกชนิดต่างๆ ตัวอย่างเช่น การใช้สารกำจัดวัชพืช acetochlor อัตรา 240, 300, 360 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ sulfentrazone อัตรา 96 และ 134.4 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ และ imazapic อัตรา 18 และ 24 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ เพื่อควบคุมหญ้าในข้าวโพดหวาน (ธันส์สัมพันธ์และมณฑิตา, 2563) การใช้สารกำจัดวัชพืช diclosulam และ imazapic + imazethapyr อัตรา 6.3 และ 19.20 + 21.20 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ เพื่อควบคุมหญ้าในถั่วเขียว (ภัทร์พิชชาและคณะ, 2561) การใช้สารกำจัดวัชพืช oxyfluorfen และ pendimethalin อัตรา 80 และ 264-330 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ เพื่อควบคุมกกทราย และหนวดปลาตุกในนาหวานข้างแห้งและข้าวไร่ (กลุ่มวิจัยวัชพืช, 2554)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การจัดการกกระจุกสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีการหลักๆ คือ

- 1) การจัดการโดยไม่ใช้สารกำจัดวัชพืช โดยการคลุมดินด้วยวัสดุคลุมดิน ได้แก่ ฟางข้าว แกลบดิบ พลาสติกคลุมแปลง ใบและต้นธูปฤๅษี แต่สำหรับการอบวัสดุปลูกและเมล็ดกกระจุกที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 และ 60 องศาเซลเซียส นั้นไม่สามารถใช้ควบคุมการงอกของเมล็ดกกระจุกได้
- 2) การจัดการโดยใช้สารกำจัดวัชพืช โดยการพ่นคลุมดินด้วยสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอก ได้แก่ acetochlor, alachlor, amicarbazone, atrazine, bromacil, diclosulam, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil อัตรา 200, 312, 119, 315, 320, 12.6, 20, 252, 84, 35.25,

214.5, 153.6, 120 และ 10.5 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมกกระจุกได้ดี จนถึงระยะ 90 วันหลังพ่นสาร

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดกกระจุก ที่พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดลดลง ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปโดยการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นตั้งแต่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ขึ้นไป เพื่อให้ทราบแน่ชัดถึงอุณหภูมิที่มีผลต่อการยับยั้งการงอกของเมล็ดกกระจุก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมา ของกลุ่มวิจัยวัชพืช ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กชกร อรัญญากานนท์ ปราณี นางงาม และชนนิษฐ์ ชูพยัคฆ์. 2561. การพัฒนาวิธีการกระตุ้นการงอกของเมล็ดวัชพืชบริเวณนาข้าว. หน้า 137-145. ใน : รายงานการประชุมทางวิชาการระดับชาติ “นเรศวรวิจัย” ครั้งที่ 14. มหาวิทยาลัยนเรศวร 1 พฤศจิกายน 2561 ณ อาคารเอกาทศรถ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก.
- กลุ่มวิจัยวัชพืช. 2554. คำแนะนำการควบคุมวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 149 หน้า.
- เกล้ายุคล สุจิรา 2547. ผลของสารสกัดจากธูปฤๅษี (*Typha angustifolia* L.) ต่อการเจริญเติบโตของพืช และการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 104 หน้า.
- ธัชชัณห์ พูนไพบูลย์พิพัฒน์ และมณฑิตา วะชู. 2563. ประสิทธิภาพของสารกำจัดวัชพืชบางชนิดต่อการควบคุมเห็บหมุและความเป็นพิษต่อข้าวโพด. ว. เกษตรนเรศวร. 17(1): 48-57.
- เพ็ญศรี นันทสมสรายุ และจรัญ ดิษฐไชยวงศ์. 2553. ศึกษาวัสดุคลุมดินที่มีผลต่อการควบคุมวัชพืชในกวาวเครือขาว. หน้า 2,182-2,191. ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่มที่ 3. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- ภัทร์พิชชา รุจิระพงษ์ชัย คมสัน นครศรี อมฤต ศิริอุดม และจิราลักษณ์ ภูมิไธสง. 2561. การทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชเพื่อควบคุมเห็บหมุในถั่วเขียว. หน้า 1,046-1,059. ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2561 เล่มที่ 2. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- ศิริพร ชิงสนธิพร ธัญชนก จงรักไทย อ้นศยา สุริยะวงศ์ตระกูล และกาญจนา พฤษพันธ์. 2558. ศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการจำแนกเมล็ดวัชพืชสกุลกก (*Cyperus* L.). ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2557 เล่ม 4. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

- อันศยา พรหมมา ศิริพร ชิ่งสนธิพร ธีญชนก จงรักไทย เอกรัตน์ ธนุทอง และกาญจนา พฤษพันธ์. 2558. ชีววิทยาและการแพร่กระจายของกกกระจุก (*Cyperus entriarianus* Boeckl.). ใน : ผลงานวิจัยประจำปี 2561 เล่ม 1. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- Einhelling, F.A. 1987. Interactions among allelochemicals and other stress factors of the plant environment, pp. 343 - 357. In G.R. Waller, ed. *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. ACS Symp. Ser. 330, american chemical society., Washington, D.C.
- Gonzalez L. and J. DallaRosa. 2007. *Cyperus entriarianus* Boeckl. (Deep-rooted sedge). (Online). Available. http://www.texasinvasives.org/plant_database/.php?symbol=CYEN2. (February 16, 2021).
- Invasive Plant Atlas of the United State. 2014. *Deeprooted sedge: Cyperus entriarianus. Boeckl.* (Online). Available. <http://www.invasiveplantatlas.org/subject.html?sub=10954#maps>. (February 16, 2021).
- King J.R., W.C. Conway, D.J. Rosen and B.P. Oswald. 2012. Seed biomass production and germination reates of *Cyperus entriarianus*. *Journal of the Torrey Botanical Seociety* 139(1) : 76-85.
- Muenscher, W.C. 1980. *Weeds. 2nd edition*. Cornell University Press, Ithaca and London.
- Shilla, O., M.O. Abukutsa-Onyango, F.F. Dinssa and T. Winkelmann, 2017. Seed dormancy, viability and germination of *Cleome gynandra* (L.) Briq. *African Journal of Horticultural Science*. 10: 1-10.
- Stall, W.M. 2009. *Weed control in eggplant. EDIS*. University of Florida IFAS Extension.(Online). Available. <https://edis.ifas.ufl.edu/wg028> (February 16, 2021).

Table 1 Effect of mulching materials on seed germination in Deep-Rooted Sedge (*Cyperus entrerianus* Boeckl.)

Treatments	Seed germination (%) ^{1/}
Mulching Film	0.00 a
Straw	0.05 a
Rice Husk	0.05 a
Rice Husk Ash	0.94 b
Leave and Leaf sheath of Bulrush	0.00 a
Control	32.41 c
C.V. (%)	27.1

^{1/} Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 2 Effect of temperature on seed germination in Deep-Rooted Sedge (*Cyperus entrerianus* Boeckl.)

Treatments	Seed germination (%) ^{1/}
Baking media and seeds in temperature 40 °C	3.70 a
Baking media and seeds in temperature 45 °C	3.95 a
Baking media and seeds in temperature 50 °C	5.00 a
Baking media and seeds in temperature 55 °C	6.95 a
Baking media and seeds in temperature 60 °C	6.42 a
Control	5.78 a
C.V. (%)	37.5

^{1/} Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 3 Effect of pre-emergence herbicides on number of Deep-Rooted Sedge at 15, 30, 45, 60 and 90 days after application.

Treatment	Rate (g ai/rai)	number of Deep-Rooted Sedge (plant/pot) ^{1/}				
		15 DAA	30 DAA	45 DAA	60 DAA	90 DAA
1. acetochlor 50% W/V EC	200	0.7 a	1.0 ab	2.7 ab	2.3 a-d	7.6 a-f
2. alachlor 48% W/V EC	312	0.0 a	0.4 a	1.4 a	2.1 a-d	4.4 a-d
3. amicarbazone 70% WG	119	1.8 a	0.9 ab	3.1 ab	1.5 abc	5.6 a-e
5. atrazine 90% WG	315	2.4 a	2.5 ab	4.5 ab	4.5 bcd	10.9 c-f
5. bromacil 80% WP	320	0.0 a	0.3 a	0.4 a	0.0 a	3.6 a-d
6. clomazone 48% W/V EC	96	1.8 a	1.6 ab	3.2 ab	2.2 a-d	9.2 b-f
7. diclosulam 84% WG	12.6	0.0 a	0.1 a	0.4 a	0.0 a	0.0 a
8. diuron 80% WP	320	0.3 a	1.4 ab	4.9 ab	8.7 cde	29.5 fg
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	2.7 a	4.4 bc	7.9 b	10.2 de	25.9 efg
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	0.8 a	1.7 ab	3.2 ab	4.8 bcd	11.4 c-f
11. metolachlor 72% W/V EC	252	1.0 a	1.5 ab	4.0 ab	2.2 a-d	9.1 b-f
12. metribuzin 70% WP	84	0.0 a	0.1 a	0.9 a	1.0 ab	4.5 a-d
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	0.2 a	1.1 ab	2.2 ab	4.0 bcd	17.2 def
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	0.0 a	0.6 ab	1.3 a	1.4 abc	7.9 a-f
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	0.0 a	0.1 a	1.1 a	1.1 ab	5.3 a-d
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	0.0 a	0.1 a	1.2 a	1.3 abc	2.9 abc
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	0.0 a	0.1 a	0.8 a	0.3 ab	1.3 a
18 sulflufenacil 70% WG	10.5	0.0 a	0.2 a	0.2 a	0.0 a	1.6 ab
19. control	-	7.0 b	13.5 c	34.2 c	31.2 e	70.5 g
C.V. (%)		104.0	80.7	73.3	57.1	33.5

^{1/} Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 4 Effect of pre-emergence herbicides on growth of Deep-Rooted Sedge at 60 days after application.

Treatment	Rate (g ai/rai)	growth of Deep-Rooted Sedge at 60 days after application ^{1/}			
		height (cm)	leaves/pot (no)	fresh weight (g)	dry weight (g)
1. acetochlor 50% W/V EC	200	1.3 a	1.3 b	0.044 a	0.007 a
2. alachlor 48% W/V EC	312	1.1 a	0.7 b	0.006 a	0.001 a
3. amicarbazone 70% WG	119	8.4 a	5.3 b	3.093 a	0.415 a
4. atrazine 90% WG	315	5.7 a	13.5 b	0.302 a	0.034 a
5. bromacil 80% WP	320	0.0 a	0.0 a	0.000 a	0.000 a
6. clomazone 48% W/V EC	96	5.0 a	6.7 b	1.209 a	0.152 a
7. diclosulam 84% WG	12.6	0.0 a	0.0 a	0.000 a	0.000 a
8. diuron 80% WP	320	3.8 a	8.8 b	0.588 a	0.068 a
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	4.9 a	33.0 bc	1.019 a	0.122 a
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	3.6 a	7.5 b	0.415 a	0.048 a
11. metolachlor 72% W/V EC	252	5.2 a	5.3 b	0.690 a	0.077 a
12. metribuzin 70% WP	84	1.9 a	1.1 b	0.037 a	0.005 a
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	6.5 a	2.8 b	1.439 a	0.179 a
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	3.0 a	1.2 b	0.090 a	0.013 a
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	1.9 a	0.9 b	0.029 a	0.004 a
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	3.9 a	4.2 b	0.149 a	0.019 a
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	1.3 a	0.9 b	0.022 a	0.003 a
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	0.0 a	0.0 a	0.000 a	0.000 a
19. control	-	3.6 a	227.2 c	2.911 a	0.401 a
C.V. (%)		151.6	87.6	226.8	228.8

^{1/} Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 5 Effect of pre-emergence herbicides on growth of Deep-Rooted Sedge at 90 days after application.

Treatment	Rate (g ai/rai)	growth of Deep-Rooted Sedge at 90 days after application ^{1/}			
		height (cm)	leaves/pot (no)	fresh weight (g)	dry weight (g)
1. acetochlor 50% W/V EC	200	8.4 b	73.7 bcd	7.283 ab	1.080 a
2. alachlor 48% W/V EC	312	24.6 b	100.6 b-e	19.973 ab	3.173 a
3. amicarbazone 70% WG	119	8.4 b	85.9 b-e	17.537 ab	3.323 a
4. atrazine 90% WG	315	20.8 b	132.8 b-e	30.660 b	4.897 a
5. bromacil 80% WP	320	18.3 b	74.8 bcd	18.767 ab	3.300 a
6. clomazone 48% W/V EC	96	22.0 b	251.1 def	55.030 bc	11.770 b
7. diclosulam 84% WG	12.6	0.0 a	0.0 a	0.000 a	0.000 a
8. diuron 80% WP	320	12.4 b	276.0 def	19.467 ab	2.873 a
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	13.1 b	214.4 def	18.930 ab	2.970 a
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	14.1 b	145.7 cde	22.967 ab	3.113 a
11. metolachlor 72% W/V EC	252	19.3 b	168.1 cde	29.210 ab	5.493 a
12. metribuzin 70% WP	84	18.7 b	95.6 b-e	14.993 ab	2.427 a
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	21.3 b	201.6 def	22.053 ab	3.913 a
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	20.3 b	117.3 b-e	19.773 ab	3.237 a
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	14.3 b	81.9 b-e	8.343 ab	1.267 a
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	14.6 b	33.8 abc	6.417 ab	1.310 a
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	9.0 b	15.2 a	7.760 ab	1.187 a
18 sulflufenacil 70% WG	10.5	14.7 b	32.7 abc	8.483 ab	1.257 a
19. control	-	13.6 b	459.8 f	84.377 c	17.483 b
C.V. (%)		65.0	42.1	79.6	88.6

^{1/} Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.



Mulching Film



Straw



Rice Husk



Rice Husk Ash



Leave and Leaf sheath of Bulrush



Control

Figure 1 Effect of mulching materials on seed germination in Deep-Rooted Sedge (*Cyperus entrerianus* Boeckl.)



Temperature 40 °C



Temperature 45 °C



Temperature 50 °C



Temperature 55 °C



Temperature 60 °C



Control

Figure 2 Effect of temperature on seed germination in Deep-Rooted Sedge
(*Cyperus entrerianus* Boeckl.)



acetochlor 50% W/V EC



alachlor 48% W/V EC



amicarbazone 70% WG



atrazine 90% WG



bromacil 80% WP



clomazone 48% W/V EC



diclosulam 84% WG



diuron 80% WP

Figure 3 Effect of pre-emergence herbicides on seed germination and growth of Deep-Rooted Sedge at 60 days after application



isoxaflutole 75% WG



imazethapyr 5.3% W/V EC



metolachlor 72% W/V EC



metribuzin 70% WP



oxadiazon 25% W/V EC



oxyfluorfen 23.5% W/V EC



pendimethalin 33% W/V EC



s-metolachlor 96% EC

Figure 3 Effect of pre-emergence herbicides on seed germination and growth of Deep-Rooted Sedge at 60 days after application (continue)



sulfentrazone 48% W/V EC



sulflufenacil 70% WG



control

Figure 3 Effect of pre-emergence herbicides on seed germination and growth of Deep-Rooted Sedge at 60 days after application(continue)



acetochlor 50% W/V EC



alachlor 48% W/V EC



amicarbazone 70% WG



atrazine 90% WG



bromacil 80% WP



clomazone 48% W/V EC



diclosulam 84% WG



diuron 80% WP

Figure 4 Effect of pre-emergence herbicides on seed germination and growth of Deep-Rooted Sedge at 90 days after application



isoxaflutole 75% WG



imazethapyr 5.3% W/V EC



metolachlor 72% W/V EC



metribuzin 70% WP



oxadiazon 25% W/V EC



oxyfluorfen 23.5% W/V EC



pendimethalin 33% W/V EC



s-metolachlor 96% EC



sulfentrazone 48% W/V EC

Figure 4 Effect of pre-emergence herbicides on seed germination and growth of Deep-Rooted Sedge at 90 days after application (continue)



Figure 4 Effect of pre-emergence herbicides on seed germination and growth of Deep-Rooted Sedge at 90 days after application (continue)

ชีววิทยาและการจัดการมะเขือหนาม (*Solanum sisymbriifolium* Lam.)Biology and management of *Solanum sisymbriifolium* Lam.

อัญศยา พรพมา ธีญชนก จงรักไทย เอกรัตน์ ธนุทอง
 จริญญา ปิ่นสุภา ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย
 กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

 Abstract

Study Biology and management of *Solanum sisymbriifolium* was conducted during October 2018 – September 2020. Survey in agricultural areas and other ecosystem in 13 provinces found *S. sisymbriifolium* in Phetchaburi province. The result shown that *S. sisymbriifolium* was a perennial plant, the height, canopy, number of branches, number of inflorescences, number of fruits, number of seed, fresh and dry weight were not significant. It produces 13,558 – 45,459 seeds/pod, had the life cycle 104 days, propagated by stem cutting, and had seed germination on the soil surface, depth 5 and 10 cm, 65.4, 47.8 and 4.2%, respectively. The efficacy of 18 pre-emergence herbicides, bromacil was the best control for *S. sisymbriifolium*. At 60 days after application (DAA) had the number of plants survived 0.5 plant/plot, at 40 and 60 DAA had the dry weight 0.01 and 0.72 g/plot, respectively.

Keywords: Distribution, Biology and management, *Solanum sisymbriifolium*, Weed

 รหัสการทดลอง 03-27-60-01-00-08-62

บทคัดย่อ

การศึกษาชีววิทยาและการจัดการมะเขือหนาม ทำการทดลองระหว่าง ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 โดยสำรวจในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในพื้นที่ 13 จังหวัด พบมะเขือหนามแพร่กระจายในภาคกลางจังหวัดเดียว คือ จังหวัดเพชรบุรี การศึกษาการเจริญเติบโตมะเขือหนามเป็นพืชอายุหลายปี มีความสูง ขนาดทรงพุ่ม จำนวนแขนง จำนวนช่อดอก จำนวนผล จำนวนเมล็ด น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยสามารถผลิตเมล็ดได้อยู่ระหว่าง 13,558 - 45,459 เมล็ดต่อต้น และมีวงจรชีวิต 104 วัน สามารถขยายพันธุ์ด้วยการปักชำกิ่ง เมล็ดงอกได้บนผิวดิน และการวางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 และ 10 เซนติเมตร โดยมีความงอก 47.8, 65.4 และ 4.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอก 18 ชนิด กรรมวิธีพ่นสาร bromacil ควบคุมมะเขือหนามได้ดีที่สุด โดยที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร พบจำนวนต้นมะเขือหนามเพียง 0.5 ต้นต่อกระถาง และมีน้ำหนักแห้ง ที่ระยะ 40 และ 60 วันหลังพ่นสาร 0.01 และ 0.72 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ

คำหลัก : การแพร่กระจาย ชีววิทยาและการจัดการ มะเขือหนาม วัชพืช

คำนำ

จากการสำรวจในจังหวัดเพชรบุรีพบพืชในวงศ์มะเขือหนึ่งชนิดที่แพร่กระจายในพื้นที่ว่างเปล่าและข้างถนน พื้นที่ประมาณ 2 ไร่ และพบต้นขนาดเล็ก ซึ่งคาดว่างอกมาจากเมล็ด โดยพืชดังกล่าวเป็นไม้พุ่มมีเนื้อไม้ สูงประมาณ 0.5-1 เมตร ใบเป็นใบประกอบ กลีบดอกสีขาว-ม่วง กลีบเลี้ยงสีเขียวมีหนาม ผลถูกห่อหุ้มด้วยกลีบเลี้ยง โดยผลอ่อนสีเขียว ผลแก่สีส้ม-แดง ภายในผลมีเมล็ดเป็นจำนวนมาก ช่อผลคล้ายมะเขือเทศ ลักษณะพิเศษคือ ลำต้น และกลีบเลี้ยงมีหนามแหลม และจากการค้นคว้าเอกสารเบื้องต้น พบว่ามีลักษณะคล้ายกับ *Solanum sisymbriifolium* Lam. (USDA, 2015) ซึ่งพบแพร่กระจายในหลายพื้นที่ ได้แก่ เอเชีย แอฟริกา อเมริกาใต้ และยุโรป โดยในเอเชีย พบในประเทศจีน อินเดีย ญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน และ ตุรกี (CABI, 2015) และมีรายงานพบเป็นวัชพืชในแอฟริกาใต้ (Byrne *et al.*, 2002; King *et al.*, 2011) เนื่องจากพืชดังกล่าวมีลักษณะพิเศษคือ ลำต้น และกลีบเลี้ยงมีหนามแหลมดังนั้นเพื่อให้ง่ายต่อการจดจำจึงเรียกว่า “มะเขือหนาม” เพื่อให้สอดคล้องกับลักษณะของพืช

วัชพืชร้ายแรงหลายชนิดสามารถสร้างเมล็ดได้จำนวนมาก เมล็ดมีการพักตัวเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือมีอายุยาว นอกจากนี้หลายชนิดยังมีขนาดเล็ก ยากต่อการตรวจสอบ หรือมีขนาดใกล้เคียงกับเมล็ดพืชปลูก ทำให้แยกออกจากเมล็ดพันธุ์พืชปลูกได้ยาก (Muenscher, 1980) นอกจากนี้การแพร่กระจายของวัชพืชชนิดนี้ เมล็ดเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญแล้ว วัชพืชยังสามารถขยายพันธุ์จากส่วนอื่นๆ ได้ โดย พรชัย (2540) รายงานว่าในกรณีที่มีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือส่วนของลำต้น และใบถูกกำจัดออกไป ไม่สามารถผลิตเมล็ดได้ วัชพืชสามารถพัฒนาส่วนของลำต้นให้ขยายพันธุ์ต่อไปได้ เช่น ไทล (stolon และ runner) เหง้า (rhizome) หัว (tuber) และ Bulb

เนื่องจากมะเขือหนามสามารถสร้างเมล็ดได้เป็นจำนวนมาก รูปร่างและขนาดใกล้เคียงกับพืชวงศ์มะเขือ ดังนั้นโอกาสในการแพร่กระจายโดยเมล็ดจึงสูง นอกจากนี้จากการสังเกตเบื้องต้นพบว่ามะเขือหนามเป็นพืชอายุหลายปี ลำต้นมีเนื้อไม้ อาจจะขยายพันธุ์โดยลำต้นได้เช่นกัน ดังนั้นการศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของมะเขือหนาม รวมถึงวิธีการจัดการ จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสนับสนุนการแจ้งเตือนเกษตรกร และเป็นข้อมูลประกอบการวางแผนป้องกันและกำจัดที่เหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) กล้องถ่ายภาพแบบดิจิทัล
- 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 ฟินอล เมอคิวริกคลอไรด์ เอทิลแอลกอฮอล์
- 9) การบูร
- 10) เครื่องรับสัญญาณดาวเทียม เพื่อระบุพิกัด
- 11) อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถังพลาสติกขนาดต่างๆ กระถางพลาสติก กระบะปูน และป้ายแสดงกรรมวิธี
- 12) สารกำจัดวัชพืช
- 13) สมุดบันทึก

วิธีการ

ศึกษานิเวศวิทยา

1) สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดมะเขือหนาม โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลพบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สมุทรสงคราม สระบุรี สุพรรณบุรี ชลบุรี ระยอง ตราด กาญจนบุรี และราชบุรี บันทึก สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก ลักษณะพืชเป้าหมาย การถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ แมลง และศัตรูธรรมชาติ ที่พบในพื้นที่ที่สำรวจ

2) การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างมะเขือหนามมาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย

ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์กรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

3) เมล็ด นำเมล็ดที่เก็บได้ไปทำความสะอาด ผึ่งในที่ร่มให้แห้ง แบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ ส่วนที่ 2 เก็บใส่กล่องพลาสติก ปิดมิดปิดป้าย ระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

การเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วสุ่มเมล็ดมาใช้ในการทดลอง โดยวางแผนการทดลอง แบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำๆ ละ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ต้นมะเขือหนาม จำนวน 1 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 2 ต้นมะเขือหนาม จำนวน 3 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 3 ต้นมะเขือหนาม จำนวน 5 ต้นต่อกระบะ

กรรมวิธีที่ 4 ต้นมะเขือหนาม ทั้งหมดที่งอก

หว่านเมล็ดมะเขือหนาม จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร เมื่อเมล็ดมะเขือหนามงอก 1 สัปดาห์ ถอนให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง จำนวนต้นตามกรรมวิธีต่างๆ ที่กำหนด สังเกตการณ์เจริญเติบโต และบันทึกข้อมูลดังนี้

- 1) บันทึกวันที่งอก หลังจากหว่าน
- 2) วัดความสูง และขนาดทรงพุ่ม ทุกสัปดาห์
- 3) วันที่ออกดอก และวันที่ติดเมล็ด (นับจากวันที่ต้นมะเขือหนามงอก)
- 4) จำนวนเมล็ดต่อผล
- 5) จำนวนเมล็ดต่อต้น

6) เมื่อต้นมะเขือหนามมีใบยอดเหลือง (พืชเริ่มตาย) ถอน ล้างทำความสะอาด บันทึกน้ำหนักสด จำนวนช่อดอก จำนวนผลต่อช่อ จำนวนเมล็ดต่อผล และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้ง

นำข้อมูลที่ได้คำนวณหาค่าเฉลี่ยระยะเวลาการงอก การเจริญเติบโต การออกดอก การแก่ของเมล็ด เพื่อหาระยะเวลาที่พืชเริ่มงอกจนถึงสร้างเมล็ดแก่ ที่จะใช้ขยายพันธุ์ต่อไป (ครบวงจรชีวิต 1 รอบ) คำนวณความสามารถในการผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อต้น โดยทำการทดลองใน ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ความสามารถในการขยายพันธุ์ด้วยกิ่ง

หว่านเมล็ดมะเขือหนาม จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังมะเขือหนามงอก 1 สัปดาห์ ถอนออก ให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง เมื่อต้นมะเขือหนามเจริญเติบโตและมีอายุ 1.5 เดือน ถอนออกจากแปลง ทำการตัดแขนง

บริเวณโคนต้น ให้แต่ละกิ่งมีข้อจำนวน 5 ข้อ นำไปปักชำ (วางแนวนอน แล้วกลบด้วยดิน) ในกระบะปูน จำนวน 10 กระถางๆ ละ 10 แขนง และบันทึกข้อมูลจำนวนหน่อที่เกิดขึ้นต่อกิ่ง ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 30 วัน

การงอกของเมล็ดที่ความลึกของดินระดับต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 วางเมล็ดบนผิวดิน

กรรมวิธีที่ 2 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 3 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 4 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 5 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 20 เซนติเมตร

กรรมวิธีที่ 6 วางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 25 เซนติเมตร

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร สูง 30 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด หว่านให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงขอบบนของกระถาง รดน้ำเช้า และเย็น เพื่อให้มีความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน แต่ไม่เกิน 1 เดือน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก

การทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอก

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 3 กระถาง 19 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่)
1. acetochlor 50% W/V EC	200
2. alachlor 48% W/V EC	312
3. amicarbazone 70% WG	119
4. atrazine 90% WG	315
5. bromacil 80% WP	320
6. clomazone 48% W/V EC	96
7. diclosulam 84% WG	12.6
8. diuron 80% WP	320
9. isoxaflutole 75% WG	11.25
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20
11. metolachlor 72% W/V EC	252
12. metribuzin 70% WP	84
13. oxadiazon 25% W/V EC	80

14.	oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25
15.	pendimethalin 33% W/V EC	214.5
16.	s-metolachlor 96% EC	153.6
17.	sulfentrazone 48% W/V EC	120
18.	sulflufenacil 70% WG	10.5
19.	ไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช	-

เตรียมกระถางขนาด 12 นิ้ว ใส่ดินร่วนเป็นวัสดุปลูก จากนั้นหว่านเมล็ด 50 เมล็ดต่อกระถาง แล้วทำการพ่นสารกำจัดวัชพืชตามกรรมวิธีที่กำหนดหลังหว่านเมล็ด 1 วัน และบันทึกข้อมูลดังนี้

1) บันทึกจำนวนต้นที่มีชีวิตรอด (ต้นวัชพืชที่ยังมีสีเขียว) ที่ระยะ 15, 30, 45 และ 60 วันหลังพ่นสาร

2) บันทึกความสูง จำนวนใบ น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง (เก็บข้อมูลจำนวน 1 กระถาง/ครั้ง/กรรมวิธี/ซ้ำ) ที่ระยะ 40 และ 60 วันหลังพ่นสาร โดยดึงต้นออกจากกระถาง ล้างทำความสะอาดรากนำไปชั่งน้ำหนักสด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หรือจนกว่าต้นแห้ง และนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง

เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่าง ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 (ระยะเวลา 2 ปี) ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ และพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ศึกษานิเวศวิทยา

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดมะเขือหนาม โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ทั้งหมด 32 แหล่ง ในพื้นที่ 13 จังหวัด ได้แก่ ภาคเหนือ 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน ภาคกลาง 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดลพบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สมุทรสงคราม สระบุรี และสุพรรณบุรี ภาคตะวันออก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด และภาคตะวันตก 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี และราชบุรี พบมะเขือหนามแพร่กระจายในตำบลสามพระยา ตำบลไร่ใหม่พัฒนา ตำบลชะอำ ในอำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี โดยพบการแพร่กระจายเป็นระยะทางประมาณ 14 กิโลเมตร พื้นที่ประมาณ 65 ตารางกิโลเมตร (Table 1 และ Figure 1)

การเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเมล็ด

เนื่องจากการนำเมล็ดมะเขือหนามไปหว่านในแปลงทดลองมีจำนวนต้นที่ออกน้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการทดลอง จึงใช้วิธีเพาะในถาดเพาะเมล็ดแล้วย้ายปลูก (กรรมวิธีที่ 4 มีจำนวนต้น

มะเขือหนามเฉลี่ย 22 ต้น) หลังหยอดเมล็ด 8 วัน ถึงพบการงอกของมะเขือหนาม หลังงอก 27 วัน จึงย้ายปลูกลงแปลงทดลอง พบว่ามะเขือหนามเริ่มแตกแขนง ออกดอก ติดผล และผลแก่ (ผลเปลี่ยนเป็นสีแดง) ที่ระยะ 55, 62, 77 และ 104 วันหลังงอก (Figure 2) ส่วนการเจริญเติบโต พบว่า ถึงแม้จะเลือกต้นมะเขือหนามที่งอกวันเดียวกัน มีขนาดใกล้เคียงกันลงปลูกในแปลง แต่การเจริญเติบโตมีความแตกต่างกัน จึงพบว่าบางต้นออกดอกติดผลก่อน ในขณะที่บางต้นยังไม่ออกดอกติดผล จึงทำการบันทึกข้อมูลเป็นเวลา 5 เดือน จนกระทั่งทุกต้นออกผลเป็นสีแดงจึงทำการเก็บต้น พบว่ามะเขือหนามมีความสูง ขนาดทรงพุ่ม จำนวนแขนง จำนวนช่อดอก จำนวนผล จำนวนเมล็ด น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงอยู่ระหว่าง 95.1 – 116.8 เซนติเมตร มีขนาดทรงพุ่มอยู่ระหว่าง 73.9 – 99.0 เซนติเมตร มีจำนวนแขนงอยู่ระหว่าง 43.2 -98.7 แขนงต่อต้น มีจำนวนช่อดอกอยู่ระหว่าง 12.5 – 43.7 ช่อต่อต้น มีจำนวนผลอยู่ระหว่าง 6.6 – 9.0 ผลต่อช่อ มีจำนวนผลอยู่ระหว่าง 95.5 – 320.1 ผลต่อต้น มีจำนวนเมล็ดอยู่ระหว่าง 13,558 – 45,459 เมล็ดต่อต้น มีน้ำหนักสดอยู่ระหว่าง 300.0 – 773.3 กรัมต่อต้น และมีน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 74.8 – 208.0 กรัมต่อต้น (Table 2 และ Figure 3 - 5) จากการศึกษาการเจริญเติบโต พบว่ามะเขือหนามเป็นพืชอายุหลายปี ลำต้นมีเนื้อไม้ ลำต้นและกลีบเลี้ยงมีหนามแข็ง และเมื่อถึงระยะออกดอกแล้วจะมีการติดผลและเมล็ดตลอดการเจริญเติบโต

ความสามารถในการขยายพันธุ์ด้วยกิ่ง

เนื่องจากต้นมะเขือหนามอายุ 1 เดือนหลังงอก ต้นยังมีขนาดเล็กไม่สามารถนำมาปักชำได้ จึงใช้ต้นมะเขือหนามที่อายุ 1.5 เดือน นำไปปักชำโดยวางในแนวนอน บันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า มีหน่อเกิดใหม่ 0.5 หน่อต่อกิ่ง โดยสัปดาห์ที่ 1 และ 2 มีหน่อเกิดใหม่ 0.2 และ 0.3 หน่อต่อกิ่ง ตามลำดับ และสัปดาห์ที่ 3, 4 และ 5 ไม่พบหน่อเกิดใหม่ เมื่อปล่อยให้หน่อที่เกิดใหม่เจริญเติบโต พบว่า สามารถออกดอก ติดผล และสร้างเมล็ดได้เช่นเดียวกับต้นมะเขือหนามที่งอกจากเมล็ด Figure 6) ซึ่งจากการศึกษาการเจริญเติบโตและวงจรชีวิต พบว่า มะเขือหนามเป็นพืชอายุหลายปีหรือหลายฤดู สอดคล้องกับ ประวิตร (2556) รายงานว่าการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ได้แก่ ไหล (stolon หรือ runner) เหงา (rhizome) หัว (tuber) หัวกลีบ (bulb) ราก (root) ลำต้น (stem) หน่อ (sucker) และใบ (leaf) เป็นวิธีการขยายพันธุ์ที่สำคัญของวัชพืชประเภทค้ำปีหรือหลายฤดู

การงอกของเมล็ดที่ความลึกของดินระดับต่างๆ

หลังหว่านเมล็ดมะเขือหนาม พบการงอกเพียง 3 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีวางเมล็ดบนผิวดินและกรรมวิธีวางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 และ 10 เซนติเมตร โดยพบการงอกที่ระยะ 5, 5 และ 12 วันหลังหว่าน ตามลำดับ เมื่อครบ 1 เดือน พบว่า กรรมวิธีวางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร มีความงอกมากที่สุด คือ 65.4 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกับกรรมวิธีอื่นๆ รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีวางเมล็ดบนผิวดิน โดยมีความงอก 47.8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรรมวิธีวางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10, 15, 20 และ 25 เซนติเมตร มีความงอกไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง

0.0 – 4.2 เปอร์เซ็นต์ (Table 3 และ Figure 7 และ 8) เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำกระถางที่ไม่พบการงอกเห็ดดินออก และแผ่นดินในกระถางให้มีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตร พบว่ามีต้นมะเขือหนามงอกขึ้นมาใหม่ ซึ่งระดับความลึกที่เมล็ดถูกฝังในดินอาจมีผลต่อการงอกของเมล็ดเช่นเดียวกับวัชพืชชนิดอื่น เช่น Vanijajiva (2014) รายงานว่าเมล็ดตีนตุ๊กแก (*Tridax procumbens*) งอกได้ดีที่สุดที่ระดับผิวดินหรือที่ความลึก 2 เซนติเมตร และไม่พบเมล็ดงอกเมื่อฝังเมล็ดไว้ลึก 3 เซนติเมตร โองการ (2556) พบว่าที่ระดับผิวดินเมล็ดผักเผ็ดแม้วดอกแดง ดอกฟ้า และดอกม่วง งอกได้ 63, 60 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไม่พบการงอกเมื่อฝังเมล็ดไว้ลึกตั้งแต่ 8 เซนติเมตร Fang *et al.* (2012) รายงานว่า เมล็ด Goatgrass (*Aegilops tauschii*) งอกได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฝังเมล็ดไว้ลึก 1 - 3 เซนติเมตร และไม่พบเมล็ดที่งอก เมื่อฝังเมล็ดไว้ลึกตั้งแต่ 8 เซนติเมตร และ Javid and Tanveer (2014) รายงานว่า เมื่อเพิ่มความลึกในการฝังเมล็ด *Emex spinosa* และ *E. australis* เปอร์เซ็นต์การงอกจะยิ่งลดลง อย่างไรก็ตามปัจจัยที่ทำให้เมล็ดมะเขือหนามที่ฝังในดินที่ลึกลงไปแล้วไม่งอกอาจมีสาเหตุจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิในดิน น้ำในดิน การสัมผัสกับแสง ความเข้มข้นของไนเตรต ค่า pH ของน้ำ และแก๊ซในดิน (Travlos *et al.*, 2020) ซึ่งต้องมีการศึกษาปัจจัยเหล่านี้เพิ่มเติม เพื่อใช้ประกอบการวางแผนจัดการมะเขือหนามต่อไปในอนาคต

การทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอก

วางแผนการทดลองแบบ RCB 3 ซ้ำ มี 19 กรรมวิธี ทำการพ่นสารกำจัดวัชพืชหลังหว่านเมล็ด 1 วัน พบว่า ที่ระยะ 7 วันหลังพ่นสาร มะเขือหนามกำลังเริ่มงอก จึงยังไม่นับจำนวนต้นที่มีชีวิตรอด และที่ระยะ 15 วันหลังพ่นสาร พบการงอกของมะเขือหนามทุกกรรมวิธี โดยพบว่า กรรมวิธีพ่นสาร amicarbazon มีจำนวนต้นที่รอดชีวิตน้อยสุด คือ 4.7 ต้นต่อกระถาง ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor,alachlor, atrazine, bromacil, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone, sulflufenacil และกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ที่มีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 5.4 – 25.4 ต้นต่อกระถาง ที่ระยะ 30 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีจำนวนต้นที่รอดชีวิตน้อยสุด คือ 0.6 ต้นต่อกระถาง ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีพ่นสารalachlor, amicarbazon, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone, sulflufenacil และกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ที่มีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 0.9 – 21.8 ต้นต่อกระถาง ที่ระยะ 45 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีจำนวนต้นที่รอดชีวิตน้อยสุด คือ 0.7 ต้นต่อกระถาง ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีพ่นสาร amicarbazon, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone, sulflufenacil และกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ที่มีจำนวนต้นอยู่ระหว่าง 3.0 – 22.3 ต้นต่อกระถาง และที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีจำนวนต้นที่รอดชีวิตน้อยสุด คือ 0.5 ต้นต่อกระถาง ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีพ่นสารalachlor, amicarbazon, atrazine, diclosulam, diuron,

isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone, sulflufenacil และกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืช ที่มีจำนวนตันอยู่ระหว่าง 2.0 – 22.7 ตันต่อกระถาง (Table 4 และ Figure 9 และ 10)

ทำการวัดความสูง นับจำนวนใบ ชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของมะเขือหนาม ที่ระยะ 40 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีความสูงน้อยสุด คือ 0.0 เซนติเมตร ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีพ่นสาร amicarbazon, diclosulam, diuron, imazethapyr, metolachlor, metribuzin และ oxyfluorfen ที่มีความสูงอยู่ระหว่าง 1.3 – 4.7 เซนติเมตร จำนวนใบ พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีจำนวนใบน้อยสุด คือ 0.0 ใบต่อต้น ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีพ่นสาร amicarbazon และ diuron ที่มีจำนวนใบอยู่ระหว่าง 2.2 – 3.1 ใบต่อต้น น้ำหนักสด พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีน้ำหนักสดน้อยสุด คือ 0.02 กรัมต่อกระถาง ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor, amicarbazon, atrazine, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxadiazon, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil ที่มีน้ำหนักสดอยู่ระหว่าง 0.13 - 14.45 กรัมต่อกระถาง และน้ำหนักแห้ง พบว่ากรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีน้ำหนักแห้งน้อยสุด คือ 0.01 กรัมต่อกระถาง ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีพ่นสาร acetochlor, amicarbazon, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor, sulfentrazone และ sulflufenacil ที่มีน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 0.09 – 2.53 กรัมต่อกระถาง (Table 5) และที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีความสูงและจำนวนใบน้อยสุด คือ 1.1 เซนติเมตร และ 2.3 ใบต่อต้น ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีพ่นสาร amicarbazon ที่มีความสูง 3.4 เซนติเมตร และ 5.4 ใบต่อต้น และพบว่า กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งน้อยสุด คือ 4.72 และ 0.72 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีพ่นสาร amicarbazon, diclosulam, diuron, isoxaflutole, imazethapyr, metolachlor, metribuzin, oxyfluorfen, pendimethalin, s-metolachlor และ sulflufenacil ที่มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 10.01 - 28.53 และ 1.52 – 5.28 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ (Table 6) เนื่องจากที่ระยะ 40 วันหลังพ่นสาร กรรมวิธีพ่นสาร bromacil มะเขือหนามมีการงอก แต่มีขนาดเล็กมาก ส่วนใหญ่ยังไม่มีใบจริง ดังนั้นข้อมูลความสูงและจำนวนใบต่อต้นมีค่าน้อยมาย เมื่อใช้ทศนิยม 1 ตำแหน่ง จึงทำให้ค่าที่ได้เป็นศูนย์ ในขณะที่น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเป็นการรวมจำนวนต้นทั้งหมดที่งอกต่อกระถาง และใช้ทศนิยม 2 ตำแหน่ง จึงมีค่าตัวเลขปรากฏให้เห็น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ทั้งหมด 32 แหล่ง ในพื้นที่ 13 จังหวัด ครอบคลุมพื้นที่ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก และภาคตะวันออก พบมะเขือหนามแพร่กระจายในภาคกลางเพียงจังหวัดเดียวคือ จังหวัดเพชรบุรี โดยพบการแพร่กระจายเป็นระยะทางประมาณ

14 กิโลเมตร พื้นที่ประมาณ 65 ตารางกิโลเมตร การศึกษาการเจริญเติบโต มะเขือหนามมีความสูง ขนาดทรงพุ่ม จำนวนแขนง จำนวนช่อดอก จำนวนผล จำนวนเมล็ด น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความสูงและขนาดทรงพุ่มอยู่ระหว่าง 95.1 – 116.8 และ 73.9 – 99.0 เซนติเมตร มีจำนวนแขนงอยู่ระหว่าง 43.2 -98.7 แขนงต่อต้น มีจำนวนช่อดอกอยู่ระหว่าง 12.5 – 43.7 ช่อต่อต้น มีจำนวนผลอยู่ระหว่าง 6.6 – 9.0 ผลต่อช่อ และ 95.5 – 320.1 ผลต่อต้น มีจำนวนเมล็ดอยู่ระหว่าง 13,558 – 45,459 เมล็ดต่อต้น มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งอยู่ระหว่าง 300.0 – 773.3 และ 74.8 – 208.0 กรัมต่อต้น และมีวงจรชีวิต 104 วัน การปักชำกิ่งเป็นเวลา 5 สัปดาห์ มีหน่อเกิดใหม่ 0.5 หน่อต่อกิ่ง โดยสัปดาห์ที่ 1 และ 2 มีหน่อเกิดใหม่ 0.2 และ 0.3 หน่อต่อกิ่ง ตามลำดับ และสัปดาห์ที่ 3, 4 และ 5 ไม่พบหน่อเกิดใหม่ กรรมวิธีวางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร มีความงอกมากที่สุด คือ 65.4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีวางเมล็ดบนผิวดิน และกรรมวิธีวางเมล็ดที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร โดยมีความงอก 47.8 และ 4.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอก 18 ชนิด กรรมวิธีพ่นสาร bromacil ควบคุมมะเขือหนามได้ดีที่สุด โดยที่ระยะ 60 วันหลังพ่นสาร พบจำนวนต้นมะเขือหนามเพียง 0.5 ต้นต่อกระถาง และมีน้ำหนักแห้ง ที่ระยะ 40 และ 60 วันหลังพ่นสาร 0.01 และ 0.72 กรัมต่อกระถาง ตามลำดับ

จากกราฟการเจริญเติบโตต้นมะเขือหนามยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้อีกแสดงให้เห็นว่าเป็นพืชอายุหลายปี ซึ่งจะสามารถผลิตเมล็ดได้เป็นจำนวนมาก หากต้นมะเขือหนามมีขนาดใหญ่และอายุมากขึ้นจะยากต่อการกำจัดเนื่องจากลำต้นมีเนื้อไม้ ลำต้นและกลีบเลี้ยงมีหนามแข็ง ดังนั้นพื้นที่ที่พบมะเขือหนามควรรีบกำจัดออก ทั้งนี้อาจจะใช้สารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอก ร่วมกับวิธีเขตกรรม เช่น การพลิกหน้าดินขึ้นมา เพื่อให้เมล็ดที่อยู่ลึกลงไปขึ้นมาอยู่บนผิวดินเพื่อกำจัดได้ง่ายขึ้น และช่วยลดปริมาณเมล็ดสะสมในดิน อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอกควรคำนึงถึงประสิทธิภาพและความเป็นพิษต่อพืชปลูก นอกจากนี้อาจจะมีการใช้สารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นหลังวัชพืชงอกร่วมด้วย เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดมะเขือหนาม ซึ่งต้องมีการศึกษาชนิดสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นหลังวัชพืชงอกที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ พนักงานและจ้างเหมา ของกลุ่มวิจัยวัชพืช ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ประวิตร โสภโณดร. 2556. *วัชพืชและการจัดการ (Weeds and weed control)*. (ระบบออนไลน์).

แหล่งข้อมูล: <http://natres.psu.ac.th/Department/PlantScience/weed/> (3 ธันวาคม 2563).

พรชัย เหลืองอากาศพงศ์. 2540. *วัชพืชศาสตร์*. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์รั้วเขียว. 585 หน้า.

- โองการ วณิชาชีวะ. 2556. เปรียบเทียบปัจจัยที่มีต่อการงอกของเมล็ดวัชพืชต่างถิ่นสกุลผักแผ้วใน ประเทศไทย. *วารสารแก่นเกษตร*. 41(3): 317-326.
- Byrne M.J., S. Currin and M.P. Hill. 2002. The influence of climate on the establishment and success of the biocontrol agent *Gratiana spadicea*, released on *Solanum sisymbriifolium* in South Africa. *Biological Control*. 24(2) : 128–134.
- CABI. 2015. *Invasive Species Compendium. Datasheets > Solanum sisymbriifolium*. (Online). Available. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/11724> (22 June 2015).
- Fang, F., C. Zhang, S. Wei, H. Huang and W. Liu. 2012. Factors Affecting Tausch's Goatgrass (*Aegilops tauschii* Coss.) Seed Germination and Seedling Emergence. *Journal of Agricultural Science*. Vol. 4, No. 1: 114-121.
- Javaid, M. M. and A Tanveer. 2014. Germination ecology of *Emex spinosa* and *Emex australis*, invasive weeds of winter crops. *Weed Research*. 54 issue-6: 65–575.
- King A.M., R. Brudvig and M.J. Byrne. 2011. Biological Control of Dense-Thorned Bitter Apple, *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Solanaceae), in South Africa. *African Entomology*. 19(SP) : 427-433.
- Muenschler, W. C. 1980. Weeds. 2nd edition. *Cornell University Press, Ithaca and London*.
- USDA. 2015. *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Online). Available. <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=SOSI>. (22 June 2015).
- Travlos, I., I. Gazoulis, P. Kanatas, A. Tsekoura, S. Zannopoulos and P. Papastyliaou. 2020. Key Factors Affecting Weed Seeds' Germination, Weed Emergence, and Their Possible Role for the Efficacy of False Seedbed Technique as Weed Management Practice. *Frontiers in Agronomy*. Volume 2: 1-9.
- Vanijajiva, O. 2014. Effect of Ecological Factors on Seed Germination of Alien Weed *Tridax procumbens* (Asteraceae). *Journal of Agriculture and Ecology Research International*. 1(1): 30-39.

Table 1 Survey locations.

Region	Sub-district	District	Province	Habitat	Latitude-N	Longitude-E
Northern	Hang Dong	Hot	Chiang Mai	roadside	18.213855	98.584218
	-	Fang	Chiang Mai	non-crop	19.908995	99.03836
	Ban Luang	Chom Thong	Chiang Mai	cabbage	18.541592	98.558003
	Pa Phai	Li	Lamphun	chilli	17.887803	98.9294631
Central	Hua Lam	Tha Luang	Lop Buri	Eggplant	15.0023233	101.3229169
	*Sam Phraya	Cha-Am	Phetchaburi	pineapple	12.65596	99.893946
	*Sam Phraya	Cha-Am	Phetchaburi	non-crop	12.656259	99.894353
	*Sam Phraya	Cha-Am	Phetchaburi	non-crop	12.65607	99.86785
	*Rai Mai Phatthana	Cha-Am	Phetchaburi	non-crop	12.634915	99.45582
	*Rai Mai Phatthana	Cha-Am	Phetchaburi	roadside	12.645362	99.865604
	*Cha-Am	Cha-Am	Phetchaburi	non-crop	12.667673	99.92852
	*Cha-Am	Cha-Am	Phetchaburi	roadside	12.650918	99.947134
	*Cha-Am	Cha-Am	Phetchaburi	roadside	12.686313	99.947464
	*Sam Phraya	Cha-Am	Phetchaburi	roadside	12.725955	99.924834
	Khao Krapuk	Tha Yang	Phetchaburi	pineapple	12.712543	99.73883
	Thap Tai	Hua Hin	Prachuap Khiri Khan	pineapple	12.524493	99.832647
	Ao Noi	Mueang	Prachuap Khiri Khan	pineapple	11.918289	99.798445
	Saeng Arun	Thap Sakae	Prachuap Khiri Khan	coconut	11.55279	99.632758
	Tha Kha	Amphawa	Samut Songkhram	coconut	13.473204	99.982696
	Than Kasem	Phraputthabath	Saraburi	roadside	14.750901	100.834435
	Ban Krang	Si Prachan	Suphan Buri	Eggplant	14.6223248	100.1413297
Nong Phak Nak	Sam Chuk	Suphan Buri	Eggplant	14.7345317	100.0664588	
Eastern	Khao Kaew	Tha Mai	Chanthaburi	pineapple	12.839515	101.951148
	Pong	Bang Lamung	Chonburi	roadside	12.8731499	101.0638406
	Wang Wa	Klaeng	Rayong	pineapple	12.7815069	101.6155107
	Huai Thab Mon	Khao Chamao	Rayong	pineapple	12.964563	101.68803
	Chum Saeng	Wang Chan	Rayong	pineapple	12.954443	101.543103
	Saen Tung	Khao Saming	Trat	pineapple	12.4272858	102.3771021
	Paneet	Khao Saming	Trat	pineapple	12.4840504	102.3516131
Western	Sai Yok	Sai Yok	Kanchanaburi	Jackfruit	14.4865217	98.8461641
	Nong Rong	Phanom Thuan	Kanchanaburi	Eggplant	14.184443	99.644033
	Samo Phlue	Ban Lat	Ratchaburi	roadside	13.0581923	99.9350202

*Locations found *S. sisymbriifolium*.

Table 2 Height, canopy, branch, inflorescence, fruit, seed, fresh and dry weight of *S. sisymbriifolium*.

Treatments	Height (cm)	Canopy (cm)	branch/ plant	Inflorescence/ plant	Fruit/ bouquet	Fruit/ plant	Seed/ plant	Fresh weight/ Plant (g)	Dry weight/ Plant (g)
1 plant/plot	116.8 ^{ns}	91.2 ^{ns}	56.0 ^{ns}	21.2 ^{ns}	9.0 ^{ns}	201.0 ^{ns}	28,542.0 ^{ns}	668.0 ^{ns}	166.0 ^{ns}
3 plants/plot	115.2	99.0	98.7	43.7	7.8	320.1	45,459.0	773.3	208.0
5 plants/plot	95.9	83.4	68.5	25.4	6.6	183.3	26,023.0	478.8	124.8
Control	95.1	73.9	43.2	12.5	7.2	95.5	13,558.0	300.0	74.8
C.V. (%)	20.32	29.87	60.22	97.67	17.42	89.15	89.15	55.32	60.89

^{ns}Average are not significantly different at 5% level by ANOVA.

Table 3 Effect of depth on seed germination of *S. sisymbriifolium*.

Treatments	Seed germination (%)
Surface	47.8 b ^{1/}
Depth 5 cm	65.4 a
Depth 10 cm	4.2 c
Depth 15 cm	0.0 c
Depth 20 cm	0.0 c
Depth 25 cm	0.0 c
C.V. (%)	24.79

^{1/}Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by HSD.

Table 4 Effect of pre-emergence herbicides for number of plants survived of *S. sisymbriifolium*.

Treatments	Rate (g ai/rai)	Number of plants survived (plants/plot)			
		15 DAA*	30 DAA	45 DAA	60 DAA
1. acetochlor 50% W/V EC	200	19.3 ab ^{1/}	26.6 d	30.6 e	25.5 bc
2. alachlor 48% W/V EC	312	22.3 ab	21.8 a-d	23.6 b-e	20.2 abc
3. amicarbazone 70% WG	119	4.7 a	1.3 a	3.0 ab	3.5 ab
4. atrazine 90% WG	315	25.4 ab	24.8 cd	25.2 cde	22.7 abc
5. bromacil 80% WP	320	6.8 a	0.6 a	0.7 a	0.5 a
6. clomazone 48% W/V EC	96	30.9 b	27.8 d	28.4 de	28.7 c
7. diclosulam 84% WG	12.6	18.1 ab	17.7 a-d	18.9 a-e	17.5 abc
8. diuron 80% WP	320	8.9 ab	0.9 a	3.2 ab	2.0 a
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	12.9 ab	4.4 a-d	5.0 abc	3.3 ab
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	14.2 ab	13.0 a-d	14.9 a-e	13.0 abc
11. metolachlor 72% W/V EC	252	19.2 ab	19.6 a-d	22.3 a-e	16.8 abc
12. metribuzin 70% WP	84	11.7 ab	3.2 ab	7.3 a-d	7.2 abc
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	25.0 ab	24.5 bcd	27.4 de	29.5 c
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	10.5 ab	7.2 a-d	10.0 a-e	7.7 abc
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	11.7 ab	12.7 a-d	12.7 a-e	9.5 abc
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	14.2 ab	15.9 a-d	16.4 a-e	11.5 abc
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	10.3 ab	15.9 a-d	17.1 a-e	16.2 abc
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	5.4 a	7.2 a-d	7.6 a-d	8.3 abc
19. control	-	15.5 ab	17.2 a-d	19.6 a-e	12.2 abc
C.V. (%)		47.54	50.24	45.94	56.06

^{1/}Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by HSD.

*DAA = Days after application.

Table 5 Effect of pre-emergence herbicides for height, number of leaves, fresh and dry weight of *S. sisymbriifolium* at 40 days after application.

Treatments	Rate (g ai/rai)	40 DAA*			
		Height (cm)	Number of leaves/plant	Fresh weight/plot (g)	Dry weight/plot (g)
1. acetochlor 50% W/V EC	200	5.4 b-e ^{1/}	6.3 de	12.32 abc	2.53 a-e
2. alachlor 48% W/V EC	312	7.3 de	7.2 de	16.37 bc	3.35 de
3. amicarbazone 70% WG	119	1.3 ab	2.2 ab	0.13 a	0.20 abc
4. atrazine 90% WG	315	6.2 b-e	6.9 de	14.45 abc	2.75 b-e
5. bromacil 80% WP	320	0.0 a	0.0 a	0.02 a	0.01 a
6. clomazone 48% W/V EC	96	7.0 cde	6.7 de	18.66 c	3.33 de
7. diclosulam 84% WG	12.6	2.2 abc	4.1 bcd	2.08 ab	0.52 abc
8. diuron 80% WP	320	1.3 ab	3.1 abc	0.57 a	0.09 ab
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	5.9 b-e	5.2 b-e	8.37 abc	1.60 a-e
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	4.7 a-e	5.5 cde	7.91 abc	1.52 a-e
11. metolachlor 72% W/V EC	252	4.6 a-e	5.9 cde	10.05 abc	2.34 a-e
12. metribuzin 70% WP	84	2.6 a-d	4.0 bcd	1.85 ab	0.32 abc
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	6.6 cde	7.1 de	14.32 abc	2.80 cde
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	3.1 a-d	6.1 cde	3.63 abc	0.82 a-d
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	6.4 cde	7.2 de	9.48 abc	1.74 a-e
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	5.7 b-e	6.7 de	12.15 abc	2.23 a-e
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	6.7 cde	6.6 de	11.71 abc	1.52 a-e
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	8.0 e	7.6 e	10.03 abc	1.84 a-e
19. control	-	6.9 cde	6.8 de	18.32 c	3.94 e
C.V. (%)		32.77	18.83	54.03	49.79

^{1/}Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by HSD.

*DAA = Days after application.

Table 6 Effect of pre-emergence herbicides for height, number of leaves, fresh and dry weight of *S. sisymbriifolium* at 60 days after application.

Treatments	Rate (g ai/rai)	60 DAA*			
		Height (cm)	Number of leaves/plant	Fresh weight/plot (g)	Dry weight/plot (g)
1. acetochlor 50% W/V EC	200	7.3 bc ^{1/}	8.6 bcd	35.91 bc	6.22 b-f
2. alachlor 48% W/V EC	312	9.5 cde	9.6 cd	46.27 c	8.30 f
3. amicarbazone 70% WG	119	3.4 ab	5.4 ab	10.01 ab	1.52 ab
4. atrazine 90% WG	315	9.1 b-e	9.2 cd	35.20 bc	6.40 c-f
5. bromacil 80% WP	320	1.1 a	2.3 a	4.72 a	0.72 a
6. clomazone 48% W/V EC	96	9.7 cde	9.2 cd	43.76 c	7.92 ef
7. diclosulam 84% WG	12.6	9.4 cde	10.1 cd	21.76 abc	3.86 a-f
8. diuron 80% WP	320	7.0 bc	8.4 bc	13.29 ab	2.38 a-d
9. isoxaflutole 75% WG	11.25	14.7 e	11.8 d	18.94 abc	3.62 a-f
10. imazethapyr 5.3% W/V EC	20	10.4 cde	11.4 cd	22.10 abc	3.96 a-f
11. metolachlor 72% W/V EC	252	9.9 cde	10.0 cd	23.64 abc	3.79 a-f
12. metribuzin 70% WP	84	12.6 cde	11.8 d	12.06 ab	2.03 abc
13. oxadiazon 25% W/V EC	80	8.4 bcd	9.2 cd	32.86 bc	5.86 b-f
14. oxyfluorfen 23.5% W/V EC	35.25	11.7 cde	10.3 cd	18.56 abc	3.39 a-e
15. pendimethalin 33% W/V EC	214.5	10.6 cde	9.8 cd	25.03 abc	4.69 a-f
16. s-metolachlor 96% EC	153.6	7.0 bc	8.1 bc	22.54 abc	4.25 a-f
17. sulfentrazone 48% W/V EC	120	13.4 de	11.8 d	36.76 bc	7.22 def
18. sulflufenacil 70% WG	10.5	9.2 cde	10.0 cd	28.53 abc	5.28 a-f
19. control	-	11.8 cde	10.6 cd	34.38 bc	6.57 c-f
C.V. (%)		20.10	11.75	35.24	34.03

^{1/}Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by HSD.

*DAA = Days after application.

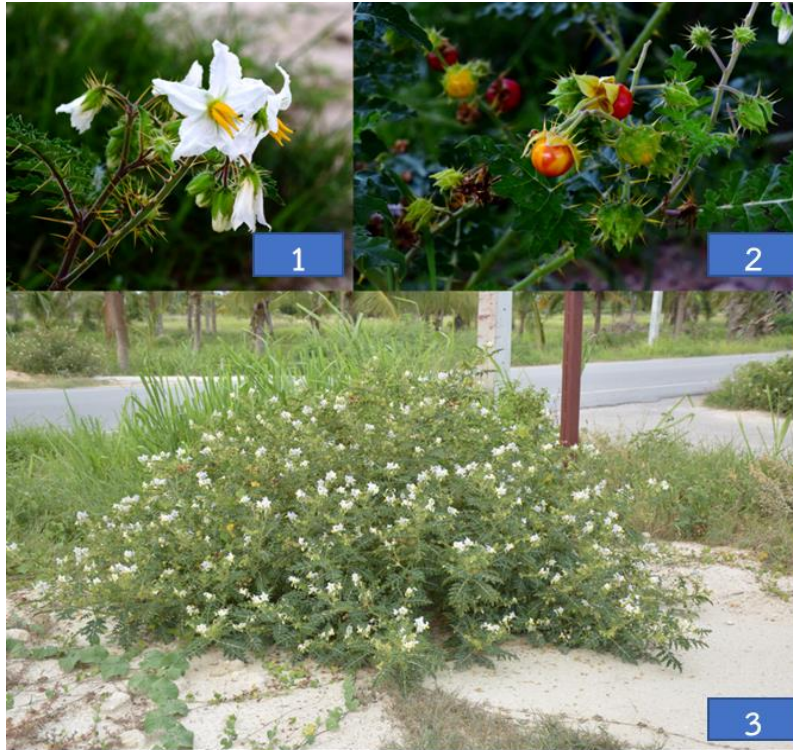


Figure 1 Habitat of *S. sisymbriifolium*; 1) flower 2) fruit and 3) the *S. sisymbriifolium* tree.



Figure 2 Life cycle of *S. sisymbriifolium*.



Figure 3 *S. sisymbriifolium* on the experimental plots.

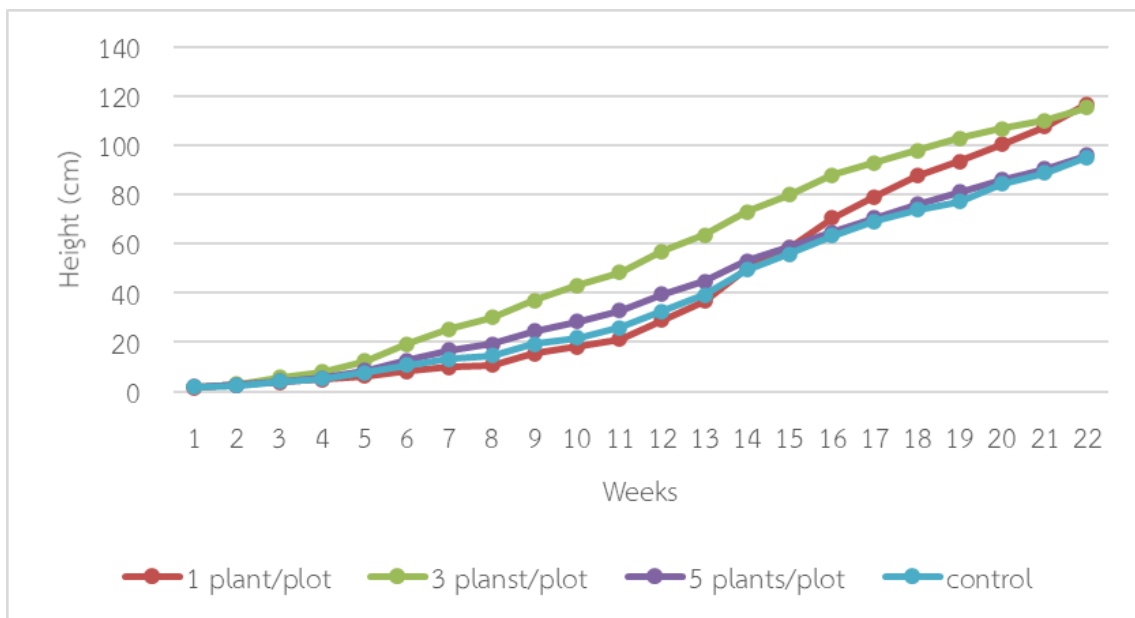


Figure 4 Height of *S. sisymbriifolium*.

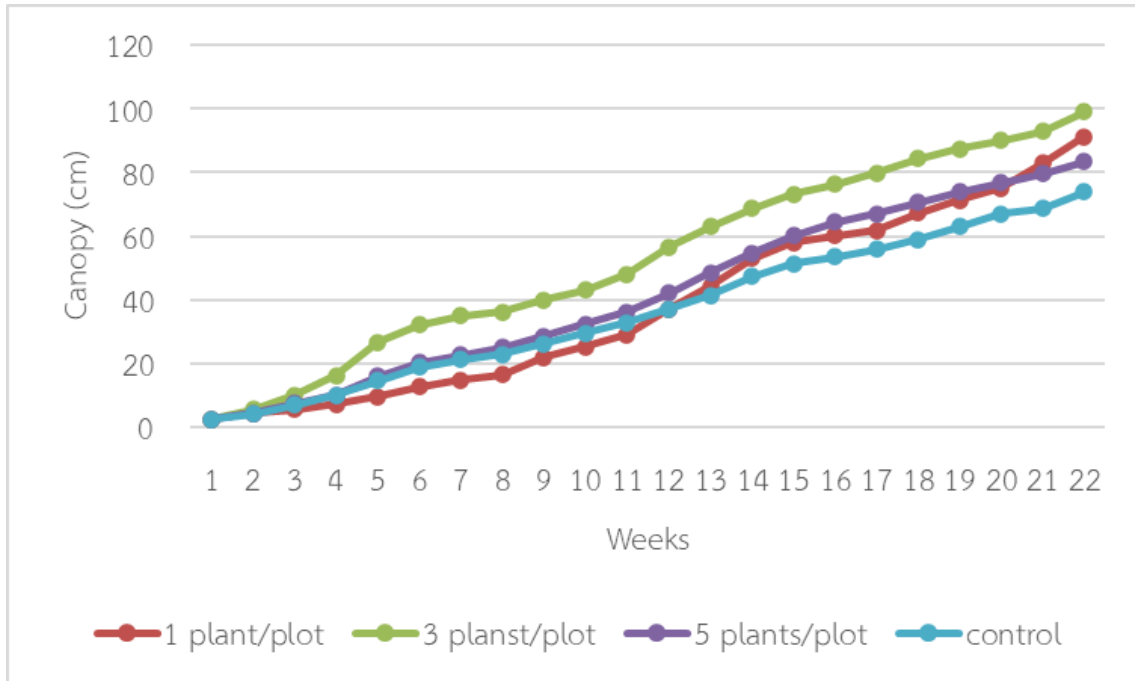


Figure 5 Canopy of *S. sisymbriifolium*.



Figure 6 Growth of *S. sisymbriifolium* from stem cutting.

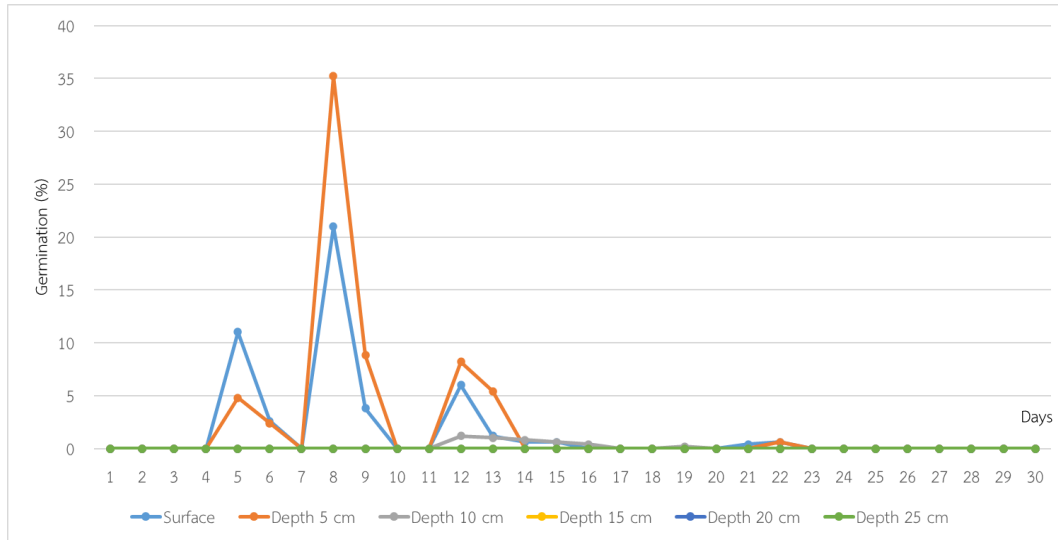


Figure 7 Effect of depth on seed germination of *S. sisymbriifolium* on 30 days.



Figure 8 Effect of depth on seed germination of *S. sisymbriifolium*.

- | | |
|----------------|----------------|
| 1) Surface | 4) Depth 15 cm |
| 2) Depth 5 cm | 5) Depth 20 cm |
| 3) Depth 10 cm | 6) Depth 25 cm |



Figure 9 *S. sisymbriifolium* at 40 days after application.

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1) acetochlor 50% W/V EC | 2) alachlor 48% W/V EC |
| 3) amicarbazone 70% WG | 4) atrazine 90% WG |
| 5) bromacil 80% WP | 6) clomazone 48% W/V EC |
| 7) diclosulam 84% WG | 8) diuron 80% WP |
| 9) isoxaflutole 75% WG | 10) imazethapyr 5.3% W/V EC |
| 11) metolachlor 72% W/V EC | 12) metribuzin 70% WP |
| 13) oxadiazon 25% W/V EC | 14) oxyfluorfen 23.5% W/V EC |
| 15) pendimethalin 33% W/V EC | 16) s-metolachlor 96% EC |
| 17) sulfentrazone 48% W/V EC | 18) sulflufenacil 70% WG |
| 19) control | |



Figure 10 *S. sisymbriifolium* at 60 days after application.

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| 1) acetochlor 50% W/V EC | 2)alachlor 48% W/V EC |
| 3) amicarbazone 70% WG | 4) atrazine 90% WG |
| 5) bromacil 80% WP | 6) clomazone 48% W/V EC |
| 7) diclosulam 84% WG | 8) diuron 80% WP |
| 9) isoxaflutole 75% WG | 10) imazethapyr 5.3% W/V EC |
| 11) metolachlor 72% W/V EC | 12) metribuzin 70% WP |
| 13) oxadiazon 25% W/V EC | 14) oxyfluorfen 23.5% W/V EC |
| 15) pendimethalin 33% W/V EC | 16) s-metolachlor 96% EC |
| 17) sulfentrazone 48% W/V EC | 18) sulflufenacil 70% WG |
| 19) control | |

ชีวชนิด (biotype) ของแมลงหริ่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius)
(Hemiptera:Aleyrodidae) ที่เป็นพาหะของโรคใบหงิกเหลืองในพริก
(Pepper yellow leaf curl virus) ในภาคตะวันตกของประเทศไทย
Biotypes of Tobacco Whitefly, *Bemisia tabaci* (Gennadius)(Hemiptera
:Aleyrodidae) in the Western part of Thailand and Transmission
of Pepper Yellow Leaf Curl Virus in Chilli

สุนัดดา เชาวลิต^{1/} ภูวนารถ มณีโชติ^{2/} เกศสุดา สนศิริ^{1/}

^{1/}กลุ่มวิจัยวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มวิจัยวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Chilli is an economic crop in Thailand. The planting areas are around the country, including western areas. Production of chilli has decreased in quantity and quality due to the outbreak of yellow leaf curl disease caused by pepper yellow leaf curl virus (PepYLCV). The whitefly, *Bemisia tabaci* is a vector for virus transmission. One approach for disease management is to reduce the spread of the virus by the insect vector. This research aimed to investigate the relationship of the virus, whiteflies and host plants. A sampling of *B. tabaci* on chilli plantations showing symptoms of yellow leaf curl disease was carried out from October 2017 to September 2019 in Tak, Kanchanaburi, Ratchaburi and Phetchaburi provinces. Sixty whitefly samples were collected from the diseased fields and identified based on pupal morphology. Biotypes of *B. tabaci* were inspected by amplification of partial mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and nucleotide sequenced. The morphology of the pupal stage revealed smooth leaf forms. The obtained DNA product was 850 base pairs. Nucleotide sequences revealed four biotypes including Asial, Asiall_1, Asiall_6 and Asiall_7 from chilli and other host plants. Three biotypes from chilli were Asial, Asiall_6 and Asiall_7 in a proportion of 66.67%, 28.20% and 5.13.% respectively. The identity percentage of nucleotide

รหัสการทดลอง 03-47-61-01-00-01-61

sequences of the mtCOI gene of biotype Asial ranged from 99.48 – 100%, while that of Asiall_1 was 86.1 – 100%, Asiall_6 was 85.2 – 100%, and Asiall_7 was 86.8 – 100%. Phylogenetic analysis showed tree of branches separating different biotype of *B. tabaci* biotypes Asiall_1 Asiall_6 and Asiall_7. Transmission of PepYLCV by *B. tabaci* biotype Asial from diseased chilli plant to healthy seedlings was successful. The detectable populations in chilli, for which clades found coherent with plant host species. The branching in relative with biotype and clades with host species were also found for rate of PepYLCV from single whitefly was 63.34% after 72 hr AAP, while it was 36.67% by 48 hr AAP. The inoculation access period of PepYLCV by whitefly for 72 hr AAP provided 100% transmission rate, while 48 and 24 hr AAP revealed 90 and 50% transmission rate, respectively. The chilli seedlings exhibited typical yellow leaf curl and dwarf symptoms within 14 – 30 days after insect transmission.

Keywords : Chilli, Eggplant, Whitefly, Cytochrome oxidase gene, *Begomovirus*, Transmission

บทคัดย่อ

พริกเป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายรวมทั้งในภาคตะวันตก สาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตพริกลดลง เนื่องมาจากการระบาดของโรคใบหงิกเหลือง ที่เกิดจาก pepper yellow leaf curl virus (PepYLCV) ที่มีแมลงหวี่ขาวยาสูบเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดโรค การลดการแพร่ระบาดของโรคที่เกิดจากแมลงพาหะ เป็นแนวทางหนึ่งในการจัดการโรค ซึ่งจำเป็นต้องทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัส แมลงหวี่ขาว และพืชอาศัย การศึกษาวิจัยนี้ทำโดยเก็บตัวอย่างแมลงหวี่ขาวยาสูบบนต้นพริกที่แสดงอาการเป็นโรคใบหงิกเหลือง และพืชอื่นในแปลงพริก ในจังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2562 จำนวนรวม 60 ตัวอย่าง จำแนกชนิดแมลงหวี่ขาวโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจำแนกไปโอไทป์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไซโตโครมออกซิเดส (mtCOI) พบว่าแมลงหวี่ขาวยาสูบมีลักษณะสัณฐานวิทยาของดักแด้เป็น แบบ smooth leaf form จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาด 850 นิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกแมลงหวี่ขาวยาสูบจากพริกและพืชอาศัยอื่นได้ 4 ไปโอไทป์ ได้แก่ Asial Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 โดยแต่ละไปโอไทป์มีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระดับ 99.48 – 100 86.1 – 100 85.2 – 100 และ 86.8 – 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แมลงหวี่ขาวยาสูบที่เก็บจากพริกมี 3 ไปโอไทป์ ได้แก่ Asial Asiall_6 และ Asiall_7 ในสัดส่วน 66.67 28.20 และ 5.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ทางไฟโลเจเนติกส์พบว่าแมลงหวี่ขาวยาสูบจับกลุ่มเป็นคลัสเตอร์ตามไปโอไทป์ โดยไปโอไทป์ Asial ในพริกและมะเขือทุก

ตัวอย่างอยู่ในคลัสเตอร์เดียวกัน และแยกเป็นคลด (clade) ตามชนิดพืช ส่วนไปโอไทป์ Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 ในพริก มะเขือ แตงโมป่า แยกคลัสเตอร์ตามไปโอไทป์และแยกคลดตามชนิดพืชเช่นกัน ผลการทดลองถ่ายทอดโรคใบหงิกเหลืองพริกจากต้นพริกที่ติดเชื้อ PepYLCV ไปยังต้นกล้าพริกด้วยแมลงหวีขาวยาสูบไปโอไทป์ Asial จำนวน 30 ตัวพบว่าระยะเวลาที่ให้แมลงรับเชื้อนาน 72 ชั่วโมงสามารถตรวจพบเชื้อในตัวแมลงแต่ละตัวได้ 63.34 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการรับเชื้อที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจพบเชื้อในตัวแมลงได้ 36.67 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาถ่ายทอดเชื้อ PepYLCV นาน 72 ชั่วโมงมีประสิทธิภาพถ่ายทอดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 48 และ 24 ชั่วโมงถ่ายทอดโรคได้ 90 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ต้นกล้าพริกแสดงอาการใบหงิกเหลืองและต้นแคระแกร็นภายในเวลา 14 – 30 วันหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

คำหลัก : พริก มะเขือ แมลงหวีขาว ยีนไซโตโครมออกซิเดส เบโกโมไวรัส การถ่ายทอดโรค

คำนำ

พริกเป็นพืชผักสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย มีการผลิตเพื่อใช้ในประเทศและเพื่อการส่งออกในรูปของพริกสดและพริกเพื่อการแปรรูป ในแต่ละปีประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออกพริกจำนวนมาก การผลิตพริกประสบปัญหาทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ ผลผลิตลดลงเนื่องจากการเข้าทำลายของโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคใบหงิกเหลืองที่เกิดจากไวรัสในสกุล *Begomovirus* ทำให้ความเสียหายให้พริกได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงเก็บเกี่ยวมากกว่า 97 % (Trisno *et al.*, 2009) โรคนี้มีแมลงหวีขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) เป็นพาหะ (Prakash and Singh, 2006) ในประเทศไทยพบโรคนี้อันตรายในแหล่งปลูกพริกทางภาคตะวันตกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อพืชได้รับเชื้อจะแสดงอาการอ่อนแอ ใบเหลือง หรือใบเหลืองร่วมกับใบด่าง ใบม้วน หงิก ลำต้นแคระแกร็น ผลพริกมีขนาดเล็กและบิดเบี้ยวเสียรูปทรง และผลผลิตลดลง การแพร่ระบาดและความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ทั้งด้านประชากรของแมลงพาหะ ชนิดพืช และสภาพแวดล้อม เช่น ชนิดของแมลงหวีขาวที่เป็นแมลงพาหะ ชนิดและสายพันธุ์ของพืชอาศัย ตลอดจนความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของแมลงหวีขาวและชนิดของเชื้อ *Begomovirus* (Kenyon *et al.*, 2014)

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้น มีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแมลงหวีขาว จึงทำให้การแพร่กระจายของเชื้อไวรัสเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว อีกทั้งแมลงหวีขาวยาสูบ *B. tabaci* ซึ่งจัดเป็นศัตรูพืชสำคัญที่มีการระบาดทำความเสียหายไปทั่วโลก มีความซับซ้อน การจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานยังมีความคลุมเครือ (cryptic species) ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมของแมลงหวีขาวยาสูบ ส่งผลต่อการปรับตัวให้เข้ากับพืชอาหาร การดึงดูดศัตรูธรรมชาติ การต้านทานสารฆ่าแมลง รวมถึงประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส ดังนั้นสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ในฐานะหน่วยงานที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกำกับดูแลงานด้านอารักขาพืช จึงจำเป็นต้องศึกษาให้ทราบถึงชนิดของ

แมลงพาหะและพืชอาศัย ตลอดจนความสัมพันธ์และความจำเพาะระหว่างแมลงกับเชื้อสาเหตุ เพื่อหาแนวทางการจัดการโรคโดยลดการแพร่ระบาดของโรคจากแมลงพาหะ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างแมลงหริ่งขาวยาสูบ เช่น หลอดดูดตัวอย่างแมลง (aspirator) ขวดเก็บตัวอย่าง ปากคีบ พู่กัน ถังกระดาษสีน้ำตาล และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรแมลงหริ่งขาว เช่น เข็มปลายแหลม เข็มปลายงอ ปากคีบปลายแหลม เพลท โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 %, แอลกอฮอล์ 70 – 95 % กรดกลูเซอซิติก แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แอซิกฟูซซินสแตน โคลฟออย คานาดาบาลซัม แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ ตู้อบสไลด์ และกล่องใส่สไลด์
3. สารเคมีในการศึกษาสารพันธุกรรม เช่น Chelex, TBE nuclease free water, PCR master mix, DNA template, agarose gel, RedSafe loading dye, DNA Marker ladder
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope (Olympus รุ่น SZ 51) compound microscope (Olympus รุ่น CX 41) กล้องถ่ายภาพ (Leica รุ่น M165C) และอุปกรณ์วาดภาพ (camera lucida)
5. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดแมลงหริ่งขาว ได้แก่ Russel (1958) Martin (1987) และ Mound and Halsey (1978)

วิธีการ

การเก็บตัวอย่างแมลงหริ่งขาวยาสูบ

เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงหริ่งขาวยาสูบทั้งตัวเต็มวัยและดักแด้ จากแปลงพริกที่แสดงอาการของโรคใบหงิกเหลืองจากไวรัสในแหล่งปลูกพริกทางภาคตะวันตกของประเทศไทย ได้แก่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี จำนวน 25 แปลง ระหว่าง เดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2562 โดยเก็บตัวอย่างแบบสุ่มสำรวจทั่วแปลง ตาม ISPM No.6 (FAO., 2006) แบ่งตัวอย่างแมลงเป็นสองส่วน ส่วนแรกเป็นระยะดักแด้เก็บในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำสไลด์ถาวร และส่วนที่สองเป็นตัวเต็มวัยเก็บในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แช่ในตู้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอ (fig.1A)

การตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงหริ่งขาวยาสูบ

ตรวจดูรูปร่างลักษณะภายนอกใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และเลือกแมลงระยะดักแด้เพื่อทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ Martin (1987) ตรวจดูลักษณะสำคัญใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และจำแนกชนิดตามแนวทางการวินิจฉัยของ Russel (1958), Martin (1987) และ Mound and Halsey. (1978) ตัวอย่างที่ศึกษา (voucher specimens) จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

การสกัดดีเอ็นเอจากแมลงหวีขาวยาสูบ และเพิ่มปริมาณยีน mtCOI

สกัดดีเอ็นเอจากแมลงหวีขาวยาสูบที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% ตามวิธีการของ Walsh *et al.* (1991) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณยีน mtCOI ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 23 ไมโครลิตร ประกอบด้วย nuclease free water 5.5 ไมโครลิตร master mix 12.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Bem-Bt-F (TGR TTT TTT GGT CAT CCR GAA GT) และ Bem-Bt-R (TTT ACT GCA CTT TCT GCC) (Shatters *et al.*, 2009) อย่างละ 1 ไมโครลิตร DNA template 3 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันได้ดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสงยูวี (ultraviolet) ด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Image System (Biorad) จากนั้นส่งผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้)

การจำแนกไปโอไทป์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI และวิเคราะห์ Phylogenetic tree

ตรวจสอบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากแมลงหวีขาวยาสูบ ด้วยโปรแกรม DNASTar (DNASTar package, USA) และตรวจสอบชนิดยีนและไปโอไทป์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยใช้โปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ของแมลงหวีขาวยาสูบที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW และสร้าง Phylogenetic tree ตามวิธี maximum likelihood ด้วยโปรแกรม MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางไฟโลเจเนติกส์

การเก็บตัวอย่างใบพริกและตรวจสอบชนิดเชื้อไวรัส

เก็บตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการของโรคใบหงิกเหลือง ในแปลงเดียวกับที่เก็บแมลงหวีขาว (fig.1B) เพื่อจำแนกชนิดเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุโรค ใช้ใบพริก 1 มิลลิกรัม สกัดดีเอ็นเอรวมด้วยชุดสกัด FavorPrep Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Taiwan) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ในปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ Begomovirus ด้วยไพรเมอร์ AVcore 5' GCCHATRTAYAGRAAGCCMAGRAT 3' และ ACcore 5' GGRTTDGARGCATGHGTACANGCC 3' ตามวิธีการของ Brown *et al.* (2001) เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis และส่งผลผลิตดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้) ตรวจสอบ

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNASTar และระบุชนิดของเชื้อไวรัสด้วยการใช้โปรแกรม Blast ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>)

การเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อ SLCMV ด้วยเทคนิค Rolling circle amplification (RCA)

เพิ่มปริมาณจีโนมเชื้อไวรัสในตัวอย่างมันสำปะหลังโดยเลือกตัวอย่างไวรัสจังหวัดละ 1 ตัวอย่าง ด้วยชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จรูป TempliPhi 100 Amplification Kit (GE Healthcare, Germany) ตามวิธีการที่แนะนำของของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้

1. ดูดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบต่าง ๆ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ Sample buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 95 °C นาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำมาวางบนน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที
2. เติม Reaction buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเติม Enzyme mix ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 4–18 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 10 นาที ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณจีโนมไวรัสบน 1% agarose gel แล้วย้อมด้วย GelRed แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Imaging System (Biorad, USA)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัสด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS)

แยกจีโนมเชื้อไวรัสออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป FavorPrep GEL/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต แล้วตรวจสอบขนาดและปริมาณ DNA ที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ทำการวัดปริมาณจีโนมเชื้อไวรัสด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร (O.D.) ด้วยเครื่อง Multiskan GO ELISA reader (Finland) ค่าสัดส่วนของ O.D.260/O.D.280 ที่มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 1.8 - 2.2 แสดงว่าดีเอ็นเอของจีโนมไวรัสที่ได้มีความบริสุทธิ์มาก โดยให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอจีโนมของไวรัส ≥ 2 ng/ul ปริมาตร > 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำจีโนมไวรัสที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัสด้วยการทำ Whole Genome Sequencing ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq instrument, 150PE (Illumina, San Diego, CA, USA)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัส

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไวรัสจาก Illumina HiSeq Sequence, 150PE ด้วยซอฟต์แวร์ Geneious Prime 2021.0.3 โดยการนำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ขนาดประมาณ 150 นิวคลีโอไทด์ มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสต้นแบบที่มีรายงานใน GenBank เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไวรัสที่สมบูรณ์แล้ว จะนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ PeYLCV กับเชื้อไวรัสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) เพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดเชื้อไวรัสที่นำมาทดลอง

การเลี้ยงแมลงหีขาวยาสูบเพื่อใช้ทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

นำแมลงหีขาวยาสูบไปโอโทป์ Asial ที่ได้จากแปลงพริกมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในทรงขนาด 1 x 1 ตารางเมตร จนได้โคลอนีบริสุทธ์ จากนั้นเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนต้นมะเขือเปราะ ในโรงเรือนขนาด 3 x 2 ตารางเมตร คลุมด้วยตาข่ายความถี่ 40 ช่องต่อตารางเซนติเมตร

การศึกษาอัตราและระยะเวลาการได้รับเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัสของแมลงหีขาวยาสูบ

เตรียมต้นพริกที่เป็นโรคเพื่อเป็นแหล่งของไวรัส โดยคัดเลือกแมลงหีขาวยาสูบไปโอโทป์ Asial ที่เพิ่งออกจากดักแต่ ให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากพริกที่เป็นโรคใบหงิกเหลืองและตรวจพบเชื้อ PepYLCV เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง (fig.2 A-D) แล้วย้ายแมลงให้ดูดกินต้นกล้าพริกปกติ เมื่อต้นพริกแสดงอาการใบหงิกเหลือง นำไปตรวจสอบเชื้อ PepYLCV และใช้ต้นพริกที่มีเชื้อเป็นแหล่งของไวรัสในการทดสอบการถ่ายทอดโรค

การศึกษ้อัตราและระยะเวลาในการรับเชื้อ นำแมลงหีขาวยาสูบไปโอโทป์ Asial ที่เพิ่งออกจากดักแต่ ให้ดูดอาหารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพริกที่มีเชื้อ PepYLCV ที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว) เมื่อครบกำหนดเวลานำแมลงหีขาวยาสูบมาตรวจหาเชื้อ PepYLCV ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์

การศึกษ้อัตราและระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อ นำแมลงหีขาวยาสูบไปโอโทป์ Asial ที่เพิ่งออกจากดักแต่ ให้ดูดอาหารเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพริกที่มีเชื้อ PepYLCV เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยแมลงหีขาวยาสูบจำนวน 30 ตัว ในต้นพริกปกติ (พริก ระยะ 3-4 ใบจริง) ที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 10 ซ้ำ) เมื่อครบเวลา กำจัดแมลงหีขาวยาสูบโดยการพ่นสารเคมีกำจัดแมลง นำต้นพริกมาเก็บไว้ในกรงป้องกันแมลงและสังเกตระยะเวลาที่ต้นพริกแสดงอาการของโรค บันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏ ตรวจหาเชื้อ PepYLCV ในใบพริก ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์

เวลาและสถานที่

เวลา : เดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

สถานที่ : แหล่งปลูกพริกทางภาคตะวันตกของประเทศไทย ได้แก่จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี และห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ลักษณะสัณฐานวิทยาของแมลงหีขาวยาสูบ

ผลการจำแนกแมลงหีขาวที่เก็บมาศึกษา โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดักแต่ พบว่าเป็นแมลงหีขาวยาสูบ *B. tabaci* แบบ smooth leaf form โดยดักแต่มีขนาดกว้าง 0.35 มิลลิเมตร ยาว 0.48 มิลลิเมตร (n=20) รอยหยักบริเวณขอบของช่องเปิดของปล้องอก (thoracic tracheal comb) มีขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจน ท่อช่องเปิดของปล้องอก (thoracic tracheal flod) ช่องเปิดขนาดเล็กบนลำตัว (dorsal disc pores) มีขนาดเล็ก กระจายอยู่ที่ขอบด้านนอกของลำตัว vasiform

orifice เป็นรูปสามเหลี่ยม ขอบด้านในมีรอยหยักเล็กน้อย lingular เป็นท่อยาวส่วนปลายขยายใหญ่ มีเส้นขนสั้น 2 เส้น operculum ปกคลุมลงมาถึง 1 ใน 2 ส่วนของ lingular รอยหยักบริเวณท้ายลำตัว (caudal tracheal fold) เห็นได้ชัดเจน (fig.3 A-C)

การจำแนกไบโอไทป์ของแมลงหริ่งขาวยาสูบ โดยใช้ยีน mtCOI

ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 752 นิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI จำแนกไบโอไทป์แมลงหริ่งขาวยาสูบจำนวน 60 ตัวอย่างที่เก็บได้จากแปลงพริกที่เป็นโรคใบหงิกเหลือง พืชอาศัย และวัชพืชในแปลงพริก พบว่ามี 4 ไบโอไทป์ ได้แก่ Asial จำนวน 45 ตัวอย่าง Asiall_1 จำนวน 2 ตัวอย่าง Asiall_6 จำนวน 11 ตัวอย่าง และ Asiall_7 จำนวน 2 ตัวอย่าง (Table 1) ในพริกพบ 3 ไบโอไทป์ โดยพบ Asial มากที่สุด (66.67%) ในจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี รองลงมาเป็น Asiall_6 (28.20%) และ Asiall_7 (5.13.%) พบในจังหวัดกาญจนบุรี สำหรับในพืชอาศัยอื่น พบไบโอไทป์ Asial ในมะเขือ พักทอง และแตงโมป่า พบในจังหวัดกาญจนบุรี และตาก ไบโอไทป์ Asiall_1 พบในมะเขือ ในจังหวัดตาก เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม clustalW ใน MEGA7 พบว่าแมลงหริ่งขาวยาสูบจากพริกที่เป็นไบโอไทป์ Asial มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันที่ระดับ 99.48 – 100 เปอร์เซ็นต์ Asiall_1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันที่ระดับ 86.1 – 100 เปอร์เซ็นต์ Asiall_6 อยู่ที่ระดับ 85.2 – 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Asiall_7 อยู่ที่ระดับ 86.8 – 100เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ไฟโลเจเนติกส์ (Phylogenetic analysis)

สร้างแผนภูมิแบบ maximum likelihood phylogenetic tree โดยใช้ค่าความแตกต่าง (distance) ของข้อมูลยีน mtCOI ขนาด 762 นิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ multiple alignment คำนวณค่าความเชื่อมั่นจากการวิเคราะห์ bootstrap จำนวน 1000 replications พบว่าแยกได้ 2 กิ่ง (branch) โดยกิ่งที่ 1 เป็นไบโอไทป์ Asial ทั้งหมด ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ (cluster) คลัสเตอร์ที่ 1 พบในพริก 26 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรี และราชบุรี ในมะเขือ 12 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรี ตาก และกรุงเทพมหานคร และในพักทอง 1 ตัวอย่าง จากกาญจนบุรี คลัสเตอร์ที่ 2 แยกออกเป็น 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็นไบโอไทป์ Asial ในแตงโมป่า 1 ตัวอย่างจากจังหวัดตาก แคลดที่ 2 พบในมะเขือ 4 ตัวอย่าง จากกรุงเทพมหานคร และตาก และพบในพักทอง 1 ตัวอย่าง จากกาญจนบุรี กิ่งที่ 2 มี 3 ไบโอไทป์อยู่ด้วยกัน ได้แก่ Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นไบโอไทป์ Asiall_7 จำนวน 2 ตัวอย่าง พบในพริกจากจังหวัดกาญจนบุรี คลัสเตอร์ที่ 2 แบ่งเป็น 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็นไบโอไทป์ Asiall_1 ในมะเขือ 2 ตัวอย่าง แคลดที่ 2 เป็นไบโอไทป์ Asiall_6 ในพริกทั้ง 11 ตัวอย่าง (fig. 4)

จากนั้นสร้างแผนภูมิแบบ maximum likelihood phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ โดยนำข้อมูลยีน mtCOI ขนาด 606 นิวคลีโอไทด์ของแมลงหริ่งขาวยาสูบ 60 ตัวอย่างบนพืชอาศัยชนิดต่างๆ ที่ศึกษาครั้งนี้ และที่เคยมีรายงานพบในประเทศไทยอีก 76 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นข้อมูลที่รายงานอยู่ใน GenBank หาความเชื่อมโยงระหว่างไบโอไทป์และพืชอาหาร เป็น Asia I

ทั้งหมดจำนวน 82 ตัวอย่าง แบ่งเป็น Asia I ในพริก มีการจับกลุ่มแยกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 26 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี กลุ่มที่ 2 จำนวน 9 ตัวอย่าง จากจังหวัด นครราชสีมา นครพนม อุบลราชธานี ศรีสะเกษ เชียงราย และ สุพรรณบุรี กลุ่มที่ 3 จำนวน 2 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงใหม่ และเชียงราย ส่วน Asial ในมะเขือ จับกลุ่มแยกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 12 ตัวอย่าง จากจังหวัดกาญจนบุรีและตาก กลุ่มที่ 2 จำนวน 4 ตัวอย่าง จากจังหวัดตาก และ กรุงเทพมหานคร และ Asia I ในมะเขือเทศ 18 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงราย ลำปาง บึงกาฬ หนองคาย นครราชสีมา สระบุรี ราชบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี นอกจากนี้มี Asia I ในขี้กากลาง 1 ตัวอย่างจากสุพรรณบุรี ในมันเทศ 1 ตัวอย่างจากสุพรรณบุรี ในบวบเหลี่ยม 1 ตัวอย่างจากสงขลา ในแตงกวา 1 ตัวอย่างจากนครปฐม และในถั่ว 1 ตัวอย่างจากสุพรรณบุรี (fig. 5A) สำหรับชุดที่ 2 เป็นไปโอโทป์ Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 จำนวน 54 ตัวอย่าง พบว่าแยกได้ 2 เคลด เคลดที่ 1 เป็น Asiall_7 ในพริก 2 ตัวอย่าง เคลดที่ 2 ประกอบด้วย Asiall_6 และ Asiall_1 โดย Asiall_6 จำนวน 13 ตัวอย่าง พบในพริก 7 ตัวอย่าง และในมันสำปะหลัง 6 ตัวอย่าง สำหรับ Asiall_1 จำนวน 39 ตัวอย่าง ในมันสำปะหลังทั้งหมด (fig. 5B)

การตรวจสอบเชื้อ PepYLCV ในพริกที่เป็นโรคใบหงิกเหลือง

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต KBR segment DNA-A จากวิเคราะห์ Whole Genome Sequencing ด้วย Illumina HiSeq Sequence, 150PE พบว่า ไอโซเลต KBR segment DNA-A มีขนาด 2737 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 6 Open Reading Frames (ORFs) แปลเป็นโปรตีนได้ 6 ชนิด ได้แก่ 1. AV1 Protein (Coat protein) 2. AV2 Protein (Precoat protein) 3. AC1 Protein (Replication-associated protein) 4. AC2 Protein (TrAP) 5. AC3 Protein (REn) และ 6. AC4 Protein (fig. 6)

จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต KBR segment DNA-A พบว่ามีความคล้ายคลึงกับไอโซเลตอื่นๆ ที่พบในประเทศไทยที่ระดับ 92.7%-99.2% โดยคล้ายคลึงกับไอโซเลต KON-KG5 ที่ระดับ 99.2% (Table 2) และการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต KBR segment DNA-A พบว่าไอโซเลต KBR จัดอยู่ในเดียวกับ ไอโซเลตอื่นๆ ที่พบในประเทศไทย (fig. 7) ดังนั้นเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นเชื้อไวรัสชนิด PeYLCV ไอโซเลต KBR

การศึกษาอัตราและระยะเวลาการรับเชื้อ และการถ่ายทอดเชื้อ PepYLCV ของแมลงหวี่ชว ยาสูปไปโอโทป์ Asial

ผลการศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อ พบว่าที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการรับเชื้อ PepYLCV เท่ากับ 23.33 เปอร์เซ็นต์ (7 ตัว) 13.33 เปอร์เซ็นต์ (4 ตัว) 40.00 เปอร์เซ็นต์ (12 ตัว) 36.67 เปอร์เซ็นต์ (11 ตัว) และ 63.34 เปอร์เซ็นต์ (19 ตัว) ตามลำดับ และการใช้เทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจพบเชื้อในตัวแมลงหวี่ชวยาสูป 1 ตัวได้ (fig. 8, 10)

ผลการศึกษาระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อ พบว่าที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อ PepYLCV เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ (5 ต้น) 60 เปอร์เซ็นต์ (6 ต้น) 50 เปอร์เซ็นต์ (5 ต้น) 90 เปอร์เซ็นต์ (9 ต้น) และ 100 เปอร์เซ็นต์ (10 ต้น) ตามลำดับ (fig. 9, 11) และ ต้นพริกจะแสดงอาการเกิดโรค ภายในเวลา 14 – 30 วันหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส โดยมี ลักษณะอาการใบเหลืองร่วมกับใบด่างที่ยอด โดยจะเริ่มแสดงอาการต่างที่โคนใบและขยายเต็มใบ จากใบ ยอดถึงใบล่าง หรือบางครั้งมีอาการหงิกเหลืองร่วมกับอาการด่างเหลือง และลำต้นแคระแกร็น (fig. 12)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

แมลงหวีขาวยาสูบในพื้นที่ปลูกพริก จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี และเพชรบุรี จำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของดักแด้ได้ 1 แบบ คือ แบบ smooth leaf form ในขณะที่การใช้ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาดประมาณ 850 นิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกแมลงหวีขาวยาสูบจาก พริกและพืชอาศัยอื่นได้ 4 ไบโอดีปได้แก่ Asial Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 โดยในพริก พบ 3 ไบโอดีป โดย Asial Asiall_6 และ Asiall_7 ในสัดส่วน 66.67 เปอร์เซ็นต์ 28.20 เปอร์เซ็นต์ และ 5.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไบโอดีป Asial มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันที่ระดับ 99.48 – 100 เปอร์เซ็นต์ Asiall_1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันที่ระดับ 86.1 – 100 เปอร์เซ็นต์ Asiall_6 อยู่ที่ระดับ 85.2 – 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Asiall_7 อยู่ที่ระดับ 86.8 – 100 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิเคราะห์ทางไฟโลเจเนติกส์ พบว่าแมลงหวีขาวยาสูบในภาคตะวันตกของประเทศไทย จำนวน 60 ตัวอย่าง แยกได้ 2 กิ่ง โดยกิ่งที่ 1 เป็นไบโอดีป Asial ทั้งหมด ซึ่งแยกเป็น 2 คลัสเตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 พบในพริก 26 ตัวอย่าง ในมะเขือ 12 ตัวอย่าง และในพริกทอง 1 ตัวอย่าง คลัสเตอร์ ที่ 2 แยกออกเป็น 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็นไบโอดีป Asial ในแตงโมป่า 1 ตัวอย่าง แคลดที่ 2 พบใน มะเขือ 4 ตัวอย่าง และพบในพริกทอง 1 ตัวอย่าง กิ่งที่ 2 มี 3 ไบโอดีปด้วยกัน ซึ่งแยกเป็น 2 คลัส เตอร์ โดยคลัสเตอร์ที่ 1 เป็นไบโอดีป Asiall_7 ในพริก 2 ตัวอย่าง คลัสเตอร์ที่ 2 แบ่งเป็น 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็นไบโอดีป Asiall_1 ในมะเขือ 2 ตัวอย่าง แคลดที่ 2 เป็นไบโอดีป Asiall_6 ในพริกทั้ง 11 ตัวอย่าง

นอกจากนี้ เมื่อวิเคราะห์หาความเชื่อมโยงระหว่างไบโอดีปของแมลงหวีขาวยาสูบบนพริก และพืชอาศัยชนิดต่างๆ ที่พบในไทย โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ 60 ตัวอย่าง ร่วมกับข้อมูล จาก GenBank รวมทั้งหมด 76 ตัวอย่าง เป็น Asia I ทั้งหมดจำนวน 82 ตัวอย่าง แบ่งเป็น Asia I ใน พริก จำนวน 37 ตัวอย่าง มีการจับกลุ่มแยกเป็น 3 กลุ่ม ส่วน Asial ในมะเขือ จำนวน 16 ตัวอย่าง จับ กลุ่มแยกเป็น 2 กลุ่ม และ Asia I ในมะเขือเทศ 18 ตัวอย่าง นอกจากนี้มี Asia I ในซึ้กาลาย มั่นเทศ บวบเหลี่ยม แตงกวา และถั่ว (fig. 5A) สำหรับชุดที่ 2 เป็นไบโอดีป Asiall_1 Asiall_6 และ Asiall_7 จำนวน 54 ตัวอย่าง พบว่าแยกได้ 2 แคลด แคลดที่ 1 เป็น Asiall_7 ในพริก 2 ตัวอย่าง แคลดที่ 2 ประกอบด้วย Asiall_6 และ Asiall_1 โดย Asiall_6 จำนวน 13 ตัวอย่าง พบในพริก 7 ตัวอย่าง และ ในมันสำปะหลัง 6 ตัวอย่าง สำหรับ Asiall_1 จำนวน 39 ตัวอย่างในมันสำปะหลังทั้งหมด

จาก phylogenetic tree ข้างต้น เมื่อหาความเชื่อมโยงกับพริกและพืชอาศัยอื่นในประเทศไทย มีแนวโน้มว่า ในพริกใบโอโทปที่โดดเด่นคือ Asial สอดคล้องกับ Monika and Stephan (2016) รองลงมาคือใบโอโทป Asiall_1 นอกจากนี้ยังพบในมะเขือเทศ มะเขือ และพืชผักอีกหลายชนิด สำหรับใบโอโทป Asiall_1 เป็นกลุ่มประชากรที่โดดเด่นในมันสำปะหลัง

การศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อ และถ่ายทอดเชื้อ PepYLCV ของแมลงหริ่งขาวยาสูบใบโอโทป Asial พบว่าที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการรับเชื้อ PepYLCV ได้ดีที่สุดคือ 63.34 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ 72 ชั่วโมง สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีลักษณะอาการใบเหลืองร่วมกับใบด่างที่ยอด โดยจะเริ่มแสดงอาการต่างที่โคนใบและขยายเต็มใบ จากใบยอดถึงใบล่าง หรือบางครั้งมีอาการหงิกเหลืองร่วมกับอาการต่างเหลือง และลำต้นแคระแกร็น ภายในเวลา 14 – 30 วันหลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

ดังนั้น การลดระดับของโรคใบหงิกเหลืองในพริกจากเชื้อ PepYLCV ที่มีแมลงหริ่งขาวยาสูบเป็นแมลงพาหะ จึงควรศึกษาเพิ่มเติม 1) การลดการแพร่ระบาดของโรค โดยลดประชากรแมลงหริ่งขาวยาสูบใบโอโทป Asial บนพริก และมะเขือ โดยไม่ควรปลูกพริกพร้อมกับมะเขือ แต่ควรปลูกร่วมกับพืชอาศัยอื่นที่ Asial ชอบแต่ไม่ใช่พืชอาศัยของไวรัส เช่น พืชวงศ์แตง หรือปลูกพืชอาศัยของ Asial ที่ไม่พบไวรัสไว้ขอบแปลง 2) ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพการถ่ายทอดโรคของแมลงหริ่งขาวยาสูบใบโอโทป Asiall_1, Asiall_6 และ Asiall_7 เพิ่มเติม 3) ศึกษาชนิดและประสิทธิภาพตัวห้ำที่จำเพาะกับ Asial ในพริกและมะเขือ เพื่อกำจัดใบโอโทปที่ถ่ายทอดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ ผชช. พรพิมล อธิปัญญาคม ผชช.พิเชษฐ เชาววัฒนวงศ์ ผอ. ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษา งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี และขอบคุณทีมงานกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้านตลอดการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- Brown, J.K., A.M. Idris, I Torres-Jerez, G.K. Banks and S.D. Wyatt. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Arch. Virol.* 146: 1581-1598.
- Kenyon, F. L., S. Kumar, W. S. Tsia and J. A. Hughes. 2014. Virus disease of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. *Advances in virus research.* 90: 297-354.
- Martin, J. H. 1987. An Identification Guide to Common Whitefly Pest Species of the World (Homoptera: Aleyrodidae). *Tropical Pest Management.* 33(4): 298-322.

- Monika, G. and Stephan, W. 2016. Diversity of *Bemisia tabaci* in Thailand and Vietnam and indications of species replacement. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 19(2): Pages 537-543.
- Mound L.A., & S.H. Halsey,. 1978. Whitefly of the world: a systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data. British Museum (Natural History)/ Wiley, London/Chichester.
- Kumar, S., S. Glen, L. Michael, K. Christina and T. Koichiro. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 1547-1549.
- Prakash, S. and S. J. Singh. 2006. Insect transmitted virus of pepper: *Vegetation Science*. 33: 109-116.
- Russel, L.M. 1958. Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). *Bull Brooklyn Entomol Soc.* 52:122–123.
- Shatters, R.G. Jr., C.A. Powell, L.M. Boykin, H.L. Sheng and C.L. McKenzie. 2009. Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype-specific mitochondrial cytochrome c oxidase I polymerase chain reaction primers. *J. Econ. Entomol.* 102: 750–758.
- Shoorcheh, H.R., B. Kazemi, S. Manzari, J.K. Brown and A. Sarafrazi. 2008. Genetic variation and mtCOI phylogeny for *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) indicate that the 'B' biotype predominates in Iran. *J. Pest Sci.* 81: 199-206.
- Trisno, J., S. H. Hidayat, T. Habazar, I. Manti and I. Jamsari. 2009. Detection and sequence diversity of begomovirus associated with yellow leaf curl disease of pepper (*Capsicum annuum*) in West Sumatera, Indonesia. *Microbiology Indonesia*. 3: 61-66.

Table 1 Whitefly samples on chilli plantations showing symptoms of yellow leaf curl disease and other host plants in Tak, Kanchanaburi, Ratchaburi and Phetchaburi provinces.

Species name	Biotype	Host	Location	Coordinates	Code
Asial_Phetchaburi357_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°2'53",E99°55'33"	357
Asial_Phetchaburi357.2_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°2'53",E99°55'33"	357.2
Asial_Phetchaburi358.1_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°1'19",E99°53'57"	358.1
Asial_Phetchaburi358.2_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°1'19",E99°53'57"	358.2
Asial_Phetchaburi359_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N13°1'0",E99°53'32"	359
Asial_Phetchabun360_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N12°42'18",E99°54'25"	360
Asial_Phetchaburi360.1_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N12°42'18",E99°54'25"	360.1
Asial_Phetchaburi361.1_Chilli	Asial	Chilli	Phetchaburi	N12°47'28",E99°54'20"	361.1
Asial_Ratchaburi363.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°43'44",E99°50'39"	363.1
Asial_Ratchaburi363.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°43'44",E99°50'39"	363.2
Asial_Ratchaburi363.3_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°43'44",E99°50'39"	363.3
Asial_Ratchaburi365_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	365
Asial_Ratchaburi365.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	365.2
Asial_Ratchaburi365.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	365.1
Asial_Ratchaburi366_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	366
Asial_Ratchaburi366.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	366.1
Asial_Ratchaburi366.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'55",E99°54'42"	366.2
Asial_Ratchaburi369_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'39",E99°55'25"	369
Asial_Ratchaburi372.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'39",E99°55'25"	369.1
Asial_Ratchaburi372.2_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°49'39",E99°55'25"	369.2
Asial_Ratchaburi370_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°50'4",E99°54'30"	370
Asial_Ratchaburi370.1_Chilli	Asial	Chilli	Ratchaburi	N13°50'4",E99°54'30"	370.1
Asial_Kanchanaburi372.1_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	372.1
Asial_Kanchanaburi372.2_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	372.2
Asial_Kanchanaburi374.2_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°49'75",E99°34'42"	374.2
Asial_Kanchanaburi375_Chilli	Asial	Chilli	Kanchanaburi	N13°49'75",E99°34'42"	375
Asial_Bangkok378.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°50.865",E100°34.415"	378.1
Asial_Bangkok378.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°50.865",E100°34.415"	378.2
Asial_Tak386_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'12",E98°34'20"	386
Asial_Tak386.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'12",E98°34'20"	386.2
Asial_Tak387_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'8",E98°34'20"	387
Asial_Tak387.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'8",E98°34'20"	387.1
Asial_Tak387.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°54'8",E98°34'20"	387.2
Asial_Tak389.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°25'48",E98°41'54"	389.1
Asial_Tak389.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Tak	N16°25'48",E98°41'54"	389.2
Asial_Kanchanaburi551_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	551
Asial_Kanchanaburi551.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	551.1
Asial_Kanchanaburi551.2_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	551.2
Asial_Kanchanaburi552_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	552
Asial_Kanchanaburi552.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	552.1
Asial_Kanchanaburi553_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	553
Asial_Kanchanaburi553.1_Eggplant	Asial	Eggplant	Kanchanaburi	N13°46'10.9",E99°34'07.2"	553.1
Asial_Kanchanaburi379_Pumpkin	Asial	Pumpkin	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	379
Asial_Kanchanaburi379.1_Pumpkin	Asial	Pumpkin	Kanchanaburi	N13°58'54",E99°38'49"	379.1
Asial_Tak 393.2_Wildwatermelon	Asial	Wildwatermelon	Tak	N16°29'06",E98°48'56"	393.2
Asiall_1_Tak393_Eggplant	Asiall_1	Eggplant	Tak	N16°29'06",E98°48'56"	393
Asiall_1_Tak393.1_Eggplant	Asiall_1	Eggplant	Tak	N16°29'06",E98°48'56"	393.1
Asiall_6_Kanchanaburi354.2_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N11°22'55",E99°31'11"	354.2
Asiall_6_Phetchaburi359.2_Chilli	Asiall_6	Chilli	Phetchaburi	N13°1'0",E99°53'32"	359.2
Asiall_6_Phetchaburi361_Chilli	Asiall_6	Chilli	Phetchaburi	N12°47'28",E99°54'20"	361
Asiall_6_Kanchanaburi371.1_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N13°58'20",E99°42'33"	371.1
Asiall_6_Kanchanaburi373.2_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°6'27",E99°19'42"	373.2
Asiall_6_Kanchanaburi374.1_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°6'53",E99°18'50"	374.1
Asiall_6_Kanchanaburi375.1_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°7'25",E99°10'30"	375.1
Asiall_6_Kanchanaburi375.2_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°7'25",E99°10'30"	375.2
Asiall_6_Kanchanaburi376_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°12'54",E99°11'30"	376
Asiall_6_Kanchanaburi376.1_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°12'54",E99°11'30"	376.1
Asiall_6_Kanchanaburi376.2_Chilli	Asiall_6	Chilli	Kanchanaburi	N14°12'54",E99°11'30"	376.2
Asiall_7_Kanchanaburi_373_Chilli	Asiall_7	Chilli	Kanchanaburi	N14°6'27",E99°19'42"	373
Asiall_7_Kanchanaburi373.1_Chilli	Asiall_7	Chilli	Kanchanaburi	N14°6'27",E99°19'42"	373.1

Table 2 Nucleotide sequence identity values of segment A of PeYLCV isolate KBR and other PeYLCV isolates.

Isolate	1	2	3	4	5	6	7
1 PeYLCV-KBR							
2 KT322141.1:KON-KG5	99.2						
3 KX943290.1:WF-SPN-Pep2015	98.8	99.1					
4 KT322145.1:TMK-KR5	98.8	99.1	98.7				
5 KT322143.1:SPN-PG1	98.7	99	99.5	98.6			
6 MK946436.1:BRM103	97.1	97.2	96.8	96.8	96.7		
7 KT322142.1:SNS-CM5	92.7	93	93.1	92.7	92.9	91.3	



Figure 1 A. Whitefly samples were collected on chilli plantations showing symptoms of yellow leaf curl disease and other host plants in Tak, Kanchanaburi, Ratchaburi and Phetchaburi Bangkok B. chilli plantations showing symptoms of yellow leaf curl disease



Figure 2 A.-D. Transmission PepYLCV by *B. tabaci* biotype Asial.

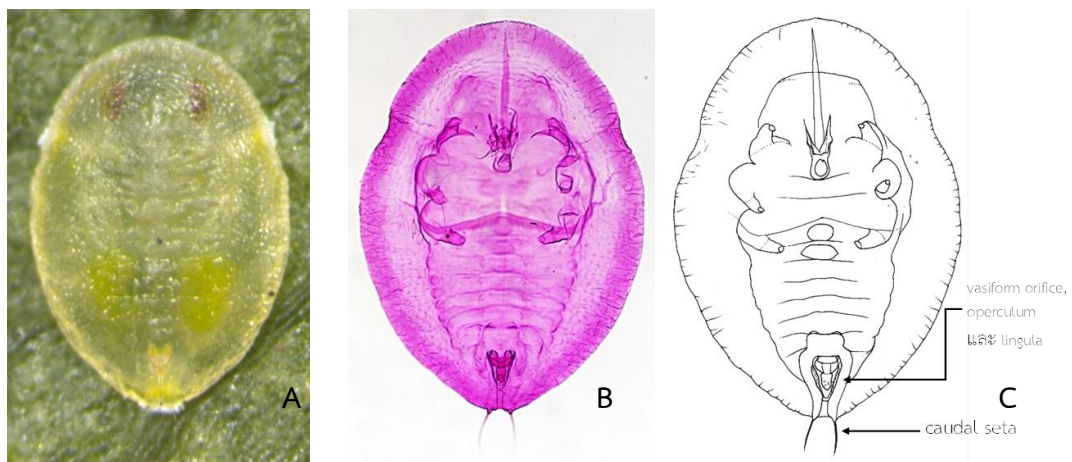


Figure 3 Smooth leaf form puparium of *B. tabaci* on chili symptomatic yellow leaf curl disease A. puparium on host plants B. puparium on slide C. drawing puparium

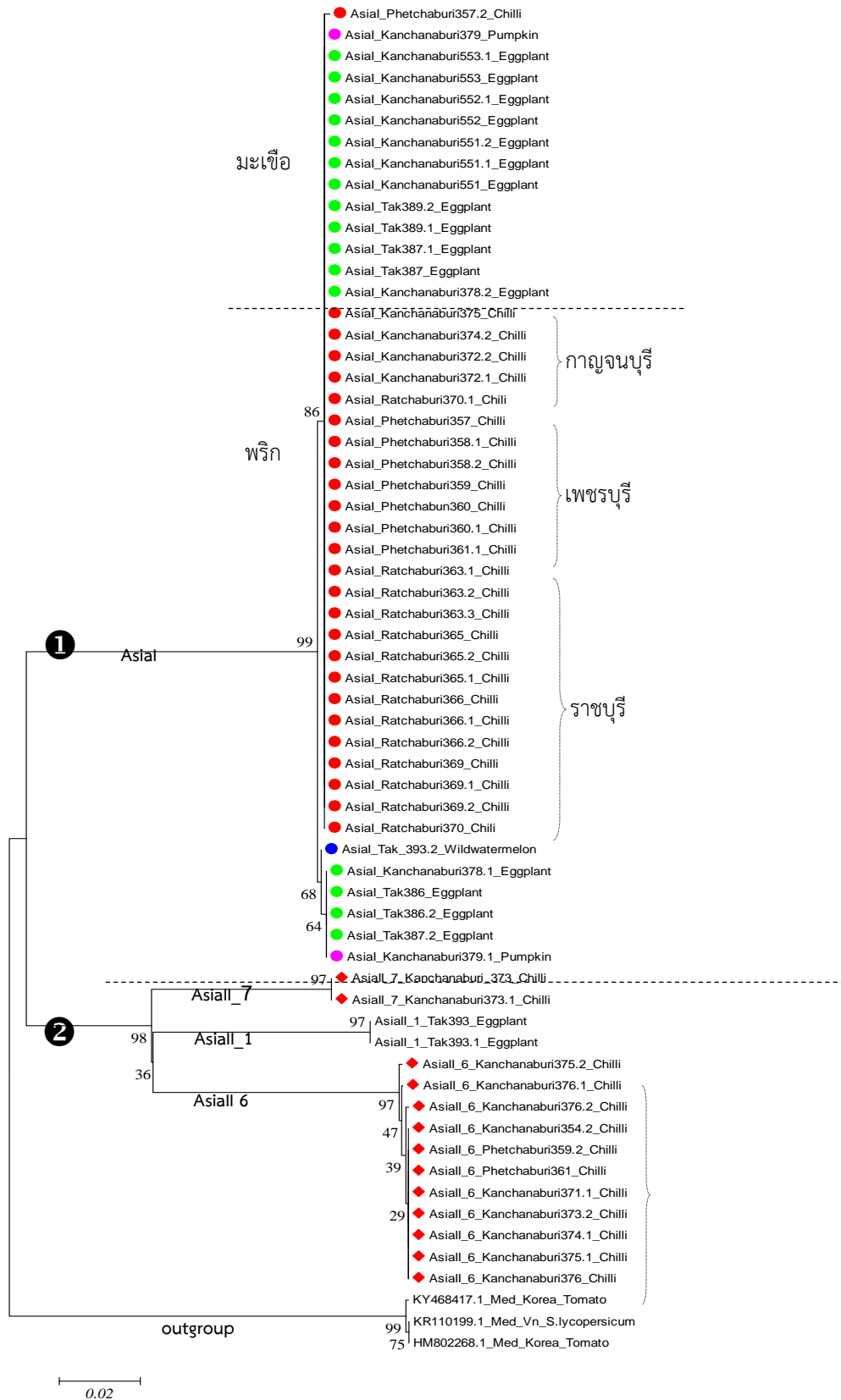


Figure 4 Phylogenetic tree based on the maximum likelihood of mtCOI sequences of *B. tabaci* on chilli plot symptomatic yellow leaf curl disease and other host plants in Tak, Kanchanaburi, Ratchaburi, and Phetchaburi

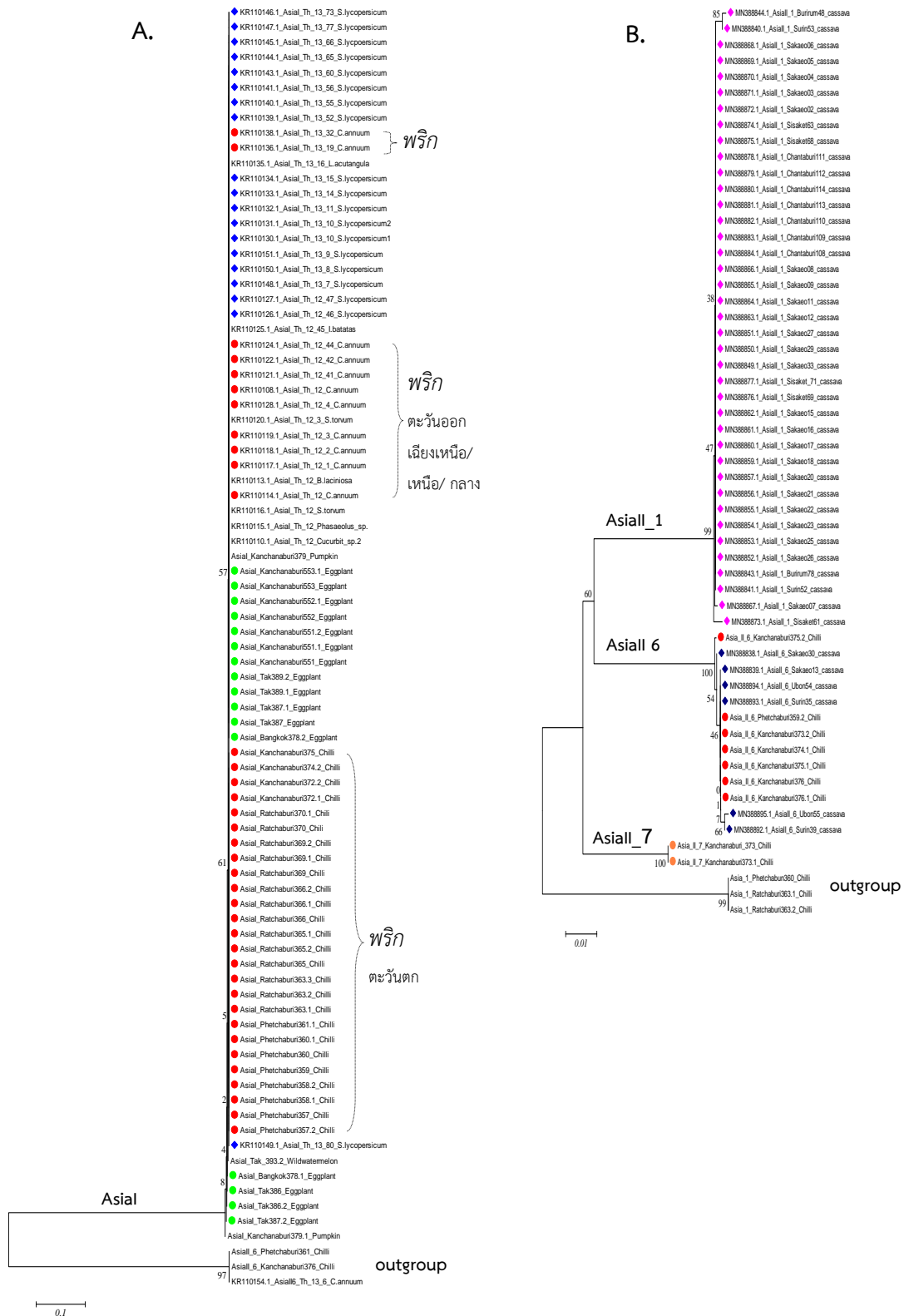


Figure 5 Phylogenetic tree based on the maximum likelihood of mtCOI sequences of *B. tabaci* on chilli plot symptomatic yellow leaf curl disease and other host plants in Thailand. A biotype Asial, B. biotype Asiall_1 Asiall_6 and Asiall_7

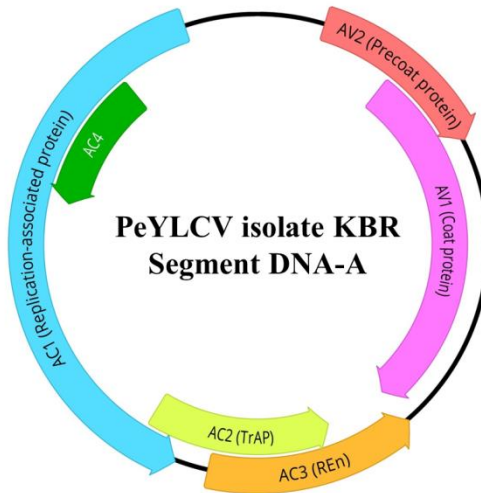


Figure 6 Genome composition of segment DNA-A of PeYLCV isolate KBR. Segment DNA-A contained 6 Open Reading Frames (ORFs) and encoded for 6 proteins: ORF AV1 encodes for coat protein, ORF AV2 encodes for precoat protein, ORF AC1 encodes for replication-associated protein, ORF AC2 encodes for transcriptional activator protein (TrAP), ORF AC3 encodes for replication enhancer protein (REn) and ORF AC4 encodes for AC4 protein.



Figure 7 A Neighbour-Joining phylogenetic tree of complete genome segment DNA-A. The data set was subjected to 1000 bootstrap replicates. The bootstrap values are shown above the branches (>80%). PeYLCV isolate KBR is indicated in red

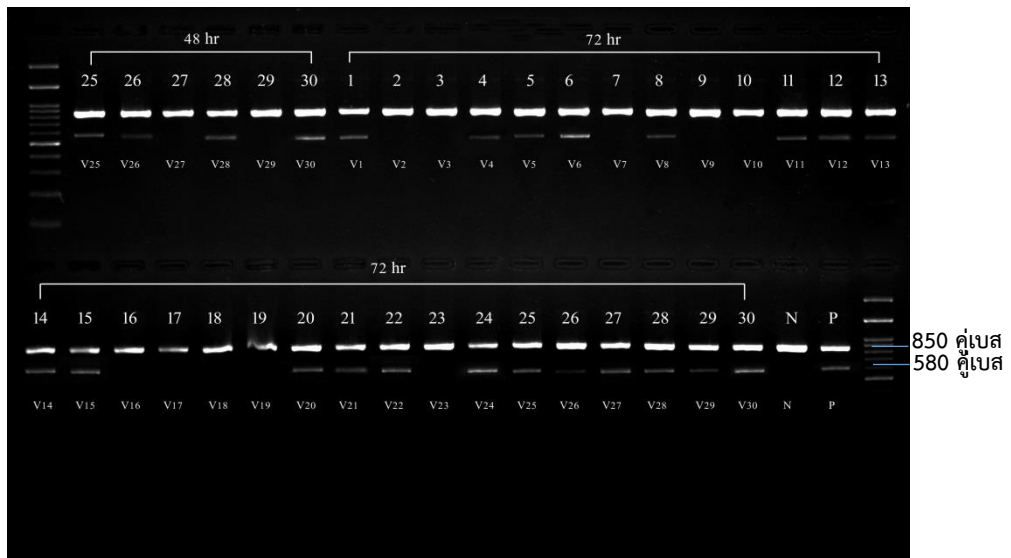


Figure 8 Electrophoresis of PCR products, Acquisition access period PepYLCV by *B. tabaci* biotype Asial at 72 hr, 100 bp DNA marker (1-30 : moco *B. tabaci*, V1-V30 : PepYLCV, N : Negative, P : Possitive (*B. tabaci* feed on Chilli infected by PepYLCV))

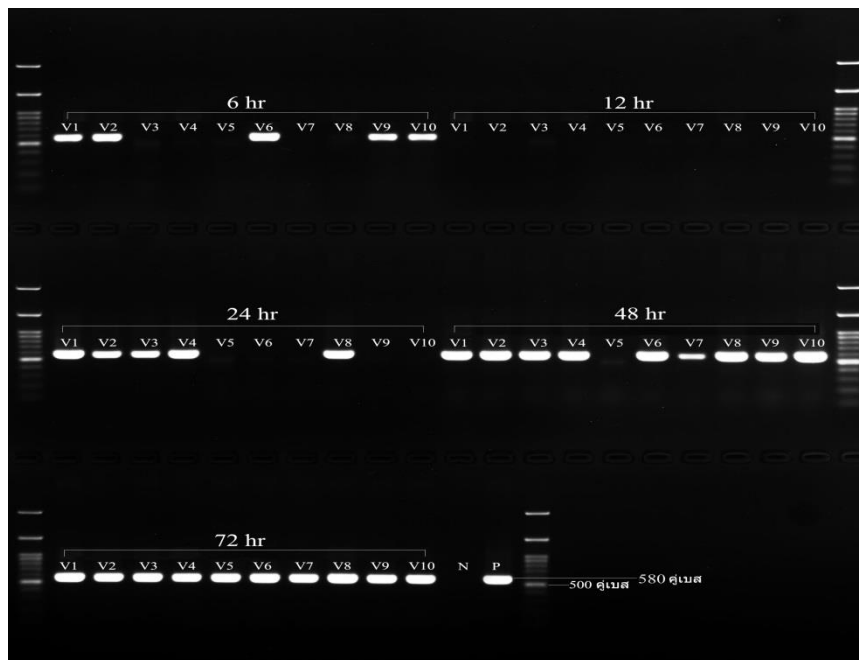


Figure 9 Electrophoresis of PCR products, Inoculation access period PepYLCV by *B. tabaci* biotype Asial at 6, 12, 24, 48 and 72 hr (V1-V10 : PepYLCV, N : Negative, P : Possitive (PepYLCV))

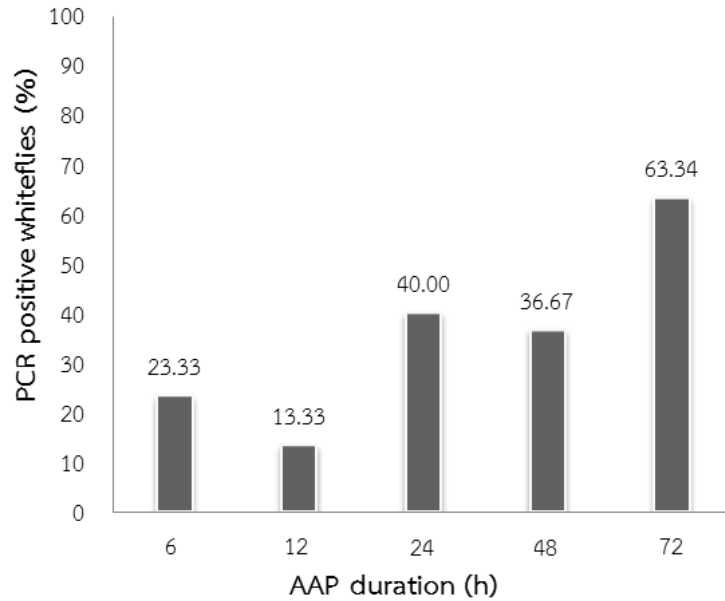


Figure 10 The effects of acquisition access period (AAP) on the proportion of PCR positive adults of *B. tabaci* Asial. Newly emerged whiteflies were allowed to feed on PepYLCV-infected chilli plants for 6, 12, 24, 48 and 72h, respectively, and 30 whiteflies from each group were collected for PCR tests

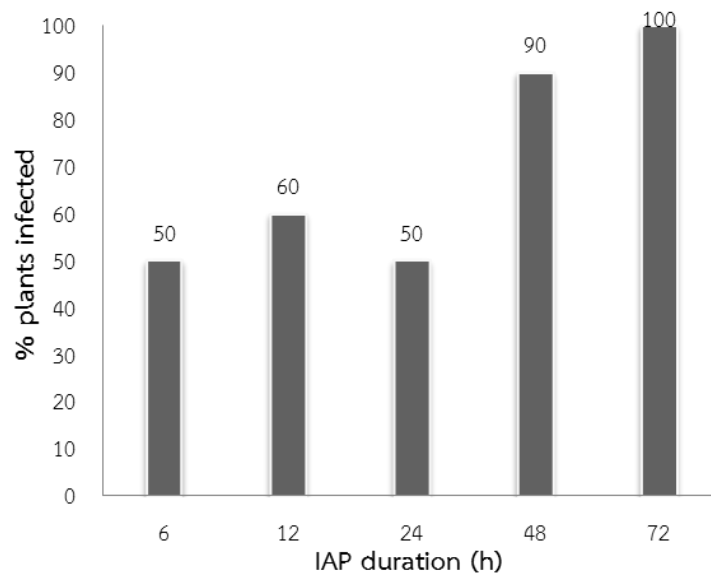


Figure 11 The effects of inoculation access period (IAP) of the vector *B. tabaci* Asial on the proportion of CCYV-infected cucumber plants. After feeding PepYLCV-infected chilli plants with 3 days, 30 whiteflies were placed on non-infected chilli leaves (3–4 leaf stage) with clip cages for 6, 12, 24, 48 and 72h, respectively. Ten plants were used for each treatment and detected with PCR after 30 days



Figure 12 Chilli ingested by PepYLCV transmission by *B. tabaci* biotype Asial

ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) ที่เป็นพาหะของเชื้อ

Polerovirus สาเหตุโรคเส้นใบเหลืองในพริก

Species of Aphid (Hemiptera: Aphididae) insect vectors of the
Polerovirus causing agent of pepper vein yellowing disease and
cucumber yellowing disease

เกศสุตา สนศิริ ภูวนารถ มณีโชติ จารุวัฒน์ แต่กุล ยุวรินทร์ บุญทบ
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Chilli (*Capsicum* sp.) is an economic crop in Thailand. It is widely planted throughout all regions. Pepper yellows disease caused by *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) is one of the most important plant viruses infecting pepper crop worldwide. The Aphid ((Hemiptera: Aphididae) is vector for virus transmission. The objective of this study is to investigate the relationship of the virus, aphids and host plants. A sampling of aphids on chilli plantations showing symptoms of pepper yellows disease was carried out from October 2017 to September 2019 in Kanchanaburi, Suphanburi, Ayutthaya, Tak and Nakhon Ratchasima provinces. 192 aphid samples were collected from the diseased fields and identified based on morphology and amplification of partial mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and nucleotide sequenced revealed two species including *Aphis gossypii* Glover and *Myzus persicae* (Sulzer). Transmission of PeVYV by *A. gossypii* from diseased chilli plant to healthy seedlings was successful. PeVYV virions were detected in aphids reached to 60% at 12 hr and 24 hr of acquisition access period (AAP). The PeVYV transmission efficiency of aphids was obtained 100% transmission efficiency at 24 hr of Inoculation access period (IAP) or much longer. The inoculated chilli developed the typical symptoms including interveinal yellowing and leaf upward within 14 - 30 days after inoculation.

Keywords : Chilli, Aphid, Transmission, Pepper vein yellows virus

รหัสการทดลอง 03-47-61-01-00-00-02-61

บทคัดย่อ

พริก (*Capsicum* sp.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ โรคเส้นใบเหลืองที่เกิดจาก *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตพริกในหลายประเทศ ที่มีเพลี้ยอ่อน (Aphid) (Hemiptera: Aphididae) เป็นแมลงพาหะถ่ายทอด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อทราบชนิดเพลี้ยอ่อนพาหะและชนิดของโรคพืชความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดโรกระหว่างชนิดของเพลี้ยอ่อนกับโรคพืชและพืชอาศัย โดยทำการศึกษาระหว่างเดือน ต.ค.60 – กย. 63 ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนศัตรูพริก ลักษณะของใบพริกที่แสดงอาการโรคเส้นใบเหลืองและโรคใบเหลือง ในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดละ 5 แปลง รวม 192 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่ได้มาจำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยา และจากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบเพลี้ยอ่อน 2 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover และเพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* (Sulzer) ผลการศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อและการถ่ายทอดเชื้อ PeVYV ของเพลี้ยอ่อน พบว่าที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการรับเชื้อ PeVYV ได้ดีที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาในการถ่ายทอดเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพริกจะแสดงอาการเส้นใบมีสีเหลือง บางครั้งขอบใบม้วนเข้าหากัน หลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อ 14-30 วัน

คำหลัก : เพลี้ยอ่อน โรคเส้นใบเหลือง พอร์โรไวรัส การถ่ายทอดโรค

คำนำ

พริก (*Capsicum* sp.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ เนื่องจากเป็นพืชอาหารที่คนนิยมบริโภคและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ สามารถสร้างอาชีพและรายได้จำนวนมากให้แก่เกษตรกร แต่ในการผลิตพืชดังกล่าวมักประสบปัญหาและอุปสรรคเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูเข้าทำลาย ทำให้ผลผลิตและคุณภาพลดลง ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด เพิ่มต้นทุนในการผลิต เพลี้ยอ่อน (Aphid) (Hemiptera: Aphididae) เป็นแมลงศัตรูสำคัญของทั้งพืชไร่และพืชผักหลายชนิด เช่น พริก พืชตระกูลแตง มันฝรั่ง และยาสูบ เป็นต้น ซึ่งสามารถทำลายใบพืชโดยทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชบริเวณใต้ใบ หรือส่วนอ่อนๆ เช่น ยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอก หลังการเข้าทำลายจะทำให้ใบหงิกงอ ร่วงหล่น ต้นแคระแกรน และขับถ่ายของเสียที่มีส่วนผสมของน้ำตาลที่เหลืองใช้ เรียกว่า มูลน้ำหวาน (honeydew) ซึ่งเป็นอาหารของมดและราดำ ราดำจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วปกคลุมใบ ใบจึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้อย่างเต็มที่ นอกจากจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชแล้วเพลี้ยอ่อนยังเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช เพลี้ยอ่อนที่พบในเขตร้อนและเขตอบอุ่นมีมากกว่า 200 ชนิด ที่เป็นพาหะนำเชื้อไวรัส (Brunt *et al.*, 1996; Nault 1997; พัชรินทร์ 2555) เพลี้ยอ่อนจัดเป็นแมลง

พาหะที่สำคัญเนื่องจากมีลักษณะเด่นคือ มีปากแบบแทงดูด (piercing sucking) สามารถถ่ายทอดอนุภาคไวรัสไปยังเซลล์พืช โดยที่ไม่ทำให้เซลล์พืชเสียหายมากนัก นอกจากนี้เพลี้ยอ่อนยังมีลักษณะเด่นที่ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายทอดโรคไวรัสดีกว่าแมลงอื่นๆ คือ เป็นแมลงที่สืบพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ ทำให้ประชากรเพลี้ยอ่อนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดการระบาดของเชื้อไวรัสเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาอันสั้น (พัชรินทร์, 2555)

เชื้อไวรัสในกลุ่ม *Polerovirus* จะทำให้ใบพืชมีอาการม้วนขึ้นเข้าหากันของขอบด้านข้าง สีซีดจาง โดยเฉพาะใบล่าง และกิ่งก้านใบมีการตั้งชูขึ้น ส่วนของต้นแคระแกร็น และอาจมีแผลเนื้อเยื่อตายแห้งตาย (necrosis) ในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารในส่วนของลำต้นและก้านใบ (Ryazantsev and Zavriev, 2009) การถ่ายทอดและการแพร่ระบาดของไวรัสชนิดนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์ได้ ดังนั้นเมื่อนำหัวพันธุ์ที่เป็นโรคไปปลูกจะมีส่วนอย่างมากที่ทำให้ผลผลิตลดลง ซึ่งเชื้อนี้ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีสัมผัส แต่สามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงพาหะจำพวกเพลี้ยอ่อน แบบ nonpersistent manner (Mayo *et al.* 2000; Dods *et al.*, 1983; Milne *et al.*, 1969; Nameth *et al.*, 1985) ซึ่งโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสนี้ไม่มีทางแก้ไขนอกจากการป้องกัน และวิธีการป้องกันกำจัดที่ได้ผลและมีประสิทธิภาพก็คือการป้องกันกำจัดแมลงพาหะที่จะนำเชื้อไวรัสมาปล่อยสู่พืช

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบชนิดของเพลี้ยอ่อนที่ระบาดในพื้นที่ปลูกพริกของประเทศไทย และสามารถใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาชนิดของเพลี้ยอ่อนที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสมาสู่พริก เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาหาแนวทางการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ รวมถึงการเฝ้าระวัง การพยากรณ์การระบาด ตลอดจนการวางแผนในการจัดการกรณีที่มีการตรวจพบการระบาดของเชื้อไวรัสในพริกและแตงกวาต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเพลี้ยอ่อน เช่น ขวดเก็บตัวอย่าง ขวดน้ำยาดอง ปากคีบ พู่กัน ถังกระดาษสีน้ำตาล และเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวรเพลี้ยอ่อน เช่น เข็มปลายแหลม เข็มปลายงอ ปากคีบปลายแหลม เพลท โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10%, แอลกอฮอล์ 70 – 95% กรดแกลเซียลอะซิติก โคลฟอย คานาดาบาลซัม แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วสไลด์ ตู้อบสไลด์ และกล่องใส่สไลด์
3. สารเคมีในการศึกษาสารพันธุกรรม เช่น Chelex, TBE nuclease free water, PCR master mix, DNA template, agarose gel, RedSafe loading dye, DNA Marker ladder
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope (Olympus รุ่น SZ 51) compound microscope (Olympus รุ่น CX 41) กล้องถ่ายภาพ (Leica M165C) และอุปกรณ์ถ่ายภาพ (camera lucida)
5. เอกสารประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยอ่อนของ Blackman and Eastop (2000)

วิธีการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนศัตรูพริก

เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนจากแปลงปลูกพริกที่แสดงอาการของเส้นใบเหลืองจากไวรัสในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และนครราชสีมา จำนวน 25 แปลง โดยทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่มสำรวจทั่วแปลง ตาม ISPM No.6 (FAO, 2006) (ภาพที่ 1) แบ่งตัวอย่างเป็นสามส่วน ส่วนที่หนึ่งนำไปศึกษาชนิดและ DNA barcode ส่วนที่สองนำไปตรวจหาเชื้อ *Polerovirus* ส่วนที่สามนำไปศึกษาการถ่ายทอดโรคระหว่างเพลี้ยอ่อนกับเชื้อ *Polerovirus* และพืชอาศัยอื่น บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยอ่อน ส่วนของพืชที่พบตัวอย่าง ลักษณะการทำลาย ลักษณะอาการของพืชที่เป็นโรค ปริมาณการพบ ปัจจัยแวดล้อม พืชปลูกข้างเคียง สภาพแวดล้อมทั้งในและนอกแปลง วัน / เดือน / ปี สถานที่ พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง รวมทั้งบันทึกโดยการถ่ายภาพ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก

นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยที่ได้จากการสำรวจมาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Blackman and Eastop (2000) นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดกับเอกสารแนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อน ลักษณะสำคัญของเพลี้ยอ่อนที่ใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่ ส่วนหัว; ร่องหนวดและร่องบริเวณหน้าผาก ความสั้นยาวของหนวด จำนวนปล้องและความยาวส่วนปลายของปล้องสุดท้าย ความยาวของปาก ส่วนอก; ความยาวของปลายขาคู่หลังและหนามบนน่องขา ส่วนท้อง; จะมีตุ่มขนาดเล็กปรากฏบริเวณปล้องท้องปล้องที่ 1 และ 7 โดยเฉพาะปล้องที่ 7 ตำแหน่งของตุ่มขนาดเล็กที่ปรากฏอยู่ด้านบนหรือด้านล่างรูหายใจใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกระดับสกุล แต่ในเพลี้ยอ่อนบางชนิดไม่ปรากฏตุ่มดังกล่าว วาดรูปแสดงลักษณะต่างๆที่สำคัญ บันทึกรายละเอียดต่างๆของเพลี้ยอ่อนที่สำรวจพบ เช่น ลักษณะ รูปร่าง ขนาด สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนในแต่ละระยะ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์เพลี้ยอ่อนแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์ และจัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาเก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลเพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

การศึกษาลำดับพันธุกรรม (DNA Barcode) ของเพลี้ยอ่อน

นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% มาสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) โดยใช้ชุดสกัด Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit ของบริษัท Favorgen Biotech Corp. ทำการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน mtCOI ของเพลี้ยอ่อน (LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' และ HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGCCAAAAAATCA-3' (Hebert *et al.*, 2003) และเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เป้าหมาย โดยใช้ส่วนผสมของ MyTag HS Red DNA Polymerase (Bioline, Australia) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 25 ไมโครลิตร นำส่วนผสมของ MyTag HS Red DNA Polymerase ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม (PCR machine)

ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยหยอด PCR product ลงใน 2% agarose gel ใน 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 45 นาที ทำให้ PCR product มีความบริสุทธิ์ด้วย Isolate II PCR and Gel kit; Cat No. BIO-52060 ทำการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) เพื่อตรวจหาลำดับเบสของ ดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่บริสุทธิ์ของเพลี้ยอ่อนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประเทศเกาหลีใต้ นำข้อมูลของดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสเพลี้ยอ่อนที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรหัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยอ่อนที่อยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ รวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้อง

การศึกษาวงจรชีวิตเพลี้ยอ่อนในพริก

นำนำตัวเต็มวัยเพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงปลูกพริก มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อน จำนวน 200 ตัว มาเพาะเลี้ยงรวมกันในกล่องพลาสติกขนาด 14 x 23 x 7 เซนติเมตร ให้ใบพริกเป็นอาหารโดยใช้สำลีชุบน้ำพันรอบก้านใบเพื่อรักษาความสด เมื่อตัวเต็มวัยออกลูกทำการแยกตัวอ่อนโดยใช้ฟุ้งกันเบอร์ศูนย์เขี่ยเพลี้ยอ่อนแต่ละตัวไปเพาะเลี้ยงใน petri dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 2 เซนติเมตร รองด้วยกระดาษกรองที่มีความชื้น petri dish ละ 1 ตัว และใส่ใบพริกเพื่อเป็นอาหาร ทำการเปลี่ยนใบพริกทุก 2 วัน สังเกตการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิต บันทึกข้อมูลจำนวนเพลี้ยอ่อนที่รอดชีวิตทุกวันจนกระทั่งเพลี้ยอ่อนเป็นตัวเต็มวัย สังเกตพฤติกรรมและระยะเวลาลอกคราบในแต่ละวัย ทำการบันทึกข้อมูลระยะตัวอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย รวมถึงพฤติกรรมในแต่ละระยะ (ภาพที่ 2)

ศึกษาชนิดเชื้อ *Polerovirus* ในพริกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ทำการสกัด DNA จากต้นพริกที่ได้รับการถ่ายเชื้อ *Polerovirus* ด้วยปฏิกิริยา One step RT-PCR สังเคราะห์ยีน CP บางส่วนของเชื้อ *Polerovirus* จากอาร์เอ็นเอรวมที่เตรียมได้ โดยไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ยีน CP บางส่วนของเชื้อไวรัสในจีโนม *Polerovirus* ประกอบด้วยไพรเมอร์ Pol3870F (5'-YTVGGTTTYAAAGTCGAGG-3') (Sharman *et al.*, 2015) และไพรเมอร์ AS3 (5'CACGCGTCIACC TATTTIGGRTTITG-3') (Abraham *et al.*, 2008) โดยได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 360 คู่เบส และใช้ส่วนผสมของ one step RT-PCR (QIAGEN) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย

Nuclease-free water	11	ไมโครลิตร
5x buffer	4	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
10 pmole Pol3870F	0.5	ไมโครลิตร

10 pmole AS3	0.5	ไมโครลิตร
enzyme mix	1	ไมโครลิตร
RNA template	2	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

1) First strand synthesis	50 °C	30 นาที
Predenaturation	94 °C	15 นาที
2) Three step-cycling 35 cycles		
Denaturation	94 °C	20 วินาที
Annealing	55 °C	20 วินาที
Extension	72 °C	30 วินาที
3) Final extension	72 °C	5 นาที

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม Redsafe Solution ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation

การโคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

แยก DNA ออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นตรวจสอบขนาดและปริมาณ DNA ที่ได้ ด้วย 1% agarose gel electrophoresis แล้วเชื่อมต่อ DNA เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega) โดยเติม DNA 150 นาโนกรัม, T4 DNA ligase buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, pGEM-T easy vector 50 นาโนกรัม และ T4 DNA ligase 3 Units รวมปริมาตรสาร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 16 °C นานข้ามคืน นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ JM109 โดยใช้วิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของเชื้อ *Polerovirus* ด้วยวิธี blue-white selection แล้วตรวจสอบโคลนของพลาสมิดสายผสมที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาวจำนวน 10 โคโลนีและสีฟ้า 1 โคโลนี มาผสมน้ำปริมาตร 2 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน CP บางส่วนของเชื้อ *Polerovirus*

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA จากปฏิกิริยา PCR มาทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจะนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Polerovirus* ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีน CP ด้วยโปรแกรม Clustal

Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของเชื้อไวรัสกลุ่ม *Poliovirus* ชนิดต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013)

การศึกษาความสัมพันธ์ของจำนวนวันที่รับเชื้อ จำนวนตัว และจำนวนวันที่ถ่ายถอดเชื้อของเพลี้ยอ่อนกับเชื้อไวรัส PeVYV ในพริก

ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพลี้ยอ่อนที่บริสุทธิ์ เตรียมต้นกล้าพริกปลอดโรค และต้นพริกที่เป็นโรคเพื่อเป็นแหล่งของไวรัส หลังจากนั้นจะนำเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากพริกที่เป็นโรคเส้นใบเหลืองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3) และทำการย้ายเพลี้ยอ่อนให้ดูดกินต้นกล้าพริกปกติ เมื่อต้นพริกแสดงอาการเส้นใบเหลือง นำส่วนของใบไปตรวจสอบหาเชื้อ และใช้ต้นพริกที่มีเชื้อเป็นแหล่งของไวรัสในการทดสอบการถ่ายทอดโรค

การศึกษาอัตราและระยะเวลาในการรับเชื้อ นำเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัย มาปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพริกที่เป็นโรคเส้นใบเหลือง ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ตัว) เมื่อครบกำหนดเวลานำเพลี้ยอ่อนมาตรวจสอบหาเชื้อ PeVYV ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์

การศึกษาอัตราและระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อ นำเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพริกที่มีเชื้อ PeVYV เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้เพลี้ยอ่อนจำนวน 20 ตัว ในต้นพริกปลอดโรค ที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 10 ซ้ำ) เมื่อครบกำหนดเวลา กำจัดเพลี้ยอ่อนโดยการพ่นสารเคมีกำจัดแมลง นำต้นพริกมาเก็บไว้ในกรงป้องกันแมลงและสังเกตระยะเวลาที่ต้นพริกแสดงอาการของโรค บันทึกลักษณะอาการโรคที่ปรากฏ ตรวจสอบหาเชื้อ PeVYV ในใบพริกด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพีซีอาร์

เวลาและสถานที่

เวลา	ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563
สถานที่	- แหล่งปลูกพริกในจังหวัด สุพรรณบุรี กาญจนบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และนครราชสีมา - ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา และ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาของเพลี้ยอ่อน

ผลการจำแนกชนิดเพลี้ยอ่อนที่ได้จากการเก็บรวบรวมบนต้นพริก ในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดละ 5 แปลง รวม 192 ตัวอย่าง โดยนำเพลี้ยอ่อนมาจัดทำสไลด์ถาวรเพื่อจัดจำแนกชนิด จากการวินิจฉัยชนิดพบว่า 190 ตัวอย่างเป็น

เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover คิดเป็น 98.96 เปอร์เซ็นต์ และ 2 ตัวอย่าง เป็นเพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* (Sulzer) คิดเป็น 1.04 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะสัณฐานวิทยาของเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลักษณะของลำตัวรูปไข่ ยาวเรียวไปทางส่วนหัว ขนาดลำตัวยาว 1.30-1.58 มิลลิเมตร ลำตัวมีสีเหลือง สีเหลืองอมเขียว ไปจนถึงเขียวเข้ม สีของลำตัวเปลี่ยนแปลงตามพืชอาหาร ส่วนหัว (head) มีขนาดเล็ก หน้าผาก (vertex) โคง ร่องหนวด (antennal tubercle) ไม่พัฒนา ตา (eyes) มีสีน้ำตาลดำ หนวด (antenna) มีจำนวน 6 ปล้อง มีความยาวน้อยกว่าลำตัว หนวดปล้องแรก (scape) สีเหลืองอมน้ำตาล หนวดปล้องที่ 2 (pedicel) สีจางลง หนวดปล้องที่ 3, 4, 5 และ 6 มีสีเหลืองแกมขาว หนวดปล้องที่ 6 ส่วนของ processus terminalis ยาวกว่าส่วนฐานน้อยกว่า 3.5 เท่า มีปากแบบเจาะดูด (piercing-sucking type) อยู่ด้านใต้ส่วนหัวมี 5 ปล้อง ขา (leg) มีสีขาอมเหลือง ตอนปลายของต้นขา (femur) ที่ต่อกับหน้าแข้ง (tibia) สีเข้มขึ้น ปลายหน้าแข้งที่ต่อกับเท้า (tarsus) และเท้ามีสีน้ำตาลเข้มหรือดำ เท้าปล้องแรกและเล็บ (claw) สีดำ ท่อเรียวยาวที่ตั้งอยู่ปลายท้องด้านบนบริเวณปล้องที่ 5 และ 6 (siphunculi) มีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ยาวกว่า ส่วนหาง (cauda) ซึ่งมีสีอ่อน มีขน 4-7 เส้น มีทั้งแบบมีปีกและไม่มีปีก เป็นเพลี้ยอ่อนที่มีพืชอาหารกว้างมาก พบเป็นศัตรูของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด มีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก ประเทศไทยพบระบาดทั่วไปในแหล่งปลูกพืชทั่วประเทศ (ภาพที่ 4) สำหรับเพลี้ยอ่อนยาสูบ *M. persicae* เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลำตัวยาว 1.68 – 1.84 มิลลิเมตร ตัวอ่อนที่ออกมาใหม่ๆ มีขนาดเล็กมากสีชมพูอ่อนปนเหลือง เมื่อโตขึ้นสีเหลืองอ่อน สีเหลืองอมเขียว หัวและหนวดมีสีเหลืองอ่อน หนวดมี 6 ปล้อง ความยาวเท่ากับลำตัว ปากยาวถึงโคนขาคู่กลาง ไชฟิงคูไลยาว ส่วนหางยาวรูปร่างคล้ายนิ้ว ไชฟิงคูไลและส่วนหาง สีจางใส มีพืชอาหารได้แก่ พริก ยาสูบ มะเขือเทศ ผักกาด กะหล่ำดอก คื่นช่าย ข้าว งาม ถั่วต่างๆ และมันฝรั่ง เป็นต้น และมีเขตการแพร่กระจายทั่วโลก (ภาพที่ 5)

การศึกษาชีววิทยาและวงจรชีวิตในห้องปฏิบัติการได้คัดเลือกเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* มาทำการศึกษาในครั้งนี้เนื่องจากพบมากถึง 98.96 เปอร์เซ็นต์ และพบทุกจังหวัดที่ทำการเก็บรวบรวม ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่า เพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* สามารถขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ตัวเต็มวัยสามารถออกลูกได้โดยไม่ต้องผสมพันธุ์ โดยมีการลอกคราบ 4 ครั้ง ตัวอ่อน (nymph) มี 4 ระยะ ตัวอ่อนออกมาใหม่ๆมีขนาดเล็กมากสีเหลืองจางจนเกือบขาว เมื่อโตขึ้นมีสีเขียวอมเหลืองจนถึงสีเขียวเข้ม ส่วนหัวมีสีดำ และบริเวณส่วนท้องมีจุดสีเขียวเข้มกระจายอยู่ ระยะตัวอ่อน 6 - 7 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุขัย 10 - 15 วัน ตัวแม่ 1 ตัว สามารถออกลูกได้ 39 - 78 ตัว วงจรชีวิตจากไข่จนถึงตัวเต็มวัยตาย 12-30 วัน ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก

การศึกษาลำดับพันธุกรรม (DNA Barcode) ของเพลี้ยอ่อน

จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI เปรียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยอ่อนที่อยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมฐานข้อมูลทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกเพื่อยืนยันความถูกต้อง ผลการวินิจฉัยชนิด พบว่า 190 ตัวอย่าง คิดเป็น 98.96 เปอร์เซ็นต์ เป็นเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* ซึ่งพบทุกจังหวัดที่ทำการเก็บ

รวบรวมตัวอย่าง (ตารางที่ 1) และจำนวน 2 ตัวอย่าง เป็นเพลี้ยอ่อนยาสูบ *M. persicae* คิดเป็น 1.04 เปอร์เซ็นต์ พบเฉพาะที่จังหวัดกาญจนบุรี (ตารางที่ 2)

การตรวจสอบเชื้อ PeVYV ในพริกที่เป็นโรคใบเส้นเหลือง

1. ตัวอย่างพริกเป็นโรคใบเส้นเหลือง

ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการอาการใบเหลืองคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร เส้นใบเขียว และใบเสียวรูปทรง จากแปลงปลูกพริกในจังหวัด กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ตาก นครราชสีมา และ พระนครศรีอยุธยา จังหวัดละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค One Step RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน CP บางส่วน (3' end of CP gene) ของเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Polerovirus* ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสขนาด 370 คู่เบส (Sharman *et al.*, 2015) จากจังหวัดกาญจนบุรี 1 ตัวอย่าง และสุพรรณบุรี 2 ตัวอย่าง (ภาพที่ 6) ส่วนตัวอย่างพริกจากจังหวัด ตาก นครราชสีมา และพระนครศรีอยุธยา ปรากฏว่าไม่พบตัวอย่างที่เป็นโรคใบเส้นเหลือง

ลักษณะอาการของพริกที่ตรวจพบเชื้อ PeVYV ครั้งนี้พบว่ามีอาการเหมือนกับที่รายงานในต่างประเทศ เช่น อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน (Knierim *et al.*, 2013) ถึงแม้ตัวอย่างพริกที่พบในจังหวัดพระนครศรีอยุธยาและกาญจนบุรี จะมีอาการเหมือนกันแต่ไม่พบว่าเป็นโรคใบเส้นเหลือง เนื่องจากนี้ลักษณะอาการใบเหลืองพริกอาจเกิดจากการขาดธาตุอาหารหรือสามารถเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น เชื้อ CMV หรือเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Potyvirus* และ *Crinivirus* เป็นต้น (Tsai *et al.*, 2008)

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน CP

จากการทำวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน CP (P3 ORF) ของเชื้อ PeVYV ทั้ง 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตกาญจนบุรี (KBR) และไอโซเลตสุพรรณบุรี (SBR) พบว่า ยีน CP ของทั้ง 2 ไอโซเลต มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 206 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 22.94 - 22.97 กิโลดาลตัน จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 7) และกรดอะมิโนของโปรตีน CP (ภาพที่ 8) พบว่าเชื้อ PeVYV ทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99% - 99.5% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเชื้อ PeVYV ที่พบในต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น อิสราเอล จีน ออสเตรเลีย สเปน มาเลเซีย และอินโดนีเซีย พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระดับ 92.9% - 98.9% และกรดอะมิโนที่ระดับ 95.1% - 100% และการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยจับกลุ่มใกล้ชิดกันและแยกออกจากเชื้อไอโซเลตอื่นที่พบในต่างประเทศ (ภาพที่ 9) และยังคงพบว่าทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยยังจับกลุ่มอยู่ร่วมกับไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในเอเชีย (Asian population) เช่นกับเดี่ยวรายงานของ Liu *et al.* (2015)

การศึกษาอัตราและระยะเวลาการรับเชื้อ และการถ่ายทอดเชื้อ PeVYV ของเพลี้ยอ่อน

ผลการศึกษาระยะเวลาต่อการรับเชื้อ พบว่าที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการรับเชื้อ PeVYV เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ (6 ตัว) 60 เปอร์เซ็นต์ (18 ตัว) 60

เปอร์เซ็นต์ (18 ตัว) 46.67 เปอร์เซ็นต์ (14 ตัว) และ 56.67 เปอร์เซ็นต์ (17 ตัว) ตามลำดับ และการใช้เทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจพบเชื้อในตัวเพลี้ยอ่อน 1 ตัวได้

ผลการศึกษาระยะเวลาต่อการถ่ายทอดเชื้อ พบว่าที่ระยะเวลา 6 12 24 48 และ 72 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อ PeVYV เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ 50 เปอร์เซ็นต์ 100 เปอร์เซ็นต์ 100 เปอร์เซ็นต์ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และต้นพริกจะแสดงอาการเกิดโรค หลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส 14 - 30 วัน โดยมีลักษณะอาการใบเส้นเหลืองทั่วทั้งใบ บางครั้งขอบด้านข้างของใบม้วนเข้าหากัน โดยเริ่มแสดงอาการจากใบล่างขึ้นไปโดยอด ส่งผลให้ต้นแคระแกรน (ภาพที่ 10)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เพลี้ยอ่อนในพื้นที่ปลูกพริกจังหวัดจันทบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดละ 5 แปลง รวม 192 ตัวอย่าง จำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัย และการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mtCOI ขนาดประมาณ 650 นิวคลีโอไทด์ สามารถจำแนกเพลี้ยอ่อนได้ 2 ชนิด คือ เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover และเพลี้ยอ่อนยาสูบ *Myzus persicae* (Sulzer) เพลี้ยอ่อนฝ้ายมีระยะตัวอ่อน (nymph) 4 ระยะ ระยะตัวอ่อน 6 - 7 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุขัย 10 - 15 วัน ตัวแม่ 1 ตัว สามารถออกลูกได้ 39 -78 ตัว วงจรชีวิตจากไข่จนถึงตัวเต็มวัยตาย 12-30 วัน ตัวเต็มวัยมีทั้งพวกมีปีกและไม่มีปีก

การตรวจสอบเชื้อ PeVYV ในพริกที่เป็นโรคเส้นใบเหลืองไอโซเลตกาญจนบุรี (KBR) และไอโซเลตสุพรรณบุรี (SBR) ยีน CP ของทั้ง 2 ไอโซเลต มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ แปรรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 206 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 22.94 - 22.97 กิโลดาลตัน และเมื่อทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของโปรตีน CP เชื้อ PeVYV ทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยมีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99% - 99.5% ตามลำดับ การวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตของไทยจับกลุ่มใกล้ชิดกัน อยู่ร่วมกับไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในเอเชีย (Asian population) แต่แยกออกจากเชื้อไอโซเลตอื่นที่พบในต่างประเทศ

ผลการศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อและการถ่ายทอดเชื้อ PeVYV ของเพลี้ยอ่อน พบว่าที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการรับเชื้อ PeVYV ได้ดีที่สุด คือ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระยะเวลาในการถ่ายทอดเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงขึ้นไป สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพริกจะแสดงอาการเส้นใบมีสีเหลือง บางครั้งขอบใบม้วนเข้าหากัน หลังจากได้รับการถ่ายทอดเชื้อ 14-30 วัน

เพลี้ยอ่อน *A. gossypii* เป็นแมลงที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดโรค และเป็นแมลงที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (parthenogenesis) ทำให้ประชากรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งหากมีเพลี้ยอ่อนชนิดนี้เข้าทำลายพริกอาจก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรวดเร็ว ดังนั้นควรมีการติดตามและเฝ้าระวังเพลี้ยอ่อนในแปลงปลูกพริก สำรวจพืชอาศัยอื่นของเพลี้ยอ่อน และเชื้อ PeVYV ซึ่งอาจจะเป็นแหล่ง

อาศัยของแมลงและโรค ปลุกพืชหมุนเวียนหรือสลับที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* และเชื้อ PeVYV เพื่อลดการระบาด และควรมีการศึกษาชนิดและประสิทธิภาพของตัวห้ำที่จำเพาะต่อเพลี้ยอ่อน *A. gossypii* เพื่อกำจัดการถ่ายทอดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ ผชช. พรพิมล อธิปัญญาคม ผชช. พิเชฐ เซาว์พัฒนวงศ์ ผอ. วัลลภมา โฆษิตเจริญกุล ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษางานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี และขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- พัชรินทร์ คุรุทเมือง. 2555. เพลี้ยอ่อนแมลงพาหะนำโรคพืช. ภาควิชากีฏวิทยา และโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่. วารสารแก่นเกษตร 40: 197-202.
- Abraham, A., Varrelmann, M. and Vetten, H.J. 2008. Molecular evidence for the occurrence of two new luteoviruses in cool season food legumes in Northeast Africa. *Afr. J. Biotechnol.* 7(4): 414-420.
- Blackman, R. L. and V. F. Eastop. 2000. *Aphida on the World's crops an Identification and Information Guide.* John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England.
- Brunt, A. A., K. Chrabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs, L. Watson, and E. J. Zurcher. 1996. Plant viruses online: description and lists from the VIDE database. Version: 20 August 1996. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>. Accessed 21 Mar. 2011.
- Dodds, J. A., J.G. Lee, S.T. Nameth, and F.F. Laemmlen. 1983. Aphid- and whitefly-transmitted viruses in Imperial County, California. *Phytopathology* 74:221-225.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S.L. Ball and J.R. Eward. 2003. Biological identifications through DNA bar-codes. *Proc. Roy. Soc. B*, 270: 313-321.
- Knierim, D., Tsai, W.-S., Kenyon, L., 2013. Analysis of sequences from field samples Reveals the presence of the recently described *Pepper vein yellows virus* (genus *Polerovirus*) in six additional countries. *Arch. Virol.* 158(6), 1337-1341.
- Liu, M., Liu, X., Li, X., Zhang, D., Dai, L. and Tang, Q. 2015. Complete genome sequence of a Chinese isolate of pepper vein yellows virus and evolutionary analysis based on the CP, MP and RdRp coding regions. *Arch. Virol.* 161(3):677-683.

- Mayo, M., E. Ryabov, G. Fraser and M. Taliansky. 2000. Mechanical transmission of Potato leaf roll virus. *J. Gen. Virol.* 81: 2791-2795.
- Milne, K. S., R.G. Grogan, and K.A. Kimble. 1969. Identification of viruses infecting cucurbits in California. *Phytopathology* 59:819-828.
- Nameth, S. T., J.A. Dodds, A.O. Paulus, and A.N. Kishaba. 1985. Zucchini yellow mosaic virus associated with severe diseases of melon and watermelon in southern California desert valleys. *Plant Dis.* 69:785-788.
- Nault, L.R. 1997. Arthropod transmission of plant viruses-a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 521-541
- Ryazantsev, D.Yu. and S.K., Zavriev. 2009. An efficient diagnostic method for the identification of potato viral pathogens. *Mol. Biol.* 43: 558 – 567.
- Sharman, M., Lapbanjob, S., Sebunruang, P. Belot, J.-L., Galbieri, R., Giband, M. and Suassuna, N. 2015. First report of *Cotton leafroll dwarf virus* in Thailand using a species-specific PCR validated with isolates from Brazil. *Australasian Plant Dis. Notes* 10:24.
- Tsai, W. S., Huang, Y. C., Zhang, D. Y., Reddy, K., Hidayat, S. H., Srithongchai, W. 2008. Molecular characterization of the CP gene and 3'UTR of *Chilli veinal mottle virus* from South and Southeast Asia. *Plant Pathol.* 57:408–416.

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยอ่อน *Aphis gossypii* Glover ที่พบในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี ตาก พระนครศรีอยุธยา และ นครราชสีมา

<p>>กาญจนบุรี</p> <p>CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTA TAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATA TTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCAC CTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAA TTAATTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATCAAATTCCTCTATTCCATGATCAATTTAATTACAGCTAT ATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC</p>
<p>>สุพรรณบุรี</p> <p>CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTA TAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATA TTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCAC CTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAA TTAATTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATCAAATTCCTCTATTCCATGATCAATTTAATTACAGCTAT ATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC</p>
<p>>ตาก</p> <p>CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTA TAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATA TTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCAC CTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAA TTAATTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATCAAATTCCTCTATTCCATGATCAATTTAATTACAGCTAT ATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC</p>
<p>>พระนครศรีอยุธยา</p> <p>CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTA TAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATA TTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCAC CTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAA TTAATTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATCAAATTCCTCTATTCCATGATCAATTTAATTACAGCTAT ATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC</p>
<p>>นครราชสีมา</p> <p>CGATTAGAATTAAGTCAAATTAATTCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTAATTGTTACAATTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTTA TAACTATACCAATCGTTATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTAATTCTATAATAATAGGATGTCCAGATATATCTTTCCACGACTAAATAATA TTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGCAGATTTATAATTAATAACGGAACAGGAACAGGATGAACTATTTATCCAC CTTTATCAAATAATATTGCTCATAATAATTTTCAGTAGACTTAACTATTTTTCCCTACATTTAGCAGGTATCTCATCAATTTTAGGAGCAA TTAATTCATCTGACTATCTTAAATATAATACCTAATAATATAAAAATTAATCAAATTCCTCTATTCCATGATCAATTTAATTACAGCTAT ATTATTAATTTTATCCTTACCTGTATTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTTAAATACATCATTTTTTGATCC</p>

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยอ่อนยาสูบ
Myzus persicae (Sulzer) ที่พบในจังหวัดกาญจนบุรี

>กาญจนบุรี

```
TTAGAATCTTAATTCGTCCTGAATTAAGACAAATTAATCAATTATTAATAATAATCAATTATATAATGTTATTGTTACAATTCACGCTTTTAT
TATAATTTTTTTATAACAATACCAATTGTTATTGGTGGATTGGAAATGGTTAATTCCTATAATAATAGGATGTCCTGATATATCTTTCCC
ACGATTAATAACATTAGATTCTGATTATTACCACCCTCATTAAATAATAAATTTGTAGTTTTTAATAATAATGGAACAGGAACAGGATG
AACTATTTACCACCCTTATCAAAATAATATTGCACATAATAATATTTTCAGTTGATTTAACTATTTTTTCATTACATTTAGCAGGAATTCATC
AATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTGTACAATCTTAAATATAATACCAAACAATATAAAATTAACCAAAATCCCTTTATTTCCATGATCAAT
TTTAATTACAGCTATTTTATTAATTTTATCTTTACCTGTTCTAGCAGGTGCTATTACAATATTATTAACGATCGTAATTTAAATA
```



ภาพที่ 1 สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนและใบพริกที่แสดงอาการโรคเส้นใบเหลือง



ภาพที่ 2 ทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) และศึกษาชีววิทยาและวงจรชีวิต
เพลี้ยอ่อน *A. gossypii* Glover ในห้องปฏิบัติการ

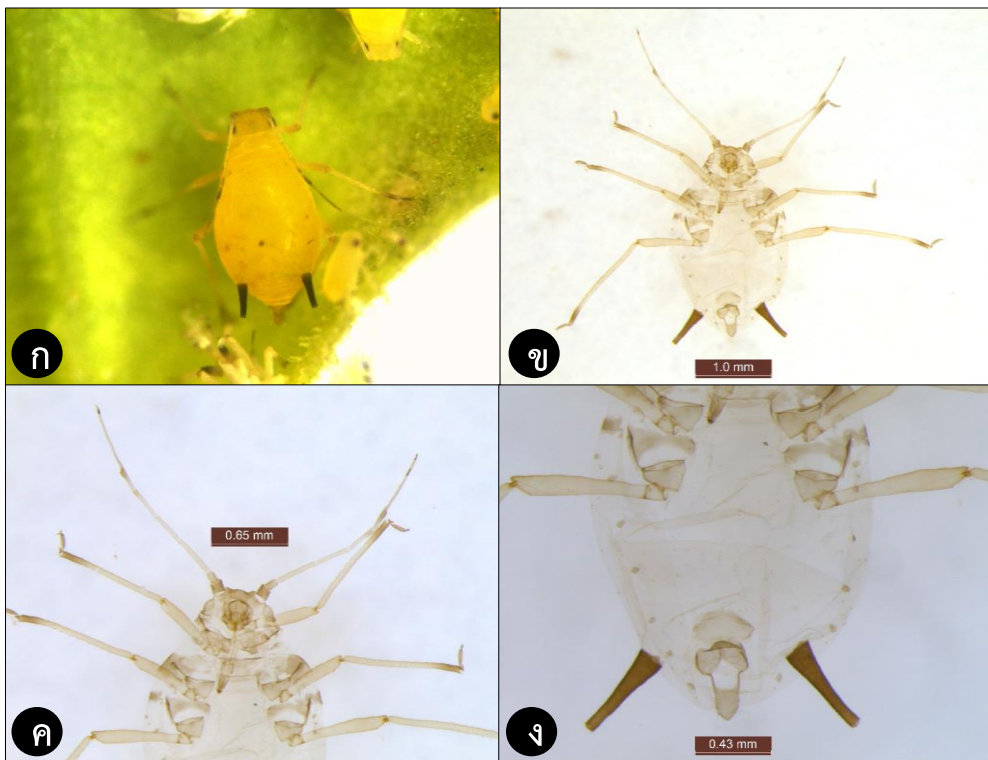


ภาพที่ 3 ทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Potterovirus* โดยเพลี้ยอ่อน



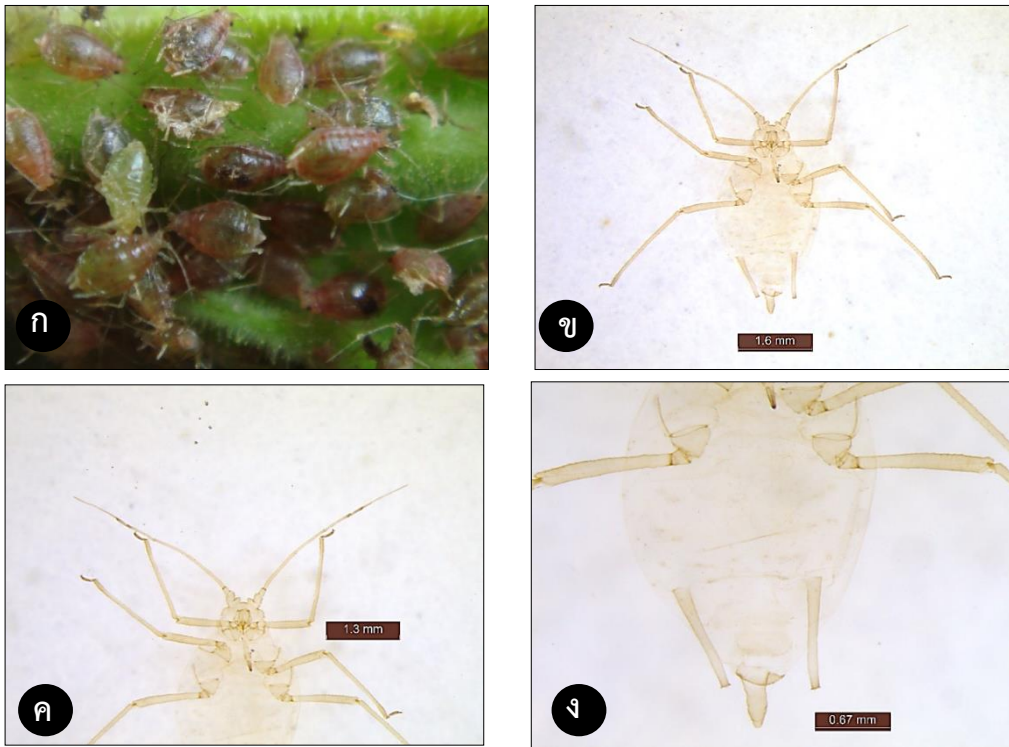
ภาพที่ 4 เพลี้ยอ่อนที่เก็บรวบรวมได้จากแปลงพริก

- ก.) ตัวเต็มวัยเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* Glover ข.) *A. gossypii* เมื่อนำไปทำสไลด์ถาวร
 ค.) ตัวเต็มวัยเพลี้ยอ่อนยาสูบ *M. persicae* ง.) *M. persicae* เมื่อนำไปทำสไลด์ถาวร



ภาพที่ 4 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii*

- ก.) ตัวเต็มวัย ข.) ตัวเต็มวัยเมื่อนำไปทำสไลด์ถาวร ค.) ส่วนหัว ง.) ส่วนหาง และไซฟิงคูไล



ภาพที่ 5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเพลี้ยอ่อนยาสูบ *M. persicae*

ก.) ตัวเต็มวัย ข.) ตัวเต็มวัยเมื่อนำไปทำสไลด์ถาวร

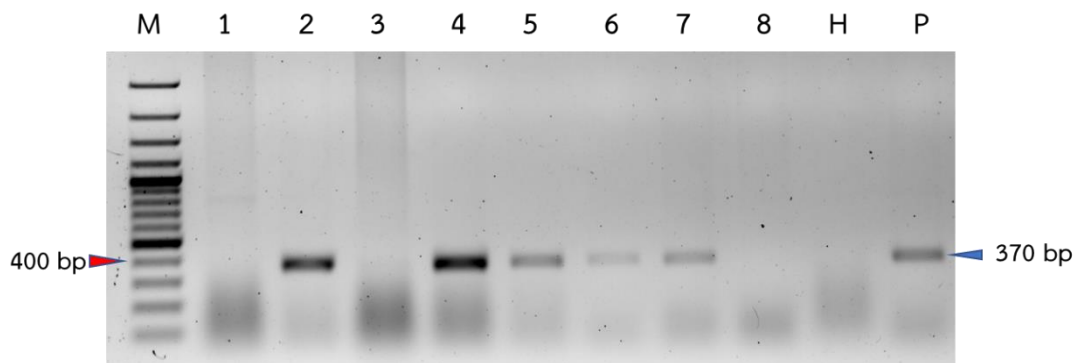
ค.) ส่วนหัว ง.) ส่วนหาง และไซฟิงคูไล



ภาพที่ 6 วงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii*

ก) ตัวเต็มวัย ข) ตัวอ่อนวัย 1 ค) ตัวอ่อนวัย 2

ง) ตัวอ่อนวัย 3) ตัวอ่อนวัย 4



ภาพที่ 6 แอบริเอ็นเอของยีน CP บางส่วน มีขนาด 370 คู่เบส (ลูกศรสีน้ำเงิน) ที่เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค One Step RT-PCR

M : 100 bp DNA ladder (Biotechrabbit, Germany)

1-3 : ตัวอย่างพริกในแปลงจังหวัดกาญจนบุรี

4 และ 8 : ตัวอย่างพริกในแปลงจังหวัดสุพรรณบุรี

5-7 : ตัวอย่างพริกที่พบในกรุงเทพมหานคร

H : พริกปกติ (Negative control)

P : ตัวควบคุมเชิงบวก (Positive control)

KBR-CP	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC	60
PKR-P3	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC	60
SBR-CP	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC *****	60
KBR-CP	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTTCGACCCCTGGGCGCACA	120
BKK-CP	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTTCGACCCCTGGGCGCACA	120
SBR-CP	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTTCGACCCCTGGGCGCACA *****	120
KBR-CP	CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCGAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT	180
BKK-CP	CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCGAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT	180
SBR-CP	CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCGAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT *****	180
KBR-CP	GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT	240
BKK-CP	GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT	240
SBR-CP	GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT *****	240
KBR-CP	TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA	300
BKK-CP	TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA	300
SBR-CP	TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA *****	300
KBR-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA	360
BKK-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA	360
SBR-CP	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA *****	360
KBR-CP	TCCTCTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCTGCAAGCTTACT	420
BKK-CP	TCCTCTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCTGCAAGCTTACT	420
SBR-CP	TCCTCTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCTGCAAGCTTACT *****	420
KBR-CP	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480
BKK-CP	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480
SBR-CP	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG *****	480
KBR-CP	GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC	540
BKK-CP	GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC	540
SBR-CP	GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC *****	540
KBR-CP	TACAGAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCTGCCGGTTTCTTTCAGATCCGGTTTACTGTG	600
BKK-CP	TACAAAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCCCGGTTTCTTTCAGATCCGGTTTACTGTG	600
SBR-CP	TACAAAGGCAACGGGACGAAGAACGTTGCCCGGTTtCTTtCAGATCCGGTTtACTGTG **** *****	600
KBR-CP	CAACTGCACAACCCCAAATGA	621
BKK-CP	CAaTTGCACAACCCCAAATGA	621
SBR-CP	CAATTGCACAACCCCAAATGA *** *****	621

ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับ
นิวคลีโอไทด์ของยีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต
KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี
BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร
SBR: ไอโซเลตสระบุรี
(* ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

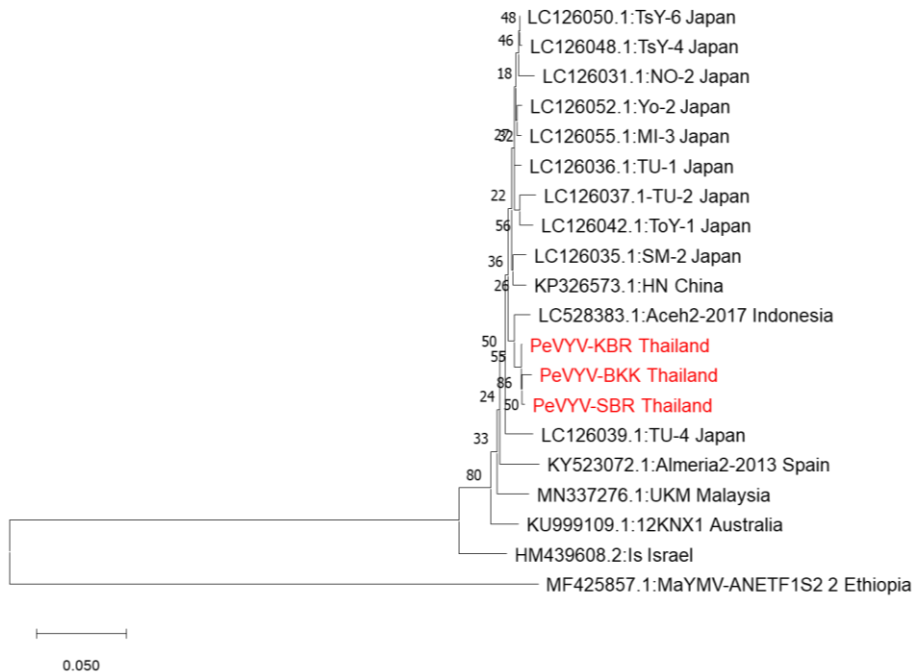
KBR-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNV	60
BKK-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNV	60
SBR-CP	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRPVVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNV	60

KBR-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGCPCLSESVALSGGVVKAYHEYKITMVNIRFVSE	120
BKK-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGCPCLSESVALSGGVVKAYHEYKITMVNIRFVSE	120
SBR-CP	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGCPCLSESVALSGGVVKAYHEYKITMVNIRFVSE	120

KBR-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSSEQFRL	180
BKK-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSSEQFRL	180
SBR-CP	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTSSEQFRL	180

KBR-CP	YKNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNP	206
BKK-CP	YRNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNP	206
SBR-CP	YKNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNP	206
* *****		

ภาพที่ 8 การวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega ด้วยลำดับกรดอะมิโนของยีน CP ของเชื้อ PeVYV ของทั้ง 3 ไอโซเลต
 KBR: ไอโซเลตกาญจนบุรี
 BKK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร
 SBR: ไอโซเลตสระบุรี
 (*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน



ภาพที่ 9 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Pepper vein yellows virus* ที่แยกได้จากพริกในประเทศไทย (อักษรสีแดง) กับไอโซเลตอื่น ๆ ในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA X และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications และใช้ข้อมูลของเชื้อ *Maize yellow mosaic virus* (MaYMV) ไอโซเลต ANETF1S2_2 ของประเทศเอธิโอเปียเป็น outgroup



ภาพที่ 10 อาการเกิดโรคของต้นพริกหลังจากการถ่ายทอดเชื้อไวรัส PeVYV
โดยเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii*

ชนิดของเพลี้ยไก่อัจฉลัม *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) และการเป็น
พาหะนำโรครีนนิง (Huanglongbin) (Citrus greening disease)
ของพืชตระกูลส้ม ในประเทศไทย

จอมสุรางค์ ดวงธิดาร^{1/} แสนชัย คำหล้า^{2/}

^{1/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The citrus psyllid is an important pest of citrus. Adults and Nymphs feed on young stems and on leaves of all developmental stages. feed on young leaves and stems, continuously secreting copious amounts of honeydew and a thread-like white waxy substance so black sooty mold develops on the honeydew. Their feeding damages citrus by burning back new shoots or causing leaves to twist or notch as they mature. Worst damage is done when the insect is vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* that cause the fatal citrus disease called citrus greening or huanglongbing (HLB). In Thailand, nonetheless, the morphology, identification and DNA barcode study of psyllid has not yet been profoundly carried out, Including nonetheless the research study can insist the psyllid be able to transmit the disease (huanglongbing bacterium). The goals of this research are to explore the species of psyllid as well as its DNA barcode, species of disease and transmission between psyllid and disease. This study was implemented from October 2018 to September 2020; the survey and collecting were executed on citrus crops in Chiang Mai, Chiang Rai, Phichit, Kamphaeng Phet, Chai Nat, Nakhon Pathom, Pathum Thani, Nakhon Si Thammarat, Krabi and Trang Province of Thailand 245 psyllid samples. Identified based on morphology 150 samples and amplification of partial mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI) gene and nucleotide sequenced 50 samples revealed nucleotide sequenced 44 samples and 1 species *Diaphorina citri* (Kuwayama). And Identified the disease (huanglongbing bacterium) by Polymerase Chain Reaction (PCR) method 45

รหัสการทดลอง 03-47-61-01-00-00-04-61

samples revealed the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* 25 samples. This disease is caused Citrus greening disease, also known as huanglongbing (HLB). The studies of durations of infection the disease (huanglongbing bacterium) that *D. citri* adults and nymphs first to fifth star were not infected by bacterium *Ca. L. Asiaticus* at times of 3, 6, 24, 48, 72, 96 and 120 hours.

Keywords : Psyllid Huanglongbing bacterium disease Citrus

บทคัดย่อ

เพลี้ยไก่อแจ้ส้ม (Citrus Psyllid) เป็นแมลงศัตรูพืชสำคัญของพืชตระกูลส้ม โดยตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากตาและยอดอ่อนของต้นส้ม สำหรับตัวอ่อนขณะดูดกินจะกลั่นสารสีขาวมีลักษณะเป็นเส้นด้าย ชักนำให้เกิดราดำติดตามมา ใบที่ถูกทำลายจะหงิกงอ เหี่ยวแห้ง ถ้าทำลายถึงขั้นรุนแรงทำให้ใบร่วงติดผลน้อยหรือไม่ติดผลเลย และยังเป็นพาหะถ่ายทอดโรครินนิ่ง (Citrus greening disease) ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มอีกด้วย (กรมวิชาการเกษตร, 2555) สำหรับในประเทศไทยข้อมูลของเพลี้ยไก่อแจ้ส้มยังมีอยู่น้อยมาก และยังไม่เคยมีการสำรวจ รวบรวม ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำแนกชนิด รวมทั้งศึกษารหัสทางพันธุกรรมของแมลงชนิดนี้มาก่อน นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาที่สามารถยืนยันได้ว่าเพลี้ยไก่อแจ้ส้มที่มีอยู่ในประเทศไทยสามารถถ่ายทอดโรครินนิ่งสู่พืชได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาคือ เพื่อทราบชนิดของเพลี้ยไก่อแจ้ส้ม ข้อมูลรหัสทางพันธุกรรม ชนิดของเชื้อโรคพืช และการถ่ายทอดโรคระหว่างชนิดเพลี้ยไก่อแจ้ส้มและโรคพืช โดยศึกษาระหว่างเดือนเดือนตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่อแจ้ส้มจากแหล่งปลูกส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาว ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร กำแพงเพชร ชัยนาท นครปฐม ปทุมธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง รวม 245 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ชนิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวน 150 ตัวอย่าง และตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 50 ตัวอย่าง ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 44 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถจำแนกชนิดได้ 1 ชนิด คือ *Diaphorina citri* (Kuwayama) และจากการตรวจสอบเชื้อโรครินนิ่งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จำนวน 45 ตัวอย่าง พบว่า พบเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรครินนิ่งในพืชตระกูลส้ม จำนวน 25 ตัวอย่าง ผลการศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อ พบว่า ตัวเต็มวัยและตัวอ่อนวัยที่ 1 ถึง 5 ของเพลี้ยไก่อแจ้ส้มไม่พบการรับเชื้อ โดยตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. Asiaticus* สาเหตุโรครินนิ่ง ในช่วงระยะเวลา 3, 6, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

คำหลัก : เพลี้ยไก่อแจ้ส้ม โรครินนิ่ง พืชตระกูลส้ม

คำนำ

เพลี้ยไก่แจ้หรือ jumping plant lice จัดอยู่ใน Superfamily Psylloidea (Aubert, 1987) เป็นแมลงที่ดูดกินน้ำเลี้ยงจากพืชและมีความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาหาร (Malenovsky *et al.* 2012) เป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญกับพืชผลทางการเกษตรหลายชนิด และยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อโรคสู่พืชได้อีกด้วย อาทิเช่น เพลี้ยไก่แจ้สกุล *Psylla* ทำให้เกิดโรค “Pear decline disease” เพลี้ยไก่แจ้สกุล *Diaphorina* ให้เกิดโรค “Asian Citrus greening disease” เพลี้ยไก่แจ้สกุล *Trioza* ให้เกิดโรค “African Citrus greening disease” และโรค “Carrot proliferation disease” (Aubert, 1987) เพลี้ยไก่แจ้ในสกุล *Cacopsylla* ทำให้เกิดโรค “phytoplasma diseases” ในแอปเปิ้ล เป็นต้น (Jarausch *et al.* 2009) เพลี้ยไก่แจ้ส้ม (Citrus Psyllid) เป็นแมลงศัตรูพืชสำคัญของพืชตระกูลส้ม โดยตัวอ่อนและ ตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพืช ทำให้ใบพืชม้วน หักกิ่ง สำหรับตัวอ่อนขณะดูดกินจะมีการปล่อยน้ำหวาน (honeydew) ออกมาชักนำให้เกิดราดำติดตามมา และยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อโรครินนิง (Citrus greening disease) สู่พืชได้อีกด้วย (Aubert, 1987) โรครินนิง (Citrus greening disease) เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบเอเชีย สร้างความเสียหายให้กับประเทศที่ปลูกส้มอย่างมากมายรวมทั้งประเทศไทยด้วย ในประเทศไทยมีรายงานการสำรวจพบโรครินนิงครั้งแรกในปี พ.ศ. 2516 (ขวัญดาว, 2552) โรคนี้เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในท่ออาหารของพืชจัดอยู่ในสกุล *Candidatus Liberibacter* มี 3 สายพันธุ์คือ *Ca. L. asiaticus* พบในเอเชีย *Ca. L. africanus* พบในแอฟริกา และ *Ca. L. americanus* เป็นสายพันธุ์ที่พบในรัฐเซาเปาโล ประเทศบราซิล (Teixeira *et al.* 2008) ในธรรมชาติเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครินนิงสามารถถ่ายทอดได้โดยมีเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (psyllids) ที่สำคัญ 2 ชนิดคือ *Trioza erytreae* (Del Guericco) พบในประเทศแถบแอฟริกา และ *D. citri* พบในประเทศแถบเอเชีย (Huang *et al.* 1990) ต้นส้มที่ได้รับเชื้อจะแสดงอาการใบเล็กเหลือง ชี้ตั้ง คล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร ผลผลิตลดลงไม่มีคุณภาพ มักจะร่วงก่อนอายุการเก็บเกี่ยว ต้นส้มจะแสดงอาการทรงกับทรุดอยู่หลายปี และตายในที่สุด (ไมตรี 2534, 2544) ซึ่งส่งผลกระทบต่อผลผลิตส้ม ทำให้ส้มขายได้ราคาตกต่ำ นับว่าเป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งของเกษตรกร (สำนักงานพาณิชย์จังหวัดเชียงใหม่, 2553) ในประเทศไทยพบเพลี้ยไก่แจ้ส้มเริ่มระบาดรุนแรงในแหล่งปลูกส้มเขียวหวานในภาคเหนือ และภาคตะวันออก และได้แพร่กระจายลงสู่แหล่งปลูกภาคกลางที่จังหวัดปทุมธานี โดยพบไข่และตัวอ่อนระยะส้มเขียวหวานแตกยอดอ่อน พบปริมาณมากช่วงเดือนมกราคม-มีนาคม และพฤษภาคม-กรกฎาคม (กรมวิชาการเกษตร, 2555) ดารุณีและคณะ (2553) ได้ทำการสำรวจ เก็บตัวอย่างและจำแนกเชื้อโรครินนิงของพืชตระกูลส้มที่แสดงอาการโรครินนิงจากจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ จำนวน 98 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อโรครินนิง จำนวน 62 ตัวอย่าง และคัดเลือกตัวอย่าง ที่ตรวจพบเชื้อโรครินนิง จำนวน 12 ตัวอย่าง มาทำการโคลนนิ่ง และวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์และหาความสัมพันธ์ของเชื้อโรครินนิงของพืชตระกูลส้ม พบว่า ตัวอย่างส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ และตระกูลมะนาวที่สำรวจทั้งหมดอยู่ในกลุ่ม *Ca. L. asiaticus* สำหรับในประเทศไทยข้อมูลของ

เพลี้ยไก่อัจฉริยะยังมีอยู่น้อยมาก และยังไม่เคยมีการสำรวจ รวบรวม จำแนกชนิด ศึกษาลักษณะทาง สันฐานวิทยา รวมทั้งศึกษารหัสทางพันธุกรรมของแมลงชนิดนี้มาก่อน นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาที่ สามารถยืนยันได้ว่าเพลี้ยไก่อัจฉริยะที่มีอยู่ในประเทศไทยสามารถถ่ายทอดโรครินนิ่งสู่พืชได้

ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการสำรวจ รวบรวม ศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยา และรหัสทาง พันธุกรรมของเพลี้ยไก่อัจฉริยะที่เป็นพาหะนำโรครินนิ่งสู่พืช เพื่อทราบชื่อชนิด ลักษณะทางสันฐาน วิทยา ข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมของเพลี้ยไก่อัจฉริยะ และทราบชนิดเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งในพืชตระกูล ส้ม รวมทั้งประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อโรคไปสู่พืช ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการนำไปสู่การหา แนวทางในการบริหารจัดการและป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) ตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉริยะที่รวบรวมได้จากแหล่งปลูกพืชตระกูลส้ม (ส้มโอ มะนาว ส้ม) ของ เกษตรกร
- 2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ หลอดดูดแมลง (aspirator) ขวดฆ่าแมลง ขวดดองแมลง ปาก คีบพู่กัน กล้องพลาสติก ถุงพลาสติก ถังรักษาความเย็นและเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
- 3) สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ 95%
- 4) อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิมเบอร์ 3 กระจกสามเหลี่ยม ปากคีบ (forcep) ตู้อบแมลง ฯลฯ
- 5) สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาสารพันธุกรรม เช่น ชุดสกัดสารพันธุกรรม (Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit; Cat. No: FATGK001-1)
- 6) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope compound microscope และกล้อง ถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์
- 7) อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ (กระจก แผ่นบันทึกข้อมูล หมึกพิมพ์ ซีดี)
- 8) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยไก่อัจฉริยะของ Hodkinson and White (1979)

วิธีการ

การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉริยะ

เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉริยะจากพื้นที่ปลูกพืชตระกูลส้ม (ส้มเขียวหวาน มะนาว ส้มโอ) ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร กำแพงเพชร ชัยนาท นครปฐม ปทุมธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง จังหวัดละ 5 แปลง รวมทั้งหมด 50 แปลง (ภาพที่ 1) แบ่งตัวอย่างเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่ง นำไปศึกษาชนิดและ DNA barcode ส่วนที่สองนำไปตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. asiaticus* สาเหตุ โรครินนิ่งในพืชตระกูลส้ม บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไก่อัจฉริยะ ส่วนของพืชที่พบตัวอย่าง ลักษณะ การทำลาย ลักษณะอาการของพืชที่เป็นโรค วัน /เดือน /ปี สถานที่ พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้ เก็บตัวอย่าง รวมทั้งบันทึกโดยการถ่ายภาพ

การตรวจสอบชนิดและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก

นำตัวอย่างเพลี้ยไก่แจ้ส้มได้จากการเก็บรวบรวมมาจัดรูปร่างและนำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 5-7 วัน จากนั้นนำตัวอย่างเพลี้ยไก่แจ้ส้มมาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง สี ลักษณะของส่วนหัว ออก ท้อง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับชนิดด้วยเอกสารประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยไก่แจ้ส้มของ Hodkinson and White (1979) ประกอบกับการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ ทำการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลหมายเลข (Lot number) ตัวอย่างในแต่ละครั้งที่ทำการสำรวจอย่างละเอียดโดยจะแยกเป็นชนิดพืชอาศัย วัน/เดือน/ปี และสถานที่ รวมทั้งถ่ายภาพลักษณะต่างๆ ของเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่ได้จากการศึกษา จากนั้นทำการจัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงต่อไป

การศึกษาลำดับพันธุกรรม (DNA Barcode) ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

นำตัวอย่างเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% มาสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) โดยใช้ชุดสกัด Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit; Cat. No: FATGK001-1 ของบริษัท Favorgen Biotech Corp. ทำการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม DCITRI COI-L 5'- AGG AGG TGG AGA CCC AAT CT -3' และ DCITRI COI-R 5'- TCA ATT GGG GGA GAG TTT TG -3' (Boykin *et al.*, 2012) ทำการสังเคราะห์ยีน mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้มจาก DNA ที่เตรียมได้ ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ (PCR) ขนาด 200 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณชิ้น DNA เป้าหมาย โดยใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม (PCR machine) ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยหยอด PCR product ลงใน 2% agarose gel ใน 0.5X TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 45 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation (ภาพที่ 2) ทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) เพื่อตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่บริสุทธิ์ของเพลี้ยอ่อนไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประเทศเกาหลีใต้ นำข้อมูลของดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทำรหัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่อยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ รวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้อง

การศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

นำเพลี้ยไก่แจ้ส้ม เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว มาเลี้ยงในกล่องพลาสติก โดยนำยอดอ่อนของต้นแก้ว (พืชอาศัย) พันด้วยสำลีชุบน้ำมาวางไว้ในกล่องพลาสติกเพื่อเป็นอาหารและให้เพลี้ยไก่แจ้ส้มวางไข่ จากนั้นสังเกตการวางไข่ การฟักไข่ การเปลี่ยนแปลงจากตัวอ่อนจนเป็นตัวเต็มวัยทุกวัน จดบันทึกเวลาการเปลี่ยนแปลง รวมทั้งถ่ายรูปเพลี้ยไก่แจ้ส้มในทุกระยะการเปลี่ยนแปลง

ศึกษาชนิดเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งในพืชตระกูลส้มที่พบในเพลี้ยไก่แจ้ส้มด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

เตรียมตัวอย่างเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่ได้จากการเก็บรวบรวมในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร กำแพงเพชร ชัยนาท นครปฐม ปทุมธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง จำนวน 45 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างแมลงมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการข้างต้น

ทำการตรวจสอบเชื้อโรครินนิ่งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยนำสารละลายดีเอ็นเอเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ Jagoueix *et. al.* (1994) ด้วยคู่ไพรเมอร์ OI1 และ OI2c ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน ในส่วน 16S ribosomal RNA (16S rRNA) เป็นตัวเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย จากปฏิกิริยา PCR จะแสดงแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 1160 เบส ลำดับเบสคู่ไพรเมอร์ OI1 และ OI2c ดังนี้

Forward OI : 5'-GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA-3'

Reverse OI2c : 5'-GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3'

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ได้แก่

- น้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH2O)	7.0	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ (OI1) (10 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ (OI2c) (10 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
- Green master mix (2x)	10.0	ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอ ต้นแบบ	1.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

นำส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR มาผสมกันแล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 2 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 40 วินาที	
ขั้นที่ 3:	60°C	นาน 1 นาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 1 นาที	** (ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ**
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	15°C	นาน 15 นาที	1 รอบ (ขั้นที่ 6 ไม่จำเป็นใส่ก็ได้)

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอ ผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม MyTag HS Red DNA ใน 1x TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation (ภาพ ที่ 3)

ศึกษาประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อโรครีนนิ่งจากเพลี้ยไก่แจ้ส้มในพืชตระกูลส้ม

การทดสอบการรับเชื้อโรค นำตัวเต็มวัยและตัวอ่อนวัยที่ 1 ถึง 5 ของเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่ทำการเพาะเลี้ยงจนปลอดโรครีนนิ่งมาปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นมะนาวที่มีเชื้อโรครีนนิ่งโดยครอบด้วยตาข่าย โดยแบ่งเป็นช่วงเวลาดังนี้ 3, 6, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวเต็มวัยและตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแต่ละช่วงเวลา (ช่วงเวลาละ 3 ตัว) มาตรวจหาเชื้อโรครีนนิ่ง เพื่อให้ทราบช่วงเวลาที่เพลี้ยไก่แจ้ส้มได้รับเชื้อโรครีนนิ่ง (ภาพที่ 4)

การทดสอบการถ่ายทอดเชื้อโรค ทำการเพาะกล้าต้นส้มที่ปลอดโรครีนนิ่ง เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายทอดโรค นำเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่ตรวจพบเชื้อโรครีนนิ่งจากข้อ 2 (เลือกช่วงเวลาที่ตรวจพบเชื้อช่วงแรก) มาปล่อยใส่กล้าต้นส้มที่ไม่เป็นโรครีนนิ่ง จำนวน 1, 3 และ 5 ตัวต่อต้น จากนั้นทำการครอบต้นด้วยตาข่ายให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพืชที่ช่วงเวลาต่างๆ ดังนี้ 7, 14 และ 30 วัน ทำทั้งหมด 5 ซ้ำ หลังจากนั้นสังเกตอาการต้นส้มว่าแสดงอาการโรครีนนิ่งหรือไม่ เมื่อครบกำหนดเวลาจะทำการกำจัดเพลี้ยไก่แจ้ส้มโดยการพ่นสารกำจัดแมลง

การบันทึกข้อมูล

บันทึกอาการของโรค ระยะเวลาตั้งแต่พืชแสดงอาการ และถ่ายรูปลูกของโรค

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ - แหล่งปลูกส้มเขียวหวาน ส้มโอ และมะนาว ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตรกำแพงเพชร ชัยนาท นครปฐม ปทุมธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาชนิดของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่แจ้ส้มจากแหล่งปลูกส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาว ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร กำแพงเพชร ชัยนาท นครปฐม ปทุมธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง ในระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2563 จำนวน 150 ตัวอย่าง และทำการวิเคราะห์ชนิดจากสัณฐานวิทยาด้วยเอกสารประกอบการจำแนกชนิดเพลี้ยไก่แจ้

ส้มของ Hodkinson and White (1979) สามารถจำแนกชนิดได้ 1 ชนิด คือ *D. citri* โดยมีรายละเอียด ดังนี้

Diaphorina citri (Kuawayama, 1907) (ภาพที่ 5ก-ค)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (description)

ลำตัว (body): ตัวเต็มวัยมีความยาวลำตัวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ลำตัวมีสีน้ำตาลกระด้าง กระดำ

หัว (head) : ส่วนหัวมีสีน้ำตาลสว่าง

หนวด (antennae) : ฐานของหนวดมีขนาดใหญ่กว่าเส้นหนวด มีสีน้ำตาลดำ เส้นหนวดมีสีน้ำตาลและบริเวณข้อต่อของหนวดมีสีน้ำตาล หนวดตรงส่วนปลายมีสีดำและมีเส้นขนยื่นออกมาสองเส้นชัดเจน

ปีก (hemelytra) : ปีกคู่หน้าตรงครึ่งส่วนปลายของปีกมีความกว้างที่สุด มีสีน้ำตาล กระดำกระด้างอยู่รอบๆ บริเวณตรงครึ่งส่วนปลายของปีก

ขา (leg) : มีลักษณะเรียวยาว มีน้ำตาลอ่อน ส่วนของโคนขา (femur) มีสีน้ำตาลดำ ส่วนของปลายขา (tarsus) ปล้องสุดท้ายมีสีดำ และเล็บ (claw) มีสีดำ

อวัยวะสืบพันธุ์ :

เพศผู้ : ปล้องท้องเรียวยาว ปลายส่วนท้องมีสีดำ อวัยวะสืบพันธุ์ไม่มีลักษณะเรียวยาว และโค้งงอขึ้นติดกับส่วนท้องด้านบน

เพศเมีย : ปล้องท้องอ้วนกลม ปลายส่วนท้องมีสีดำ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมีลักษณะเรียวยาว ยื่นตรง ไม่โค้งงอขึ้นติดกับส่วนท้องด้านบน

แหล่งที่สำรวจพบ (distribution): จังหวัดนครปฐม ชัยนาท ปทุมธานี เชียงใหม่ เชียงราย พิจิตรกำแพงเพชร นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง

ความสำคัญและพืชอาศัย : ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ดูดกินน้ำเลี้ยงจากยอดอ่อน ใบอ่อน ของพืชตระกูลส้ม เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาว และต้นแก้ว โดยเป็นพาหะนำเชื้อโรครินนิ่งเข้าสู่พืชได้

การศึกษาลำดับพันธุกรรม (DNA Barcode) ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซีเอ็นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI เปรียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่อยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมฐานข้อมูลทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกเพื่อยืนยันความถูกต้อง ผลการวินิจฉัยชนิด พบว่า จากตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 50 ตัวอย่าง ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 44 ตัวอย่าง ซึ่ง 44 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *D. citri* ซึ่งพบทุกจังหวัดที่ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

การศึกษาวงจรชีวิตเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

ผลการศึกษาวงจรชีวิตเพลี้ยไก่แจ้ส้ม พบว่า เพลี้ยไก่แจ้ส้มผสมพันธุ์และวางไข่ใช้เวลา 1-2 วัน ไข่มีลักษณะยาวเรียวยาว มีสีเหลืองอมส้ม ตัวอ่อนมีทั้งหมด 5 ระยะ โดยระยะไข่เปลี่ยนแปลงเป็นตัว

อ่อนวัยที่ 1 ใช้เวลา 2-4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 1 ลำตัวมีขนาดเล็ก สีเขียวเหลืองอมส้ม ลอกคราบ เปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 2 ใช้เวลา 2-4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 ลำตัวมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเหลืองอมส้ม เริ่มเห็นตุ่มปีกชัดเจน ลอกคราบเปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 3 ใช้เวลา 2-4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 ลำตัว ขยายใหญ่ขึ้น ลอกคราบเปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 4 ใช้เวลา 2-3 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 4 ลำตัวขยาย ใหญ่ขึ้น และตุ่มปีกแผ่ออกขยายใหญ่ขึ้น ลอกคราบเปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 5 ใช้เวลา 2-3 วัน ส่วนตัวอ่อนวัยที่ 5 ลำตัวขยายใหญ่ขึ้น และตุ่มปีกแผ่ออกขยายใหญ่ขึ้น ปลายส่วนท้องเปลี่ยนเป็นสีดำ ก่อนจะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลา 2-3 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Tsai and Liu (2000) รายงานว่า ไช้ของเพลี้ยไก่แจ้ส้มมีลักษณะเป็นรูปไข่ สีเหลืองอมส้ม ตัวอ่อนมีเขียวไปจนถึงสีส้ม ดุกินใบและลำต้นพืชเป็นอาหาร ตัวอ่อนมี 5 ระยะ โดยตัวอ่อนระยะที่ 1 ลำตัวขนาดเล็ก บาง มีตา รวมสีแดง ตัวอ่อนระยะที่ 2 มีขนาดใหญ่ขึ้น มีการพัฒนาของตุ่มปีก ตัวอ่อนระยะที่ 3 มีขนาดใหญ่ขึ้น มีตุ่มปีก ตัวอ่อนระยะที่ 4 มีขนาดใหญ่ขึ้น มีตุ่มปีก หนวดยาวขึ้น ตัวอ่อนระยะที่ 5 มีขนาดใหญ่ขึ้น มี การพัฒนาอวัยวะต่างๆ พร้อมเป็นตัวเต็มวัย ส่วนระยะเวลาในการพัฒนาวัยนั้น ไช้มีระยะฟักตัว 4 วัน ตัวอ่อนพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลารวม 17 วัน (ภาพที่ 6ก-ข)

ศึกษาชนิดเชื้อสาเหตุโรครินนิ่งที่พบในเพลี้ยไก่แจ้ส้มด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

การตรวจสอบเชื้อโรครินนิ่งในเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

ผลการตรวจสอบเชื้อโรครินนิ่งจากเพลี้ยไก่แจ้ส้มโดยเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่แจ้ส้ม จากแหล่งปลูกส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาว ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร กำแพงเพชร ชัยนาท นครปฐม ปทุมธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง จำนวน 45 ตัวอย่าง และทำการตรวจสอบเชื้อ โรครินนิ่งโดยนำสารละลายดีเอ็นเอของเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ตามวิธีการของ Jagoueix *et. al.* (1994) ด้วยคู่มือเมอร์ OI1 และ OI2c ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน ในส่วน 16S ribosomal RNA (16S rRNA) เป็นตัว เริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย จากปฏิกิริยา PCR จะแสดงแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 1160 เบส ซึ่งจากการตรวจสอบ พบว่า พบเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. Asiaticus* สาเหตุโรครินนิ่งในพืชตระกูล ส้ม จำนวน 25 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ กำแพงเพชร พิจิตร ชัยนาท นครปฐม และ นครศรีธรรมราช ส่วนในจังหวัดกระบี่ และตรัง ตรวจสอบไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. Asiaticus* สาเหตุโรค รินนิ่ง (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Manjunath *et. al.* (2008) พบว่า จากการ ตรวจสอบชนิดเชื้อโรครินนิ่งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *D. citri* จากตัวอย่างเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *D. citri* ทั้งตัวเต็มวัยและตัวอ่อนจำนวน 1,200 ตัวอย่าง ที่สำรวจ และเก็บตัวอย่างในรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า เป็นเชื้อโรครินนิ่งแบคทีเรียชนิด *Ca. L. asiaticus* มีการแพร่ระบาดเป็นวงกว้าง โดยมีเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *D. citri* เป็นพาหะนำโรค

การศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อโรครินนึ่งของเพลี้ยไก่อัจส้มในพืชตระกูลส้ม การทดสอบระยะเวลาการรับเชื้อโรครินนึ่ง

ผลการศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อโรครินนึ่ง โดยนำตัวเต็มวัยและตัวอ่อนวัยที่ 1 ถึง 5 ของเพลี้ยไก่อัจส้มที่ทำการเพาะเลี้ยงจนปลอดโรคมาปล่อยให้ดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นมะนาวที่มีเชื้อโรครินนึ่งแล้วครอบด้วยตาข่าย โดยแบ่งเป็นช่วงเวลา 3, 6, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวเต็มวัยและตัวอ่อนเพลี้ยไก่อัจส้มในแต่ละช่วงเวลามาสกัดดีเอ็นเอตรวจหาเชื้อโรครินนึ่งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่า ตัวเต็มวัยและตัวอ่อนเพลี้ยไก่อัจส้มตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. Asiaticus* สาเหตุโรครินนึ่งในทุกระยะเวลาที่ทำการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Brlansky and Rogers (2007) ได้รายงานว่าการตรวจสอบเชื้อโรครินนึ่งจากตัวเต็มวัยเพลี้ยไก่อัจส้ม *D. Citri* ที่ได้รับเชื้อโรครินนึ่งจากต้นส้มที่เป็นโรคด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในห้องปฏิบัติการ พบว่า ตรวจพบเชื้อโรครินนึ่งจากเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. asiaticus* น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากดูดกินน้ำเลี้ยงต้นส้มที่เป็นโรค 7 วัน และตรวจพบเชื้อโรค 20 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ หลังจากดูดกินน้ำเลี้ยงต้นส้มที่เป็นโรค 30 วัน และจากการรายงานของ Capoor *et al.* (1974) พบว่า ตัวเต็มวัยที่ยังไม่ติดเชื้อโรครินนึ่งหากมีการดูดกินน้ำเลี้ยงต้นพืชที่มีเชื้อโรคสามารถได้รับเชื้อโรคได้ในช่วงระยะเวลา 30 นาที ถึง 5 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างจากการทำการทดลองที่ตรวจไม่พบเชื้อโรครินนึ่งในช่วงเวลา 3, 6, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เนื่องจากในการทำการทดลองการรับเชื้อตรวจไม่พบเชื้อโรครินนึ่งจากเพลี้ยไก่อัจส้มในช่วงเวลา 3, 6, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง จึงไม่สามารถทำการทดลองการถ่ายทอดเชื้อโรคต่อได้ ซึ่งในอนาคตอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยอาจเพิ่มช่วงระยะเวลาในการรับเชื้อโรคของเพลี้ยไก่อัจส้มมากขึ้น

สำหรับการถ่ายทอดโรครินนึ่งนั้นโรครินนึ่งสามารถถ่ายทอดเชื้อโรคได้จากเพลี้ยไก่อัจส้ม *D. Citri* โดยตัวอ่อนมีการเจริญเติบโตพัฒนาวัยบนต้นพืชอาศัยที่เป็นโรคและได้รับเชื้อโรครินนึ่งจากดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นพืช และได้ส่งต่อเชื้อโรคให้กับตัวเต็มวัยในระยะแรกจนเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ ตัวอ่อนวัยที่ 4 และ 5 รวมทั้งตัวเต็มวัยสามารถถ่ายทอดเชื้อโรคได้ แต่ตัวอ่อนวัยที่ 1 ถึง 3 ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อโรคได้ และตัวเต็มวัยถ่ายทอดเชื้อโรคได้ในช่วงเวลา 5 ถึง 7 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อโรคได้ในช่วงเวลา 1 ถึง 3 ชั่วโมง (Xu *et al.* 1988)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจส้มจากแหล่งปลูกส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาว ใน จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร กำแพงเพชร นครปฐม ชัยนาท ปทุมธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง ในระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2563 รวม 245 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ชนิดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวน 150 ตัวอย่าง และตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 50 ตัวอย่าง ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 44 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถจำแนกชนิดได้ 1 ชนิด คือ *Diaphorina citri* (Kuwayama) และจากการตรวจสอบเชื้อโรครินนึ่งด้วยเทคนิค

Polymerase Chain Reaction (PCR) จำนวน 45 ตัวอย่าง พบว่า พบเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. Asiaticus* สาเหตุโรครินนิ่งในพืชตระกูลส้ม จำนวน 25 ตัวอย่าง

ผลการศึกษาระยะเวลาการรับเชื้อ พบว่า ตัวเต็มวัยและตัวอ่อนวัยที่ 1 ถึง 5 ของเพลี้ยไก่แจ้ส้มไม่พบการรับเชื้อ โดยตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. Asiaticus* สาเหตุโรครินนิ่ง ในช่วงระยะเวลา 3, 6, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เนื่องจากในการทำการทดลองการรับเชื้อตรวจไม่พบเชื้อโรครินนิ่งจากเพลี้ยไก่แจ้ส้มในช่วงเวลา 3, 6, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง จึงไม่สามารถทำการทดลองการถ่ายทอดเชื้อโรคต่อได้ ซึ่งในอนาคตอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยอาจเพิ่มช่วงระยะเวลาในการรับเชื้อโรคของเพลี้ยไก่แจ้ส้มมากขึ้น

เพลี้ยไก่แจ้ส้ม *D. citri* เป็นแมลงศัตรูพืชสำคัญของพืชตระกูลส้ม มีการแพร่กระจายได้ในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย มักพบดูดกินน้ำเลี้ยงตามยอด ใบอ่อน ลำต้นของพืช ส่งผลให้ยอด ใบพืชหงิกงอ ต้นพืชเจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ และยังเป็นพาหะนำโรครินนิ่งซึ่งเป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มอีกด้วย ซึ่งโรครินนิ่งนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. Asiaticus* เข้าไปอาศัยดูดกินน้ำเลี้ยง และทำลายท่อ น้ำ ท่ออาหารของต้นพืช ทำให้พืชไม่สามารถลำเลียงอาหารได้จึงแสดงอาการที่ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีด คล้ายอาการขาดธาตุสังกะสี แต่เส้นใบยังคงมีสีเขียวเป็นปกติ บางครั้งเส้นใบอาจปริแตก ระบบรากฝอยถูกทำลายส่งผลให้ผลหลุดร่วงก่อนเวลา ดังนั้นควรมีการติดตามเฝ้าระวัง และสำรวจเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงปลูกพืชตระกูลส้ม เพื่อลดการระบาดและหาวิธีการป้องกันกำจัดที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.พิศสุวรรณ เจริญสมบัติ ผอ. ญัฐิมา โฆษิตเจริญกุล ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้ความกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษางานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี ขอขอบคุณนักวิชาการโรคพืช และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยในการสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลง และเตรียมตัวอย่างแมลงเพื่อการจัดจำแนกชนิด ตลอดจนตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA barcode) ของเพลี้ยไก่แจ้ส้มโดยใช้เทคนิคซีวโมเลกุล ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2555. การจัดการศัตรูส้มโอเพื่อการส่งออก. เอกสารทางวิชาการ. 129 หน้า.
- ขวัญดาว ผิวขาว และอังสนา อัครพิศาล. 2552. การตรวจสอบโรคฮวงลองบิง (กรินนิ่ง) ในสวนส้มโอที่ผลิตเพื่อการส่งออกที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย. ว. วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 26: 40-46.
- ดารุณี ปุญญพิทักษ์ เยาวภา ตันติวานิช บุรณี พัวพงษ์แพทย์ และญัฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2553. การสำรวจและจำแนกเชื้อโรครินนิ่งในประเทศไทยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา.

- ไมตรี พรหมนิทร์. 2534. โรคทริสเทซ่าและโรคใบเหลืองต้นโทรมหรือโรคกรีนนิ่ง. เอกสารเทคโนโลยีป้องกันและกำจัดโรคส้ม กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร. หน้า 41-47.
- ไมตรี พรหมนิทร์. 2544. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของส้ม. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตร การจัดการโรคและแมลงศัตรูส้ม วันที่ 17 ธันวาคม 2544 ณ ห้องประชุม 220 อาคารสุขทัยสโมสร มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช หน้า 1-18.
- สำนักงานพาณิชย์จังหวัดเชียงใหม่. 2553. ศูนย์บริการข้อมูลการค้าการลงทุนจังหวัดเชียงใหม่.
- Aubert, B. 1987. *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of Citrus Greening Disease: Biology aspects and possible control strategies. Fruit. Vol. 42.
- Brlansky, R. H. and M. E. Rogers. 2007. Citrus huanglongbing: understanding the vector-pathogen interaction for disease management.
- Capoor, S. P., D. G. Rao and S. M. Visvanath. 1974. Greening disease of citrus in the Deccan Trapcountry and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. p. 43-49. In: Proc. 6th Conf. IOVC, Univ. Calif., Div. Agri. Sci., Richmond.
- Hodkinson. I and I. White. 1979. Homoptera Psylloidea. Handbooks for the identification of British insects. London: Royal Entomological Society of London. Vol 2.
- Huang. C. H., C. F. Liaw., L. Chang and T. Lan. 1990. Incidence and spread of *citrus likubin* in relation to the population fluctuation of *Diphorina citri*. Plant Protection Bulletin (Taiwan, Roc). 32: 167-176.
- Jarausch, B., D. Burckhardt., P. Lauterer and W. Jarausch. 2009. Psyllids (Hemiptera, Psylloidea) captured in commercial apple and stone fruit orchards in southwest Germany, eastern France and northwest Switzerland. 82: 205-215.
- Malenovsky. I., P. Lauterer., E. Labina and D. Burckhardt. 2012. Jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea) of Afghanistan. pp. 1-22. Vol. 52(1).
- Manjunath, K. L., S. E. Halbert., C. Ramadugu., S. Webb and R. F. Lee. 2008. Detection of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. Phytopathology. 2008 Apr; 98 (4): 387-96.
- Texeira, D.C., C. Saillard., C. Couture., E.C. Martins., N.A. Wulff., S. Jagoueix., P.T. Yamamoto., A.J. Ayres and J.M. Bove. 2008. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus* agent of huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. Mol. Cell. Probes 19: 173-179.

Tsai, J. H. and Y. H. Liu. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *J. Econ. Entomol.* 93 (6): 1721-1725.

Xu, C. F., Y. H. Xia, K. B. Li and C. Ke. 1988. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Timmer, L. W., Garnsey, S. M., and L. Navarro (eds.), *Proceedings of the 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists*. International Organization of Citrus Virologists, Valencia, Spain, pp. 100-108.

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *D. citri*

>เชียงใหม่ Chiang Rai _350/ มะนาว

```
TTCTGATTTTTGGAATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCTT
CAGCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAA
TAGATGTAGACTCAGGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATAAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTT
ACGGAATAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAG
CAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTA
TTGCTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGAG
TAAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATA
TTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAAGCTTCTAATCGAATTGTTT
ATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCCCAATGAAA
```

>เชียงใหม่ Chiang Rai _351/ มะนาว

```
TCTGATTTTTGGAATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCTTC
AGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAAT
AGATGTAGACTCAGGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATAAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTA
CGGAATAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGC
AAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTAT
TGCTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGAGT
AAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATAT
TATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAAGCTTCTAATCGAATTGTTTTA
TTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCCCAATTGAA
```

>เชียงใหม่ Chiang Rai _359/ มะนาว

```
AATNTTCTGATTTTTGGAATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAC
ACTTCAGCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTA
GGAATAGATGTAGACTCAGGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATAAAATTTTAGTTGACTAGCTAC
AATTTACGGAATAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAAT
TTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGC
CATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCG
CGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCT
GAAATATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAAGCTTCTAATCGAA
TTGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCCCAATTGAAAGN
```

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri (ต่อ)

<p>>เชียงใหม่ Chiang Rai _377/ มະນາว</p> <p>TTTCTGATTTTTGGAAATCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TCAGCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTACCACATATTTACTGTAGGA ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATT TACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA GCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT ATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGA GTAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAAT ATTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAATTCTAATCGAATTGTTT TATTCAATAGAAATTATATAAATAAGAAATGAATGCAAAACTCTCCCCCAATTGAAA</p>
<p>>เชียงใหม่ Chiang Rai _378/ มະນາว</p> <p>AATTCGATTTTTGGACTCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC TTCAGCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTACCACATATTTACTGTAGG AATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAAT TTACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTT AGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCAT TATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGA AGTAAACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAA ATATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAATTCTAATCGAATTG TTTTATTCAATAGAAATTATATAAATAAGAAATGAATGCAAAACTCTCCCCCAATTGAAA</p>
<p>>เชียงใหม่ Chiang Rai _427/ มະນາว</p> <p>CTGATTTNTGGACTCCTGAGTGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTCAG CATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTACCACATATTTACTGTAGGAATAG ATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACG GAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAA ATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTG CTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAA ACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTA TTTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAATTCTAATCGAATTGTTTTATT CAATAGAAATTATATAAATAAGAAATGAATGCAAAACTCTCCCCCAATTGAAA</p>
<p>>เชียงใหม่ Chiang Rai _429/ มະນາว</p> <p>TCTGATTTTGGAAATCCTGAGTGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTCAG CATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTACCACATATTTACTGTAGGAATAG ATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACG GAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAA ATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTG CTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCCTTCGTCGGAGTAA ACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTA TTTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAATTCTAATCGAATTGTTTTATT CAATAGAAATTATATAAATAAGAAATGAATGCAAAACTCTCCCCCAATTGAAA</p>

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri (ต่อ)

<p>>เชียงใหม่ Chiang Rai _430/ มะนาว</p> <p>TGATTNTTGAATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTCAG CATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAG ATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTACTGACTAGCTACAATTTACG GAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAA ATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTG CTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGTAA ACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTACAGGAATGCCACGACGATACTCGAATATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTA TTTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATTTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATT CAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCAATNGAAA</p>
<p>>เชียงใหม่ Chiang Mai _354/ มะนาว</p> <p>TCTGATTTTTTGAATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTC AGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAAT AGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTACTGACTAGCTACAATTTA CGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGC AAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTAT TGCTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGT AAACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAATATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATAT TATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTA TTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCAATNGAAA</p>
<p>>เชียงใหม่ Chiang Mai _424/ มะนาว</p> <p>TTCTGATTTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTT CAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAA TAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTACTGAAAGCTACAATTT ACGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAG CAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTA TTGCTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAG TAAACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAATATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATA TTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTT ATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCAATNGAAA</p>
<p>>เชียงใหม่ Chiang Mai _425/ มะนาว</p> <p>TAANTTCTGATTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAA AATTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGT AGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTACTGACTAGCTA CAATTTACGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAA TTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTG CCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCG TCGGAGTAAACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAATATCCAGATCTTCTCATTTTC TGAAATATTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGA ATTGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCAATNGAAGN</p>

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri (ต่อ)

<p>>เชียงใหม่ Chiang Mai _426/ มะนาว</p> <p>TTTCTGATTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTA AAAACT TCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAA TAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTA CGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCA AATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCCTATGTGCTATCAATAGGGGCTGATTTGCCATTATTG CTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTTAAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCCGAGTAAA CACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATT TCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAA TAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCCCAATTGAA</p>
<p>>เชียงใหม่ Chiang Mai _428/ มะนาว</p> <p>TGATTTTGAATCCTGAGGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTA AAAACTTCAGCATT CGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTA GACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAA AAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATTCATC AATTGACATTATTCTTCAT</p> <p>GACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCCTATGTGCTATCAATAGGGGCTGATTTGCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCCTTTAT TAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCCGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTT AGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTA TTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAAT GCAAAACTCTCCCCCAATTGAA</p>
<p>>กำแพงเพชร Kamphaeng Phet _328/ ส้ม</p> <p>TTCTGATTTTTGGAACTCCTGAAGGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTA AAAACTT CAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAAT AGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTAC GGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAA ATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCCTATGTGCTATCAATAGGGGCTGATTTGCCATTATTGC TAGATTTATTAATTGATACCCCTTTTAAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCCGAGTAAAC ACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATT CTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAAT AGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCCCAATTGAGAA</p>
<p>>กำแพงเพชร Kamphaeng Phet _329/ มะนาว</p> <p>TCTGATTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTA AAAACTTC AGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATA GATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTA AAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACG GAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAAA TTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCCTATGTGCTATCAATAGGGGCTGATTTGCCATTATTGCT AGATTTATTAATTGATACCCCTTTTAAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCCGAGTAAACA CTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATATTATTTC TTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATA GAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCCCAATTGAA</p>

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri (ต่อ)

>กำแพงเพชร Kamphaeng Phet _330/ มะนาว

ATTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTCAG
CATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAG
ATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACG
GAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAA
ATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTG
CTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTGGAGTAA
ACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATATTA
TTTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCACTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAAGTCTAATCGAATTGTTTTATT
CAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCAATTGAAAGC

>กำแพงเพชร Kamphaeng Phet _331/ มะนาว

ATTTCTTGAATTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTA
AACTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTG
TAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCT
ACAATTTACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTA
ATTTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTT
GCCATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTC
GTCGGAGTAAACTACTCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTT
CTGAAATATTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCACTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAAGTCTAATCG
AATTGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCAATTGATAG

>กำแพงเพชร Kamphaeng Phet _332/ มะนาว

TTCTGATTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCT
TCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA
ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCTACAATT
TACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA
GCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT
ATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTGGGA
GTAACACTACTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAAT
ATTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCACTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAAGTCTAATCGAATTGTTT
TATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCAATTGAA

>พิจิตร Phichit _333/ ส้มโอ

CTCTGATTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCT
TCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA
ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCTACAATT
TACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA
GCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT
ATTGCTAGATTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTGGGA
GTAACACTACTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAAT
ATTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCACTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAAAGTCTAATCGAATTGTTT
TATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAAACTCTCCCAANTGAAAA

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri (ต่อ)

<p>>พิจิตร Phichit_334/ มะนาว</p> <p>TTTCTGATTTTTGGAACTCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCT TCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATT TACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA GCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT ATTGCTAGATTTAATAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGA GTAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAAT ATTATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTT TATTCAATAGAAATATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAAA</p>
<p>>พิจิตร Phichit_335/ มะนาว</p> <p>TTCTGATTTTTGGACATCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCT TCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATT TACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA GCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT ATTGCTAGATTTAATAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGA GTAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAAT ATTATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTT TATTCAATAGAAATATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAAA</p>
<p>>พิจิตร Phichit_337/ มะนาว</p> <p>CTGATTTTTGGACATCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCTTC AGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAAT AGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTA CGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGC AAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTAT TGCTAGATTTAATAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGA AAACTACTCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATAT TATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTA TTCAATAGAAATATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAAAG</p>
<p>>พิจิตร Phichit_338/ มะนาว</p> <p>TCTGATTTTTGGACATCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCTTC CAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA TAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTT ACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAG CAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTA TTGCTAGATTTAATAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGA TAAACTACTCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGAAATA TTATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTT ATTCAATAGAAATATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAAAGG</p>

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri (ต่อ)

<p>>พิจิตร Phichit_336/ ส้มโอ</p> <p>ATTCTGATTTTTGGACTCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCT TCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATT TACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA GCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT ATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGA GTAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAAT ATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTT TATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAA</p>
<p>>นครปฐม Nakhon Pathom_322/ ส้ม</p> <p>TTCTGATTTTTGGACATCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCT TCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAATCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATT TACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA GCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT ATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGA GTAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAAT TATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTT TTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAA</p>
<p>>นครปฐม Nakhon Pathom_323/ ส้มโอ</p> <p>TCTGATTTTTGGAATCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCT AGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAAT AGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTA CGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGC AAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTAT TGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGAAT GAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGAAATAT TATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTA TTCATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAGN</p>
<p>>นครปฐม Nakhon Pathom_324/ มะนาว</p> <p>TAANTCTGATTTTTGGACATCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAC ACTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAATCTATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTA GGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTTAGTTGACTAGCTAC AATTTACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAAT TTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGC CATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGT CGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCT GGAATATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAA TTGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAA</p>

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri (ต่อ)

<p>>นครปฐม Nakhon Pathom _326/ ส้มโอ</p> <p>TCTGATTTTTGGACATCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCT CAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAA TAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCTACAATTT ACGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAG CAAATTCATCAATTGACATTATTTCTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTA TTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATAACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGAG TAAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGGAATA TTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTT ATTCATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCAATTGAA</p>
<p>>ปทุมธานี Pathum Thani _362/ มะนาว</p> <p>TTCTGATTTTTGGACATCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCT TCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCTACAATTT TACGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA GCAAATTCATCAATTGACATTATTTCTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT ATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATAACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGGA GTAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGGAA TATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTT TTATTCATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCAATTGAATAG</p>
<p>>ปทุมธานี Pathum Thani _363/ มะนาว</p> <p>TCTGATTTTTTTGGACATCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCT TCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCTACAATTT TACGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA GCAAATTCATCAATTGACATTATTTCTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT ATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATAACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGGA GTAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGGAA TATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTT TTATTCATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCAATTGAAA</p>
<p>>ปทุมธานี Pathum Thani _365/ มะนาว</p> <p>AATNTCTGATTTTTGGAATCCTGAAGTGACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAA CTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAG GAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCTACA ATTTACGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAAT TTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTTCTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCC ATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATAACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTC GGAGTAAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTG GAATATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAAT TGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCAATTGAAGC</p>

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri (ต่อ)

<p>>นครศรีธรรมราช Nakhon Si Thammarat _368/ มะนาว</p> <p>TTCTGATTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCT TCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA ATAGATGTAGACTCAGGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTAGTTGACTAGCTACAATT TACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA GCAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT ATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGGA GTAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTCTGGAA TATTATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTT TTATTCATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAAA</p>
<p>>นครศรีธรรมราช Nakhon Si Thammarat _394/ มะนาว</p> <p>ATTCTGATTTTTGGAATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTT CAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAA TAGATGTAGACTCAGGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTAGTTGACTAGCTACAATTT ACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAG CAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTA TTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAG TAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTCTGGAATA TTATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTT ATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAA</p>
<p>>นครศรีธรรมราช Nakhon Si Thammarat _407/ มะนาว</p> <p>TTCTGATTTTTGGAATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTT CAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAA TAGATGTAGACTCAGGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTAGTTGACTAGCTACAATTT ACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAG CAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTA TTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAG TAAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTCTGGAATA TTATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTT ATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAA</p>
<p>>นครศรีธรรมราช Nakhon Si Thammarat _408/ มะนาว</p> <p>TCTGATTTTTGGAATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTT AGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAAT AGATGTAGACTCAGGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATAATTTAGTTGACTAGCTACAATTTA CGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGC AAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTAT TGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTTAAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGAGT AAACACTACCTTTTTCCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTCTGGAATAT TATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTA TTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAA</p>

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri (ต่อ)

>นครศรีธรรมราช Nakhon Si Thammarat _413/ มะนาว

TCTGAATTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTCA
GCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGA
TGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATAAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAA
TAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATCA
TCAATTGACATTATTTCTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATT
TATTAATTGATACCTTTTATAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTGGAGTAAACACTACCT
TTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGGAATATTATTTCTTCCTTA
GGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAATTAT
ATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGATAAC

>กระบี่ Krabi_371/ มะนาว

ATTTCTGATTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAAC
TCAGCATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAAT
AGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATAAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACG
GAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAAT
TCATCAATTGACATTATTTCTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAG
ATTTATTAATTGATACCTTTTATAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTGGAGTAAACACTA
CCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGGAATATTATTTCTTCCT
TTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAAT
TATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCANTGGAAA

>กระบี่ Krabi_418/ มะนาว

TTCTTGATTTTTGGACATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCT
CAGCATTTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATA
GATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATAAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGG
AATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAAT
CATCAATTGACATTATTTCTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGA
TTTATTAATTGATACCTTTTATAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTGGAGTAAACACTAC
CTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGGAATATTATTTCTTCCT
TAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAAT
ATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGA

>กระบี่ Krabi_419/ มะนาว

TTCTGATTTTTGGAAATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAAAACCTCA
GCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGA
TGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATAAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAA
TAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTAGCAAATCA
TCAATTGACATTATTTCTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATT
TATTAATTGATACCTTTTATAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTGGAGTAAACACTACCT
TTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTTTCTGGAATATTATTTCTTCCTTA
GGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAATTAT
ATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCCCAATTGAA

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri (ต่อ)

<p>>กระบี่ Krabi_422/ มะนาว</p> <p>TTCTTGATTTTTGGAATCCTGAAGTGACATTCCTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCT TCAGCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCTACAATT TACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA GCAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT ATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGGA GTAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGCGAA TATTATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTT TTATTCATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCAATNNAANN</p>
<p>>ตรัง Trang_369/ มะนาว</p> <p>TTATTCTGATTTTTGGAATCCTGAAGTGACATTCCTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCT CTTCAGCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAG GAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCTACA ATTTACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATT TTAGCAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCC ATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTC GGAGTAAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTG GAATATTATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAAT TGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCAATGCGAAA</p>
<p>>ตรัง Trang_370/ มะนาว</p> <p>GAATTTTTTTGGAATCCTGAAGTGACATTCCTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCTTC AGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAAT AGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCTACAATTTA CGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGC AAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTAT TGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCGAGT AAACTACTCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTGGAATAT TATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTA TTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCAATTGAAAAC</p>
<p>>ตรัง Trang_415/ มะนาว</p> <p>TTCTTGANTTTTTGGAATCCTGAAGTGACATTCCTATTCTCCGGGGTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCT CTTCAGCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAAATTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAG GAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTTAGTTGACTAGCTACA ATTTACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATT TTAGCAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACATATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCC ATTATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTC GGAGTAAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTG GAATATTATTTCTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAAT TGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCAATTGAANC</p>

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 650 bp ของยีนส์ mtCOI ของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri (ต่อ)

```
>ตรัง Trang_416/ มะนาว
TTCNGATTTTTGGAATCCTGAAGGTACATTCTTATTCTCCGGGTTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAAGAGGTAACCT
TCAGCATTCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACATTGGAATTTTAGGATTTATTGTATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGA
ATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAATTATTGCAGTACCGACAGGAATTAATTTTACTGTTGACTAGCTACAATT
TACGGAATAAAAAATAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGATCATTAGGATTTATCTTCCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTTA
GCAAATTCATCAATTGACATTATCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATT
ATTGCTAGATTTATTAATTGATACCTTTATTAACAGGAAATACAATAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTAAAGAACCTTCGTCGGA
GTAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCTTCTCATTCTCTGCGAA
TATTATTTCTTCCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTT
TTATTCATAGAAATTATATAATAATAGAATGAATGCAAACTCTCCCAATTAATAAAC
```

ตารางที่ 2 ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* ผลตรวจตัวอย่างเชื้อ
แบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรครีนนิ่งจากเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
D. citri จำนวน 45 ตัวอย่าง ผลการตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ให้ผล positive พบเชื้อจำนวน
25 ตัวอย่าง

ลำดับตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	จังหวัด	พืชอาหาร	ผลการตรวจ
1	350	เชียงราย	มะนาว	+
2	359	เชียงราย	มะนาว	+
3	378	เชียงราย	มะนาว	-
4	427	เชียงราย	มะนาว	-
5	429	เชียงราย	มะนาว	+
6	294	เชียงใหม่	มะนาว	+
7	295	เชียงใหม่	ส้ม	+
8	424	เชียงใหม่	มะนาว	-
9	425	เชียงใหม่	มะนาว	+
10	426	เชียงใหม่	มะนาว	-
11	328	กำแพงเพชร	ส้ม	+
12	329	กำแพงเพชร	มะนาว	+
13	330	กำแพงเพชร	มะนาว	-
14	331	กำแพงเพชร	มะนาว	-
15	332	กำแพงเพชร	มะนาว	-
16	333	พิจิตร	ส้มโอ	-
17	334	พิจิตร	มะนาว	+
18	335	พิจิตร	มะนาว	+
19	337	พิจิตร	มะนาว	+
20	338	พิจิตร	มะนาว	+

ตารางที่ 2 ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* ผลตรวจตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรครีนนิ่งจากเปลือกไม้แฉ่ำส้ม *D. citri* จำนวน 45 ตัวอย่าง ผลการตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ให้ผล positive พบเชื้อจำนวน 25 ตัวอย่าง

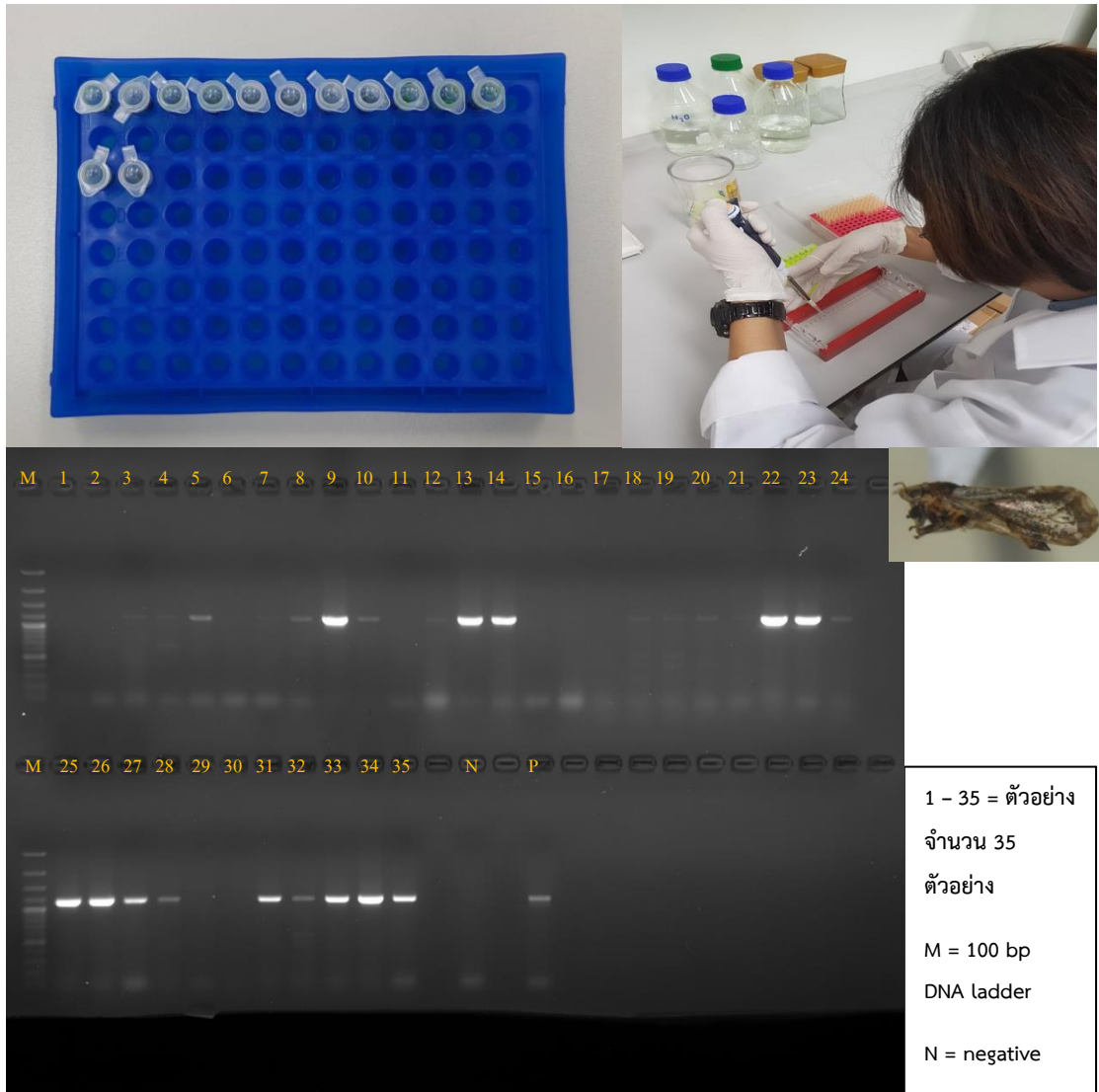
ลำดับตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	จังหวัด	พืชอาหาร	ผลการตรวจ
21	244	ชัยนาท	มะนาว	+
22	271	ชัยนาท	มะนาว	+
23	272	ชัยนาท	มะนาว	+
24	273	ชัยนาท	มะนาว	-
25	274	ชัยนาท	มะนาว	-
26	289	นครปฐม	มะนาว	-
27	322	นครปฐม	ส้ม	+
28	323	นครปฐม	ส้มโอ	+
29	324	นครปฐม	มะนาว	+
30	326	นครปฐม	ส้มโอ	+
31	360	ปทุมธานี	มะนาว	+
32	362	ปทุมธานี	มะนาว	+
33	363	ปทุมธานี	มะนาว	+
34	365	ปทุมธานี	มะนาว	+
35	368	นครศรีธรรมราช	มะนาว	-
36	394	นครศรีธรรมราช	มะนาว	+
37	407	นครศรีธรรมราช	มะนาว	-
38	408	นครศรีธรรมราช	มะนาว	+
39	413	นครศรีธรรมราช	มะนาว	-
40	370	ตรัง	มะนาว	-
41	415	ตรัง	มะนาว	-
42	416	ตรัง	มะนาว	-
43	418	กระบี่	มะนาว	-
44	419	กระบี่	มะนาว	-
45	422	กระบี่	มะนาว	-
Negative control (dH ₂ O)				-
Positive control (HLB-infected)				+



ภาพที่ 1 สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเปลือกไม้แฉ่ำส้ม *D. citri*



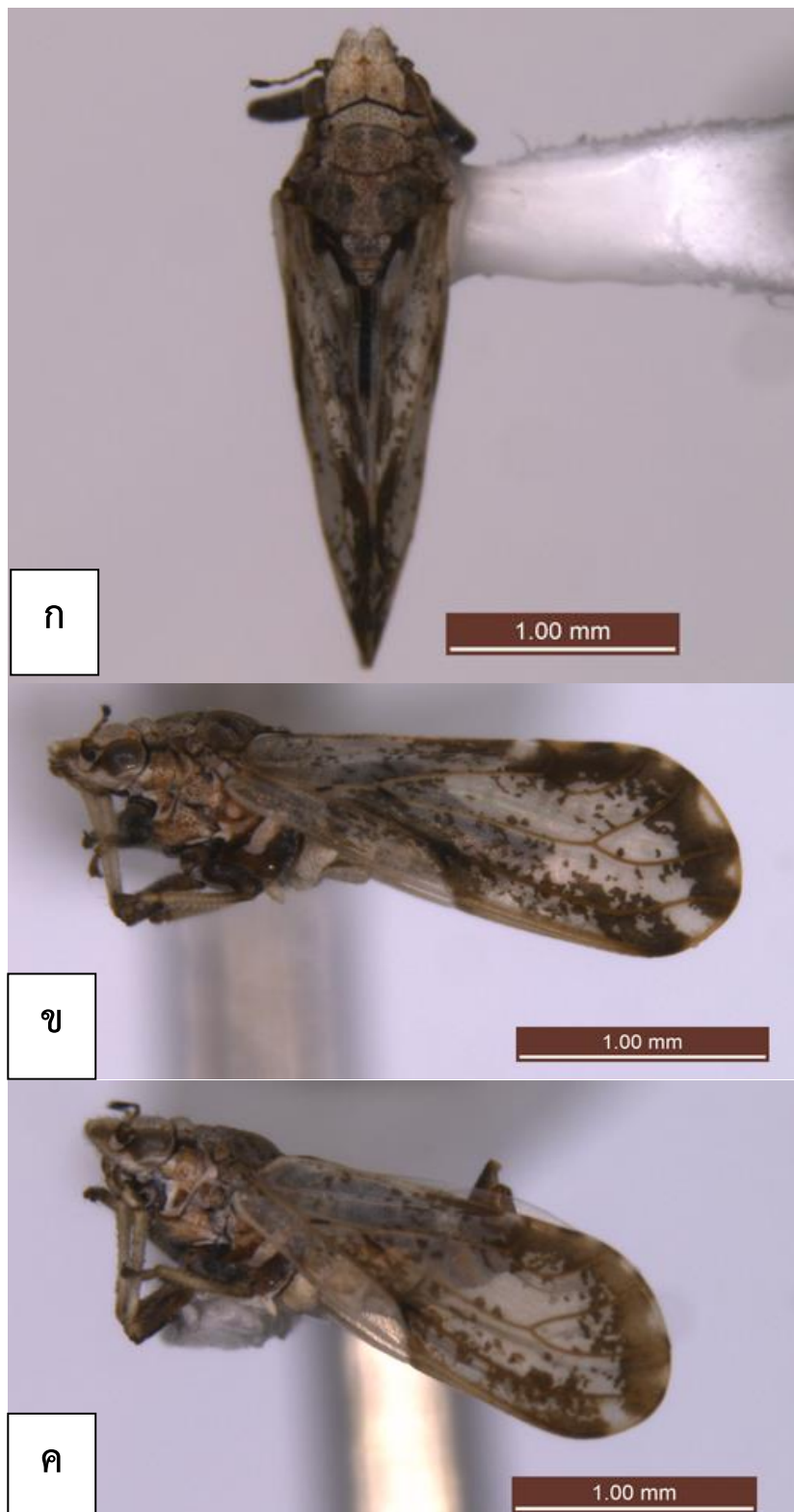
ภาพที่ 2 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) เปลือกไม้แฉ่ำส้ม *D. citri* ในห้องปฏิบัติการ



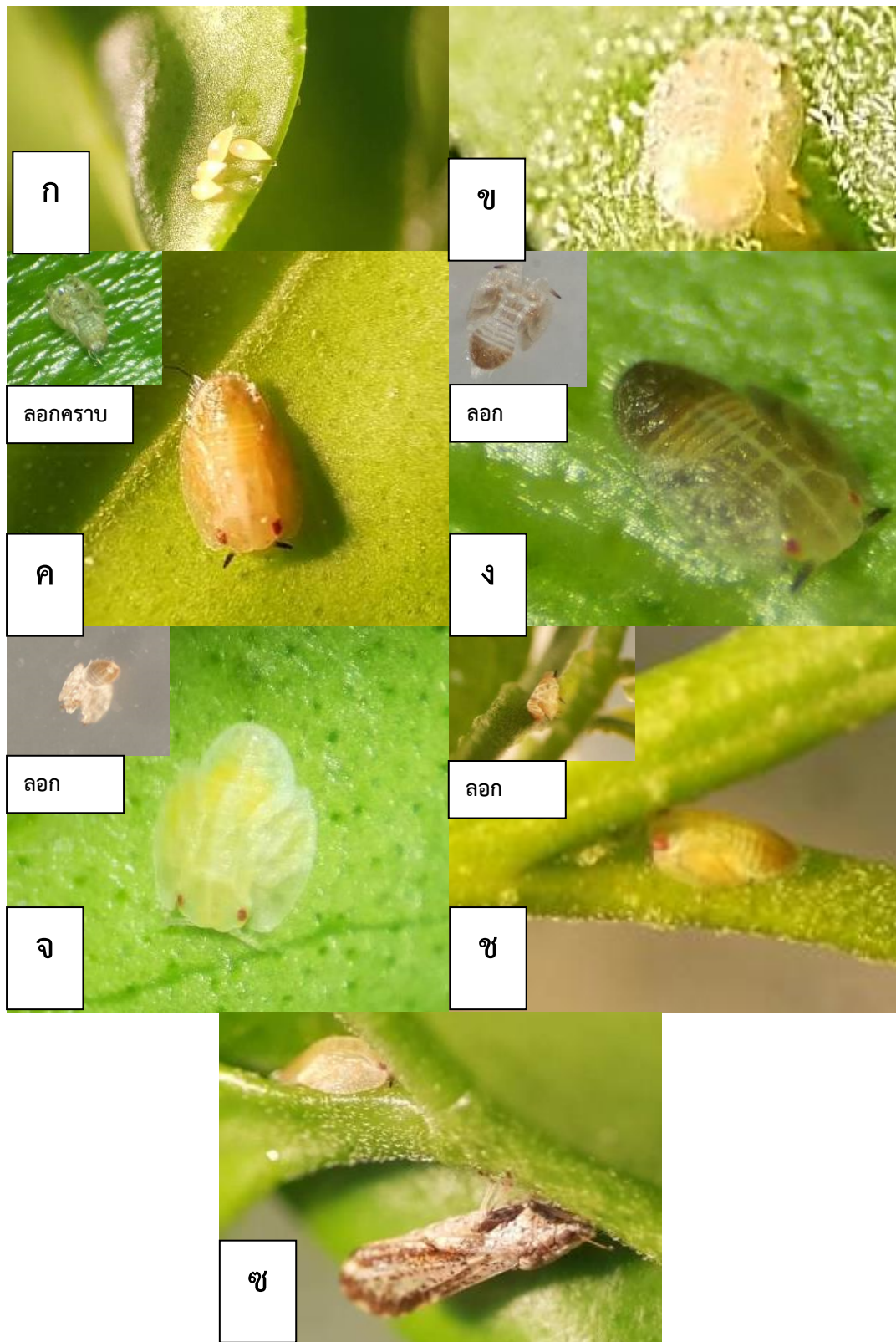
ภาพที่ 3 การตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. Asiaticus* สาเหตุโรครินนิ่งจากเปลือกส้ม *D. citri*



ภาพที่ 4 การทดสอบการรับเชื้อโรครินนิ่ง *Ca. L. Asiaticus* โดยตัวเต็มวัยและตัวอ่อนของเพลี้ยไก่อัจฉิม *D. citri*



ภาพที่ 5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวเต็มวัย (adult) เพลี้ยไก่อแจ้ส้ม *D. citri* ก) ลักษณะด้านบน (dorsal habitus); ข) ตัวเต็มวัยเพศเมีย (female); ค) ตัวเต็มวัยเพศผู้ (male)



ภาพที่ 6 วงจรชีวิตของเพลี้ยไก่อ้ำส้ม *D. citri* ก) ไข่; ข) ตัวอ่อนวัย 1; ค) ตัวอ่อนวัย 2; ง) ตัวอ่อนวัย 3; จ) ตัวอ่อนวัย 4; ช) ตัวอ่อนวัย 5; ซ) ตัวเต็มวัย

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

รายงานความก้าวหน้า

ทดสอบความจำเพาะของคูไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา real-time PCR สำหรับตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* ในข้าว ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2562 – กันยายน 2563 พบว่าการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้คูไพรเมอร์ BG1F/BG1R เชื้อ *B. gladiolipv. gladioli* มีค่า Cp และ Tm ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *B. glumae* สอดคล้องกับการทดสอบด้วย conventional PCR และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่ทดสอบ ทดสอบความจำเพาะของคูไพรเมอร์ Forward/Reverse พบว่าสามารถตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ได้สอดคล้องกับการทดสอบด้วย conventional PCR และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 10 ไอโซเลทเชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานเป็นสาเหตุโรคในข้าว ได้แก่ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *Pseudomonas fuscovaginae* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอีกหลายชนิด ได้แก่ *Acidovorax cattleyae*, *A. citrulli*, *B. gladiolipv. gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* *E. chrysanthemi* และ *Ralstonia solanacearum*

คำหลัก : การตรวจสอบ โรครวงไหม้ข้าว

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-01-00-04-62

คำนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรครวงไหม้ (bacterial panicle blight) ของข้าว พบรายงานครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่นและแพร่ระบาดในพื้นที่ปลูกข้าวของหลายประเทศทั่วโลก โดยเชื้อสร้างความเสียหายทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงสูงสุดถึง 75 % (Trunget al., 1993) สำหรับในประเทศไทยยังไม่พบรายงานการเกิดโรคจากเชื้อชนิดนี้ แต่เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สามารถติดไปกับเมล็ด (seed-borne) และเชื้อสามารถเจริญได้ถึงแม้มีอุณหภูมิสูงถึง 41 องศาเซลเซียส จึงทำให้เป็นที่กังวลของหลายประเทศเพราะเริ่มมีรายงานการแพร่ระบาดของโรครวงไหม้ในประเทศเขตร้อนและกึ่งร้อนมากขึ้น (Ham et al., 2011) หากเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ในไทยย่อมส่งผลกระทบต่อทางเศรษฐกิจเนื่องจากข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญของประเทศไทยซึ่งมีพื้นที่ปลูกประมาณ 62 ล้านไร่กระจายอยู่ทั่วประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) แบคทีเรีย *B. glumae* จึงนับเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งทางด้านกักกันพืชที่ต้องมีการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเคลื่อนย้ายหรือนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวจากประเทศที่มีการระบาดของโรค ดังนั้นการหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ จะสามารถลดโอกาสการแพร่ระบาดของเชื้อที่อาจติดมากับเมล็ดได้ จากรายงานของ Nandakumaret al. (2009) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* เป็นสาเหตุอาการรวงไหม้ในข้าวได้เช่นเดียวกัน ทำให้การตรวจสอบในเบื้องต้นโดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อและลักษณะอาการของโรคทำได้ยากขึ้น เทคนิค real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่มีประสิทธิภาพตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยในตัวอย่างพืชได้ ดังรายงานของ Saylor et al. (2006) ที่ใช้ real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* จากเมล็ดและต้นข้าวโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสของ 16S-23S rDNA ITS พบว่าสามารถตรวจเชื้อได้ที่จำนวน 1-10 เซลล์ และรายงานของ Kim et al. (2012) ซึ่งใช้เทคนิค real-time bio-PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* จากเมล็ดข้าว ได้ที่ 1 CFU ต่อปฏิกิริยา จากข้อดีของเทคนิคงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคนิค real-time PCR มาใช้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าว เพื่อลดโอกาสการแพร่ระบาดของเชื้อที่อาจติดมากับเมล็ดและสามารถนำไปปรับใช้ในงานเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันต่อไปในอนาคตได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอ

4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
8. เครื่องซั่ง
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ ทำปฏิกิริยา PCR และ real-time PCR

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก International Rice Research Institute (IRRI) เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าว และแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ ที่เก็บรักษาไว้ใน แหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขั้นตอนตามแนะนำของบริษัท โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 ลูบ 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. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae*

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* แบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าวและแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ ที่ต้องการทดสอบมาวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ทำการทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) โดยใช้ชุดน้ำยา LightCycler480 SYBR green I master (Roche Diagnostics,

Thailand) ในการทำปฏิกิริยาจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X LightCycler480 SYBR Green I Master (FaststartTaq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP, SYBR green dye และ $MgCl_2$), 0.25 uM primer และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 1 ไมโครลิตร การรายงานผลการมีหรือไม่มีผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายได้จากการวิเคราะห์ค่า C_p และ melting curve เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก International Rice Research Institute (IRRI) โดยมีรายละเอียดโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	95	00:03:00	4.40	none
Amplification	45	95	00:00:10	4.40	none
		63	00:00:20	2.20	none
		72	00:00:15	4.40	none
		72	00:05:00	4.40	single
Melting curve	1	95	00:00:05	4.40	none
		72	00:01:00	2.20	none
		95	00:00:00	0.10	continuous
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

เวลาและสถานที่

เวลา	ตุลาคม 2562 – กันยายน 2563
สถานที่	ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลองและเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาฟื้นฟูโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 1 ลูบ ในการสกัดดีเอ็นเอขึ้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae*

ดำเนินการทดสอบความจำเพาะของคู่มือ BG1F/BG1R สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าเชื้อ

B. gladiolipv. gladioli มีค่า Cp และ Tm ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *B. glumae* สอดคล้องกับการทดสอบด้วย conventional PCR และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 10 ไอโซเลท เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae*, *X. oryzaepv. oryzae*, *X. oryzaepv. oryzicola*, *A. cattleyae*, *A. citrulli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* *E. chrysanthemi* และ *R. solanacearum*

ดำเนินการทดสอบความจำเพาะของคูไพรเมอร์ Forward/Reverse สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค real-time พบว่าสามารถตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ได้สอดคล้องกับการทดสอบด้วย conventional PCR และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 10 ไอโซเลท เชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานเป็นสาเหตุโรคในข้าว ได้แก่ *X. oryzaepv. oryzae*, *X. oryzaepv. oryzicola*, *P. fuscovaginae* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอีกหลายชนิด ได้แก่ *A. cattleyae*, *A. citrulli*, *B. gladiolipv. gladioli*, *E. carotovora* subsp. *carotovora* *E. chrysanthemi* และ *R. solanacearum*

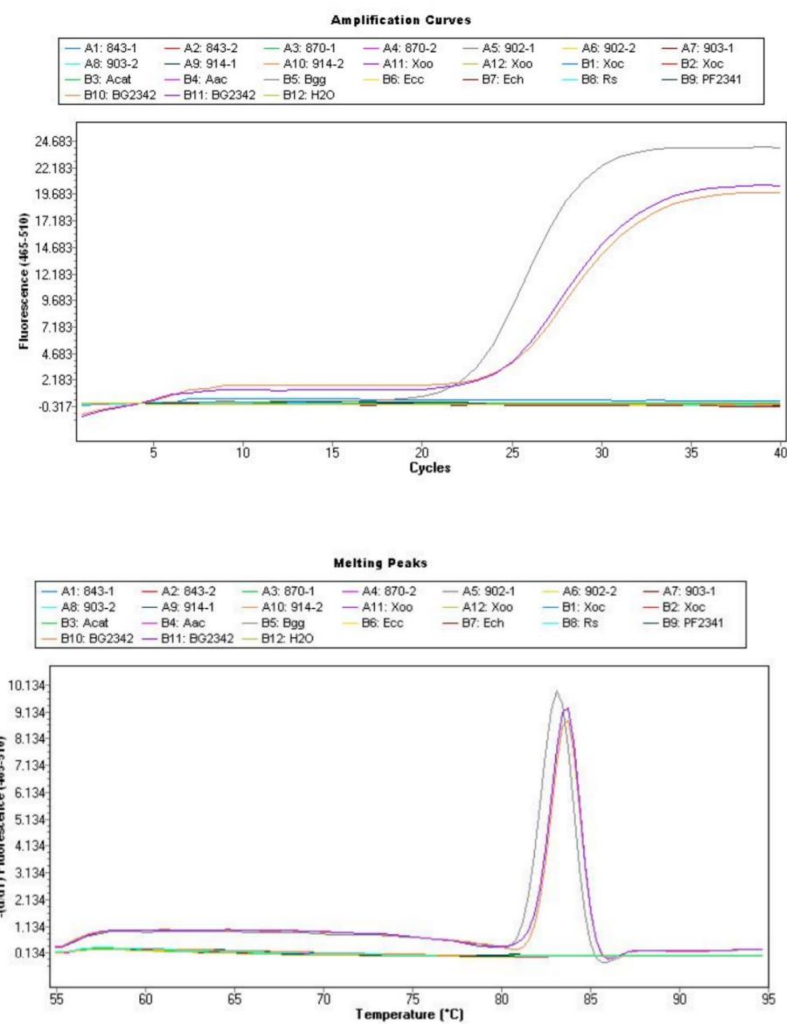
สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ดำเนินการทดสอบความจำเพาะของคูไพรเมอร์ BG1F/BG1R สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าเชื้อ *B. gladiolipv. gladioli* มีค่า Cp และ Tm ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *B. glumae* สอดคล้องกับการทดสอบด้วย conventional PCR และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่ทดสอบทดสอบความจำเพาะของคูไพรเมอร์ Forward/Reverse พบว่าสามารถตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ได้สอดคล้องกับการทดสอบด้วย conventional PCR และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 10 ไอโซเลท เชื้อแบคทีเรียที่มีรายงานเป็นสาเหตุโรคในข้าว ได้แก่ *X. oryzaepv. oryzae*, *X. oryzaepv. oryzicola*, *P. fuscovaginae* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอีกหลายชนิด ได้แก่ *A. cattleyae*, *A. citrulli*, *B. gladiolipv. gladioli*, *E. carotovora* subsp. *carotovora* *E. chrysanthemi* และ *R. solanacearum*

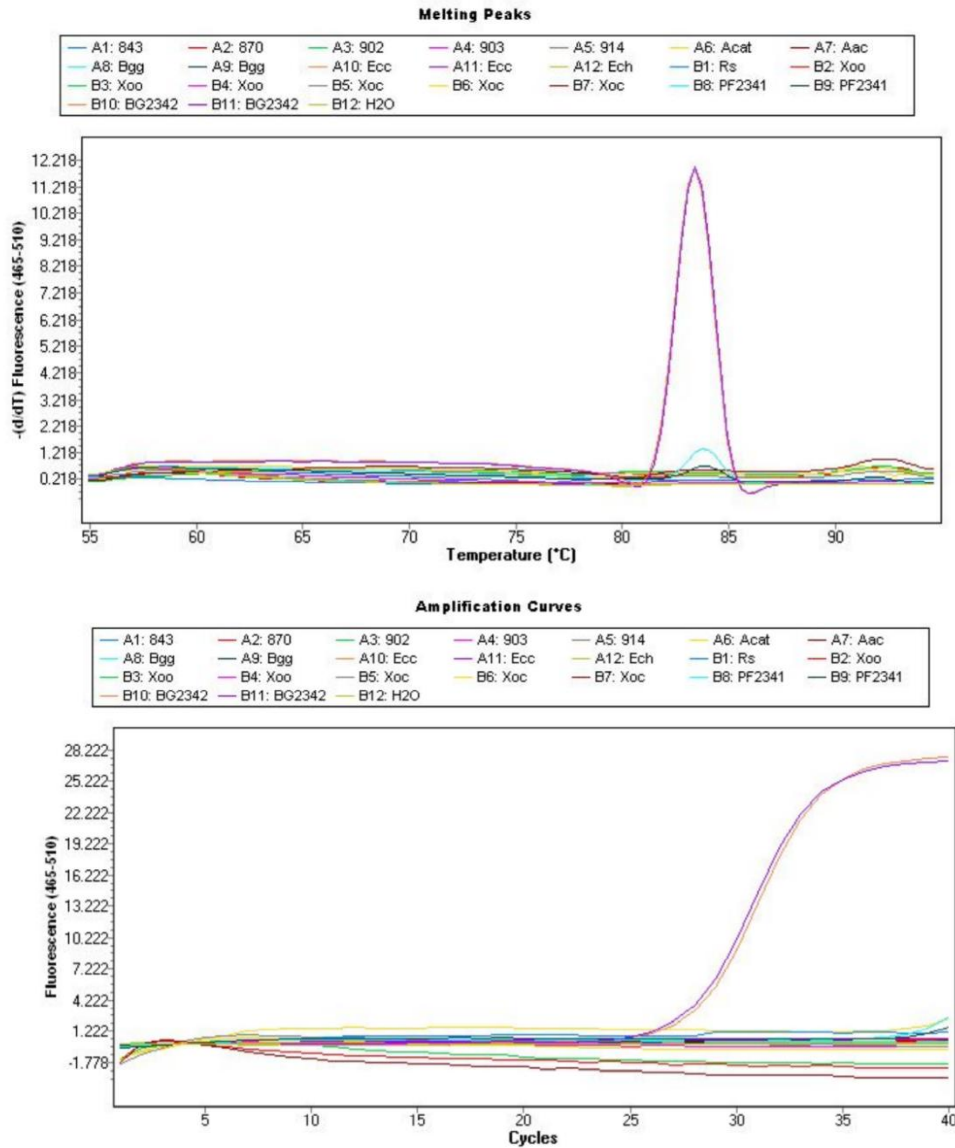
เอกสารอ้างอิง

- สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. *สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2558*. โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ, 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.
- 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.



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบความจำเพาะของคูไพรเมอร์ BG1F/BG1R ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ Forward/Reverse ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR

พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*
species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย
Detection of *Ralstonia solanacearum* Species Complex cause of
Bacterial Wilt Disease of Banana

ทิพวรรณ กันหาญาติ ญัฐิมา โฆษิตเจริญกุล บุรณี พ้วงษ์แพทย
รุ่งนภา ทองเคร็ง กาญจนา ศรีไม้
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ในการใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยตั้งแต่ เดือนตุลาคม 2562 – กันยายน 2563 พบว่าไพรเมอร์ 121F/121R สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ Blood Disease Bacterium ที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเป็นโรคเหี่ยวได้อย่างเฉพาะเจาะจง ส่วนคู่ไพรเมอร์ 759/760 สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex ได้แก่ เชื้อ Blood Disease Bacterium ที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเป็นโรคเหี่ยว แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกกล้วย และแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากพืชอื่น เช่น พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ชิง ปทุมมา ยูคาลิปตัส และให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรีย *A. citrulli*, *A. cattleyae*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *E. carotovora* subsp. *Carotovora* และ *E. chrysanthemi*

คำหลัก : การตรวจสอบ โรคเหี่ยวกล้วย

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-01-00-05-62

คำนำ

โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstoniasolanacearum* เป็นโรคพืชที่มีความสำคัญมาก โรคหนึ่งของกล้วยเนื่องจากก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงแก่พืชจนไม่สามารถให้ผลผลิตได้ โดยเฉพาะในโคลอมเบีย ทำความเสียหายสูงถึง 100% (Álvarez *et al.*, 2015) ในเอเชียพบการแพร่ระบาดของโรคครั้งแรกที่ประเทศฟิลิปปินส์ (Rillo, 1979) ประเทศอินเดีย (Mondalet *et al.*, 2012) และต่อมาพบที่ประเทศมาเลเซีย (Zulperi and Sijam, 2014) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้ในกล้วย (วนิดา, 2542) แต่เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกกล้วยเพื่อบริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกกระจายอยู่ทั่วทั้งประเทศ (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) และมีรายงานการระบาดของโรคเหี่ยวของกล้วยที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในประเทศเพื่อนบ้านที่มีชายแดนติดกับประเทศไทย จึงต้องหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ เพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อเพราะหากเกิดการแพร่ระบาดจะเป็นไปอย่างรวดเร็วและกว้างขวางเนื่องจากเชื้อสามารถติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตรที่ใช้ในแปลงและส่วนขยายพันธุ์ของพืชได้ เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่มีความจำเพาะ ตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยในตัวอย่างพืชได้ ดังรายงานของ Opina *et al.* (1997) ที่ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าสามารถตรวจเชื้อได้ที่จำนวน 1.4-20 เซลล์ จากข้อดีของเทคนิคงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิค PCR มาใช้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย เพื่อลดโอกาสการแพร่ระบาดของเชื้อที่อาจติดมากับส่วนขยายพันธุ์และสามารถนำไปปรับใช้ในงานเฝ้าระวังศัตรูพืชกักกันต่อไปในอนาคตได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขั้นตอนตามแนะนำของบริษัท โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 ลูบ 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 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul เพื่อนำไปทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค PCR เปรียบเทียบกับคูไพรเมอร์ 759/760 (Opinaet *al.*, 1997) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 50 ng/μl, 1X One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taipei, Taiwan) และไพรเมอร์ 0.5 μM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedicalische Analytik GmbH, Goettingen, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose

ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC CambridgePlatinum (Uvitec Ltd., Cambridge, UK)

เวลาและสถานที่

เวลา	ตุลาคม 2562 – กันยายน 2563
สถานที่	ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานбакเทรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลองและเก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาฟื้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 1 ลูบ ในการสกัดดีเอ็นเอขึ้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

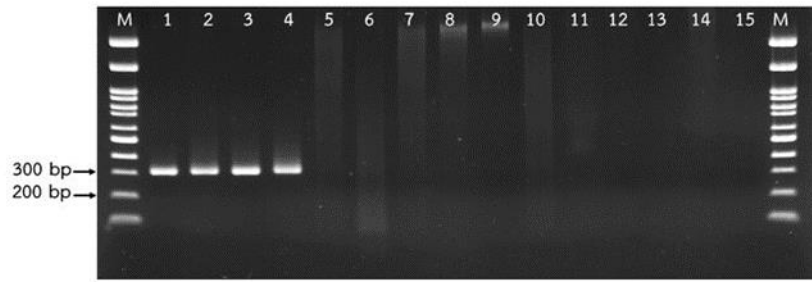
ดำเนินการทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ในการใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย พบว่าไพรเมอร์ 121F/121R (Tan, 2003) สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ Blood Disease Bacterium สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเป็นโรคเหี่ยวได้อย่างเฉพาะเจาะจงปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 317 bp และให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบกับเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกกล้วย แบคทีเรีย *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวจากพืชอื่น เช่น พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ยูคาลิปตัส เชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax citrulli*, *A. cattleyae*, *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* และ *E. chrysanthemi* ส่วนคู่ไพรเมอร์ 759/760 สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex ได้แก่ เชื้อ Blood Disease Bacterium สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเป็นโรคเหี่ยว แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกกล้วย และแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากพืชอื่น เช่น พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ยูคาลิปตัส ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 280 bp และให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรีย *A. citrulli*, *A. cattleyae*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi*

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

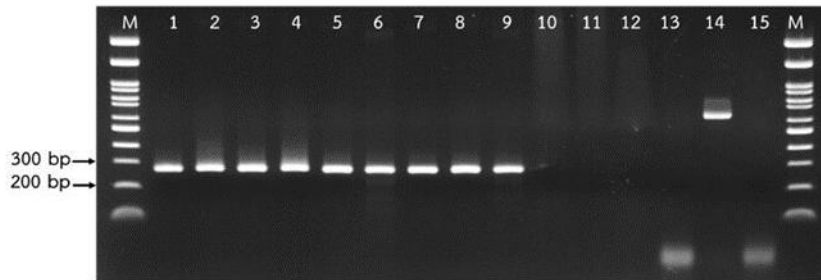
ทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์ในการใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย พบว่าไพรเมอร์ 121F/121R สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อ Blood Disease Bacterium สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเป็นโรคเหี่ยวได้อย่างเฉพาะเจาะจงปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 317 bp และให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ที่ใช้ทดสอบ ส่วนคู่ไพรเมอร์ 759/760 สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex ได้แก่ เชื้อ Blood Disease Bacterium สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเป็นโรคเหี่ยว แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกกล้วย และแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากพืชอื่น เช่น พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ยูคาลิปตัส ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 280 bp และให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรีย *A. citrulli*, *A. cattleyae*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi*

เอกสารอ้างอิง

- วนิดา ฐิตะฐาน. 2542. โรคเหี่ยวของพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstoniasolanacearum*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 151 หน้า.
- สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. สารสนเทศเศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้าปี 2560. บริษัท 21 เซ็นจูรี 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)
- Mondal, B., S.K. Ray, D.K. Misra and D.C. Khatua. 2012. Bacterial wilt of banana in West Bengal, India. *Internat. J. Plant Protec.*, 5: 227-231.
- 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 *Burkholderiasolanacearum* (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.
- Tan, P.H.L. 2003. The blood disease bacterium: exploiting genetic diversity for the development of a molecular diagnostic test. Bachelor of Science (Honours) thesis, The University of Queensland, Brisbane.
- Zulperi, D., and K. Sijam. 2014. First report of *Ralstoniasolanacearum* Race 2 biovar 1 causing Moko disease of banana in Malaysia. *Plant Dis.* 98:275. doi: 10.1094/PDIS-03-13-0321-PDN.



ไพรเมอร์ 121F/121R



ไพรเมอร์ 759/760

ภาพที่ 1 ทดสอบความจำเพาะของคู่ไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย

R. solanacearum species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย โดย

ช่อง M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน OneMark 100

ช่อง 1 คือ เชื้อแบคทีเรีย Blood Disease Bacterium (ตัวอย่างโรคเหี่ยวกล้วย)

ช่อง 2 คือ เชื้อแบคทีเรีย Blood Disease Bacterium (ตัวอย่างโรคเหี่ยวกล้วย)

ช่อง 3 คือ เชื้อแบคทีเรีย Blood Disease Bacterium (ตัวอย่างโรคเหี่ยวกล้วย)

ช่อง 4 คือ เชื้อแบคทีเรีย Blood Disease Bacterium (ตัวอย่างโรคเหี่ยวกล้วย)

ช่อง 5 คือ เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (ตัวอย่างดิน)

ช่อง 6 คือ เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (ตัวอย่างดิน)

ช่อง 7 คือ เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (พริก)

ช่อง 8 คือ เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (ขิง)

ช่อง 9 คือ เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* (ปทุมมา)

ช่อง 10 คือ เชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax citrulli*

ช่อง 11 คือ เชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax cattleiae*

ช่อง 12 คือ เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*

ช่อง 13 คือ เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi*

ช่อง 14 คือ เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

ช่อง 15 คือ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

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

รายงานความก้าวหน้า

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2562 – กันยายน 2563 พบว่าทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันไดซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP การตรวจสอบผลด้วยสารเรืองแสง SYBR Green I หลังทำปฏิกิริยาเสร็จ พบว่าสารเรืองแสง SYBR Green I เปลี่ยนจากสีส้มเป็นเรืองแสงสีเขียวในทุกตัวอย่างดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่ทดสอบยกเว้นน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ สอดคล้องกับการตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

คำหลัก :

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-01-00-06-63

คำนำ

เชื้อสาเหตุของโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าวถูกศึกษาและจัดจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมี พิษอาศัย ความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยาว่าเป็นแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* โดย Tani 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 มีสีขาวยิ่งสีน้ำตาลอ่อนเหลืองปนแสง มีความเหนียวเหนียวเหนียว

อาการของโรคเน่าสีน้ำตาลจะปรากฏที่กาบใบเปลือกหุ้มใบข้าวระยะต้นกล้าและระยะเจริญเติบโตในภายหลัง ต้นกล้าที่ติดเชื้อในระยะเริ่มแรกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลบนกาบใบด้านล่าง (Cottyn et al., 1994) หลังจากนั้นจะเปลี่ยนสีจากสีเทาน้ำตาลเป็นสีน้ำตาลเข้ม ในที่สุดต้นกล้าที่ติดเชื้อจะเน่าและตายในที่สุด ใบต้นกล้าจะเกิดการเปลี่ยนสีของเส้นกลางใบและเส้นใบได้ อาการของโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลในข้าวจะพบบนกาบใบของต้นข้าวโดยเฉพาะกาบใบของใบธงและรวงข้าว มีลักษณะอาการเช่นเดียวกับบนต้นกล้า เกิดแผลบริเวณกาบใบเป็นสีน้ำตาลเข้มล้อมรอบด้วยรอยข้าวขอบสีน้ำตาลเข้ม บางครั้งกาบใบแสดงอาการฉ่ำน้ำ เน่าเป็นสีน้ำตาลเข้มแต่ไม่มีแผลที่ชัดเจน หากเป็นโรครุนแรงกาบใบจะกลายเป็นเน่าและแห้งตายในที่สุด อาการของโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลในแปลงนาข้าวใกล้เคียงกับอาการของโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและเชื้อราอื่นๆทำให้สับสนในการวินิจฉัยโรค นอกจากนี้แบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ยังสามารถติดไปกับเมล็ดได้ ในประเทศอินโดนีเซีย มีรายงานว่าแปลงนาที่มีการระบาดของโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลถึง 72% ในฤดูร้อนพบว่าเมล็ดข้าวที่เก็บเกี่ยวจากแปลงที่มีการระบาดของโรคมีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง แต่ในฤดูฝนพบว่าเมล็ดข้าวเมล็ดข้าวที่เก็บเกี่ยวมีลักษณะไม่ตีสีเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ไม่สามารถนำไปใช้ในการขยายพันธุ์ได้ (Cahyaniati and Mortensen, 1997). โรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลแพร่ระบาดในพื้นที่ปลูกข้าวของหลายประเทศทั่วโลก ในเดือนเมษายน 2554 เกิดการระบาดอย่างรุนแรงในประเทศสาธารณรัฐเกาหลีใต้ สร้างความเสียหายทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงถึง 10 -20% พื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด. (Kim et al., 2015) สำหรับในประเทศไทยยังไม่พบรายงานการเกิดโรคจากเชื้อชนิดนี้ แต่เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* สามารถติดไปกับเมล็ด (seed-borne) และเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งทางด้านกักกันพืชที่ต้องมีการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเคลื่อนย้ายหรือนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวจากประเทศที่มีการระบาดของโรค การใช้เมล็ดพันธุ์ปลอดโรคเป็นอีกวิธีที่ใช้ป้องกันการแพร่ระบาดของโรค ดังนั้นการหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ จะสามารถลดโอกาสการแพร่ระบาดของเชื้อที่อาจติดมากับเมล็ดได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

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

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลในข้าว และแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขึ้นตอนตามแนะนำของบริษัท เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย

P. fuscovaginae

ดำเนินการทดสอบโปรแกรมที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าวด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดโปรแกรมดังแสดงในตาราง (Table 1) ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP โดยการหาความเข้มข้นของสารในการทำปฏิกิริยา อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยใช้โปรแกรมเซตที่กล่าวข้างต้น ปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยชุดไพรเมอร์ 1.6 μ M FIP และ BIP, 0.2 μ M F3 และ B3 primer, 0.4 μ M loop B primer, 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 cell suspension ของเชื้อที่ต้องการทดสอบ บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งก่อน แล้วเติม 8U *Bst* DNA polymerase บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

เวลาและสถานที่

เวลา	ตุลาคม 2562 – กันยายน 2563
สถานที่	ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลองและเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาฟื้นฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 1 ลูบ ในการสกัดดีเอ็นเอขั้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae*

ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* 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 ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันไดซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP การตรวจสอบผลด้วยสารเรืองแสง SYBR Green I หลังทำปฏิกิริยาเสร็จพบว่าสารเรืองแสง SYBR Green I เปลี่ยนจากสีส้มเป็นเรืองแสงสีเขียวในทุกตัวอย่างดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่ทดสอบยกเว้นน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ สอดคล้องกับการตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* พบว่าทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันไดซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของผลผลิตที่

ได้จากปฏิกิริยา LAMP การตรวจสอบผลด้วยสารเรืองแสง SYBR Green I หลังทำปฏิกิริยาเสร็จพบว่าสารเรืองแสง SYBR Green I เปลี่ยนจากสีส้มเป็นเรืองแสงสีเขียวในทุกตัวอย่างดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่ทดสอบยกเว้นน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ สอดคล้องกับการตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

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 Dis* 98: 909– 915.
- Cahyaniati A., 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 pp
- Cottyn B., M.T. Cerez, T.W. Mew. 1994. Bacterial pathogens. p. 91–96. In: “A Manual of Rice Seed Health Testing” (T.W. Mew, J.K. Misra, eds.). International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- 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; T. Akita. 1983. *Pseudomonas fuscovaginae* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(3):656-657
- Tanii A; K. Miyajima; T. Akita. 1976. The sheath brown rot disease of rice plant and its causal bacterium, *Pseudomonas fuscovaginae* A. Tanii, K. Miyajima & T. Akita 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 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers used in this study.

Primer set	Single primer	Sequence (5'-3')	Reference
Pf3	F3	GAATTCGGTTCCTATGATTCCT	Ash <i>et al.</i> (2014)
	B3	TTGAGCAGACTCATGATTCAG	
	FIP	TCACGCACAACTGTTCTGGTTGC AGAGCAATAATCGCTAT	
	BIP	AAAGGCCGGGTACGCAACTCTGGT AGCTCTTCATCTGT	
	LoopF	GCCGACTTCAGCACATCT	
	LoopB	TACGCCAGCAAGATCACG	
Pf8	F3	TGTGTTTCAGTTCCTTCATCG	Ash <i>et al.</i> (2014)
	B3	TAACAGCGTCACGTTCTTC	
	FIP	GATCATCAGCGGGACTGTCAGGGT GAGGTCTACGAGAAATTC	
	BIP	CGACGGCGATTCGTTGCGTTATA CAACAACGCTTGCC	
	LoopF	TGAGAAACGCCTTCTGGTC	
	LoopB	TGTGCTGTGCCTGATTCTT	

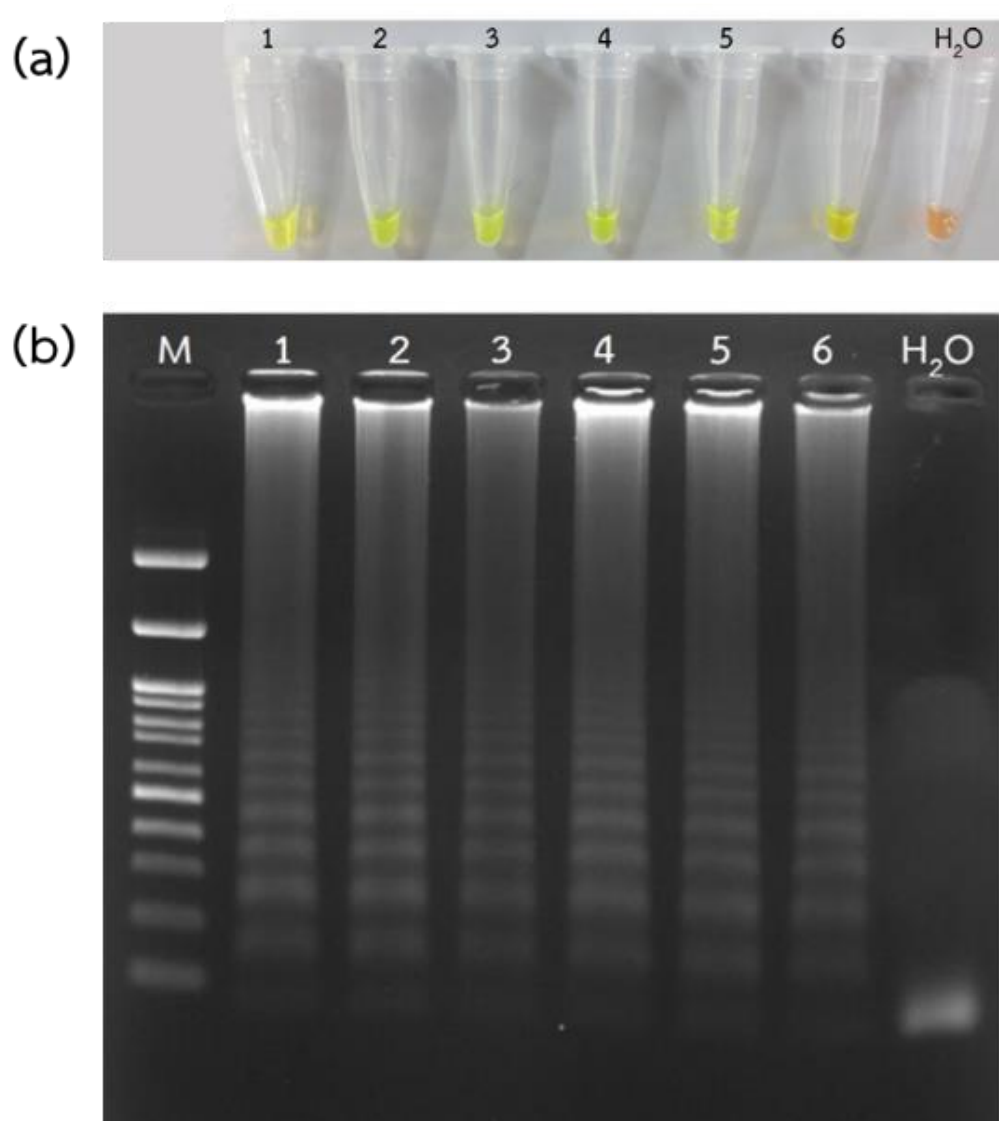


Figure 1 Detection of *Pseudomonas fuscovaginae* by loop-mediated amplification (LAMP) assay. (a) Visual inspection of LAMP assay with SYBR Green I and (b) agarose gel electrophoresis visualization

การตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum* ด้วยเทคนิค
 Polymerase Chain Reaction
 Detection of *Neoscytalidium dimidiatum* using Polymerase
 Chain Reaction Technique

พรพิมล อธิปัญญาคม^{1/} ชนินทร ดวงสอด^{2/} มะโนรัตน์ สุดสงวน^{2/}

^{1/}ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Brown spot or stem canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* and it shown as the important disease of dragon fruits. The whole plant parts could be infected by the causal agent, which caused the severe damage to dragon fruit production. It would be provided the advantage and benefit to dragon fruit production if the disease could be detected before the appearance of the symptoms. This study was conducted to the detection method to detect *N. dimidiatum*, which could reduce the limitations of morphological identification and the requirement of fast and accurate diagnosis, the species-specific primer was designed to detect *N. dimidiatum*. Two pairs of primers from this study namely, NdDOA-8F/NdDOA-6R and NdDOA-7F/ITS4 showed the specific results to *N. dimidiatum*. Developed the detection method can support the fast and accurate diagnosis, which could bring the advantages for making a decision for disease management as well as support the export and import of dragon fruits.

Keywords: *Neoscytalidium dimidiatum*, brown spot, stem canker, PCR

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-06-61

บทคัดย่อ

โรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (brown spot หรือ stem canker) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* โรคที่สำคัญแก้วมังกร ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล ทำให้เกิดความเสียหายกับเกษตรกรเป็นจำนวนมาก เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อวินิจฉัยโรคในขณะที่ยังไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งสามารถตรวจสอบโรคให้รวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้นก่อนการแสดงอาการของโรคจะปรากฏเพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสม เพื่อลดข้อจำกัดของการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเพื่อการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว แม่นยำ จึงพัฒนาวิธีการตรวจสอบรา *N. dimidiatum* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล จากการศึกษาครั้งนี้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* จำนวน 2 คู่ ได้แก่ NdDOA-8F/NdDOA-6R และ NdDOA-7F/ITS4 ผลจากการศึกษาครั้งนี้ นอกจากสามารถตรวจสอบวินิจฉัยสาเหตุโรคได้อย่างรวดเร็วเพื่อการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพแล้ว ยังสามารถสนับสนุนและเพิ่มศักยภาพในวินิจฉัยสาเหตุโรคก่อนการส่งออกและการนำเข้าสินค้าเกษตร

คำหลัก : *Neoscytalidium dimidiatum* brown spot stem canker PCR

คำนำ

แก้วมังกรเป็นพืชวงศ์กระบองเพชร (*Cactaceae*) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton & Rose มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกากลาง ประเทศเม็กซิโก บริเวณแปซิฟิก ประเทศกัวเตมาลา คอสตาริกา และเลซัลวาดอ และเรียกผลไม้ชนิดนี้ว่า pitaya (พีไทอา) หรือ pitahaya (พีทาโฮอา) หรือ strawberry pear ประเทศไทยเรียกผลไม้ชนิดนี้ว่าแก้วมังกร (dragon fruit) แก้วมังกรเป็นพืชไม้เลื้อยมีลำต้น 3 แฉก ๆ เป็นหยัก ๆ คล้ายครีบบัมกร ที่ตาข้างมีหนาม 1-5 หนาม แฉกนั้นอวบน้ำซึ่งเป็นใบที่เปลี่ยนรูป ลำต้นจริงอยู่กึ่งกลางของแฉก เมื่อต้นสมบูรณ์มีอายุประมาณ 2 ปี จากกิ่งปักชำ ฤดูกาลของผลแก้วมังกรมีช่วงยาวพอสมควร ตั้งแต่พฤษภาคมถึงตุลาคม (สุรพงษ์, 2544)

สำหรับในประเทศไทยนั้น โรคที่สำคัญคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (brown spot หรือ stem canker) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล (พรพิมล และคณะ, 2550; พรพิมล และคณะ, 2552; Athipunyakom and Likhitekaraj. 2010; Athipunyakom *et al.*, 2015) ซึ่งในปัจจุบันพบการระบาดของโรคนี้ในหลายประเทศในเขตประเทศเอเชีย ได้แก่ ประเทศไต้หวัน (Wang and Lin *et al.*, 2005; Hui-Fang *et al.*, 2013) จีน (Yi *et al.*, 2015) มาเลเซีย (Mizrahi *et al.*, 2015) และเวียดนาม (Hieu *et al.*, 2014) ดังนั้นปัญหาโรคของแก้วมังกรที่สำคัญที่สุดที่ระบาดในหลายประเทศในเขตเอเชีย คือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ มีการระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว และการป้องกันกำจัดค่อนข้าง

ยาก ซึ่งแต่ละประเทศกำลังเร่งดำเนินงานวิจัยศึกษาอยู่ รา *N. dimidiatum* สามารถเจริญเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชและสามารถเข้าไปพักตัวอยู่ในพืชได้โดยยังไม่แสดงอาการ ถ้าแก้วมังกรแสดงอาการของโรคชัดเจนแล้ว แสดงว่าเชื้อราเข้าไปทำลายพืชและสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราและสปอร์ ทำให้การป้องกันกำจัดโรคนั้นยากมากขึ้น

ดังนั้นการศึกษานี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction ซึ่งจะทำให้สามารถวินิจฉัยชนิดของเชื้อราสาเหตุได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ หาวีธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม

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

1. วัสดุในห้องปฏิบัติการ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบบิดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ

2. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ปิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate

3. สารเคมี ได้แก่

- Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)
- High fidelity Phusion® DNA Polymerase (New England Biolabs)
- 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: TTACGTCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al.*, 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell *et al.*, 1998)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA)

6. Sequence assemble program ได้แก่ Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012)

วิธีการ

1. ข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum*

สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม

2. การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum*

2.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium*

2.1.1 รวบรวมราในสกุล *Neoscytalidium* จาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2.1.2 รวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราในสกุล *Neoscytalidium*

2.1.2.1 เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราในสกุล *Neoscytalidium* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในฟิโธธัมน์โรคพืช ตึกอภิศรีศรีการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2.1.2.2 แยกราให้บริสุทธิ์โดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมามาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่

อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน แยกมาให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.1.2.3 จำแนกชนิดของรา *Neoscytalidium* โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Neoscytalidium* ศึกษาเกี่ยวกับคู่มือการจำแนกชนิดที่เกี่ยวข้อง (Alcorn, 1983; Carmichael *et al.*, 1980; Ellis, 1971; 1993; Sutton, 1980)

2.1.3 นำราที่ได้จากข้อ 2.1.1 และ 2.1.2 มาทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยเขียนใยของราที่เลี้ยงบน PDA จากนั้นย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

2.1.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) และ the translation elongation factor 1-alpha (tef1) กำหนดใช้ค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิต แนะนำ

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 (tef1)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell *et al.*, 1998)

2.1.5 การตรวจสอบปฏิกิริยา 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

2.1.6 การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบโดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>, Kears *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน

รูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาพื้นฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence และจำแนกชนิดโดยวิธี phylogenetic reconstruction

2.1.7 รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Neoscytalidium* จาก GenBank โดยรวบรวมข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Neoscytalidium* ที่มีใน GenBank ทั้งหมด เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากตัวอย่างราที่แยกได้จากตัวอย่างโรคพืช และจาก Culture Collection

2.2 การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Neoscytalidium*

นำข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Neoscytalidium* ทั้งหมดที่ได้จากข้อ 2.1 มาจัดเรียง และบันทึกเป็นชุดข้อมูลในรูปแบบ fasta ไฟล์ โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar *et al.*, 2018) หรือใช้โปรแกรม online จากเว็บไซต์ www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/

2.3 ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* โดยการพิจารณาชุดข้อมูลของราใน genus *Neoscytalidium* ใช้โปรแกรม Geneious Prime และวิธีพิจารณาลำดับของไพรเมอร์ด้วยสายตา

2.4 ทดสอบความจำเพาะเบื้องต้นของไพรเมอร์

ทดสอบความจำเพาะเบื้องต้นของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับดีเอ็นเอของรา *N. dimidiatum* และราในวงศ์ *Botryosphaeria* ก็ฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม

3. การทดสอบไพรเมอร์จำเพาะกับดีเอ็นเอของราสกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria*

3.1 การเตรียมตัวอย่างต้นแบบดีเอ็นเอ (DNA templates)

การสกัดดีเอ็นเอจาก clean culture ของรา *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria* เชื้อเส้นใยของราที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ Dungsard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง ITS (ITS1/ITS4) ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามและผู้ผลิตแนะนำ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* ที่ออกแบบได้กำหนดค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ซึ่งได้จากการทดสอบ primer optimization

3.3 การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ

stain ในปริมาณ 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer)

การบันทึกข้อมูล

ตัวอย่างเราจะเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum*

ข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum* ได้แก่ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด พืชอาศัย ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยข้อมูลพันธุกรรม

รายละเอียดของรา *Neoscytalidium* ดังนี้

Scientific name	<i>Neoscytalidium</i>
Kingdom	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Class	<i>Dothideomycetes</i>
Order	<i>Botryosphaeriales</i>
Family	<i>Botryosphaeriaceae</i>
Genus	<i>Neoscytalidium</i>
Species	<i>N. dimidiatum</i>

พืชอาศัย

แก้วมังกร (*Hylocereus undatus*) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) องุ่น (*Vitis vinifera*) มะรุมป่า (*Albizia lebbek*) ทางนกกยุงฝรั่ง (*Delonix regia*) มะเดื่อฝรั่ง (*Ficus carica*) มะเดื่อ หรือ ไทร (*Ficus spp.*) นนทรี (*Peltophorum petrocarpum*) โพทะเล (*Thespesia populena*) เบย์เบอร์รี่ (*Arbutus*) เกาลัด (*Castanea*) ส้ม (*Citrus*) วอลนัต (*Juglans*) กล้วย (*Musa*) มะม่วง (*Mangifera*)

indica) กลุ่ม *Prunus* ได้แก่ พลัม เซอร์รี่ ลูกท้อ เอพริคอต ซากุระ อัลมอนต์ *Populus Rhus* และ *Sequoiadendron*

ที่อยู่อาศัยและนิเวศวิทยาของรา

ราชนิดนี้พบในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน เช่น อเมริกาใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และแอฟริกาใต้ รวมทั้งเชื้อราชนิดนี้อยู่ในแอฟริกาตะวันตกและใต้ แถบคาริเบียน และเอเชีย แต่ก็มีบางชนิดพบเจริญประเทศในเขตนานซึ่งอาจจะเป็นการแพร่กระจายมาจากประเทศเขตร้อน ราชนิดนี้พบในดินและไม้ที่สลายตัว

สาเหตุโรคพืชและลักษณะอาการ

Neoscytalidium dimidiatum เป็นราสาเหตุโรคพืชทำให้พืชมีอาการจุดคล้ายแคงเกอร์ และอาการจุดบนลำต้นของพืช หรือบนผล รวมทั้งแผลเน่าดำในผล และแผลเน่าสีน้ำตาลในลำต้นของแก้วมังกร (Figure 1) มีรายงานในประเทศจีน มาเลเซีย เวียดนาม และประเทศไทย และยังมีรายงานเป็นโรคแคงเกอร์ที่ลำต้นขององุ่นในเมืองแคลิฟอร์เนียในประเทศสหรัฐอเมริกาด้วย

การเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา

ราสร้างเส้นใยลักษณะรูปร่างเป็นคลื่นและไม่แน่นอน โคลโคนิเจริญเติบโตเร็ว เส้นใยฟูเจริญบนอาหาร เส้นใยรวมกันเป็นก้อน เส้นใยเริ่มแรกมีสีอ่อนและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่ออายุมากขึ้น สร้างสปอร์เรียกว่า arthroconidia (Figure 2) ภายในส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia มักพบทั้ง 2 ชนิด

การจำแนกชนิดด้วยข้อมูลพันธุกรรม

เลี้ยงรา *Neoscytalidium* บนอาหาร PDA สังเคราะห์ จำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากแก้วมังกร (8 ไอโซเลท) มันสำปะหลัง (1 ไอโซเลท) และพญาไร้ใบ (1 ไอโซเลท) สกัดดีเอ็นเอของรา *Neoscytalidium* ทั้ง 10 ไอโซเลทๆ ละ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS และ TEF ส่ง sequencing จำนวน 40 reactions จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจัดทำ consensus sequences ของรา *Neoscytalidium* ทั้ง 10 ไอโซเลทๆ ละ 2 ตำแหน่ง เมื่อการวิเคราะห์ชนิดของราเปรียบเทียบกับชุดข้อมูลกับฐานข้อมูลต่าง ๆ และพบว่าคือ รา *N. dimidiatum*

2. การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum*

ออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอ (ไพรเมอร์จำเพาะ) ด้วย Primer-BLAST และ Primer3 in Geneious Prime โดยใช้ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ได้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ หรือ 20 เส้น และตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบต่อรา *N. dimidiatum* กับฐานข้อมูล ดังแสดง Table 1

3. การทดสอบไพรเมอร์จำเพาะต่อราสกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria*

3.1 การทดสอบไพรเมอร์จำเพาะเบื้องต้นที่มีต่อรา สกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria*

เมื่อตรวจสอบความจำเพาะเบื้องต้นของไพรเมอร์ที่มีต่อรา *Neoscytalidium* และ ราในวงศ์ *Botryosphaeria* พบว่า ไพรเมอร์ NdDOA7F และ NdDOA6R มีความจำเพาะต่อ *N. dimidiatum*

เท่านั้น (Figure 3 และ 4) และไพรเมอร์ NdDOA3F NdDOA6F และ NdDOA8F จำเพาะต่อ *N. dimidiatum* และ *N. novaehollandiae* (Figure 5 6 และ 7) NdDOA5R จำเพาะต่อ *N. dimidiatum*, *N. novaehollandiae* และ *N. orchidacearum* (Figure 8) ถึงแม้ว่า NdDOA4R จะจำเพาะต่อ *N. dimidiatum* แต่ก็สามารถตรวจจับรา *Botryosphaeria* อื่นๆ เช่น *Botryobambusa fusicoccum* และ *Neodeightonia subglobosa* ได้ (Figure 9) ส่วนไพรเมอร์ NdDOA1F NdDOA1R NdDOA2F NdDOA2R NdDOA4F NdDOA5F NdDOA8R NdDOA9F NdDOA9R NdDOA10F และ NdDOA10R ไม่มีความจำเพาะ เนื่องจากสามารถตรวจจับราส่วนใหญ่ในวงศ์ *Botryosphaeria* (Figure 10 และ 11)

เมื่อทำการตรวจสอบชนิดของราที่ไพรเมอร์ NdDOA7F และ NdDOA6R สามารถตรวจจับได้ด้วยวิธี blastn พบว่า ไพรเมอร์ NdDOA7F และ NdDOA6R ตรงกับรา *N. dimidiatum* (syn. *N. hyalinum*) ที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 12)

ตรวจสอบความจำเพาะเบื้องต้นของไพรเมอร์พบว่าได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะจำนวน 5 เส้น และจับคู่ไพรเมอร์สำหรับการทดสอบได้จำนวน 5 คู่ ได้แก่ ITS5/NdDOA6R NdDOA6F/NdDOA6R NdDOA3F/ NdDOA6R NdDOA8F/NdDOA6R และ NdDOA7F/ITS4 ขนาดของ PCR product จะมีขนาดประมาณ 942 442 449 453 และ 88 bp (Table 2)

เมื่อทดสอบการจับคู่ไพรเมอร์โดยทดสอบกับ sequence ของ DNA template โดยการวิเคราะห์เบื้องต้นจาก primer map เพื่อพิจารณาไพรเมอร์ และขนาดของ PCR product (Figure 13) จากการทำ primer optimization พบว่า annealing temperature ที่เหมาะสมของทุกคู่ไพรเมอร์คือ 56 องศาเซลเซียส

3.2 การทดสอบไพรเมอร์จำเพาะต่อดีเอ็นเอของราสกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria*

ทดสอบไพรเมอร์จำเพาะกับดีเอ็นเอของราสกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria* ดังแสดงใน Table 3 และผลจากการทดสอบกับดีเอ็นเอพบว่าไพรเมอร์คู่ NdDOA-8F/NdDOA-6R และ NdDOA-7F/ITS4 มีความจำเพาะเจาะจงต่อดีเอ็นเอของรา *N. dimidiatum* (Figure 14)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ราในสกุล *Neoscytalidium* และรา *N. dimidiatum* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด พืชอาศัย ความเสียหายจากการเข้าทำลายของราการจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม และรวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 12 ไอโซเลท พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างโรคของแก้วมังกร และพญาไร้ใบมาแยกเชื้อ ผลจากการแยกเชื้อจากลำต้นและผลของแก้วมังกรที่เป็นโรคแยกได้ราจำนวน 30 ไอโซเลท จากพญาไร้ใบที่เป็นโรคแยกได้ราจำนวน 2 ไอโซเลท แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ จากผลการ

จำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลพันธุกรรม สามารถจำแนกชนิดได้เป็นรา *N. dimidiatum* ทั้งหมด

ผลจากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* จำนวน 10 คู่ เมื่อทำการทดสอบเบื้องต้น ทดสอบกับดีเอ็นเอของราในกลุ่ม *Botryosphaeria* พบว่าได้ไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* จำนวน 2 คู่ ได้แก่ NdDOA-8F/NdDOA-6R และ NdDOA-7F/ITS4

จากการศึกษานี้ได้เทคนิคในการตรวจวินิจฉัยยรา *Neoscytalidium dimidiatum* สาเหตุโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรซึ่งสามารถตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสมาชิก กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตมงคล พงณา ตระกูลสุขรัตน์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ บุรณี พ่วงศ์แพทย์ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ณีฐฐิมา โฆษิตเจริญกุล และอมรรรัตน์ ภูไพบูลย์. 2550. การศึกษาชนิดของโรคแก้วมังกรและกวนอิมเพื่อการส่งออก. หน้า 1024 – 1034. ใน : รายงานผลงานวิจัย ประจำปี 2550. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. จตุจักร กรุงเทพฯ.
- พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สิมะเตือ และ ชนินทร ดวงสะอาด. 2552. โรคผลเน่าของแก้วมังกรสาเหตุเกิดจาก *Bipolaris cactivora*. หน้า 216-223. ใน : การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 “อารักขาพืชไทย เทิดไท้องค์ภูมิ ตามวิถีเศรษฐกิจพอเพียง” ณ โรงแรมสุนีย์แกรนด์ จังหวัดอุบลราชธานี. 24-26 พฤศจิกายน 2552.
- สุรพงษ์ โกสิยะจินดา. 2544. แก้วมังกรพืชเศรษฐกิจผลไม่สุภาพ. พันธุ์พืชลิขิ่ง, กรุงเทพฯ. 108 หน้า.
- Athipunyakom, P, S. Likhitekaraj. 2010. Fruit Rot Diseases of Dragon fruit (*Hylocereus* spp.) in Thailand, pp. 156. In : 9th International Mycological Congress, Edinburgh, UK, 1-6 August.
- Athipunyakom P, S. Seemadua and C. Doungsa-ard. 2015. Diseases of dragon fruit in Thailand: Incidence and Management Strategies pp. 95-106. In : International Workshop on Improving Pitaya Production and Marketing, Frenghshan, Kaohsiung, Taiwan, 7-9 September 2015.
- Alcorn, J.L. 1983. Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. *Mycotaxon* 17: 1-86.

- Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- Carmichael, J.W., W. Bryce Kendrick, I.L. Connors and Lynne Sigler. 1980. *Genera of Hyphomycetes*. Univ. of Alberta Press. Edmonton, Alberta, Canada. 386 p.
- 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.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew, Surrey, England. 608 pp.
- Ellis, M.B. 1993. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew, Surrey, England. 507pp.
- Hieu, N.T., N.A. Nguyen, V.N. Thu and H. Van. 2014. Identification, morphological and biological characterizations of *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker on dragon fruit. p.114-120. *In* : The 13th national conference of Phytopathological society of Vietnam.
- 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: 1647-1649.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Mizrahi, Y. 2015. Thirty-one of research and development in the vine cacti pitaya in Israel. pp. 1-18. *In* : International Workshop on Improving Pitaya Production and Marketing, Frengshan, Kaohsiung, Taiwan, 7-9 September 2015.
- 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.
- Hui-Fang, N., C.W. Huang, S.L. Hsu, S.Y. Lai and H.R. Yang. 2013. Pathogen characterization and fungicide screening of stem canker of pitaya. *Journal of Taiwan Agricultural Research* 62: 225-234.
- 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.

- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stroma*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. England. 695 p.
- Wang, C.L. and Lin, C.C. 2005. Fruit rot of pitaya and stem rot of cacti in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 14: 269-274.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 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.
- Yi, R.H., Q.L. Lin, J.J. Mo, F.F. Wu. and J. Chen. 2015. Fruit internal brown rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on pitahaya in Guangdong province, China. *Australasian Plant Disease Notes* 10: 1-4. 10.1007/s13314-015-0166-1.

Table 1 List of specific primers designed from this study.

Primer code	Length (bp)	%GC	Tm	Taxa specificity
NdDOA1F	20	60	60.7	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA1R	20	60	60.7	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA2F	20	50	58.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA2R	20	55	58.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA3F	20	55	59.4	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
NdDOA3R	20	50	57.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA4F	20	50	57.6	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA4R	20	50	58.1	<i>N. dimidiatum</i> , <i>Botryobambusa fusicoccum</i> and <i>Neodeightonia subglobosa</i>
NdDOA5F	20	50	57.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA5R	20	55	58	<i>N. dimidiatum</i> , <i>N. novaehollandiae</i> and <i>N. orchidacearum</i>
NdDOA6F	20	55	59.9	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
NdDOA6R	20	55	60	<i>N. dimidiatum</i>
NdDOA7F	20	55	60	<i>N. dimidiatum</i>
NdDOA7R	20	50	60.1	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA8F	20	60	60	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
NdDOA8R	20	55	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA9F	20	55	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA9R	20	60	60.1	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA10F	20	60	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA10R	20	55	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>

Table 2 List of primers for PCR.

Pair	Primer code	target size (bp)	Taxa specificity
1	ITS5	942	universal primer
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
2	NdDOA6F	442	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
3	NdDOA3F	449	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
4	NdDOA8F	453	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
5	NdDOA7F	88	<i>N. dimidiatum</i>
	ITS4		universal primer

Table 3 The list of *Neoscytalidium* and *Botryosphaeria* DNA templates used in this study.

No.	Voucher	Taxa	Host
1	M0303	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Manihot esculenta</i>
2	M0305	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Euphorbia tirucalli</i>
3	M0330	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Hylocereus undatus</i>
4	M0352	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Hylocereus undatus</i>
5	M0566	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Hylocereus undatus</i>
6	M0567	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Hylocereus undatus</i>
7	M0207	<i>Neodeightonia</i>	<i>Cocos nucifera</i>
8	M0484	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Citrus maxima</i>
9	M0514	<i>Colletotrichum</i>	Solanum
10	negative	-	-



Figure 1 The symptoms of brown spot or stem canker of *Hylocereus undatus*

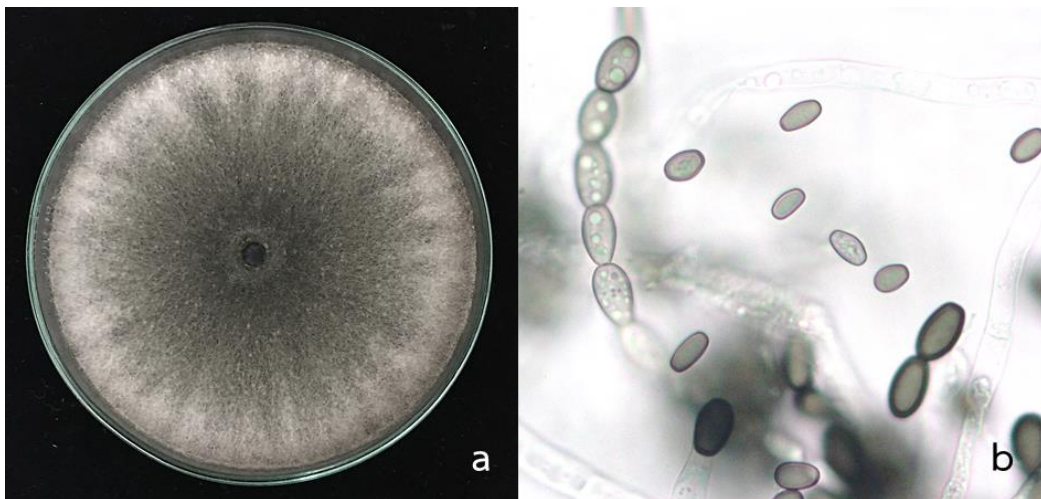


Figure 2 The colony and conidia of *Neoscytalidium dimidiatum*

a: colony of *N. dimidiatum* on PDA

b: arthroconidia (100X)

Species/Abbrv	Group Name	* * * * *
1. Neoscytalidium_orchidacearum_MFLUCC_12-0533	N. orchidacearum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
2. Neoscytalidium_novaeahollandiae_WAC13275	N. novaeahollandiae	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
3. Neoscytalidium_novaeahollandiae_WAC13273	N. novaeahollandiae	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
4. Neoscytalidium_novaeahollandiae_CBS122072	N. novaeahollandiae	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
5. Neoscytalidium_novaeahollandiae_CBS_122071	N. novaeahollandiae	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
6. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_145.78	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
7. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13305	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
8. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13302	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
9. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13287	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
10. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13282	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
11. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13277	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
12. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13274	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
13. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC12693	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
14. Neoscytalidium_dimidiatum_UTHSCSA_DI_14-340	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
15. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_499.66	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
16. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_251.49	N. dimidiatum	C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
17. Neodeightonia_subglobosa_CBS_448.91		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
18. Neodeightonia_phoenicum_CBS_122528		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
19. Macrophomina_phaseolina_CBS_460.70		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
20. Macrophomina_phaseolina_CBS_227.33		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
21. Lasiodiplodia_theobromae_CBS_164.96		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
22. Lasiodiplodia_pseudotheobromae_CBS116459		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
23. Diplodia_rosulata_CBS116470		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
24. Diplodia mutila_CBS_112553		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
25. Copriniforma_atrovirens_MFLUCC_11-0425		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
26. Copriniforma_atrovirens_CBS_117444		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
27. Botryosphaeria_ramosa_CMW_26167		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
28. Botryosphaeria_fusispora_MFLUCC_10-0098		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
29. Botryosphaeria_dothidea_CMW8000		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
30. Botryosphaeria_dothidea_CBS110302		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
31. Botryosphaeria_agaves_MFLUCC_11-0125		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
32. Botryobambusa_fusicoecum_MFLUCC_11-0143		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T
33. Barriopsis_fusca_CBS_174.26		C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T G C G A T A A G T A A T

Figure 11 The specificity of NdDOA7R, which most likely aligned to fungi in the genus

Botryosphaeria

Description	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Neoscytalidium dimidiatum ND9 genes for ITS1_5.8S rRNA ITS2_28S rRNA, partial and complete sequence	100%	0.47	100.00%	LC474119.1
Neoscytalidium dimidiatum ND2 genes for ITS1_5.8S rRNA ITS2_28S rRNA, partial and complete sequence	100%	0.47	100.00%	LC474118.1
Neoscytalidium dimidiatum ND4 genes for ITS1_5.8S rRNA ITS2_28S rRNA, partial and complete sequence	100%	0.47	100.00%	LC474114.1
Neoscytalidium dimidiatum ND2 genes for ITS1_5.8S rRNA ITS2_28S rRNA, partial and complete sequence	100%	0.47	100.00%	LC474112.1
Neoscytalidium dimidiatum ND1 genes for ITS1_5.8S rRNA ITS2_28S rRNA, partial and complete sequence	100%	0.47	100.00%	LC474111.1
Neoscytalidium dimidiatum strain ARM 508 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MK488051.1
Neoscytalidium dimidiatum strain ARM 493 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MK488046.1
Neoscytalidium dimidiatum strain ARM 400 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MK488037.1
Neoscytalidium dimidiatum strain URM8036 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MK488036.1
Neoscytalidium dimidiatum strain ARM364 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MK480472.1
Neoscytalidium dimidiatum strain ARM364 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MK480471.1
Neoscytalidium dimidiatum strain ARM214 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MK480469.1
Neoscytalidium dimidiatum strain ARM203 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MK480467.1
Neoscytalidium dimidiatum isolate COUFP1241 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c	100%	0.47	100.00%	MT026927.1
Neoscytalidium dimidiatum isolate COUFP1239 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, c	100%	0.47	100.00%	MT026926.1
Neoscytalidium dimidiatum clone URF_P102 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, cor	100%	0.47	100.00%	MT010217.1
Neoscytalidium dimidiatum clone URF_P101 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, cor	100%	0.47	100.00%	MT010216.1
Neoscytalidium dimidiatum strain URM8030 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MK461880.1
Neoscytalidium dimidiatum isolate UFE8N1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1_5.8S ribosomal RNA gene, ar	100%	0.47	100.00%	MN520610.1
Neoscytalidium dimidiatum isolate PY320N2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1_5.8S ribosomal RNA gene, i	100%	0.47	100.00%	MN520609.1
Neoscytalidium dimidiatum isolate MW403N1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1_5.8S ribosomal RNA gene,	100%	0.47	100.00%	MN520608.1
Neoscytalidium dimidiatum isolate HL321N1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1_5.8S ribosomal RNA gene, i	100%	0.47	100.00%	MN520607.1
Neoscytalidium sp. ETAC-2019a strain ITD_G6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA g	100%	0.47	100.00%	MK677466.1
Neoscytalidium hyalinum strain MMG-G93 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MN526951.1
Neoscytalidium hyalinum strain MMG-G311 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal tran	100%	0.47	100.00%	MN526950.1
Neoscytalidium dimidiatum strain MMG-G112 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, co	100%	0.47	100.00%	MN526949.1
Neoscytalidium hyalinum strain MMG-G111 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MN526948.1
Neoscytalidium hyalinum strain MMG-G43 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	100%	0.47	100.00%	MN526947.1
Neoscytalidium hyalinum strain MMG-G42 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal trans	100%	0.47	100.00%	MN526946.1
Neoscytalidium dimidiatum strain MMG-G81 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, cor	100%	0.47	100.00%	MN526945.1
Neoscytalidium hyalinum strain MMG-M10 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal trans	100%	0.47	100.00%	MN526944.1
Neoscytalidium dimidiatum strain MMG-M9 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal trans	100%	0.47	100.00%	MN526943.1
Neoscytalidium hyalinum strain MMG-M8 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transc	100%	0.47	100.00%	MN526942.1
Neoscytalidium dimidiatum strain MMG-M7 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal tran	100%	0.47	100.00%	MN526941.1

Figure 12 The blastn results of NdDOA7F and NdDOA6R



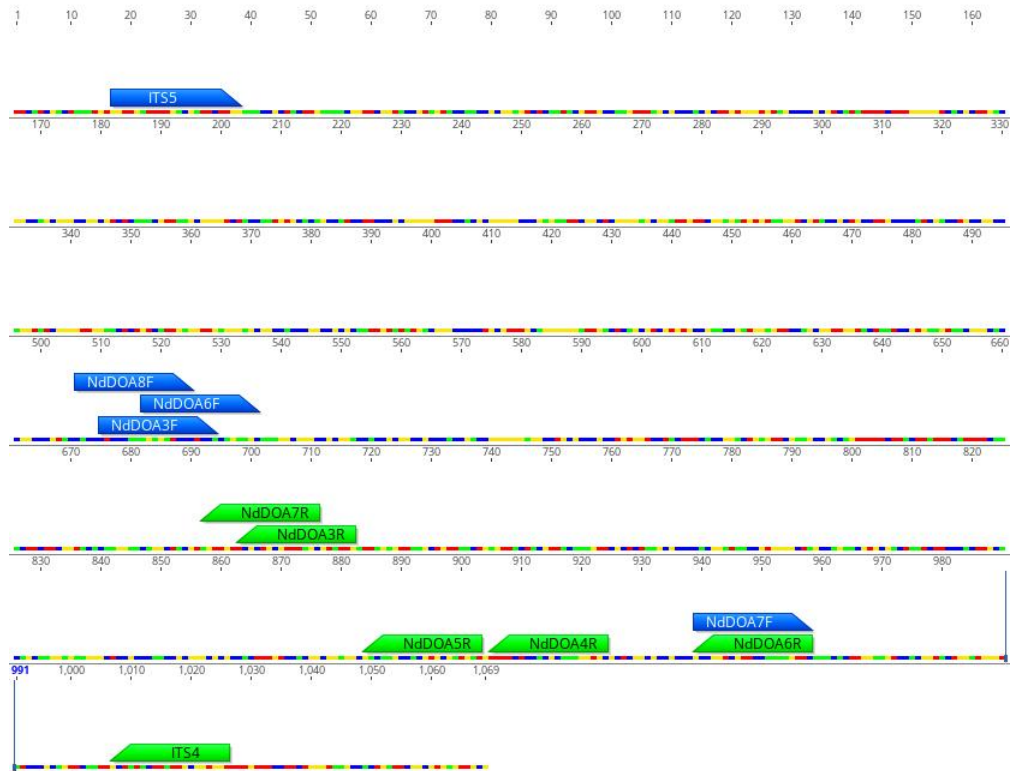


Figure 13 Map of primers namely, ITS5, NdDOA6R, NdDOA6F, NdDOA6R, NdDOA3F, NdDOA6R, NdDOA8F, NdDOA6R, NdDOA7F and ITS4

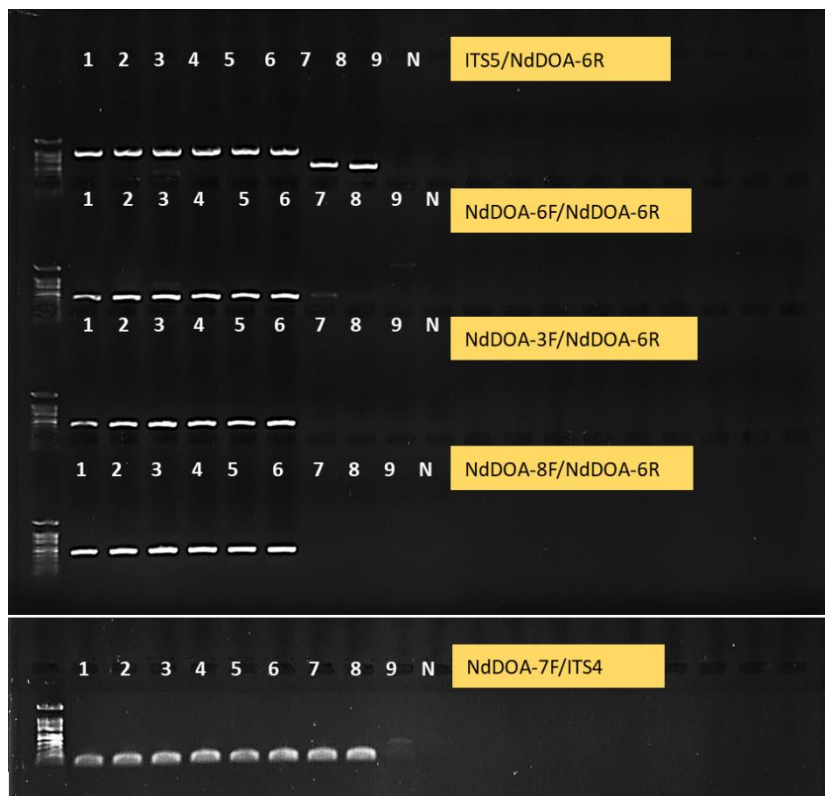


Figure 14 The results of primers tested with DNA templates of various of fungi

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบแมลงวันแดง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett)
(Diptera: Tephritidae) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง
Development Diagnostic Technique of the Economically Important
Fruit fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae)
using species specific primer

ยุวรินทร์ บุญทบ^{1/} ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล^{2/} นพรัตน์ จันทร์หอม^{3/}

^{1/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมวัสดุทางการเกษตร

Abstract

The melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett), is a quarantine pest species for many countries. Larvae of melon fly are intercepted by quarantine inspections, but their morphological similarity to other fruit fly species makes identification difficult and unreliable. Rapid, precise identifications 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 c oxidase subunit I (cox1)* gene to differentiate *Z. cucurbitae* in its various life stages. The species-specific assay demonstrated high specificity, sensitivity and reliability for 11 species examined (*Bactrocera carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *Dacus longicornis*, *Z. apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* and *Z. tau*). This study demonstrated the feasibility of using species-specific diagnostic tools (utilising 83 base pair sequences) for identifying fruit fly populations from all regions of Thailand. The primers were also validated 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

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-11-61

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, Melon fly

บทคัดย่อ

แมลงวันแตง (melon fly); *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) เป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก และจากการสุ่มตรวจศัตรูพืชในการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทยมักพบตัวอ่อนแมลงวันผลไม้ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการกีดกันทางการค้า จากลักษณะสัณฐานของตัวอ่อนที่คล้ายคลึงกันมากทำให้การระบุชนิดนั้นทำได้ยาก ดังนั้นการจำแนกชนิดของตัวอ่อนแมลงวันแตงด้วยเทคนิคที่มีความรวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ นั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการส่งออกผลิตผลทางการเกษตร การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชโดยใช้คู่มือที่มีความจำเพาะต่อศัตรูพืชนั้นถือว่าเป็นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูงมาก งานวิจัยนี้จึงได้ออกแบบคู่มือไพรเมอร์จากยีน *Cytochrome c oxidase subunit I (cox1)* ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* โดยทำการตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ด้วยการทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *Dacus longicornis*, *Z. apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* ซึ่งให้ผลบวกเฉพาะ *Z. cucurbitae* มีขนาดดีเอ็นเอ 83 คู่เบส และพบว่าสามารถใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างแมลงวันแตงในระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัยจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย รวมทั้งจากตัวอ่อนที่ตรวจพบการปนเปื้อนในผักผลไม้ที่ต้องการส่งออกไปขายยังต่างประเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบนั้นมีความถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือวินิจฉัยเพื่อระบุชนิดแมลงวันผลไม้ก่อนการส่งออกผัก ผลไม้ อีกทั้งสามารถเป็นต้นแบบในการประยุกต์ใช้พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ นำไปสู่การสร้างความมั่นใจให้กับประเทศคู่ค้า เพิ่มขีดความสามารถในการส่งออกสินค้าพืชผลทางการเกษตรของประเทศไทยและการเพิ่มมูลค่าของสินค้าเกษตรของไทย

คำสำคัญ : การจำแนกชนิด แมลงวันผลไม้ แมลงวันแตง

คำนำ

แมลงวันแตง (melon fly): *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) สามารถเข้าทำลายและสร้างความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจมากกว่า 125 ชนิด (Piñero *et al.*, 2006) โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา แตงโม แคนตาลูป บวบเหลี่ยม ฟักทอง และมะระ เป็นต้น ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพของผลผลิต พบความเสียหายจากการเข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตรอยู่ระหว่าง 30 - 100 เปอร์เซ็นต์ (Dhillon *et al.*, 2005) โดยพบความเสียหายต่อมะม่วง (12-60%) ฝรั่ง (40-90%) และมะละกอ (12-60%) (Allwood and Drew) จัดเป็นศัตรูพืชที่มีสำคัญอันดับหนึ่งของพืชผัก ก่อให้เกิดผลกระทบต่อ การส่งออกพืชผักผลไม้ไปยังตลาดโลก เนื่องจากมักพบแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เข้าทำลายและพบปัญหาการปนเปื้อนของตัวอ่อนแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ติดไปกับพืชผักที่ต้องการส่งออก ส่งผลกระทบต่อเนื่องในการส่งออกพืช ผัก ผลไม้ของไทยไปยังต่างประเทศ เป็นสาเหตุหลักในการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย (Piñero *et al.*, 2006; Koyama *et al.*, 2004) และในปัจจุบันจากความเข้มงวดในการนำเข้าผักผลไม้จากไทยไปสู่ตลาดโลกมีมาตรฐานสูงขึ้น และมีการแข่งขันการส่งออกพืช ผัก และผลไม้ของประเทศในภูมิภาคอาเซียนสูงขึ้นตามลำดับนั้น การจำแนกชนิดแมลงศัตรูพืชที่มีโอกาสติดไปกับการส่งออกหรือนำเข้านั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการใช้เป็น ข้อมูลยืนยันประกอบการส่งออกและนำเข้า แต่ปัจจุบันเมื่อพบปัญหาการปนเปื้อนจากแมลงในพืชผักที่ต้องการส่งออก ผู้ทำการตรวจวินิจฉัยจะต้องปฏิบัติงานด้วยความรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ แต่หากมีการปนเปื้อนจากแมลงศัตรูพืชในระยะไข่ หรือตัวอ่อนนั้น หากใช้การตรวจวินิจฉัยแบบดั้งเดิม (traditional taxonomy) จะต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้เติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งส่งผลกระทบต่อเนื่องต่อผู้ผลิตที่ต้องการส่งออก รวมทั้งก่อให้เกิดผลกระทบต่อ การส่งออกและนำเข้าผักและผลไม้ระหว่างประเทศอีกด้วย (Armstrong and Ball, 2005)

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ใช้การศึกษาทางอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมซึ่งใช้ลักษณะทางสัณฐานภายนอกเท่านั้น ดังนั้นการจำแนกชนิดแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* ให้ความถูกต้อง และรวดเร็ว จะสามารถช่วยประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย รวมทั้งสร้างมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยให้เทียบเท่าระดับสากลจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงเป็นการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (species - specific primer) ต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากยีน *cox1* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น DNA Barcode (ดีเอ็นเอมาตรฐานบริเวณสั้น ๆ ที่มีศักยภาพในการใช้ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้) ซึ่งเป็นการพัฒนาการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพให้เป็นตามมาตรฐานสากลนั้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการตรวจรับรองและจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชเพื่อให้เป็นไปตามเงื่อนไขการส่งออก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope
- กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง (ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก กัดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) สารฟีโรโมนล่อแมลงวันผลไม้ ได้แก่ เมทิล ยูจีนอล (Methyl Eugenol) คิวลัวร์ (CUE lure) รวมทั้งโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) สำหรับรักษาคุณภาพของแมลงวันผลไม้ระหว่างติดกับดักไว้ในแปลงสำรวจ
- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอ เช่น ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Bioline, Australia), Agarose gel (Bioline, Australia) และ TBE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), MyTag (Bioline, Australia) HS Red DNA Polymerase และ $MgCl_2$
- สารเคมี และไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากพื้นที่การเกษตร โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) โดยเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างภูมิภาคละ 3 จังหวัด (Figure 1) ใช้กับดักล่อแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) จาก Bugs for Bugs Pty Ltd, Australia ซึ่งประกอบด้วยล่อสารล่อ (pheromone) แมลงวันผลไม้ 2 ประเภท ได้แก่ เมทิลยูจีนอล (Methyl Eugenol) และคิวลัวร์ (CUE lure) ผสมสารฆ่าแมลง malathion ในอัตราส่วน 4 : 1 และภายในกับดักบรรจุสารโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ติดกับดัก 5 กับดักต่อสารล่อหนึ่งประเภทต่อหนึ่งพื้นที่ เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2560 - กันยายน พ.ศ. 2561 จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd, Switzerland) ร่วมกับแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ของ Drew and Romig (2013, 2016) นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ดองในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้มาสกัดดีเอ็นเอ ตามกรรมวิธี Boontop *et al.*, (2017) 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 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 ทิ้งของเหลวที่เหลือ ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 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 เพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ universal primer จากยีน *cox1*: LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al.*, 1994) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 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 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหนึ่งขวดเพื่อให้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยนำปฏิกิริยา 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 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ที่อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 2% ผสม RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในสารละลาย 1X TBE

buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation XR) รุ่น Universal Hood II (Biorad, USA) ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้

2.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA และวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบระดับความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้จากงานวิจัยนี้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ด้วยการ Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) และเก็บบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae*

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ที่ทำการศึกษา (ข้อ 2) และแมลงวันผลไม้ ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นศัตรูพืชกักกันจากฐานข้อมูล GenBank มาจัดลำดับและทำการตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม chromas (version, 2.33, Technelysium Pty Ltd, Australia) และ BioEdit เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* คัดเลือกตำแหน่ง single - nucleotide polymorphism (SNP) ซึ่งจะใช้ระบุชนิดของแมลง *Z. cucurbitae* เท่านั้น จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงโดยอาศัยโปรแกรม Vector NIT (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 GenBank

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae*

4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* กับแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการสำรวจในประเทศไทย

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ในระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ โดยทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ (laboratory samples) ในระยะ ไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย

4.3 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ (geographical populations) จากตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ที่เก็บรวบรวมมาจากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

4.4 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* กับตัวอย่างที่พบปนเปื้อนในพืช ผัก และผลไม้ที่พบจากการสุ่มตรวจผัก ผลไม้ (intercepted samples) จากเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชที่มีการส่งออก

4.5 ยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคูไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยการทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ให้บริสุทธิ์และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ตามกรรมวิธีของบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- 2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

สถานที่ : 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้

การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ด้วยกับดักถังเปียกซึ่งบรรจุสารล่อเมธิลยูจินอลและคิวลิวัร์ จาก 6 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคใต้ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคตะวันตกของไทย นำตัวอย่างที่ได้มาจำแนกชนิดเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ 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*

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) และจากข้อมูลที่ต้องการของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว แสดงว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นสามารถนำดีเอ็นเอจากวิธีการสกัดดังกล่าวมาทดสอบกับไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมของยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ 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* และรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้บางส่วนจากฐานข้อมูลของ GenBank มาจัดลำดับ และตรวจหาตำแหน่ง single nucleotide polymorphisms (SNPs) ด้วยโปรแกรม Vector NIT (in vitro gen) (<https://www.themofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>) พบตำแหน่ง SNPs ที่มีเฉพาะแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* เท่านั้น และเป็นตำแหน่งที่ไม่พบในแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ มาออกแบบ Forward primer และ Reverse primer ได้ 1 คู่ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมที่ตำแหน่งเริ่มต้นที่ 488 จำนวน 25 คู่เบส และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 580 จำนวน 22 คู่เบส (Figure 3) เมื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo (version 6.0) (DBA Oligo, Inc., USA) พบว่า % GC ของ Forward และ Reverse primers เท่ากับ 48 และ 59 ตามลำดับ มีค่า melting temperature (Tm) อยู่ที่อุณหภูมิ 53 และ 60 องศาเซลเซียส (Table 2) ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นไม่สามารถจับกันเป็น dimer ได้ ตั้งชื่อ Forward และ Reverse primers แต่ละเส้นว่า (*Zeugodacus cucurbitae* Forward: Zcu-F1 และ *Zeugodacus cucurbitae* Reverse: Zcu-R1) โดยไพรเมอร์คู่นี้สังเคราะห์ให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดประมาณ 83 คู่เบส จากการวิเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นด้วยโปรแกรม Primer map (https://www.bioinformatics.org/sms2/primer_map.html) พบว่าทุกไพรเมอร์มีตำแหน่งอยู่บนยีน *cox1* ของแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* เท่านั้น และเมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ โดย

โปรแกรม BLAST ของฐานข้อมูล GenBank พบว่าไพรเมอร์ทุกเส้นมีความเหมือนที่ 99 -100% กับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* จากยีน *cox1* (Table 3)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae*

เพื่อยืนยันว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีประสิทธิภาพและสามารถใช้ได้จริงโดยทำการทดสอบ 4 กรรมวิธี

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* กับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

การทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ 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* พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบ และตรวจวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่สังเคราะห์ได้จากคู่ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 83 คู่เบสที่จำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ได้อย่างชัดเจน และไม่เกิดปฏิกิริยากับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ (Figure 4) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และมีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้แยกแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ออกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ต่อระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ด้วยเทคนิค PCR กับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ที่เลี้ยงจากห้องปฏิบัติการในระยะไข่ หนอน ดักแด่ และตัวเต็มวัย ระยะละ 50 ตัวอย่าง รวมเป็นจำนวน 300 ตัวอย่าง และตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอขนาด 83 คู่เบส ในทุกระยะการเจริญเติบโต (Figure 5) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบนั้นสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และมีความถูกต้อง 99 - 100%

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ (geographical populations)

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบกับตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* จาก 6 ภูมิภาคของไทย ได้แก่ ภาคใต้ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคตะวันตก ทำการทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ภูมิภาคละ 50 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 300 ตัวอย่าง ผลที่ได้สามารถยืนยันได้ว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* จากภูมิภาคต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี (Figure 6)

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* กับตัวอย่างที่พบปนเปื้อนในการส่งออก (intercepted samples)

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้กับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่พบการปนเปื้อนจากผักและผลไม้ที่ต้องการส่งออกไปขายยังต่างประเทศ จำนวนทั้งหมด 80 ตัวอย่าง (Table 4) จากการสุ่มตรวจ ณ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 83 คู่เบส จากตัวอย่างหนอนที่พบการปนเปื้อนในถั่วฝักยาวที่ต้องการส่งออกไปประเทศอังกฤษ และสวิตเซอร์แลนด์ (Figure 7) และยืนยันความถูกต้องโดยการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100% แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะกับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และจากการนำตัวอย่างหนอนที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างบางส่วนมาเลี้ยงไว้เพื่อให้เป็นตัวเต็มวัย และจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน และพบว่าผลที่ได้จากนั้นสอดคล้องกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ปัจจุบันหากมีการสำรวจพบระยะไข่ หรือตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ที่ติดไปกับพืช ผัก และผลไม้ที่ต้องการส่งออกหรือการนำเข้านั้น ใช้การตรวจสอบชนิดศัตรูพืชแบบดั้งเดิมด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของตัวเต็มวัยเท่านั้น แต่การจำแนกชนิดจากรูปร่างลักษณะของไข่ หรือตัวอ่อนนั้นเป็นเรื่องที่ทำการศึกษายาก เพราะไข่และตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก (ยุวรินทร์ และคณะ, 2562) ดังนั้นในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชที่พบในการส่งออกหรือนำเข้านั้น หากมีการสำรวจพบระยะไข่ หรือตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ที่ติดไปกับพืช ผัก และผลไม้ ก็จะทำให้ต้องเสียเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้เติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน ดังนั้นระยะเวลาที่ต้องเสียไปในการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ หรือตัวอ่อนเพื่อให้เติบโตเป็นตัวเต็มวัยนั้นเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นอย่างมาก เพราะความล่าช้าที่เกิดขึ้นนั้นจะส่งผลกระทบต่อส่งออกและนำเข้าผักและผลไม้ระหว่างประเทศ (Armstrong and Ball, 2005) ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุล เช่นการออกแบบไพรเมอร์ที่เจาะจงมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งปัจจุบันมีการออกแบบไพรเมอร์ที่เจาะจงต่อแมลงวันผลไม้เพียง 2 ชนิด ได้แก่ *B. correcta* (Jiang et al., 2013) และ *B. zonata* และ *B. tau* (Asokan et al., 2011) แต่ในปัจจุบันทั่วโลกยังไม่มีข้อมูลการออกแบบไพรเมอร์ที่เจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ดังนั้นการศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่เจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* โดยการประยุกต์หลักการพื้นฐานของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR กับ species specific DNA Barcode และใช้เพียงขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการระบุชนิดแมลงวันผลไม้จะสั้นมากเพียง 2-3 ชั่วโมง เท่านั้น ก็สามารถตรวจวินิจฉัยยืนยันได้ว่าเป็นแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* หรือไม่ นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันแดง

Z. cucurbitae ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ไม่ว่าจะเป็นระยะ ไข่ หนอน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัย จึงสามารถได้ว่าแมลงวันผลไม้ที่ตรวจพบนั้นเป็นแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* หรือไม่ จากประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเจาะจง มีความรวดเร็ว และประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัยนั้นก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การตรวจวินิจฉัยชนิดศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องกับการส่งออกหรือนำเข้าสินค้าเกษตร เมื่อพบปัญหาการปนเปื้อนจากศัตรูพืช เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชหรือนักอนุกรมวิธานแมลงผู้ทำการตรวจวินิจฉัยจะต้องปฏิบัติงานด้วยความรวดเร็วและแม่นยำ แต่หากพบการปนเปื้อนจากแมลงศัตรูพืชในระยะไข่ ตัวอ่อน หรือดักแด้ นั้น ถ้าใช้การตรวจวินิจฉัยแบบดั้งเดิมจะต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้เติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งเวลาที่สูญเสียไปนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงชนิดนั้น ๆ และการเสียเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้เป็นตัวเต็มวัยนั้นก่อให้เกิดผลกระทบต่อการนำเข้าผักและผลไม้ระหว่างประเทศอีกด้วย ดังนั้นเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลที่มีความรวดเร็ว จึงเข้ามามีบทบาทเป็นอย่างมากในการตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชที่ปนเปื้อนกับการส่งออกและนำเข้า ดังนั้นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* จึงก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งกับการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชที่สำคัญของไทยให้มีความถูกต้องตามมาตรฐานสากล แม่นยำ และรวดเร็วทันเหตุการณ์ เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีความสะดวก รวดเร็ว และสามารถใช้ได้กับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ทุกระยะการเจริญเติบโต ทำให้สามารถจำแนกชนิดแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งในงานด้านการกักกันพืช ต่อการวินิจฉัยเพื่อเฝ้าระวังแมลงศัตรูพืชและการนำเข้าและส่งออกผักผลไม้ของประเทศไทย และยังเพิ่มความเชื่อมั่นและสร้างความน่าเชื่อถือในการเจรจาต่อรองเพื่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของไทยไปสู่ตลาดโลก เกิดการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย ส่งผลในองค์รวมต่อความเป็นอยู่ที่ดีขึ้นของประชาชนชาวไทย

ผลลัพธ์จากงานวิจัยภายใต้โครงการวิจัยเป็นต้นแบบและสามารถนำไปต่อยอดในการตรวจวินิจฉัยชนิด การตรวจสอบจำแนกชนิดศัตรูพืชอีกหลายชนิด อีกทั้งยังสามารถนำไพรเมอร์ที่ออกซึ้นมาอย่างจำเพาะเจาะจงไปพัฒนาเทคนิคการตรวจตรวจวินิจฉัยศัตรูพืช อย่างเช่น Multiplex PCR, Real-time PCR หรือ Loop-Mediated Isothermal Amplification หรือชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสำหรับการตรวจจำแนกชนิดแมลงวันผลไม้ หรือพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบในภาคสนาม ลดขั้นตอนความยุ่งยาก และมีค่าใช้จ่ายที่ลดน้อยลง ถือเป็นการสร้างและพัฒนาเทคโนโลยีและนวัตกรรมของประเทศ

เอกสารอ้างอิง

- ยวรินทร์ บุญทพ ชัยพร บัวมาศ เกศสุตา สนศิริ จอมสุรางค์ ดวงอิสาร สิทธิสิโรตม แก้วสวัสดิ์. 2562. การศึกษาอนุกรมวิธานตัวอ่อนแมลงวันผลไม้เผ่า Dacini (Diptera: Tephritidae) ร่วมกับการใช้เทคนิค Morphometrics ในตัวเต็มวัย. หน้า 402-417 ใน การประชุมวิชาการ อารักขาพืช แห่งชาติครั้งที่ 14 ระหว่างวันที่ 12-14 พฤศจิกายน 2562 โรงแรมดุสิตธานีหัวหิน จังหวัด เพชรบุรี.
- Allwood, A.J. and Drew, R.A.I. 1996. *Management of fruit flies in the Pacific. Canberra, ACIAR Proceedings.* 76, 208-211.
- Armstrong, K.F. and S.L. Ball. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences.* 360(1462): 1813 -1823.
- Asokan, R., K. B. Rebijith, Shakti K. Singh, A. S. Sidhu, S. Siddharthan, Praveen. K. Karanth, R. Ellango, and V.V. Ramamurthy. 2011. Molecular identification and phylogeny of *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae). *The Florida Entomologist.* 94(4): 1026-035.
- Boontop, Y., M. K. Schutze, A.R. Clarke, Cameron, S.L. and M.N. Krosch. 2017. Signatures of invasion: using an integrative approach to infer the spread of melon fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Diptera: Tephritidae), across Southeast Asia and the West Pacific. *Biological Invasions.* 1-23 pp.
- Dhillon, M.K., R. Singh, J.S. Naresh and H.C. Sharma. 2005. The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. *Journal of Insect Science.* 5(1): 40.
- Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 2013. *Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia.* CABI. London, UK. 664 pp.
- Drew, R.A.I. and M.C. Romig. 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.

Jiang, F., Z. H. Li, Y.L. Deng, J.J. Wu, R.S. Liu. 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. *Bulletin of entomological research*. 103(03): 363-371.

Koyama, J., H. Kakinohana and T. Miyatake. 2004. Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: importance of behavior, ecology, genetics, and evolution. *Annual Reviews in Entomology*. 49: 331-349.

Piñero, J.C., I. Ja'come, R. Vargas and R.J. Prokopy. 2006. Response of female melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, to host-associated visual and olfactory stimuli. 121: 261-269.

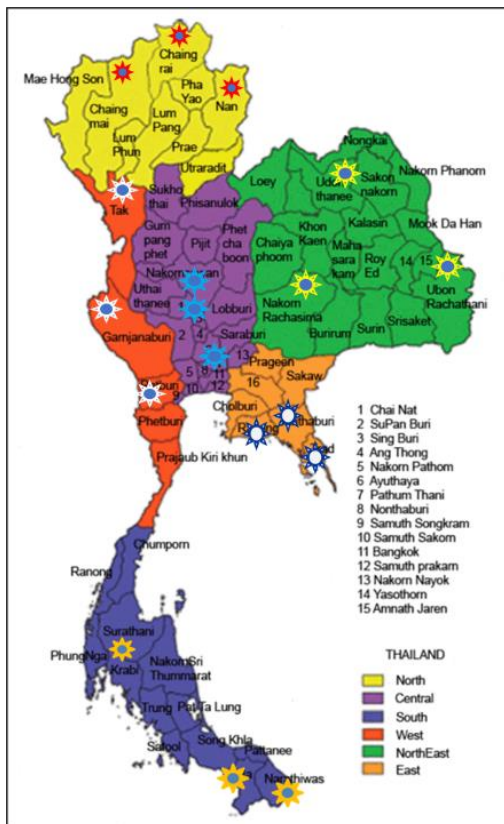


Figure 1 Locations of sampling sites in the six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) at which fruit flies were collected

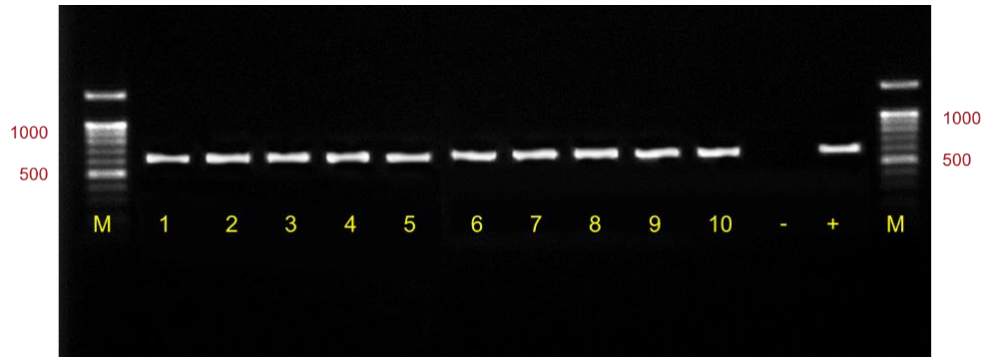


Figure 2 PCR results using the *cox1* (LCO1490/HCO2198) universal primer pair.

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. cilifera*
 Lane 10 = *Z. tau* Lane 11 = Negative
 Lane 12 = Positive (*Z. cucurbitae*)

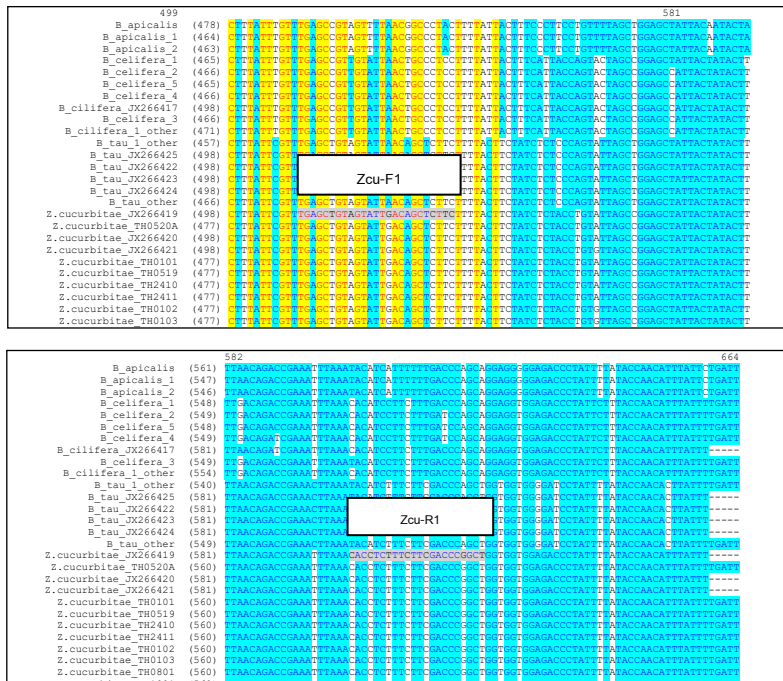


Figure 3 Alignment of the nucleotide sequence regions of *cox1* gene on fruit flies.

Consensus sequences were used to design broad-spectrum primers for *Zeugodacus cucurbitae*. Nucleotide sequences of ZcuF1 and ZcuR1 primers are highlighted

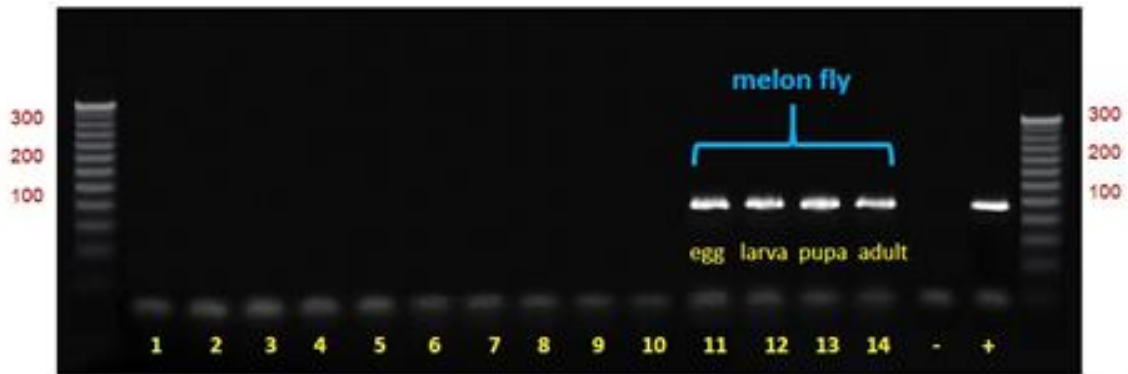


Figure 4 Specificity testing of the Zcu-F/ Zcu-R *Zeugodacus cucurbitae*-specific primer pair.

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. cilifera*
 Lane 10 = *Z. tau* Lane 11-14 = *Z. cucurbitae*
 Lane 15 = Negative (ddH₂O) Lane 16 = Positive (*Z. cucurbitae*)

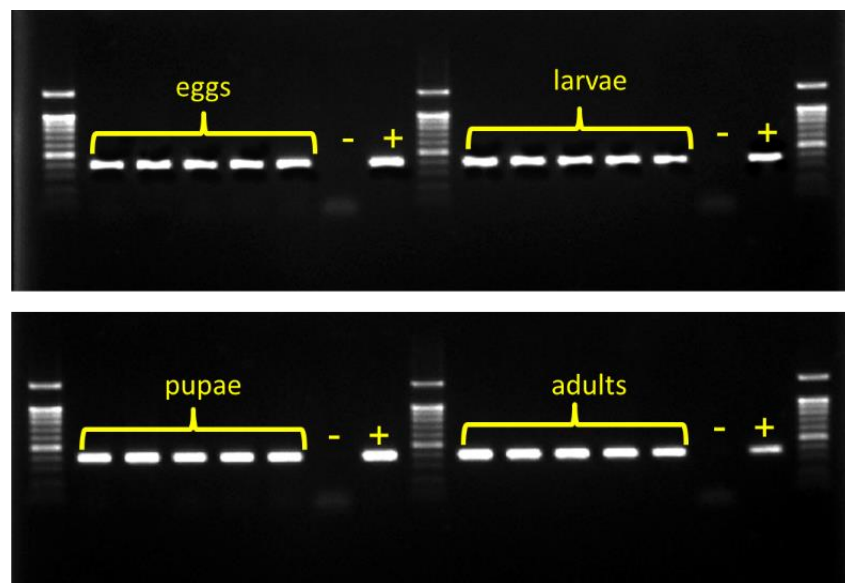


Figure 5 DNA from all stage of *Zeugodacus cucurbitae* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *Z. cucurbitae* -specific primer pair Zcu-F1 and Zcu-R1. Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *Z. cucurbitae*. Lane M: D2000 Marker

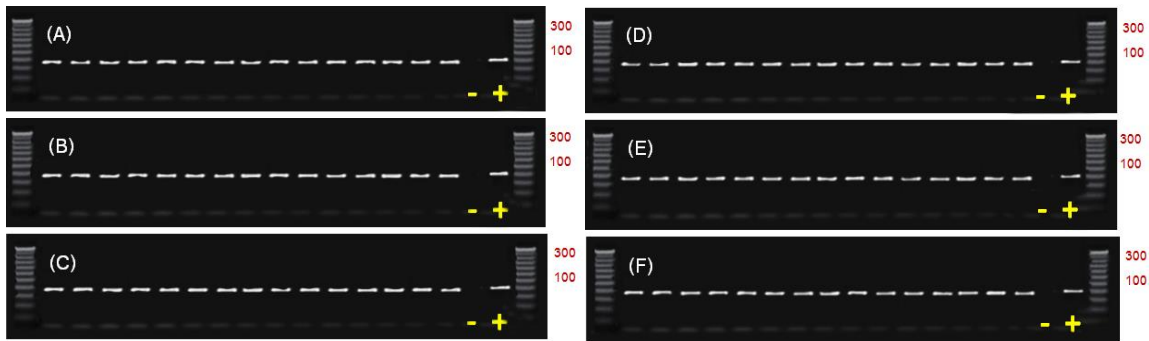


Figure 6 DNA of *Zeugodacus cucurbitae* from six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) was amplified using the *Z. cucurbitae*-specific primer pair Zcu-F1 and Zcu-R1. Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *Z. cucurbitae*. Lane M: D2000 Marker

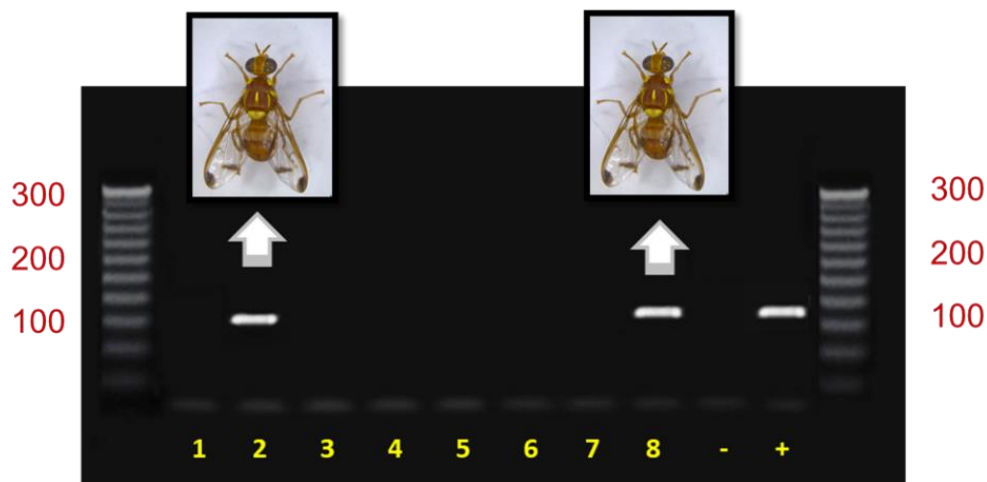


Figure 7 DNA from unknown larvae species was amplified using the *Zeugodacus cucurbitae*-specific primer pair Zcu-F2 and Zcu-R1.

Lanes 1- 8: intercepted fruit fly larvae.

Lane 9: negative control ddH₂O.

Lane 10: *Z. cucurbitae* positive control sample.

Lane M: D2000 Marker

Table 1 Collection details (scientific name, accession number, number of specimens and voucher specimen) for fruit flies in Thailand used in this study.

	Scientific name	Accession number	No of specimens	Voucher specimen
1	<i>Bactrocera carambolae</i>	MW052780 - 84 MW093419 - 23	10	EMBT.L(SEM) 1301 - 1320
2	<i>Bactrocera correcta</i>	MW067300 - 09	10	EMBT0601.L(SEM) - 0620
3	<i>Bactrocera dorsalis</i>	MW052785 - 89 MW093424 - 28	10	EMBT0701.L(SEM) - 0720
4	<i>Bactrocera latifrons</i>	MW136282 - 93	12	EMBT0901.L(SEM) - 0920
5	<i>Bactrocera umbrosa</i>	MW376156 - 73	14	EMBT1301 - EMBT1320
6	<i>Dacus longicornis</i>	MW376179 - 83	5	EMBT0201 - EMBT0209
7	<i>Zeugodacus apicalis</i>	MW376174 - 77,	5	EMBT.0401 - EMBT0410
8	<i>Zeugodacus caudatus</i>	MW376156 - 73	14	EMBT1501 - EMBT1520
9	<i>Zeugodacus cilifer</i>	MW376133 - 41	9	EMBT2001 - EMBT2020
10	<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	MW045505 - 14 MW052790 - 94	20	EMBT1601.L(SEM) - 1620
11	<i>Zeugodacus tau</i>	MW052795 - 99 MW093429 - 33	10	EMBT1901.L(SEM) - 1920

Table 2 Nucleotide of sequences and properties of broad-spectrum primer set used in *Zeugodacus cucurbitae* screening in this study primer (primer name, sequences, position, no. of base pair, temperature (Tm), % GC and size of PCR product).

Primer name	Sequences	Position	No.of base pair	Tm	% GC	Size of PCR product
Zcu-F1 (Forward)	TGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTTC	518-542	25	53	48	83
Zcu-R1 (Reverse)	AGCCGGGTCGAAGAAAGAGGTG	580-601	22	60	59	83

Table 3 Nucleotide sequence analysis of the 83 bp DNA fragments from 20 melon fly samples amplified by species-specific primers compared with the GenBank database.

No.	Melon fly with Acc. no. in GenBank	Voucher specimens	Primer	Samples with Acc. No	%Identity
1	MW363765	EMBT(SS)1601	1-Zcu-F1	KY615958.1	100%
2	MW363766	EMBT(SS)1602	1-Zcu-R1	MF095182.1	100%
3	MW363767	EMBT(SS)1603	1-Zcu-F1	MF095183.1	100%
4	MW363768	EMBT(SS)1604	1-Zcu-R1	MG384735.1	99%
5	MW363769	EMBT(SS)1605	1-Zcu-F1	MH667305.1	100%
6	MW363770	EMBT(SS)1606	1-Zcu-R1	MH751503.1	100%
7	MW363771	EMBT(SS)1607	1-Zcu-F1	MK296116.1	100%
8	MW363772	EMBT(SS)1608	1-Zcu-R1	MN016981.1	100%
9	MW363773	EMBT(SS)1609	1-Zcu-F1	MN256073.1	100%
10	MW363774	EMBT(SS)1610	1-Zcu-R1	MN256082.1	100%
11	MW363775	EMBT(SS)1611	1-Zcu-F1	MN256083.1	100%
12	MW363776	EMBT(SS)1612	1-Zcu-R1	MN256084.1	100%
13	MW363777	EMBT(SS)1613	1-Zcu-F1	MN256090.1	100%
14	MW363778	EMBT(SS)1614	1-Zcu-R1	MN256092.1	100%
15	MW363779	EMBT(SS)1615	1-Zcu-F1	MN256098.1	100%
16	MW363780	EMBT(SS)1616	1-Zcu-R1	MN256101.1	100%
17	MW363781	EMBT(SS)1617	1-Zcu-F1	MN256102.1	100%
18	MW363765	EMBT(SS)1618	1-Zcu-R1	MN256103.1	100%
19	MW363766	EMBT(SS)1619	1-Zcu-F1	MT474907.1	100%
20	MW363767	EMBT(SS)1620	1-Zcu-R1	MT474908.1	100%

Table 4 Detection of *Zeugodacus cucurbitae* Intercepted using species-specific primer (ZcuF1 - ZcuR1). 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 fly)
1	Rose apple	<i>Syzygium samarangense</i>	England	10	-	<i>B. correcta</i>
2	Yard long bean	<i>Vigna unguiculata</i>	England	10	+	<i>Z. cucurbitae</i>
3	Yard long bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Switzerland	10	+	<i>Z. cucurbitae</i>
4	Mango	<i>Mangifera indica</i>	Switzerland	10	-	<i>B. correcta</i>
5	Lychee	<i>Litchi chinensis</i>	Switzerland	10	-	<i>B. dorsalis</i>
6	Ramble Bambi	<i>Baccaurea ramiflora</i>	Spain	10	-	<i>B. carambolae</i>
7	Custard apple	<i>Annona reticulate</i>	China	10	-	<i>B. dorsalis</i>
8	Custard Apple	<i>Annona reticulate</i>	Denmark	10	-	<i>B. dorsalis</i>
Total				80		

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

กาญจนา ศรีไม้ ทิพวรรณ กันหาญาติ

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

แยก genomic DNA ของแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ของกรมวิชาการเกษตร นำไปตรวจด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ DLH120 : 5'CCGTAGCACTT AGTGCAATG 3' กับ DLH125 : 5'GCATTTCCATCGGTCACGATTG 3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *X. campestris* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hrpF* และใช้คู่ไพรเมอร์ DLH109 : 5'ATGTC GCTCAACACGCTTTC-3' กับ DLH112 : 5'-GTTTTGCGTGTAGCCCTTTGC-3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Brassica* spp. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ ITS ผลการตรวจด้วยคู่ไพรเมอร์ DLH120/DLH125 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 619 คู่เบส และผลการตรวจด้วยคู่ไพรเมอร์ DLH109/DLH112 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 1,400 คู่เบส ทำการสืบค้นข้อมูลไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ด้วยเทคนิค Real-time PCR คัดเลือกไพรเมอร์และนำลำดับเบสของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์ตั้งนี้ ตรวจ Xcc (*hrpF*) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ DLH153 : GTAAT TGATACCGCACTGCAA กับ DLH154 : CACCGCTCCAG CCATATT และตรวจ *Brassica* spp. (ITS) ด้วยคู่ไพรเมอร์ DLH155 : CAACGGATATCT CGGCTCTC กับ DLH156 : TTGCGTT CAAAGACTCGATG ได้สถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR เพื่อนำไปตรวจสอบเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ดได้

คำหลัก : โรคเน่าดำหรือขอบใบทอง ตรวจแบคทีเรียในเมล็ด

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-13-62

คำนำ

โรคขอบใบทองหรือเน่าดำมีสาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* เป็นโรคที่พบได้ทั่วไปและเป็นปัญหามากกับพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งประกอบด้วย บล็อกโคลี (broccoli) กะหล่ำดาว (Brussels sprouts) กะหล่ำปลี (cabbage) กะหล่ำดอก (cauliflower) collards คะน้า (kale) กะหล่ำปลม (kohlrabi) มัสตาร์ด (mustard) radish rutabaga และ turnip โรคเน่าดำทำให้ผลผลิตเสียหายค่อนข้างมาก โดยเฉพาะในช่วงที่สภาวะแวดล้อมเหมาะสม พืชจะเริ่มแสดงอาการโรคให้เห็นในส่วนใบ โดยใบจะเริ่มเหลืองจากขอบใบแล้วลามลึกเข้ามาในเนื้อใบจนจรดแกนกลางของใบ เป็นรูปตัววี (V) เส้นใบบริเวณนี้จะมีสีน้ำตาลดำ ต่อมาจะเกิดอาการแห้งจากขอบใบ ใบเหี่ยวเฉาและหลุดจากต้น เมื่อตัดลำต้นตามขวางจะพบว่าส่วนที่เป็นท่อน้ำ (xylem) เน่ามีสีดำ ในระยะกล้าที่งอกใหม่ๆ จะเกิดอาการเน่าดำที่ขอบใบเลี้ยง ต่อมาใบเลี้ยงจะเหี่ยวและต้นกล้าตาย นอกจากอาการดังกล่าวแล้ว บางครั้งพบอาการแผลจุดบนใบกับพืชตระกูลกะหล่ำบางชนิด เช่น ผักคะน้า โดยจะเริ่มเกิดจุดแผลขนาดเล็กๆ ต่อมาจุดขนาดใหญ่ขึ้นมีสีน้ำตาล ขนาดประมาณ ๑ มิลลิเมตร และถ้าความชื้นสูงจะปรากฏลักษณะฉ่ำน้ำรอบจุดแผลสีน้ำตาล เมื่อจุดแผลเกิดใกล้ชิดกันทำให้เกิดลักษณะใหม่ แห้งตายเป็นหย่อมๆ เนื้อใบที่เป็นแผลขาดทะลุเป็นรู การแพร่ระบาดของโรคนี้ที่สำคัญและไปได้ไกลที่สุดคือการติดไปกับเมล็ดพันธุ์และแพร่ไปยังต้นกล้าอื่นในแปลงเพาะกล้า ส่วนการเกิดโรคในแปลงเกิดจากต้นกล้าที่ได้รับเชื้อในแปลงเพาะ หรือจากเชื้อที่ตกค้างอยู่ในเศษซากพืชในดิน หรือในพืชอาศัยที่ตกค้างอยู่ในแปลง (volunteer plants) แล้วแพร่กระจายโดยน้ำฝน หรือน้ำที่ใช้รดต้นพืช เชื้อเข้าสู่พืชทางระบบราก ทางปากใบ (stomata) ต่อมาคายน้ำ (hydathodes) หรือทางแผลแล้วกระจายไปสู่ส่วนต่างๆ ทาง xylem เชื้อแพร่กระจายจากต้นเป็นโรคไปยังต้นข้างเคียงโดยไปกับลม ฝน น้ำชลประทาน เป็นต้น การระบาดของโรคจะเกิดได้ดีเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม และพืชเกิดบาดแผลโดยแมลงกัดกิน หรือแผลจากการเขตรกรรม

การแพร่ระบาดของโรคนี้ที่สำคัญและไปได้ไกลที่สุดคือการติดไปกับเมล็ดพันธุ์และแพร่ไปยังต้นกล้าอื่นในแปลงเพาะกล้า จากการระบาดที่พบในปัจจุบันทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรอย่างมาก (ศศิธร, 2545) Berg et. al. (2006) ได้พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของผักกาดโดยใช้เทคนิค multiplex real-time PCR พบว่าเทคนิคนี้มีความรวดเร็ว ใช้เวลาน้อยกว่าการตรวจด้วยเทคนิค PCR มีความเฉพาะเจาะจง และสามารถตรวจเชื้อในปริมาณต่ำได้ จากการพัฒนาเทคนิค real-time PCR ให้สามารถตรวจเชื้อจากเมล็ดได้เป็นประโยชน์แก่บริษัทที่ผลิตเมล็ดพันธุ์มาก 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 เป็น การพัฒนานำเทคโนโลยี 2 ส่วน ได้แก่ การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจหาดีเอ็นเอในสารละลายโดยใช้ สารเรืองแสง (Fluorescence reporters) ต่างๆ และการใช้เครื่อง thermal cycler ซึ่งเป็นเครื่อง ควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มารวมเป็นเครื่อง Real-time PCR โดยเพิ่มส่วนที่เป็น แหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของซินติเอ็นเอ และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้น ณ เวลานั้น (Higuchi et. al., 1992) Mavrodieva et.al. (2004) พัฒนาเทคนิค real-time PCR ในการตรวจสอบโรคแคงเกอร์ทุกสายพันธุ์ ที่มีความไว รวดเร็ว และวิเคราะห์ตามเวลาจริงที่เกิดขึ้นใน หลอด PCR โดยสามารถนำไปใช้เครื่อง RAPID machine ที่สามารถพกพาไปใช้ในแปลงปลูกได้ นำไปใช้ตรวจสอบโรคแคงเกอร์ในแปลงปลูกโดยสามารถตรวจสอบใบส้มที่เป็นโรคเพียงจุดแผลเล็กๆ แผลเดียว โดยมีความไวในการตรวจจับความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* 10 หน่วยโคโลนี/แผล และเป็นการรายงานผลครั้งแรกในการใช้วิธีนี้ไปตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนตัวอย่างแห้งโรคพืช ที่เก็บไว้ตั้งแต่ปี 1912 ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ญัฐริมา และคณะ (2556) ได้ พัฒนาการตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของ พืชตระกูลส้มด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ออกแบบมา จาก 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* ที่พบใน ประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท มีความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA เท่ากับ 5 พิโคกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 81 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ผลการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างโรคแคงเกอร์ที่เก็บมาจากแปลงปลูก ส้มโอที่ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย ด้วยเทคนิค real time PCR โดย primer D1/D2 และ primer 2/3 จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า primer ทั้ง 2 คู่ สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง

วิธีดำเนินการ

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) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย บริสุทธิ์ Xcc สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA (nutrient agar) ใช้ลูบฆ่า เชื้อ และเชื้อแบคทีเรียให้เต็มลูบ 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 ที่ซึ่งส่วนใสข้างบน 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* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hrpF* และใช้คู่ไพรเมอร์ DLH109 : 5'ATGTCGCTCAACACGCTTTC-3' DLH112 : 5'-GTTTTGCGTGAGCCCTTGC-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 ทำในถาดพลาสติกหลุมขนาด 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 10⁸ 10⁷ 10⁶ 10⁵ 10⁴ 10³ 10² 10¹ 10 หน่วยโคลน/มิลลิลิตร นำไปทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์

เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2564
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานбакเทรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

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* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hrpF* และใช้คู่ไพรเมอร์ DLH109 : 5'-ATGTCGCTCAACACGCTTTC-3' DLH112 : 5'-GTTTTGCGTGAGCCCTTGC-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 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 (ภาพที่ 1) และผลการตรวจด้วยคู่ไพรเมอร์ DLH109/DLH112 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 1,400 คู่เบส (ภาพที่ 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 ทำในสภาพพลาสติกหลอดขนาด 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 (ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นเพื่อให้ได้สภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา) 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) ของแต่ละกราฟเส้นโค้ง จะแสดงจำนวนรอบถึงระดับการสะสมของ SYBR green fluorescence ในผลผลิต PCR เป้าหมาย และใช้ค่า melting curve เป็นเกณฑ์ในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีผลผลิต PCR เป้าหมาย พบว่าค่า Tm ของคู่ไพรเมอร์ DLH153 และ DLH154 ที่ความจำเพาะต่อแบคทีเรีย Xcc เท่ากับ 85.4 °C

6. 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 ตามสถานะของ

ปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสม พบว่าปฏิกิริยา real-time PCR มีความไวในการตรวจ DNA ได้ที่ความเข้มข้น 500 พิโคกรัม

7. 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 (ภาพที่ 5)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

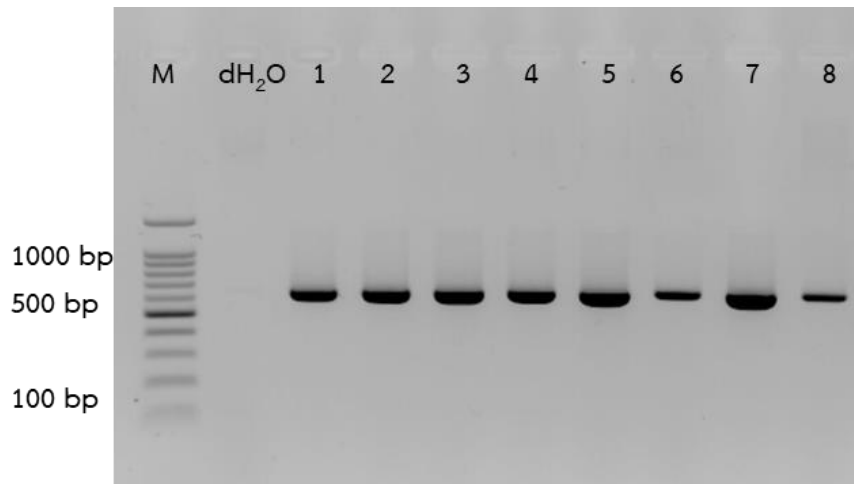
นำเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ของกรมวิชาการเกษตร แยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ และนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ผลการตรวจด้วยคูไพรเมอร์ DLH120/DLH125 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 619 คู่เบส และผลการตรวจด้วยคูไพรเมอร์ DLH109/DLH112 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 1,400 คู่เบส ทำการสืบค้นข้อมูลไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ด้วยเทคนิค Real-time PCR คัดเลือกไพรเมอร์และนำลำดับเบสของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ Xcc ได้สถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR เพื่อนำไปตรวจสอบเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ดได้

เอกสารอ้างอิง

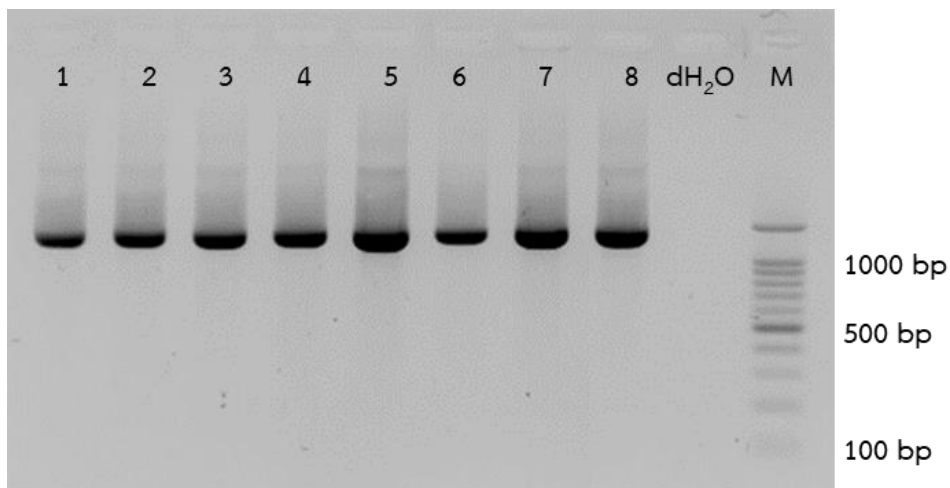
- ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2545. โรคของผักและการควบคุมโรค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. จตุจักรกรุงเทพฯ. 173 น.
- ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ บุรณี พัววงษ์แพทย์ และรุ่งนภา ทองเคิ่ง. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real-time PCR. หน้า 2863 – 2879. ใน : 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.

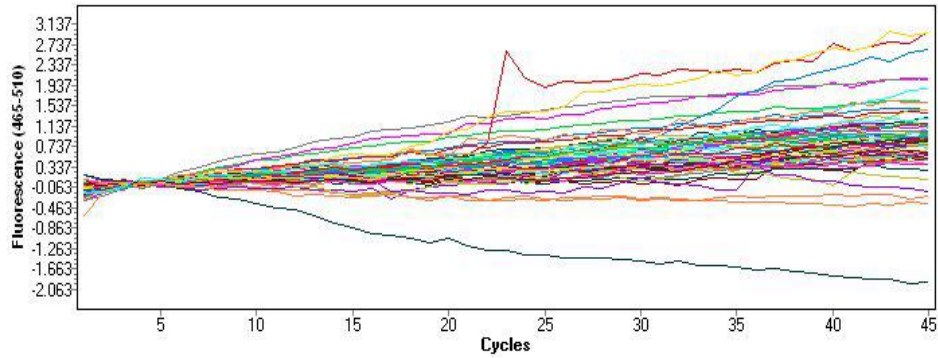
Reischi, U. and B. Kochanowski. 1999. Quantitative PCR. In *Method in Molecular Medicine: Quantitative PCR Protocol*. Totowa Press, New Jersey. 3-30.



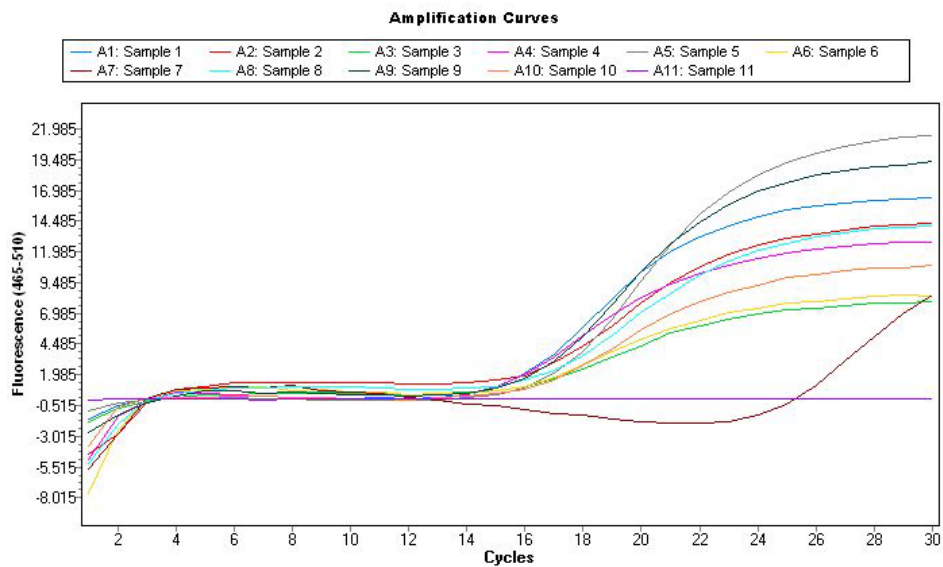
ภาพที่ 1 ผลิตรหัสจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้คูไพรเมอร์ DLH120/DLH125 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน *hrpF* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 619 คู่เบส



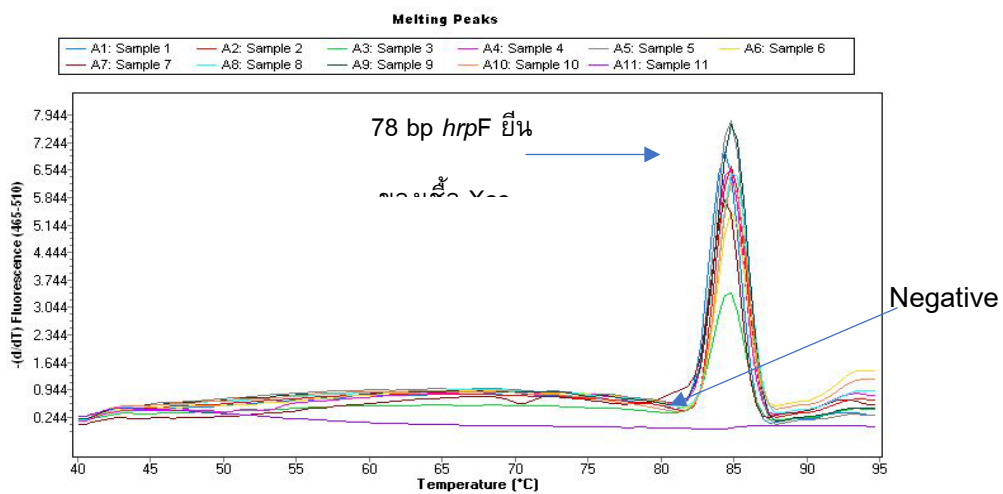
ภาพที่ 2 ผลิตรหัสจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้คูไพรเมอร์ DLH109/DLH112 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน *Brassica* spp. ITS ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.4 kb คู่เบส



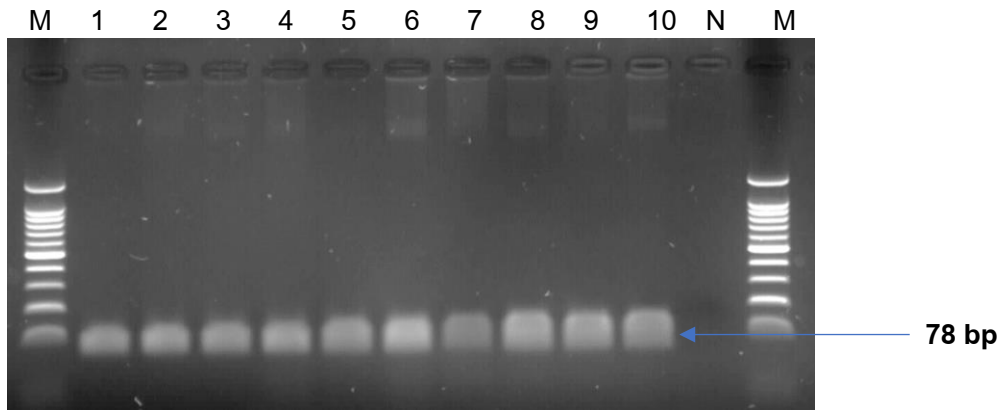
ภาพที่ 3 ผลการทดสอบคู่ไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hrpF* ด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR



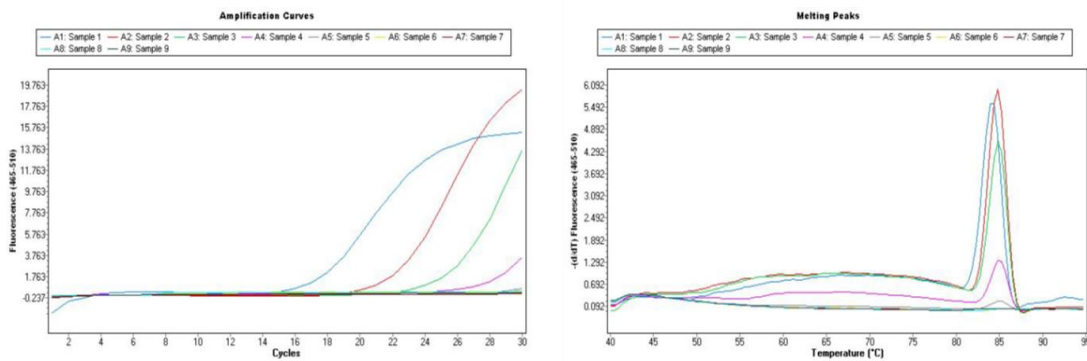
ภาพที่ 4 แสดงผลเป็นกราฟเส้นโค้ง (semi log curve) ค่า crossing point (Cp) ของแต่ละกราฟเส้นโค้งจะแสดงจำนวนรอบถึงระดับการสะสมของ SYBR green fluorescence ในผลผลิต PCR เป้าหมาย



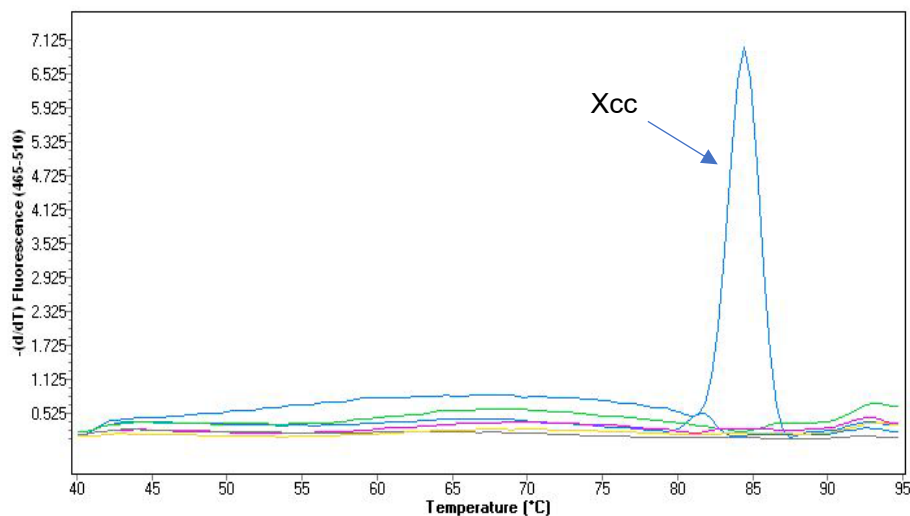
ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ melting curve ของผลผลิต PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ DLH153 และ DLH154 ที่ความจำเพาะต่อแบคทีเรีย *Xcc* พบว่ามีค่า T_m เท่ากับ 85.4°C



ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ melting curve ของผลผลิต PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ DLH153 และ DLH15 ที่ความจำเพาะต่อแบคทีเรีย Xcc พบว่ามีค่า T_m เท่ากับ 85.4°C



ภาพที่ 8 ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR นำดีเอ็นเอของ Xcc มาเจือจางแบบ 10-fold dilution ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม



ภาพที่ 7 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

การตรวจไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* ด้วยเทคนิคแลมปป์
 Detection of Root-knot Nematode *Meloidogyne enterolobii* using Loop
 Mediated Isothermal Amplification PCR Technique

ไทรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ ทิพวรรณ กันหาญาติ
 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Verification of Loop Mediated Isothermal Amplification PCR technique for the root-knot nematode *M. enterolobii* identification was carried out at the Nematology Section, Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development office. Soil samples were collected from guava orchards at Nakhon Pathom and Samut Sakhon Province. Root-knot nematodes were detected in 16 samples and 9 isolates were purified and maintained in tomato roots. Root-knot nematodes were further identified as *M. enterolobii* by the morphology of adult males and juveniles and female perineal patterns, and subsequently confirmed with PCR technique using specific primer Me-F/Me-R and MK7-F/MK7-R which obtained DNA fragments of 236 and 520 bases respectively. Loop Mediated Isothermal Amplification PCR of *M. enterolobii* was performed and found that the optimum condition was 30 minutes at 60 degree Celsius. LAMP-PCR was found to be specific with *M. enterolobii* and the sensitivity was as low as 15 picograms DNA concentration.

Keywords : plant parasitic nematodes, identification, plant pest diagnosis, molecular biology

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-14-62

บทคัดย่อ

การทดสอบการใช้เทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification PCR ในการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ดำเนินการที่กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เก็บตัวอย่างดินจากสวนฝรั่ง จ. นครปฐม และสมุทรสาคร รวม 24 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 16 ตัวอย่าง เลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ประชากรที่บริสุทธิ์ 9 ตัวอย่าง ตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทางสัณฐานวิทยา โดยใช้ลักษณะ perineal pattern ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ลักษณะของตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สอง และตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ Me-F/Me-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 236 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์จำเพาะ MK7-F/MK7-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 520 คู่เบส ซึ่งยืนยันว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ทดสอบการตรวจสอบชนิดด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification PCR พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เป็นวิธีการที่มีความจำเพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอของ *M. enterolobii* ได้ถึงความเข้มข้น 15 พิโคกรัม

คำหลัก: ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช การจัดจำแนก การวินิจฉัยศัตรูพืช อนุชีววิทยา

คำนำ

เทคนิคแลมป์ (Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)) พืชีอาร์เป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ *Bst* DNA polymerase ที่อุณหภูมิคงที่ 60 ถึง 65 องศาเซลเซียส และใช้ไพรเมอร์ 4 เส้นที่ออกแบบอย่างจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการ 6 ตำแหน่ง ทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง (Notomi *et al.*, 2000) วิธีนี้จะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาสั้นมากไม่เกิน 1 ชั่วโมง โดยตรวจผลการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอได้จากความขุ่น (turbidity) ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการจับกันของ pyrophosphate ions กับ magnesium ions เกิดเป็นตะกอน magnesium pyrophosphate สีขาวขึ้นในสารละลายซึ่งสังเกตได้ด้วยตาเปล่า โดยเทคนิคแลมป์นี้ใช้เพียงตู้บ่มเชื้อที่ตั้งอุณหภูมิ 60 ถึง 65 องศาเซลเซียส ไม่ต้องใช้ผู้ที่มีความเชี่ยวชาญในการทดสอบ ขั้นตอนในการทดสอบไม่ยุ่งยาก และให้ผลการทดสอบภายในเวลา 1-2 ชั่วโมง เทคนิคแลมป์พืชีอาร์มีการนำไปผลิตเป็นชุดสำเร็จรูป (kits) ในเชิงการค้าเพื่อตรวจสอบเชื้อหลายชนิด เช่น ไวรัส แบคทีเรีย รา และปรสิตที่ก่อโรคในมนุษย์ (Mori and Notomi, 2009) สำหรับการนำมาใช้ในการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีรายงานการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่สำคัญบางชนิด เช่น ไส้เดือนฝอยศัตรูต้นสน (pinewood nematode) *Bursaphelenchus xylophilus* (Kikuchi *et al.*, 2009) ไส้เดือนฝอยรากโพรง *Radopholus similis* (Peng *et al.*, 2012) ไส้เดือนฝอยศัตรูสั้ม *Tylenchulus semipenetrans* (Lin *et al.*, 2016) ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. (Niu *et al.*, 2011), ไส้เดือนฝอยราก

ปม *M. hapla* (Peng *et al.*, 2017) สำหรับไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* นั้น Niu *et al.* (2012) ได้ประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ที่แยกจากตัวอย่างรากและตัวอย่างดิน โดยตรวจบริเวณของ 5s rDNA-IGS2 พบว่า มีความจำเพาะต่อประชากรของ *M. enterolobii* สามารถตรวจติดตามได้ที่ปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุด 10 fg และ He *et al.* (2013) ใช้เทคนิคแลมป์ ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* จากตัวอย่างพืช โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS ระหว่าง *M. enterolobii* และไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ

ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* เป็นไส้เดือนฝอยรากปมชนิดสำคัญ มีพืชอาศัยกว้าง ทั้งพืชปลูกที่เป็นพืชเศรษฐกิจ และวัชพืช สามารถเข้าทำลายได้ทั้งพืชประเภทที่ลำต้นมีเนื้อไม้ (woody stem) เช่น ไม้ยืนต้น และไม่มีเนื้อไม้ (herbaceous stem) เช่น ไม้ล้มลุก และที่สำคัญอย่างยิ่งคือสามารถเข้าทำลายพืชหลายชนิดที่มียืนต้นทานไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Castagnone-Sereno, 2012; Kiewnick *et al.*, 2009) ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการใช้พันธุ์ต้านทานในการป้องกันกำจัด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *M. enterolobii* มีความสามารถในการเข้าทำลายและอัตราการขยายพันธุ์สูงกว่าไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่พบแพร่ระบาดทั่วไป เช่น *M. incognita* หรือ *M. arenaria* ไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* พบครั้งแรกที่มณฑลไห่หนาน ประเทศจีน ปัจจุบันพบในทวีปต่าง ๆ ทั่วโลก ในประเทศไทยมีรายงานการพบไส้เดือนฝอยรากปมชนิดนี้ในสวนฝรั่ง จ. ราชบุรี และ จ. นครปฐม ในปี พ.ศ. 2555 ซึ่งตรวจยืนยันโดยใช้ esterase phenotype และ PCR ในยีนส่วนไมโทคอนเดรีย (Jindapunapat, 2012) ในปี ค.ศ. 2010 *M. enterolobii* จัดอยู่ในบัญชีรายชื่อศัตรูพืชประเภท A2 ของ European Plant Protection Organization ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่พบในสหภาพยุโรป แต่มีการควบคุมในระดับเดียวกันกับศัตรูพืชกักกัน (Castagnone-Sereno, 2012) จากความสามารถในการแพร่กระจายและตั้งถิ่นฐานของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดนี้ทำให้หลายประเทศประกาศให้ *M. enterolobii* เป็นศัตรูพืชกักกัน (Elling, 2013) การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ให้ถูกต้องแม่นยำจึงมีความจำเป็น เพื่อวางแผนในการป้องกันกำจัด เทคนิคแลมป์พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีความเหมาะสมในการนำไปปฏิบัติในภาคสนาม หรือห้องปฏิบัติการที่ไม่มีเครื่องมือวิเคราะห์ราคาสูง ชุดไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ได้มีผู้ออกแบบไว้แล้ว อย่างไรก็ตามการนำมาใช้ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ในประเทศไทย ควรมีการทดสอบเพื่อให้เกิดความมั่นใจถึงประสิทธิภาพ ความถูกต้องแม่นยำ และข้อจำกัดต่าง ๆ ก่อนการนำไปใช้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช สารฆ่าแมลง ปุ๋ยเคมี กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์

กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ สไลด์ ถ้วยนับ ตัวอย่าง อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยา เช่น เครื่องปั่นเหวี่ยง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องอิเล็กทรอนิกส์

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างและจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้สัณฐานวิทยา

การเก็บตัวอย่างดิน และรากพืช

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงฝรั่ง โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตร โดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดิน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว คลุกเคล้าเข้าด้วยกันให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ รวมทั้งเก็บตัวอย่างรากหรือส่วนของพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม

การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและพืช

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน 250 กรัมโดยวิธีการกวนตัวอย่างดินในน้ำปริมาตร 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างไส้ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจสอบไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แยกไส้เดือนฝอยรากปมจากพืชโดยการคีบกลุ่มไข่จากรากหรือส่วนของพืชโดยตรง

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมในกระถาง หลังจากนั้น 45 วัน ล้างรากมะเขือเทศด้วยน้ำสะอาด เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมโดยเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่ 1 กลุ่มจากรากด้วยปากคีบ นำไปแช่ในน้ำสะอาดในถ้วยนับตัวอย่าง ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์ หากเป็นตัวอย่างรากที่มีกลุ่มไข่ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่มาแช่ในน้ำกลั่น ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนระยะที่สอง แล้วนำไปเทใส่ในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบฆ่าเชื้อ

การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

ตรวจลักษณะรูปร่างส่วนกัน โดยแยกตัวเต็มวัยไส้เดือนฝอยรากปมเพศเมียจากรากมะเขือเทศ แช่ใน lactic acid 45% นาน 30 นาที ตัดส่วนของผนังลำตัว (cuticle) บริเวณส่วนกันวางบนสไลด์ในหยดกลีเซอรอล ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงเตรียมไส้เดือนฝอยเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐาน โดยคงสภาพไส้เดือนฝอยตามวิธีการของ Seinhorst (1959) ตรวจสอบรูปร่างลักษณะทางสัณฐาน วัดขนาดส่วนต่างๆ เปรียบเทียบกับลักษณะของไส้เดือน

ฝอยรากปม *M. enterolobii* ในเอกสารวิชาการ (Yang and Eisenback, 1983; Rammah and Hirschmann, 1988) โดยตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ เช่น ลักษณะส่วนหัวของตัวเต็มวัยเพศเมีย ส่วน hyaline region บริเวณหางของตัวอ่อนระยะที่สอง (EPPO, 2011)

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง และตรวจสอบชนิดด้วยเทคนิค PCR

การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เชื้อไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงในหลอด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช้ส่วนปลายของ pipette tip คูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส ใน water bath นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟนาน 6 นาที

ตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ MK7-F: 5'GATCAGAGGCGGGCGCATTGCGA 3' และ MK7-R : 5'CGAACTCGCTCGAACTCGAC 3' และคู่ไพรเมอร์ Me-F: 5'AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG 3' และ Me-R: 5'TCAGTTCAGGCAGGATCAACC 3' ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้ GoTaq® Green Master Mix (Promega) 10 ไมโครลิตร forward และ reverse primer (ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ DNA template 1 ไมโครลิตร ในหลอด PCR ขนาด 0.2 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สำหรับคู่ไพรเมอร์ MK7-F/MK7-R, และอุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สำหรับคู่ไพรเมอร์ Me-F/Me-R, อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทั้งหมด 40 รอบ ตามด้วย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำผลผลิตปฏิกิริยา (PCR product) ที่ได้ไปตรวจด้วยเจลอีแอกโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที

3. การทดสอบเทคนิคแลมป์ซีอาร์

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสม

ทำปฏิกิริยาแลมป์ตามวิธีการของ Notomi *et al.* (2000) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Niu *et al.* (2012) ซึ่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 5S rDNA-IGS2 ในปฏิกิริยาปริมาณ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x *Bst* DNA polymerase buffer 2.5 μ L, 1.4mM dNTP, FIP และ BIP primers อย่างละ 1.6 μ M, F3 และ B3 outer primers อย่างละ 0.2 μ M, LF and LB primers อย่างละ 0.8 μ M, 0.8 M betaine, 8 U *Bst* DNA polymerase และ 1 μ L purified genomic DNA ซึ่งมีดีเอ็นเอประมาณ 10 นาโนกรัม หาสภาวะที่เหมาะสมโดยทำปฏิกิริยาที่ 60-65 องศาเซลเซียส

นาน 30 45 60 หรือ 75 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำผลผลิตปฏิกิริยาที่ได้ไปตรวจด้วยเจลอีแอกโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที หรือตรวจสอบโดยเติมสาร 1:10 fluorescent dye SYBR Green I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และตรวจภายใต้แสง UV

การทดสอบความไว (sensitivity)

ทดสอบความไวของปฏิกิริยา โดยการทำให้ 10-fold dilution ของดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR (ใช้คู่ไพรเมอร์ MeF3/B3) โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์พีซีอาร์ โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ และไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่น ๆ เช่น *Radopholus Pratylenchus Hirschmaniella Rotylenchulus Tylenchorhynchus Helicotylenchus* รวมทั้งไส้เดือนฝอยที่ไม่ใช่ศัตรูพืชชนิดต่างๆ ที่มักพบในตัวอย่างดิน ซึ่งเป็นตัวอย่างไส้เดือนฝอยจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์ เปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR ที่ใช้ universal primers สำหรับไส้เดือนฝอย เช่น VRF1/F2 และคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* เช่น SCAR marker Mk7-F/R ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลของปฏิกิริยาแลมป์ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์เปรียบเทียบกับ conventional PCR ผลการตรวจพบรากมะเขือเทศด้วยเทคนิคแลมป์เปรียบเทียบกับ conventional PCR ผลการตรวจพบรากพืชจากแปลงปลูกของเกษตรกรด้วยเทคนิคแลมป์เปรียบเทียบกับ conventional PCR

- การวิเคราะห์ผลการทดลอง
- เปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ กัน
- เปรียบเทียบความไวของเทคนิคแลมป์ กับ conventional PCR โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่างๆ

เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2563
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างดิน การแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย

เก็บตัวอย่างดินจากสวนฝรั่งจำนวน 24 ตัวอย่าง จาก อ. สามพราน จ. นครปฐม 5 ตัวอย่าง อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร 4 ตัวอย่าง อ. กระทุ่มแบน จ. สมุทรสาคร 15 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจาก

ตัวอย่างดิน ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 16 ตัวอย่าง ปลุกมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ ในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ครบวงจรชีวิตและสร้างกลุ่มไข่ เพื่อใช้เตรียมประชากรไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ โดยการเลี้ยงจาก 1 กลุ่มไข่ เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมได้ 9 ตัวอย่าง จาก ต.หนองนกไข่ อ. กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร 4 ตัวอย่าง ต.เกษตรพัฒนา อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร 3 ตัวอย่าง ต.ท่าไม้ อ. กระทุ่มแบน จ. สมุทรสาคร 1 ตัวอย่าง และ ต. บ้านใหม่ อ. สามพราน จ. นครปฐม 1 ตัวอย่าง (Table 1)

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้ จาก perineal pattern ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ลักษณะของตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สอง เปรียบเทียบกับ OEPP/EPPO Bulletin (2016) 46 (2), 190-201 พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* (Figure 2)

ตัวเต็มวัยเพศเมีย

Perineal pattern มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ส่วน dorsal arch ค่อนข้างสูงส่วนใหญ่มีลักษณะโค้งมน

ตัวเต็มวัยเพศผู้

มี labial disk ลักษณะกลมมีขนาดใหญ่ ซึ่งรวมเข้ากับ medial lips กลายเป็น dorsoventrally elongate lip region ส่วน labial disk หนุนขึ้นเล็กน้อย medial lips มีลักษณะ crescent-shaped ส่วน lip region มีลักษณะสูง โค้งมน แยกออกจากลำตัวเล็กน้อย ทางสันโค้งมน phasmids มีขนาดเล็ก ลักษณะเป็นรู อยู่ระดับเดียวกับ anus

ตัวอ่อนระยะที่สอง

ยาวประมาณ 436.6 (405.0-472.9) ไมโครเมตร hemizonid อยู่เหนือ excretory pore ประมาณ 1-2 annules lateral lips มีขนาดใหญ่ ลักษณะเป็นสามเหลี่ยม ส่วนหัวมีลักษณะปลายตัด (truncate) stylet knob ใหญ่และกลม ทางแหลม ปลายหางมน ส่วน hyaline tail terminus ชัดเจน

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง และตรวจสอบชนิดด้วยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) นำไปตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้คูไพรเมอร์ MK7-F/ MK7-R และคูไพรเมอร์ Me-F/Me-R ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปมด้วยคูไพรเมอร์จำเพาะต่อ *M. enterolobii* โดยคูไพรเมอร์ Me-F/Me-R ได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาขนาด 236 คู่เบส และคูไพรเมอร์ MK7-F/MK7-R ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาขนาด 520 คู่เบส ซึ่งตรงกับ *M. enterolobii* (Figure 3)

3. การทดสอบเทคนิคแลมป์ซีอาร์

เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* แต่ละไอโซเลต สกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* และไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ เช่น *M. incognita* และ *M. javanica* และไส้เดือนฝอยชนิดต่าง ๆ สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

การทดสอบสถานะที่เหมาะสม

ทดสอบสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP-PCR ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ได้สถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Figure 4)

การทดสอบความไว (sensitivity)

ทดสอบความไวของปฏิกิริยา โดยการทำให้ 10-fold dilution ของดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR (ใช้คูโพรเมอร์ MeF3/B3) พบว่าสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของ *M. enterolobii* ได้ถึงความเข้มข้น 15 พิโคกรัม (Figure 5)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์พีซีอาร์ โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ รวมทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่น ๆ ได้แก่ *Pratylenchus Radopholus Helicotylenchus Tylenchorhynchus Hoplolaimus* และ *Criconemoides* พบว่าเทคนิคแลมป์พีซีอาร์มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* (Figure 6)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การใช้เทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* เป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็วใช้เวลาประมาณ 30 นาที มีความจำเพาะเจาะจงมีความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอของ *M. enterolobii* ได้ถึงความเข้มข้น 15 พิโคกรัม

เอกสารอ้างอิง

- 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.
- He, X.F., P. Huan and D. Zhong. 2013. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of *Meloidogyne enterolobii* directly from Infected Plants. *Journal of China Agriculture Science* 46:534-544.
- Hunt, D.J., and Z.A. Handoo. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In : Ed. Perry RN, Moens M & Starr JL, pp. 55–97. *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., Frey, J. E., and A. Braun-Kiewnick. 2015. Development and validation of LNA-based quantitative real-time PCR assays for detection and identification of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* in complex DNA backgrounds. *Phytopathology* 105:1245-1249.
- Kikuchi, T., T. Aikawa, Y. Oeda, N. Karim, and N. Kanzaki. 2009. A rapid and precise diagnostic method for detecting the Pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology* 99:1365-1369.
- Lin, B.R., H.H. Wang, K. Zhuo and J.L. Liao. 2016. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Tylenchulus semipenetrans* in soil. *Plant Disease* 100:877-883.
- Mori, Y. and T. Notomi. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy* 15:62-69.
- Niu, J.H., Q.X. Guo, H. Jian, C.L. Chen, D. Yang, Q. Liu and Y.D. Guo. 2011. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots. *Crop Protection* 30:1063-1069.
- Niu, J.H., H. Jian, Q.X. Guo, C.L. Chen, X.Y. Wang, Q. Liu and Y. D. Guo. 2012. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathology* 61:809-819.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28: e63.
- Peng, H., D.L. Peng, X.Q. Hu, X.F. He, Q. Wang, W.K. Huang and W.T. He. 2012. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and precise detection of the burrowing nematode, *Radopholus similis*, directly from diseased plant tissues. *Nematology* 14:977-986.

Peng, .H., H. Long., W. Huang, J. Liu, J. Cui, L. Kong, X. Hu, J. Gu and D. Peng. 2017. Rapid, simple and direct detection of *Meloidogyne hapla* from infected root galls using loop-mediated isothermal amplification combined with FTA technology. *Scientific Reports* 7:44853.

Table 1 Number of samples and locations.

No.	Location			RKN	Me Morpho	Me
	Sub District	District	Province	detection	logical ID	PCR ID
1	Ban Mai	Sam Phran	Nakhon Pathom	×	×	×
2	Ban Mai	Sam Phran	Nakhon Pathom	✓	✓	✓
3	Tha Mai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
4	Ban Mai	Sam Phran	Nakhon Pathom	×	×	×
5	Bang Chang	Sam Phran	Nakhon Pathom	×	×	×
6	Bang Chang	Sam Phran	Nakhon Pathom	×	×	×
7	Kaset Phatthana	Ban Phaeo	Samut Sakhon	✓	✓	✓
8	Kaset Phatthana	Ban Phaeo	Samut Sakhon	✓	✓	✓
9	Kaset Phatthana	Ban Phaeo	Samut Sakhon	✓	✓	✓
10	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
11	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
12	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
13	Khlong Tan	Ban Phaeo	Samut Sakhon	×	×	×
14	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
15	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
16	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
17	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
18	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
19	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
20	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
21	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
22	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
23	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×
24	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	×	×	×

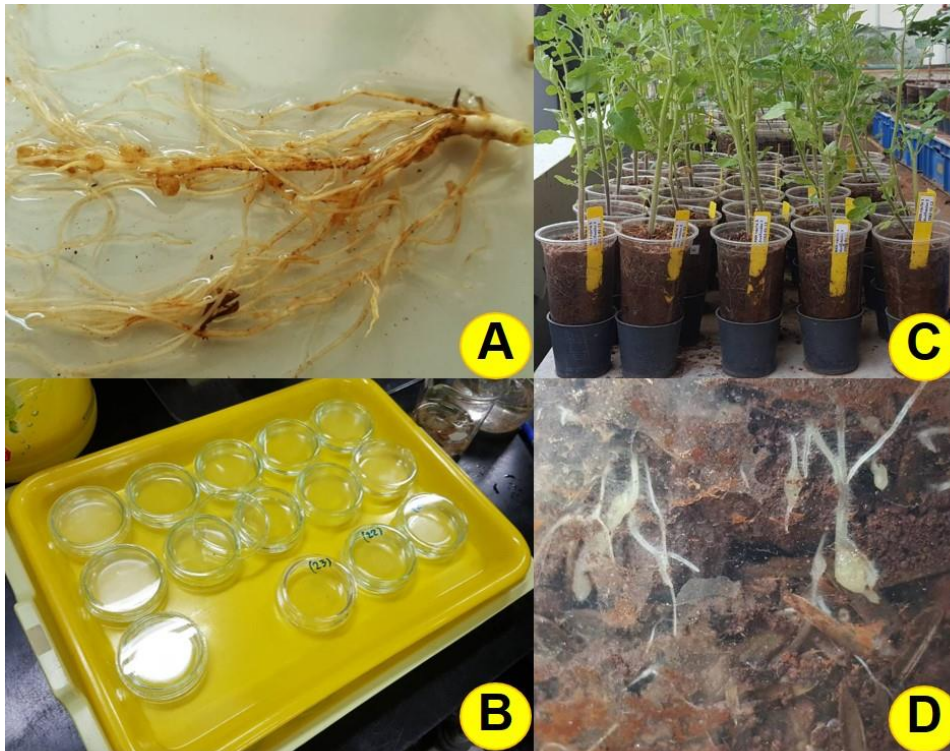


Figure 1 (A) Galled tomato root from tomato plant grown in soil samples from fields infested with root-knot nematodes. (B) Single eggmass was detached from the root and placed in sterile water (C) Hatched juveniles were inoculated into tomato plants grown in sterile soil (D) pure nematode population were obtained and used for the experiment.

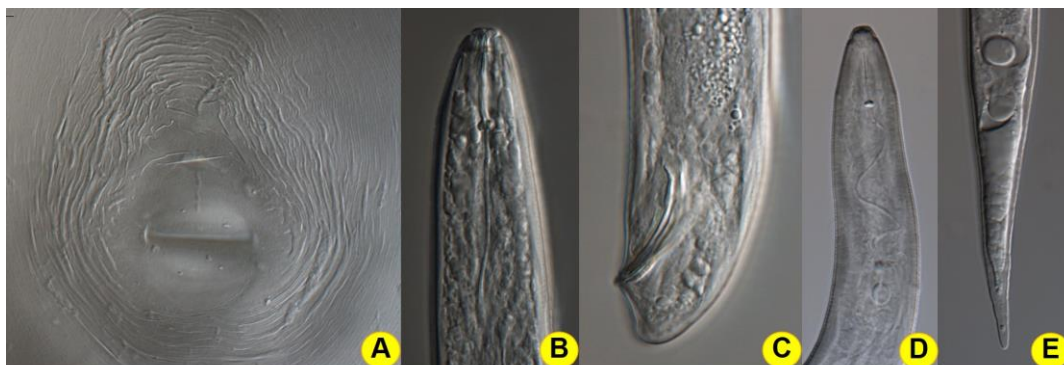


Figure 2 (A) Female perineal pattern (B, C) head and tail region of male and (D, E) head and tail of second stage juvenile of *M. enterolobii*.

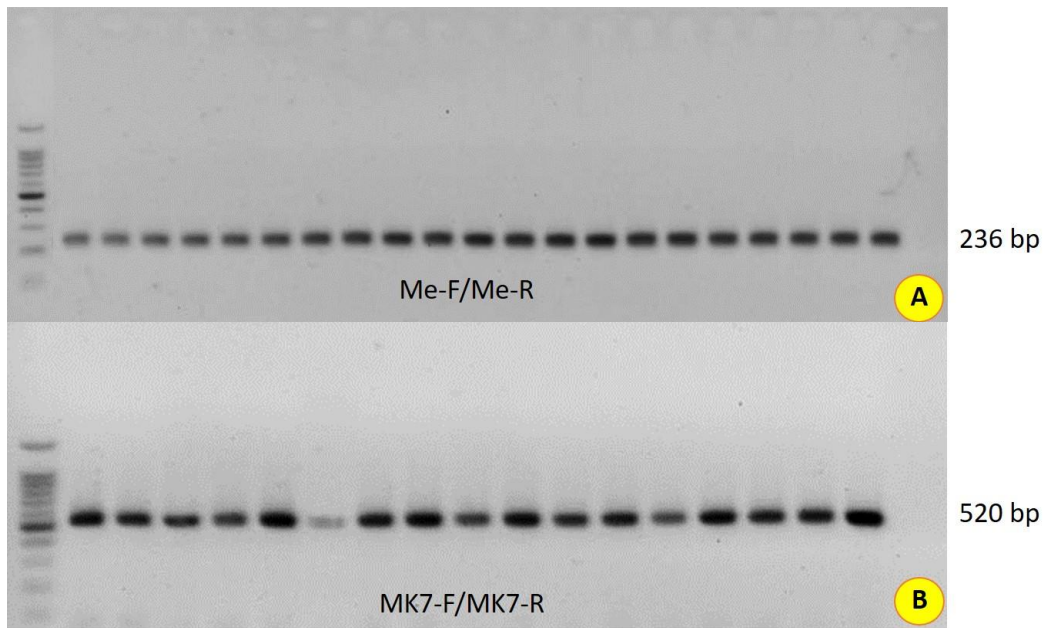


Figure 3 (A) Detection of *M. enterolobii* with Me-F/Me-R primers yielded 236 bp fragment and (B) Detection of *M. enterolobii* with MK7-F/MK7-R primers yielded 520 bp fragment

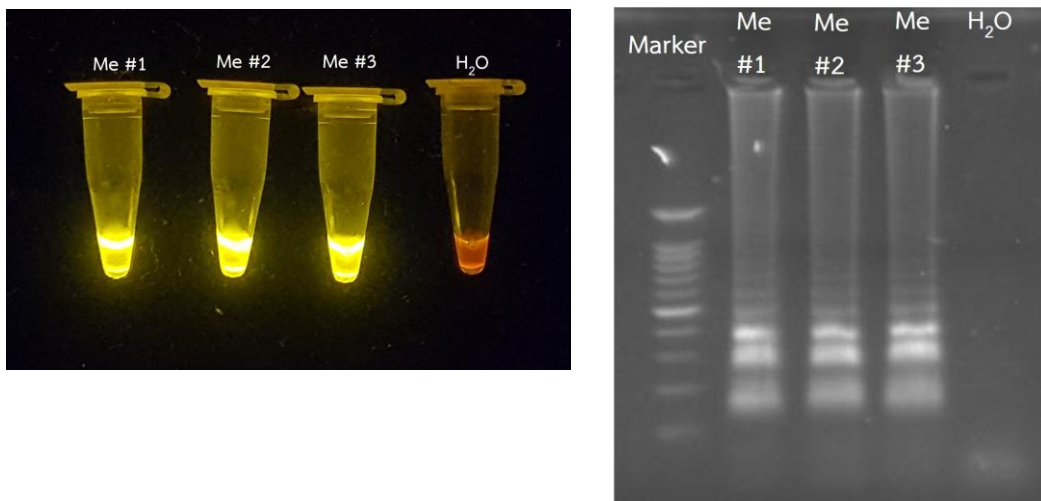


Figure 4 Detection of *M. enterolobii* with LAMP PCR

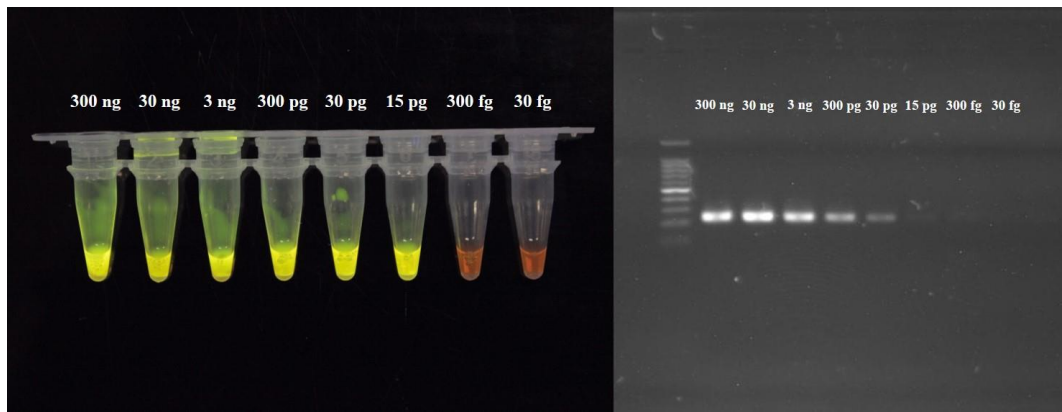


Figure 5 Sensitivity of LAMP-PCR to detect *M. enterolobii* compare with conventional PCR. LAMP-PCR could detect 15 pg DNA concentration

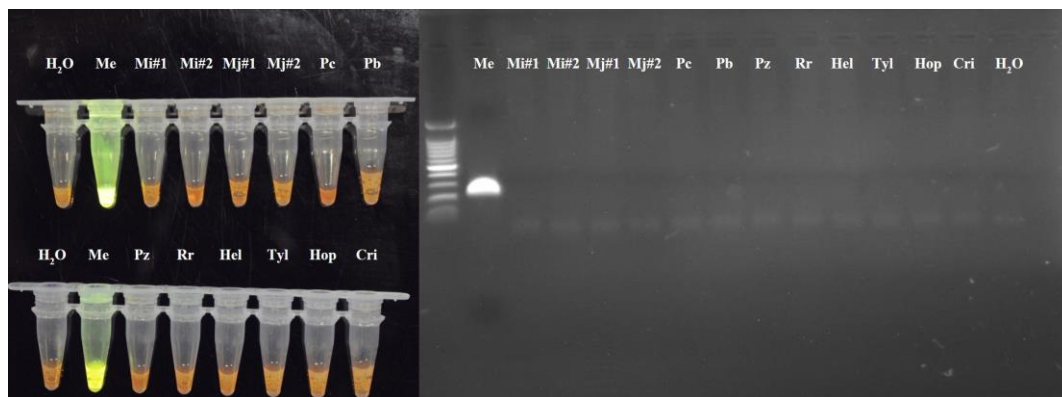


Figure 6 Specificity of LAMP-PCR to detect *M. enterolobii* (Me = *Meoidogyne enterolobii*, Mi = *Meloidogyne incognita*, Mj = *Meloidogyne javanica*, Pc = *Pratylenchus coffeae*, Pb = *Pratylenchus brachyurus*, Pz = *Pratylenchus zae*, Rr = *Rotylenchulus reniformis*, Hel = *Helicotylenchus* sp., Tyl = *Tylenchorhynchus* sp., Hop = *Hoplolaimus* sp. Cri = *Criconemoides* sp.)

การใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *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 ข่ายทอง อังคณา พวงเงินมาก ธิติยา สารพัฒน์
 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ภาคเหนือ และจังหวัดอุบลราชธานี รวม 60 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ด้วยวิธี Decanting and Sieving with Baermann's tray ตรวจหาตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยปลูกมะเขือเทศลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ตัวอ่อนระยะที่สองที่อยู่ในดินเข้าทำลายรากและเจริญเติบโตสร้างกลุ่มไข่ จากนั้นเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมโดยเริ่มจาก 1 กลุ่มไข่เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกจากตัวอย่างดิน 21 ตัวอย่าง โดยใช้ลักษณะรูปร่างส่วนกัน พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และ *M. javanica* จากนั้นตรวจสอบยืนยันด้วยวิธี PCR โดยใช้คูไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 2 ชนิดพบว่าได้ผลตรงกับการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา

คำหลัก : ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช การจัดจำแนก การวินิจฉัยศัตรูพืช อนุชีววิทยา

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-16-63

คำนำ

โรครากปมทำความเสียหายต่อพืชหลายชนิดในประเทศไทย ไล่เดือนฝอยรากปมชนิดสำคัญที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในประเทศไทยคือ *Meloidogyne incognita* และ *M. javanica* โดยพบว่าไล่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* แพร่ระบาดทำความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจหลายชนิด การสำรวจทั่วภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และบางส่วนของภาคเหนือ พบไล่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* เข้าทำลายพืชต่างๆ มากถึง 60 ชนิด (สืบศักดิ์, 2538) ไล่เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานการพบในประเทศไทยคือ *M. arenaria*, *M. exigua*, *M. graminicola*, *M. hapla*, *M. microcephala* และ *M. naasi* (สืบศักดิ์, 2538) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบไล่เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ในสวนฝรั่ง จ.นครปฐม ในปี พ.ศ. 2555 ซึ่งตรวจยืนยันโดยใช้ esterase phenotype และ PCR ในยีนส่วนไมโทคอนเดรีย (Jindapunnapat, 2012) ซึ่งไล่เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* เป็นไล่เดือนฝอยที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงมาก (highly virulent and pathogenic) สามารถเข้าทำลายพืชที่มีความต้านทานต่อไล่เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ได้หลายประเทศให้ความสำคัญต่อไล่เดือนฝอยรากปมชนิดนี้ รวมทั้งสหภาพยุโรปที่ได้บรรจุไล่เดือนฝอยรากปมชนิดนี้ในบัญชีรายชื่อศัตรูพืชควบคุมประเภท A2 (ศัตรูพืชที่พบในอาณาเขตของสหภาพยุโรป) การจำแนกชนิดของไล่เดือนฝอยรากปมให้ถูกต้องมีความสำคัญต่อการวางแผนการป้องกันกำจัด อย่างไรก็ตามการจำแนกชนิดไล่เดือนฝอยรากปมโดยใช้สัณฐานวิทยาทำได้ยาก เนื่องจากลักษณะบางอย่างของไล่เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิดมีความคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ยังมีความแปรปรวนของลักษณะต่าง ภายในประชากรของไล่เดือนฝอยชนิดเดียวกันอีกด้วย จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยามาช่วยในการจำแนกชนิดไล่เดือนฝอยรากปมซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำ เทคนิค Multiplex PCR ได้มีการนำมาใช้ตรวจสอบไล่เดือนฝอยรากปมหลายชนิดพร้อมๆ กัน แต่ยังไม่มียังมีรายงานการใช้เทคนิคนี้ในประเทศไทย รวมทั้งยังไม่มียังมีรายงานการใช้ตรวจไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* and *M. enterolobii* พร้อมๆ กัน จึงควรมีการนำเทคนิค Multiplex PCR มาพัฒนาเพื่อใช้ตรวจไล่เดือนฝอยรากปมที่สำคัญทั้ง 4 ชนิดของประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์สำหรับแยกไล่เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องปั่นเหวี่ยง สไลด์ กระจกปิดสไลด์ ถ้วยนับตัวอย่าง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส 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 ล้างตัวอย่างที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างไส้ลงบนกระดาษกรอง 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 ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์ หากเป็นตัวอย่างรากที่มีกลุ่มไข่ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่มาแช่ในน้ำกลั่น ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนระยะที่สอง แล้วนำไปเทใส่ในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบฆ่าเชื้อ เตรียมตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยคีบกลุ่มไข่วางลงบนตะแกรงไนลอนที่แช่อยู่ในน้ำสะอาดในจานเลี้ยงเชื้อ ได้ตัวอ่อนระยะที่สองในน้ำสะอาดสำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอ

การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานโดยเปรียบเทียบลักษณะรูปร่างของส่วนก้นของตัวเต็มวัยเพศเมีย (perineal patterns) เปรียบเทียบลักษณะ ความกว้างยาวและสัดส่วนของอวัยวะต่างๆ ของไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สองประกอบในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะรูปร่างส่วนก้นในการจำแนกได้ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากตำราและรายงานตีพิมพ์

จำแนกตัวอ่อนระยะที่สองด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา โดยใช้ Molecular Diagnostic Key ที่จัดทำขึ้นโดย Adam *et al.* (2007) การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser[®] (BioVentures) ตามเอกสารที่แนบมากับผลิตภัณฑ์เชื้อไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงในหลอด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตรบนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช้ส่วนปลายของ pipette tip ตูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด 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 นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟชนิด 750 วัตต์ เป็นเวลา 6 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Adam *et al.* (2007)

ทดสอบคู่ไพรเมอร์ต่างๆ และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* (2564)

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR

ทดสอบคู่ไพรเมอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 1 กับตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด 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 μ 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 ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม 4 ชนิด

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* ชนิดละอย่างน้อย 5 ไอโซเลต ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ multiplex PCR ที่ได้ โดยมีไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* เป็นตัวเปรียบเทียบ

ทดสอบความสามารถในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืช

ปลูกเชื้อต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่พืชมัยอายุ 1 เดือน ที่ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตรบรรจุดินอบฆ่าเชื้อ ด้วยตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 จำนวน 200 ตัวต่อกระถาง โดยใช้ไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 4 ชนิด และใช้การปลูกเชื้อโดยใช้น้ำเปล่าเป็นวิธีการเปรียบเทียบ สกัดดีเอ็นเอจากปมรากมะเขือเทศ 15 20 และ 30 วันหลังปลูกเชื้อ 10 ปมต่อราก ของต้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด สำหรับวิธีการที่ปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า จะตัดชิ้นส่วนรากมาสกัดดีเอ็นเอ ตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย multiplex PCR

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมทั้งทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา ผลการทดสอบสถานะที่เหมาะสมและ ความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยา multiplex PCR ผลการตรวจปมรากพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดต่างๆ

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

- เปรียบเทียบผลขององค์ประกอบและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา จำนวนรอบของปฏิกิริยา annealing temperature, extension time และ dNTP
- เปรียบเทียบผลการตรวจไส้เดือนฝอยรากปมชนิดต่างๆ ด้วย multiplex PCR
- เปรียบเทียบผลการตรวจปมรากพืชที่ระยะเวลาต่างๆด้วย multiplex PCR

เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น ตุลาคม 2563 สิ้นสุด กันยายน 2564
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมจากประชากรไส้เดือนฝอยที่เก็บรักษาไว้ ในงานเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมไส้เดือนฝอยศัตรูพืช เก็บตัวอย่างดินเพิ่มเติมจากพื้นที่ภาคเหนือ และจังหวัดอุบลราชธานีรวม 60 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ตรวจหาตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยปลูกมะเขือเทศลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ตัวอ่อนที่อยู่ในดินเข้ารากและเจริญเติบโตสร้างกลุ่มไข่ จากนั้นเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมโดยเริ่มจาก 1 กลุ่มไข่เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกจากตัวอย่างดิน 21 ตัวอย่าง โดยใช้ลักษณะรูปร่างส่วนกัน พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และ *M. javanica* ทดสอบคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิดพบว่าได้ผลตรงกับการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกจากตัวอย่างดิน 21 ตัวอย่าง โดยใช้ลักษณะรูปร่างย่นส่วนกัน พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และ *M. javanica* ทดสอบคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิดพบว่าได้ผลตรงกับการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา ไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกได้จะนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธี multiplex PCR ในลำดับต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- บัญชา ชินศิริ. 2553. การจำแนกไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* spp.) ในแหล่งปลูกพริกทางเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคอณูชีวโมเลกุล. กรุงเทพมหานคร : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2538. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย สำนักพิมพ์ริ้วเขียว 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. In : Perry RN, Moens M & Starr JL, pp. 55-97. *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.

ตารางที่ 1 ผลการตรวจตัวอย่างดินจากพื้นที่ภาคเหนือ และ จ. อุบลราชธานี

ลำดับที่	ชนิดพืช	N	E	การตรวจหา	การตรวจสอบชนิด
				ไส้เดือนฝอยรากปม	ไส้เดือนฝอยรากปม
1	พริก	15.4325	104.8208333	พบ	<i>M. javanica</i>
2	พริก	15.43194444	104.8213889	พบ	<i>M. javanica</i>
3	พริก	15.41361111	104.7869444	ไม่พบ	-
4	พริก	15.43	104.8208333	ไม่พบ	-
5	พริก	15.42972222	104.8208333	ไม่พบ	-
6	พริก	15.435	104.8186111	พบ	<i>M. javanica</i>
7	หม่อน	15.435	104.8186111	พบ	<i>M. incognita</i> <i>M. javanica</i>
8	หม่อน	15.1475	104.9008333	พบ	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
9	หม่อน	15.14777778	104.9008333	พบ	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
10	ขึ้นฉ่าย	15.14777778	104.9008333	พบ	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
11	จิงจูฉ่าย	15.1475	104.9011111	พบ	<i>M. javanica</i>
12	มะเขือเทศ	15.1475	104.9011111	พบ	<i>M. javanica</i>
13	ผักสลัด	15.1475	104.9011111	ไม่พบ	-
14	พริก	15.14777778	104.9011111	ไม่พบ	-
15	ผักสลัด	15.14777778	104.9011111	พบ	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
16	ผักสลัด	15.24527778	104.9936111	ไม่พบ	-
17	มะเขือ	15.24527778	104.9933333	ไม่พบ	-
18	พริก	15.00222222	104.7877778	พบ	<i>M. javanica</i>
19	พริก	15.00194444	104.7883333	ไม่พบ	-
20	ผักชีฝรั่ง	15.00166667	104.7880556	พบ	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
21	หญ้าหวาน อิตาลี	15.00694444	104.7844444	ไม่พบ	-
22	พริก	15.00111111	104.7855556	ไม่พบ	-
23	ผักสลัด	14.99722222	104.7938889	พบ	<i>M. incognita</i>
24	หม่อน	14.99722222	104.7947222	พบ	<i>M. incognita</i>
25	พริก	15.22	104.9341667	พบ	<i>M. incognita</i>
26	ข้าว	15.21972222	104.9344444	ไม่พบ	-
27	ข้าว	15.08277778	104.5361111	ไม่พบ	-
28	พริก	15.06527778	104.5422222	ไม่พบ	-
29	พริก	15.07138889	104.5494444	พบ	<i>M. incognita</i>

ตารางที่ 1 ผลการตรวจตัวอย่างดินจากพื้นที่ภาคเหนือ และ จ. อุบลราชธานี (ต่อ)

ลำดับที่	ชนิดพืช	N	E	การตรวจหา	การตรวจสอบชนิด
				ไส้เดือนฝอยรากปม	ไส้เดือนฝอยรากปม
30	พริก	15.15944444	104.5813889	ไม่พบ	-
31	พริก	15.21527778	104.5372222	ไม่พบ	-
32	พริก	15.21555556	104.5388889	ไม่พบ	-
33	พริก	15.21527778	104.5394444	ไม่พบ	-
34	พริก	15.21666667	104.5494444	ไม่พบ	-
35	พริก	15.21	104.5380556	ไม่พบ	-
36	ข้าว	14.92666667	104.3486111	ไม่พบ	-
37	พริก	14.92666667	104.3488889	ไม่พบ	-
38	พริก	14.96916667	104.2469444	ไม่พบ	-
39	พริก	14.92166667	104.2002778	ไม่พบ	-
40	ยาสูบ	20.22777778	99.895	ไม่พบ	-
41	ยาสูบ	20.23111111	99.85666667	พบ	<i>M. javanica</i>
42	พริก	20.23111111	99.89833333	พบ	<i>M. javanica</i>
43	ยาสูบ	20.23138889	99.89861111	พบ	<i>M. incognita</i>
44	ฝรั่ง	20.23166667	99.89888889	ไม่พบ	-
45	แตงกวา	20.23138889	99.89916667	ไม่พบ	-
46	กล้วย	20.27972222	99.9575	ไม่พบ	-
47	กล้วย	20.18777778	100.0358333	ไม่พบ	-
48	กล้วย	20.18722222	100.0327778	ไม่พบ	-
49	กล้วย	20.16194444	99.97944444	ไม่พบ	-
50	กล้วย	19.73194444	99.62472222	พบ	<i>M. incognita</i>
51	กล้วย	19.43972222	99.50138889	ไม่พบ	-
52	กล้วย	19.30888889	99.41805556	ไม่พบ	-
53	กล้วย	19.37722222	99.17166667	ไม่พบ	-
54	กล้วย	19.37138889	99.17805556	ไม่พบ	-
55	พริก	19.36694444	99.18333333	ไม่พบ	-
56	ยาสูบ	19.36666667	99.18611111	ไม่พบ	-
57	กล้วย	19.13611111	99.16527778	พบ	<i>M. incognita</i>
58	กล้วย	19.09138889	99.00027778	ไม่พบ	-
59	กล้วย	19.02055556	98.98055556	ไม่พบ	-
60	พริก	19.0175	98.98222222	ไม่พบ	-

การคัดเลือกอนุภาคไวรัส เอ็น พี วี ที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก
Efficacy Test of Viral Particles for The Occlusion Bodies of
Nucleopolyhedrovirus (NPV) in *Plutella xylostella* Cell Line

สุขลวจันน์ ว่องไวลิขิต พชรีวรรณ จงจิตเมตต์ สาทิพย์ มาลี
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การทดลองวิจัยการคัดเลือกอนุภาคไวรัส เอ็น พี วี ที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2563 พบว่าผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการโดยการทดสอบประสิทธิภาพไวรัสกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 โดยมีหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบกับ Virions of SeMNPV by cells culture, Occlusion bodies of SeMNPV by cells culture, Occlusion bodies of SeMNPV by larvae, Virions of HaSNPV, Virions of HaSNPV infected Sf cells culture, Occlusion bodies of SlNPV by larvae, Occlusion bodies of TnNPV by larvae และเปรียบเทียบกับ Control(distilled water) พบว่ามีหนอนตายในไวรัสทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ แต่จะมีขนาดของหนอนที่แตกต่างกันซึ่งข้อมูลการตายของหนอนแต่ละตัวจากไวรัสแต่ละชนิดนำไปใช้ทดสอบกับหนอนใยผักต่อไป และต้องมีการตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมด้วยจึงจะสรุปได้แน่นอนยิ่งขึ้น

คำหลัก: ไวรัส เอ็น พี วี หนอนใยผัก เซลล์เพาะเลี้ยง Nucleopolyhedrovirus, NPV,
Plutella xylostella, cell culture

รหัสการทดลอง 03-05-59-01-01-00-13-61

คำนำ

หนอนใยผัก *Plutella xylostella* Linnaeus เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ มักพบระบาดทั่วไปตามแหล่งปลูกผักทั่วโลก มูลค่าการควบคุมกว่าพันล้านเหรียญสหรัฐต่อปี (Sarfraz *et al.*, 2005) โดยเฉพาะในกลุ่มพืชตระกูลกะหล่ำ เช่น คะน้า กวางตุ้ง กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี บร็อกโคลี่ ผักกาดเขียว ผักกาดหัว เป็นต้น หนอนแมลงชนิดนี้มีวงจรชีวิตสั้น ประมาณ 14-18 วัน (ฤดูร้อน) 28-29 วัน (ฤดูหนาว) หรือโดยเฉลี่ยมี 17-25 ชั่วโมงต่อปี มีการแพร่พันธุ์และขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว หลังออกจากดักแด้ภายใน 1 วัน สามารถวางไข่ได้ทันทีและวางไข่ได้ตลอดชีวิต ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่ได้ระหว่าง 50-400 ฟอง/ตัว ตามสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมและมีพืชอาหารตลอดปี ปัจจุบันมีรายงานหนอนใยผักสามารถพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้รวดเร็วและหลายชนิด จึงเป็นการยากต่อการป้องกันกำจัดด้วยการใช้สารฆ่าแมลงฉีดพ่นเป็นประจำเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงควรใช้หลายๆ วิธีผสมผสานกันจึงจะสามารถลดการระบาดของหนอนใยผักได้ เช่น การใช้วิธีเขตกรรม การใช้กับดัก การใช้โรงเรือนตาข่ายไนล่อน การใช้ระดับเศรษฐกิจและการสูมตัวอย่างก่อนพ่นสารฆ่าแมลง และการใช้ศัตรูธรรมชาติ แตนเบียนไข่ และแบคทีเรีย ซึ่งผลการควบคุมหนอนใยผักทั่วปของเกษตรกรยังไม่ประสบผลสำเร็จ นอกจากนี้ยังพบสารพิษตกค้างเป็นปัญหาในการส่งออกพืชไปยังต่างประเทศ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องหาศัตรูธรรมชาติชนิดอื่นมาช่วยในการป้องกันกำจัดแบบยั่งยืนเพื่อให้เป็นทางเลือกให้กับเกษตรกร นั่นคือไวรัสโรคของแมลง ชนิด Nucleopolyhedrovirus (NPV) ที่มีคุณสมบัติทำให้หนอนแมลงเป็นโรคตาย แบบเฉพาะเจาะจงต่อชนิดหนอน และหนอนแมลงไม่สามารถสร้างความต้านทานได้ เนื่องจากไวรัส NPV จะเข้าไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของนิวเคลียสของเซลล์หนอนทำให้ระบบการทำงานของเซลล์ถูกทำลายอย่างสิ้นเชิง ในลักษณะที่ทำให้หนอนป่วยเป็นโรคตายในที่สุด ซึ่งเหตุผลนี้จะทำให้การวิจัยนำไวรัส NPV โรคของหนอนใยผักนำมาใช้ประโยชน์ในการแก้ไขปัญหาให้กับเกษตรกรได้ ซึ่งไวรัส NPV ของหนอนใยผัก ในประเทศไทยยังไม่ยังมีรายงานมาก่อน วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อคัดเลือกอนุภาคไวรัส เอ็น พี วี ที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก จากเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง

จากการตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้องและผลงานวิจัยที่ผ่านมา หนอนใยผัก diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ เช่น พืชตระกูลกะหล่ำ การระบาดเข้าทำลายได้มาก เนื่องจากมีวงจรชีวิตที่สั้น ขยายพันธุ์ได้จำนวนมากและรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า หนอนใยผักสามารถต้านทานต่อสารเคมีฆ่าแมลง และสารชีวอินทรีย์ (bio-pesticide) ชนิด *Bacillus thuringiensis* (Bt) ได้ด้วย (Shelton and Talekar, 1993; Tabashnik *et al.*, 1992) สารเคมีเกือบทั้งหมดจะมีผลต่อแมลงเบียนที่มีประโยชน์ (DBM parasitoids) ทั้งระยะหนอน และตัวเต็มวัย (Ildris and Grafius, 1993)

การใช้ไวรัสเป็นสารชีวอินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิดได้แพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก เช่น สาธารณรัฐสหภาพโซเวียต อินเดีย จีน ญี่ปุ่น แอฟริกา ออสเตรเลีย อเมริกา เป็นต้น ซึ่งบางชนิดได้มีการผลิตเป็นการค้า (Entwistle, 1998) สำหรับในประเทศไทย นับแต่ปี พ.ศ. 2510

มีรายงานการศึกษาวิจัยโรคไวรัส NPV สาเหตุโรคของแมลง ในกลุ่ม Nucleopolyhedrovirus หรือชื่อเดิม Nuclear polyhedrosis viruses หรือ NPV จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ไวรัส NPV สาเหตุโรคของหนอนเจาะสมอฝ้าย (HaNPV) ไวรัส NPV สาเหตุโรคของหนอนกระทู้หอม (SeNPV) ไวรัส NPV สาเหตุโรคของหนอนกระทู้ผัก (SlNPV) และ ไวรัส NPV สาเหตุโรคของหนอนคืบกะหล่ำ (TnNPV) ซึ่งหนอนเหล่านี้เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญมักทำลายผลผลิตของเกษตรกรอยู่เสมอ เนื่องจากมีพืชอาหารที่สมบูรณ์ตลอดปี (อุทัย, 2544; สุขลวจันและพิมลพร, 2544) สำหรับกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้มีการวิจัยผลิตขยายไวรัสสาเหตุโรคของแมลง ชนิด HaNPV SeNPV และ SlNPV เป็นปริมาณมากจากตัวแมลง (การผลิตแบบ *in vivo*) ก็มักประสบปัญหาการผลิตไม่เพียงพอ คุณภาพไม่สม่ำเสมอเช่นกัน จึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืชแบบ *in vitro* จาก United States Department of Agriculture USDA ประเทศสหรัฐอเมริกา (สุขลวจันและคณะ, 2543) มาประยุกต์ใช้และสามารถทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้ผักสายพันธุ์ไทย (Sl cell line : *Spodoptera litura* cell line) จากเอ็มบริโอได้เป็นผลสำเร็จ เซลล์เพาะเลี้ยงมีอัตราการเจริญ 91.49% (สุขลวจันและคณะ, 2545) ต่อมาใช้เทคนิคเดียวกันเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้หอมสายพันธุ์ไทย ผลิตขยายไวรัสต่อเนื่องกัน 3 รุ่น (passage 1-3) จำนวน 2 ซ้ำ ใช้อัตราความเข้มข้นเซลล์เพาะเลี้ยงตั้งต้น 1×10^6 เซลล์/มล. ใน T-flask ปริมาตร 5 มล./ขวด และ ใน E-flask ปริมาตร 25 มล./ขวด เก็บผลึกไวรัสหลัง infected 7 วัน ได้ผลึกไวรัสเฉลี่ย 3.12×10^7 , 3.84×10^7 และ 4.95×10^7 ผลึก/มล. ตามลำดับ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพไวรัส SeMNPV ทั้ง 3 รุ่นเปรียบเทียบกับไวรัส SeMNPV ที่เก็บเกี่ยวจากหนอนไถ่ตายกับหนอนกระทู้หอม วัยที่ 3 โดยวิธีการทดลองแบบ surface layer method ใช้ระดับความเข้มข้นผลึกไวรัสเท่ากับ 2×10^6 ผลึก/มล. ปริมาตร 40 ไมโครลิตร/ถ้วย วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ 4 กรรมวิธี พบว่า ไวรัส SeMNPV ทั้ง 3 รุ่น และไวรัส SeMNPV ที่เก็บเกี่ยวจากหนอนไถ่ตาย ทำให้หนอนตาย 85.00, 80.00, 77.50 และ 75.00% ตามลำดับ ภายใน 6 วันหลังจากการติดเชื้อ (infection) โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT และมีแนวโน้มที่จะตายได้เร็วกว่าในช่วง 2-4 วันหลังจากการติดเชื้อ (สุขลวจันและคณะ, 2551) นอกจากนี้ยังได้มีการตรวจวิเคราะห์ชนิดไวรัส Nucleopolyhedrovirus ด้วย PCR-Based Typing โดยใช้ไพรเมอร์ แบบ degenerate primer จากยีน cathepsin สามารถจำแนกความแตกต่างของไวรัส เอ็น พี วี ทั้ง 4 ชนิดได้ (สุขลวจันและวัชรวิ, 2552; Wongwilikhit *et al.*, 2008)

ไวรัสโรคของหนอนใยผัก มีรายงานผลงานวิจัยเกี่ยวกับไวรัส ชนิด Granulosis (GV) ของ ประเทศจีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน อินเดีย และเคนยา (Sarfranz *et al.*, 2005)

ส่วนไวรัส NPV ในประเทศจีน มีรายงานการทดลองเชื้อไวรัส AcMNPV and AfMNPV เปรียบเทียบ ไวรัส PxMNPV กับหนอนใยผัก พบว่ามีค่า LC_{50} มากกว่า 3-4 รอบการทดลอง (Kariuki and McIntosh 1999) และ ไวรัส *Anagrapha falcifera* (Kirby) (AfMNPV), *Autographa californica* (Speyer) (AcMNPV), และ *Galleria melonella* L. (GmMNPV) มีการทดสอบใน

หนอนใยผัก DBM (Kadir *et al.*, 1999) แต่มีศักยภาพลดลงเมื่อผ่านมาหลายรุ่นในตัวแมลง (serial passage) (Farrar & Ridway, 1999) และ มีรายงานหนอนแมลงชนิด *G. mellonella* และ *A. californica* ผลการทดลองพบว่า ไวรัสที่ได้จากหนอนแมลง *A. californica* (AcNPV) สามารถทำให้หนอนใยผักอ่อนแอต่อการเกิดโรคไวรัส NPV ได้ (Crook *et al.*, 1999)

รายงานการทดสอบความอ่อนแอของเซลล์เพาะเลี้ยงต่อไวรัส NPV ชนิด HaSNPV, AcMNPV, GmMNPV, SeMNPV และไวรัสกลุ่ม Cytoplasmic polyhedrosis viruses ชนิด BmCPV, CfCPV, EsCPV, HaCPV พบว่าเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยงอ่อนแอต่อไวรัส AcMNPV และ EsCPV ซึ่งไวรัส AcMNPV มักทำให้เกิดโรคกับตัวหนอนชนิดอื่นได้ ตามที่มีผลงานวิจัยรายงาน (Petcharawan *et al.*, 2006)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างแมลงและการเลี้ยงแมลงในห้องปฏิบัติการ เช่น กล่องพลาสติก ปากคีบ น้ำหวาน อาหารเทียมเลี้ยงแมลง เป็นต้น
- วัสดุอุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น จานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง ชุดเครื่องผ่าตัด หลอดดูดสารละลาย หลอดปั่นแยกสาร T-flask และภาชนะเพาะเลี้ยง Cells lines ขนาดต่างๆ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ สารเคมีที่จำเป็น เช่น Sodium phosphate, Serum, Glucose, Yeastolate, Tryptose, Primatone, Cystine, Methionine, Inosine, Pluronic, Sodium bicarbonate, Potassium chloride, Magnesium sulfate เป็นต้น
- เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น เครื่องกรองอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เครื่องวัดค่าออสโมซิส กล้องจุลทรรศน์ ถังไนโตรเจนเหลวเก็บสต็อกเซลล์ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ เครื่องเพาะเลี้ยงเซลล์ cell spin เป็นต้น
- วัสดุอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง Cell line เช่น หลอดปั่นแยกสารละลาย หลอดดูดสารละลาย หลอด Cryotube ใส่สารละลาย ไนโตรเจนเหลว เป็นต้น
- วัสดุ-อุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ขวดใส่สารละลาย สารเคมีผสมสูตรสำเร็จ กระดาษกรอง ชุดกรองสารละลาย อาหารเพาะเลี้ยงแมลง หลอดปั่นแยกสารละลาย หลอดดูดสารละลาย เป็นต้น
- วัสดุ-อุปกรณ์การตรวจสอบสายพันธุ์ เช่น สารเคมีใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ไพรเมอร์เพื่อการวิเคราะห์ เจลแยกชิ้นดีเอ็นเอ สีย้อมแผ่นเจล เป็นต้น
- โรงเรือนปลูกพืชอาหารเลี้ยงหนอนใยผัก ขนาด 4x8 เมตร จำนวน 1 โรงเรือน

วิธีการทดลอง

ดำเนินการทดลองวิจัย 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1) คัดเลือกไวรัส NPV ที่มีศักยภาพในเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง 2) ตรวจสอบสายพันธุ์ผลิตภัณฑ์ไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง และ 3) ทดสอบประสิทธิภาพผลิตไวรัส NPV กับหนอนใยผัก

ขั้นตอนที่ 1 คัดเลือกไวรัส NPV ที่มีศักยภาพในเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง (ปี 2561)

- แบบและวิธีการทดลอง

แผนการทดลอง

วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด ตามลักษณะเฉพาะเพื่อทดลองกับไวรัส ให้ได้อัตรามาตรฐานความเข้มข้นเซลล์เพาะเลี้ยง 2×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงไวรัสแบบชนิดอนุภาคไวรัส และผลิตไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง ในประเทศไทย 4 ชนิด ได้แก่ อนุภาคไวรัสหนอนคืบกะหล่ำปลี อนุภาคไวรัสหนอนกระทู้หอม อนุภาคไวรัสหนอนกระทู้ผัก และอนุภาคไวรัสหนอนเจาะสมอฝ้าย

2. เพาะเลี้ยงขยายเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง จาก embryonic stem cell หรือจากหนอนวัย 1 ตามเทคนิควิธีการของสุชลวัจน์ (2545) เพาะเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 27 องศาเซลเซียส เพื่อหาอัตราการเจริญของเซลล์ที่เหมาะสมในภาชนะ และอัตราการขยายเพิ่มปริมาณ บันทึกผลโดยการตรวจนับจำนวนเซลล์ทุกวันต่อเนื่องด้วย Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light compound microscope จำนวน 4 ซ้ำ นำเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง มาเลี้ยงขยายในภาชนะ แบบ T-flask ใช้เซลล์ตั้งต้น 2×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลิตไวรัสในเซลล์หนอนใยผัก ด้วยอนุภาคไวรัสของหนอนชนิดอื่นที่พบในประเทศไทยในงานทดลองแบบ 24 well plates เปรียบเทียบกับเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยงปกติตามกรรมวิธี โดยใช้อนุภาคไวรัสที่ใช้มีค่า Multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้น 2×10^5 เซลล์/มิลลิลิตร หลังจากนั้นตรวจดูการสร้างผลิตโปรตีนไวรัสบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบ inverted microscope เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกผลการทดลอง ด้วยภาพถ่ายและวิเคราะห์ผล

ขั้นตอนที่ 2 ตรวจสอบสายพันธุ์ไวรัสที่ได้จากเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง เหมือนขั้นตอนที่ 1

- แบบและวิธีการทดลอง

แผนการทดลอง

วิธีการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมดีเอ็นเอของไวรัสที่ได้จากการขั้นตอนที่ 1 เปรียบเทียบกับไวรัสที่ได้จากตัวหนอนแมลง ด้วยเทคนิค PCR - Based Typing โดยใช้ไพรเมอร์แบบ degenerate primer จากยีน cathepsin มีลำดับเบส ดังนี้ cathepsin forward primer 5'-

TT(AC)G AA(G)A GTC AA(G)T ATG CC(T)A T-3' และ cathepsin reverse primer 5'-TAG CA(GC)G TCG AC(T)G CCC A(G)TG(C) G-3' หรือออกแบบจากยีนชนิดอื่น เพื่อใช้ตรวจจับที่สายดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ไวรัส จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ (amplification) ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle โปรแกรม PCR ดังนี้ เริ่มต้น initial denaturing ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56°C นาน 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และทำให้เกิดปฏิกิริยา dsDNA อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 72°C นาน 6 นาที และตั้งอุณหภูมิที่ 4°C เพื่อรอการเก็บผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากเครื่อง แบ่งส่วนสารละลายชิ้นดีเอ็นเอ (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C) มาตรวจสอบ ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5% ใน 0.5 M TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100V สม่ำเสมอ 30-40 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมในสารละลาย 1X Fluorostain dye (อัตราส่วน 1:10) นาน 15-20 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ โดยนำเจลไปวางบนเครื่อง B-Box Light LED epi-illuminator เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานพร้อมถ่ายรูปแบบบันทึกผล เปรียบเทียบผลของขนาดชิ้นและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอระหว่างไวรัสที่ได้ โดยพิจารณาจากความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอว่ามีความเหมือนกันหรือแตกต่างกัน

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลการทดลองด้วยภาพถ่าย

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ไวรัส NPV กับหนอนใยผัก

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง เหมือนขั้นตอนที่ 1

- แบบและวิธีการทดลอง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD 6 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ (หนอนใยผัก 10 ตัว/ซ้ำ) ทดสอบไวรัสเอ็น พี วี ที่อัตราความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้น จำนวน 5 อัตรา และปรับอัตราความเข้มข้น ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 5-10 เท่า กับหนอนใยผักวัย 2 และ 3

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ปลุกพืชทดลอง ในการทดลองนี้ใช้พืชคะน้า เตรียมผลิตภัณฑ์ไวรัสเอ็น พี วี และหนอนใยผัก เพื่อใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการ
2. ทดสอบไวรัสตามกรรมวิธี โดยใช้วิธีการเคลือบใบคะน้า ด้วยสารละลาย ไวรัสเอ็น พี วี แฉวนลอย แล้วปล่อยให้หนอนใยผักกินภายใน 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนใบคะน้าใหม่ที่ไม่เคลือบไวรัส เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น บันทึกข้อมูลจำนวนหนอนตายทุก 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาค่า LC₅₀ ทุกกรรมวิธี

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลด้วยภาพถ่าย และ บันทึกจำนวนหนอนตายเพื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ

แต่ด้วยมีข้อจำกัดในการทดลองวิจัย พบหนอนใยผักเป็นโรโคโปรโตซัวจำนวนมาก จึงปรับการดำเนินงานในส่วนนี้มาทดสอบในห้องปฏิบัติการแทน โดยทดสอบประสิทธิภาพไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอม ไวรัส NPV ของหนอนเจาะสมอฝ้ายที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับไวรัส NPV ที่ได้จากหนอนกระทู้หอม ไวรัส NPV จากหนอนกระทู้ผัก กับหนอนกระทู้หอมวัย 2 ทดแทนโดยมีหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าหนอนกระทู้หอมตายในการทดสอบกับ HaNPV/cell, SeNPV/cell, SeNPV/WT และ HaNPV/Sfcell ส่วนหนอนกระทู้ผักตายในการทดสอบกับ HaNPV/cell, HaNPV/WT, SeNPV/cell, SeNPV/WT และ HaNPV/Sfcell

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการวิจัย เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2561 สิ้นสุดกันยายน 2563 รวม 3 ปี ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักงานวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ และโรงเรียนปลูกพืชทดลอง/แปลงปลูกพืชอาหารหนอนใยผักของเกษตรกร เพื่อเก็บตัวอย่างหนอนใยผักและโรคของแมลง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการดำเนินการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์หนอนเจาะสมอฝ้ายเพาะเลี้ยง (Ha-cell line) เซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง (Se-cell line) เซลล์หนอนกระทู้ผักเพาะเลี้ยง (St-cell line) เซลล์หนอนคืบกะหล่ำปลี (Tn-cell line) เซลล์หนอนใยผัก (Px-cell line) และเซลล์เพาะเลี้ยงต่างประเทศเปรียบเทียบกับ Sf9-cell line (เซลล์หนอนกระทู้ Fall armyworm *S. frugiperda*) เพื่อใช้ในการทดลอง พบว่าเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ต่อเนื่อง (cell line) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์หนอนเจาะสมอฝ้ายเพาะเลี้ยง และเซลล์เพาะเลี้ยงต่างประเทศเปรียบเทียบกับ อัตราการเจริญมาตรฐานตั้งต้นที่ 2×10^5 เซลล์/มล. มีค่า cells viability มากกว่า 80% (Table 1) ส่วนเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง เซลล์ยังเจริญไม่เพียงพอต่อการตรวจนับจำนวน รอบการเลี้ยง 5-7 วัน และ ยังต้องมีเซลล์ที่ต้องเพาะเลี้ยงอีก 2 ชนิด คือ เซลล์หนอนคืบกะหล่ำปลี (Tn-cell line) จำนวน 1 แหล่งปลูก (จ.นครปฐม) และเซลล์หนอนใยผัก (Px-cell line) จำนวน 2 แหล่งปลูก (จ.นครปฐม และ จ.นครราชสีมา) ต้องทำการเพาะเลี้ยงใหม่ เนื่องจาก พบโปรโตซัวในตัวหนอนที่มาจากแปลงปลูกพืช ต้องหาแหล่งใหม่ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด ต้องใช้เวลาของการการเลี้ยงเริ่มต้น 3-6 เดือน (Figure 1) เมื่อได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่องจึงจะใช้รอบการเลี้ยง 5-7 วัน ในช่วงเวลาเดียวกันได้ทำการคัดเลือกอนุภาคไวรัสโรคแมลง โดยการคัดเลือกหนอน (bleeding) ได้จำนวน 3 ชนิด คือ อนุภาคไวรัสของหนอนเจาะสมอฝ้าย อนุภาคไวรัสของหนอนกระทู้หอม และอนุภาคไวรัสของหนอนกระทู้ผัก (Figure 2) ส่วนอีก 1 ชนิด อนุภาคไวรัสของหนอนคืบกะหล่ำปลีพบการระบาดน้อย ทำให้ยังไม่ได้หนอนแมลงต้นแบบที่นำมาใช้ในการเตรียมอนุภาคไวรัส และต้องนำมาคัดแยกเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการ แล้วจึงจะทำการคัดเลือกหนอน ให้ได้อนุภาคไวรัสได้ ซึ่งในปีต่อมาจะได้โรงเรือนที่เหมาะสมในการเลี้ยงหนอนใยผัก ซึ่งจะทำให้ได้ตัวอย่างแมลงที่

ต่อเนื่องกว่าการไปเก็บมาจากแปลงปลูก ซึ่งจะทำให้ได้ทั้งเซลล์เพาะเลี้ยงและอนุภาคไวรัสได้ครบ จำนวนตามแผนการทดลองต่อไป

ผลจากการเพาะเลี้ยงรักษาสายพันธุ์เซลล์ต้นแบบ โดยการ sub-culture ทุกๆ 5-7 วัน จำนวน 3 ชนิด (เซลล์หนอนเจาะสมอฝ้ายเพาะเลี้ยง เซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง เซลล์เปรียบเทียบ และรักษาสภาพอนุภาคไวรัส 3 ชนิด (อนุภาคไวรัสของหนอนเจาะสมอฝ้าย อนุภาคไวรัสของหนอนกระทู้หอม และอนุภาคไวรัสของหนอนกระทู้ผัก) รวมทั้งเตรียมเพาะเลี้ยงเซลล์เพิ่มเติม และเพาะเลี้ยงรักษาสายพันธุ์เซลล์ต้นแบบ โดยการ sub-culture ทุกๆ 5-7 วัน จำนวน 2 ชนิด (เซลล์หนอนเจาะสมอฝ้ายเพาะเลี้ยง เซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง) ขยายเซลล์หนอนเจาะสมอฝ้ายใช้เพาะเลี้ยงขยายไวรัส NPV ให้ได้รูปผลึกและอนุภาคไวรัสในขวดเพาะเลี้ยง (cells spin) ขนาด 50 มล. และ 250 มล. เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการเกิดโรคหนอนใยผัก

ผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการโดยการทดสอบประสิทธิภาพไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอม ไวรัส NPV ของหนอนเจาะสมอฝ้ายที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับไวรัส NPV ที่ได้จากหนอนกระทู้หอม และไวรัส NPV จากหนอนกระทู้ผัก กับหนอนกระทู้หอมวัย 2 โดยมีหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบกับ Virions of SeMNPV by cells culture, Occlusion bodies of SeMNPV by cells culture, Occlusion bodies of SeMNPV by larvae, Virions of HaSNPV, Virions of HaSNPV infected Sf cells culture, Occlusion bodies of SnNPV by larvae, Occlusion bodies of TnNPV by larvae และเปรียบเทียบกับ Control(distilled water) พบว่ามีหนอนตายในไวรัสทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ แต่จะมีขนาดของหนอนที่แตกต่างกัน (Table 2) ซึ่งข้อมูลการตายของหนอนจากไวรัสแต่ละชนิดนำไปใช้ทดสอบกับหนอนใยผักต่อไป และต้องมีการตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมด้วยจึงจะสรุปได้แน่นอนยิ่งขึ้น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ยังคงใช้ได้ดีสามารถเลี้ยงได้ดี ผลการทดสอบประสิทธิภาพไวรัสในรูปแบบมีโปรตีนหุ้ม (Occlusion bodies) ที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง กับไม่มีโปรตีนหุ้ม (Virions) ที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถทำให้หนอนตายได้ ก็จะสามารถนำไปขยายผลได้ อย่างไรก็ตามต้องทำการตรวจวิเคราะห์ไวรัสที่ได้ เพื่อเป็นการยืนยันสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดความเฉพาะต่อชนิดหนอนต่อไป แต่ด้วยการทดลองนี้มีข้อจำกัดในการดำเนินการหลายส่วน เช่น ต้นแบบหนอนตัวอย่างแมลงมีพาหะโรคโปรโตซัว และต้องใช้โรงเรือนปลูกพืชอาหารสดในการเลี้ยงหนอนใยผัก และหนอนคืบกะหล่ำ ทำให้ยังไม่ได้ไม่ครบทุกตัวอย่าง โดยเฉพาะหนอนใยผักที่เป็นตัวอย่างหลักทำให้ดำเนินการไม่ทันรอบของในการทดสอบการคัดเลือกอนุภาคไวรัสในเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับไวรัสชนิดอื่น ซึ่งต้องทั้งเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่อง และเพื่อรักษาสายพันธุ์ต้นแบบเดิมตลอดปี ทำให้ต้องเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้นอีก ในขณะที่ปัจจัยการดำเนินงานอื่นๆลดลงไม่สอดคล้องกัน ทำให้ต้องมีการทดลองเพิ่มเติมต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางธนิศา คำอำนวย นางสาวศิริพร สอนท่าโก และเจ้าหน้าที่ของกลุ่มงานวิจัย วัตถุประสงค์การเกษตรจากสารธรรมชาติ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ที่ช่วยอนุเคราะห์ ตัวอย่างหนอนใยผัก และหนอนคืบกระหล่ำปลีจากแปลงพืชอินทรีย์มาใช้ในการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- สุขลวัญ ว่องไวลิขิต วชิรี สมสุข สาทิพย์ มาลี และเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์. 2551. วิจัยรูปแบบการผลิตไวรัส *Spodoptera exigua* Multiple-nucleocapsids Nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) จากเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*) ใน เอกสารการประชุม ผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2550 การประชุมวิชาการ ประจำปี 2551 กรมวิชาการเกษตร. 16-18 มิถุนายน, โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.
- สุขลวัญ ว่องไวลิขิต พิมลพร นันทะ และวชิรี สมสุข. 2545. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้ผักสายพันธุ์ไทยจากเอ็มบริโอ. น. 197-206 ใน เอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ “เทคโนโลยีการจัดการแมลงและศัตรูพืชเพื่อเกษตรดีที่เหมาะสม” ครั้งที่ 13 ประจำปี 2545 กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 6-9 สิงหาคม, โรงแรมโกลเด้นแชนด์ อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี.
- สุขลวัญ ว่องไวลิขิต และพิมลพร นันทะ. 2544. เชื้อไวรัส เอ็น พี วี ของหนอนคืบกระหล่ำปลี. หน้า 73-78. ใน เอกสารการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5. วันที่ 21-23 พฤศจิกายน 2544. โรงแรมเฟลิซ ริเวอร์แคว, กาญจนบุรี.
- สุขลวัญ ว่องไวลิขิต และวชิรี สมสุข 2552. การตรวจวิเคราะห์ชนิดไวรัส Nucleopolyhedrovirus ด้วย PCR-Based Typing. วารสารกรมวิชาการเกษตร ปีที่ 27 ฉบับที่ 3 (กันยายน-ธันวาคม): 234-243.
- สุขลวัญ ว่องไวลิขิต อุทัย เกตุญาติ และพิมลพร นันทะ. 2543. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้หอมเพื่อการผลิตเชื้อไวรัส NPV. น. 447-458. ใน เอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ “แมลงและศัตรูพืช” ครั้งที่ 12 ประจำปี 2543 กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 28-31 มีนาคม, โรงแรม อมารี ออคิด รีสอร์ท เมืองพัทยา จ.ชลบุรี.
- สุขลวัญ ว่องไวลิขิต. 2550. การผลิตไวรัสจาก cell culture. น.105-117. ใน เอกสารประกอบการอบรม “แมลง-ศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด” ครั้งที่ 13. วันที่ 4-8 มิถุนายน 2550. กลุ่มกัญและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- อุทัย เกตุญาติ. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส NPV. น. 141-177. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี เพื่อการเกษตรยั่งยืน กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. พิมพ์ที่ โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ.

- Crook, N.E., H.B.A. Kadir, C.C. Payne and D. Winstanley. 1999. Characterization and Cross-transmission of Baculoviruses Infectious to the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*, and some other Lepidopteran Pests of Brassica Crops. *Biocontrol Science and Technology*. 9: 227-238.
- Entwistle, P.F. 1998. A world survey of virus control of insect pests, p.186-201. In *Insect viruses and pest management*. Frances R. Hunter-Fujita, Philip F. Entwistle, Hugh F. Evans and Norman E. Crook. (eds). John Wiley & Sons Ltd, England. 620 p.
- Farrar, R.R. Jr and R.L. Ridway. 1999. Relative potency of selected nuclear polyhedrosis viruses against five species of Lepidoptera. *J. of Agricultural and Urban Entomol.* 16: 187-196.
- Idris, A.B. and E.J. Grafius. 1993. Field studies on the effect of pesticides on the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) and parasitism by *Diadegma insulare* (Cresson) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *J. Econ. Entomol.* 86: 1196-1202.
- Idris, A.B., M.A. Norazlin and A.K. Hussan. 2006. Does host size and virus sources influence the production of polyhedra inclusion body (PIB) by the Nuclear polyhedrosis viruses (NPV) of *Plutella xylostella* (PxNPV) and *Spodoptera exigua* (SeNPV). *Malays. Appl. Biol.* 35: 63-66.
- Kadir H.B.A., C.C. Payne, N.E. Crook, J.S. Fenlon and D. Winstanley. 1999b. The comparative susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* and some other major lepidoptern pests of Brassica crops to a range of baculoviruses. *Biocontrol Science and Technology* 9: 421-433.
- Kariuki C.W. and A.H. McIntosh. 1999. Infectivity studies of a new baculovirus isolate for the control of the diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera). *J. of Economic Entomol.* 92: 1093-1098.
- Petcharawan, O., K. Mongkolpoch and S. Belloncik. 2006. Establishment of cell line derived from embryonic tissue of the Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *KMITL Sci. Tech. J. Vol.* 6: 56-66.
- Sarfraz, M., A.B. Keddie and L. Dossdall. 2005. Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*: A review. *Biocontrol Science and Technology*, 15: 763-789.

- Shelton, A.M. and N.S. Talekar. 1993. Biology, ecology and management of the diamondback moth. *Ann. Rev. Entomol.*, 38: 275–301.
- Tabashnik, B.E., J.M. Schwartz, N. Finson and M.W. Johnson. 1992. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 85: 1046-1055.
- Wongwilikhit, S., K. Ukoskit, M. Mingmuang, A. Thongpan and V. SomSook. 2008. A rapid detection and identification of Thai Nucleopolyhedrovirus using PCR-based typing. *In International seminar: Bio Agricultural Input for Sustainable Agriculture Prospects and Challenges.* July 1-2, Medan, Indonesia.

Table 1 Average cells viability of *Heilicoverpa armigera* cell line on 1-4 passage at 1:5 sub-culture

Type of cell line	cells viability (%)				
	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	average
TH-Ha-cell line	86.50	89.27	91.44	94.27	90.37
Sf9 cell line	87.63	88.27	89.01	90.76	88.92

Table 2 Mortality in second instar *Spodoptera exigua* infected with polyhedral occlusion bodies and virions of NPV treatments which were compared with the control. (distilled water)

Treatments	Dosage	Total larvae per treatment	Total dead larvae after post infection (3 rep.)					
			1 day	3 days	7 days	10 days	percentage of dead larvae	
T1	Virions of SeMNPV by cells culture	1:10	30	-	2	3	4	13.33
T2	Occlusion bodies of SeMNPV by cells culture	1x10 ⁵ OBs/ml	30	-	2	14	16	53.33
T3	Occlusion bodies of SeMNPV by larvae	1x10 ⁵ OBs/ml	30	-	2	10	14	46.67
T4	Virions of HaSNPV	1:10	30	-	2	10	13	43.33
T5	Virions of HaSNPV infected Sf cells culture	1:10	30	-	2	2	5	16.67
T6	Occlusion bodies of SlNPV by larvae	1x10 ⁵ OBs/ml	30	-	1	2	3	10.00
T7	Occlusion bodies of TnNPV by larvae	1x10 ⁵ OBs/ml	30	-	2	8	10	33.33
T8	Control(distilled water)	30 µl/larvae	30	-	-	-	-	-



Figure 1 Establishment and maintenance insect cells lines stock at 27°C



Figure 2 NPV virions stock for cells line infection at -20°C

ชนิดและศักยภาพของบั่วตัวห้ำในการควบคุมเพลี้ยแป้ง Potential Study of Gall Midges Predator for Control Mealybugs

ประภัสสร เขยคำแหง สาทิพย์ มาลี ณัฐธินิ ศิริมาจันทร์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ทำการเก็บรวบรวมบั่วตัวห้ำ โดยเก็บจากแปลงปลูกพืชที่มีเพลี้ยแป้งลงทำลาย เช่น น้อยหน่า ขบา กระเจี๊ยบเขียว พริก มะเขือเปราะ มะเขือพวง มะเขือเทศ ลั่นทม ทานตะวัน เป็นต้น ใส่กล่องนำกลับมาวางในห้องปฏิบัติการ หลังจากนั้นตรวจดูทุกๆ 3 วัน จนกระทั่งพืชที่เก็บมาแห้งเมื่อพบบั่วตัวห้ำ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และศึกษาศักยภาพการทำลายเพลี้ยแป้งตามกรรมวิธี

คำหลัก : บั่วตัวห้ำ เพลี้ยแป้ง

คำนำ

บั่ว (gall midges) เป็นแมลงในอันดับ Diptera บั่วตัวห้ำ จัดอยู่ในวงศ์ Cecidomyiidae เป็นวงศ์เดียวกับบั่วศัตรูพืช บั่วตัวห้ำตัวเต็มวัยมีขนาดเล็กบอบบาง ตัวหนอนสีแดง จากรายงานของ Daane *et al.* (2008) พบว่าที่รัฐแคลิฟอร์เนียพบบั่วตัวห้ำชนิด *Dicrodiplosis California* Felt ซึ่งตัวหนอนเป็นตัวห้ำของเพลี้ยแป้งในอุ้ง ตัวเต็มวัยจะวางไข่ไว้ใกล้ๆ กับอุ้งไซของเพลี้ยแป้ง และเมื่อไข่ฟักก็จะกินไซเพลี้ยแป้งและตัวอ่อนเพลี้ยแป้งเป็นอาหารจนกระทั่งเข้าดักแด้ทิ้งจะตัวลงด้านล่าง ในประเทศนิวซีแลนด์ มีรายงานว่าบั่ว *Diadiplosis koebeleri* (Koebele) สามารถลดการระบาดของเพลี้ยแป้งได้ถึง 30% (Charles 1985) เนื่องจากในการศึกษาการป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้งในกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ มีการเลี้ยงเพลี้ยแป้งในห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นเหยื่ออาหารของแมลงศัตรูธรรมชาติ แต่ในปี 2561 มีช่วงหนึ่งการเลี้ยงหยุดชะงักเนื่องจากเพลี้ยแป้งไม่เจริญเติบโตในห้องเลี้ยงเพลี้ยแป้ง ทำให้ไม่มีเพลี้ยแป้งที่จะเลี้ยงแมลงศัตรูธรรมชาติ เมื่อสังเกตดูพบว่ามีหนอนสีแดงเจริญเติบโตอยู่ในตุ่มไซของเพลี้ยแป้ง และพบตัวเต็มวัยบั่วเต็มห้องเลี้ยง จึงเป็นปัญหาหนึ่งในการเลี้ยงศัตรูธรรมชาติ แต่เป็นเรื่องที่ดีที่ทำให้เราพบว่าศัตรูธรรมชาติที่ช่วยทำลายเพลี้ยแป้งได้อีกชนิดหนึ่ง ในเบื้องต้นก็ควรศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาทั่วไปของบั่วชนิดนี้เพื่อนำไปเลี้ยงขยาย และสามารถนำมาใช้ควบคุมเพลี้ยแป้งได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัย เพื่อศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของบั่วตัวห้ำเพื่อการควบคุมเพลี้ยแป้ง

รหัสการทดลอง 03-05-59-01-01-00-15-62

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- แมลงบัวตัวห้ำ
- เปลี้ยแป้ง
- ฟักทอง
- กล่องขนาด 18x26x10 เซนติเมตร
- กล่องขนาด 8x12x6 เซนติเมตร
- ตะกร้าพลาสติกขนาด 35x45x12 เซนติเมตร
- ผ้าขาวบาง ยางยืด ผ้าตาข่าย
- กรงตาข่ายขนาด 45x45x22 เซนติเมตร
- กระดาษทิชชู สำลี น้ำผึ้ง

วิธีการ

- แบบและวิธีการทดลอง ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้
 - ขั้นตอนที่ 1 สํารวจ รวบรวมบัวตัวห้ำจากแปลงปลูกพืช (2562)
 - ขั้นตอนที่ 2 เลี้ยงขยายเปลี้ยแป้งบนฟักทอง เพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารของบัวตัวห้ำ (2562)
 - ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาชีววิทยาของบัวตัวห้ำ (2562-2563)
 - ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาศักยภาพของบัวตัวห้ำควบคุมเปลี้ยแป้งในห้องปฏิบัติการ (2564)

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 สํารวจ รวบรวมบัวตัวห้ำจากแปลงปลูกพืช (2562)

ทำการเก็บรวบรวมบัวตัวห้ำจากแปลงปลูกพืชที่มีเปลี้ยแป้งลงทำลาย เช่น น้อยหน้า ชบา กระเจี๊ยบเขียว พริก มะเขือเปราะ มะเขือพวง มะเขือเทศ ลั่นทม ทานตะวัน เป็นต้น นำกลับมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นำส่งกลุ่มอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกสถานที่ พืช วัน เดือน ปี ที่เก็บ
- จำนวนบัวตัวห้ำที่พบ
- ชนิดบัวที่สำรวจพบ

ขั้นตอนที่ 2 เลี้ยงขยายเปลี้ยแป้งบนฟักทองเพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารของบัวตัวห้ำ (2562)

1. เก็บรวบรวมเปลี้ยแป้งในแหล่งที่มีการระบาด
2. เตรียมผลฟักทองซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเปลี้ยแป้ง เลือกฟักทองผลขนาดเล็ก มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 17-20 เซนติเมตร ผลสดสีเขียว ล้างดินออกให้สะอาด ผึ่งให้แห้งสนิท
3. นำฟักทองวางลงในตะกร้าพลาสติกขนาด 35x45x12 เซนติเมตร รองผลฟักทองด้วยจานรองเพื่อชะลอการเน่าและของผลฟักทอง ประมาณ 4-5 ผล/กล่อง

4. นำเปลือกแป้งที่เก็บมาวางบนผลฟักทอง คลุมกล่องด้วยผ้าตาข่ายไนลอนเพื่อระบายอากาศ

5. นำกล่องเลี้ยงเปลือกแป้งวางบนภาชนะที่หล่อน้ำไว้ เพื่อเป็นการป้องกันมิให้เกิดการแพร่กระจายของเปลือกแป้งไปยังที่อื่นๆ จากนั้นประมาณ 10 วัน เปลือกแป้งจะย้ายจากพืชเดิมลงไปอยู่บนผลฟักทอง

6. ปลอ่ยให้เปลือกแป้งเจริญเติบโตเต็มผลฟักทองประมาณ 15 วัน และจึงนำมาใช้เลี้ยงบัวตัวห้ำ

การบันทึกข้อมูล

- ชนิดของเปลือกแป้ง
- จำนวนฟักทองที่ใช้

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาชีววิทยาของบัวตัวห้ำ (2562-2563)

1. นำตัวเต็มวัยบัวตัวห้ำจำนวน 20 คู่มาเลี้ยงในกรงตาข่ายขนาด 45x45x22 เซนติเมตร ใส่ผลฟักทองที่มีเปลือกแป้งไว้ในกรง รองด้วยกระดาษกรองที่มีความชื้น

2. เมื่อพบการวางไข่ของบัวตัวห้ำ แยกฟักทองออกจากกรงเก็บไว้ในกล่องขนาด 35x45x12 เซนติเมตร สังเกตการณ์เจริญเติบโตของบัวตัวห้ำและพฤติกรรมจนครบวงจรชีวิต

การบันทึกข้อมูล

- วงจรชีวิต ระยะเวลา ไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาศักยภาพของบัวตัวห้ำควบคุมเปลือกแป้งในห้องปฏิบัติการ (2564)

นำตัวหนอนบัวตัวห้ำจาก stock culture จำนวน 30 ตัว มาแยกเลี้ยงแต่ละตัวบนผลฟักทองที่มีเปลือกแป้งให้เป็นอาหารทุกวันให้ในปริมาณที่เพียงพอ นับจำนวนเปลือกแป้งที่ถูกกินทุกวัน จนกระทั่งตัวหนอนเข้าดักแด้

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนเปลือกแป้งที่ถูกกิน

เวลาและสถานที่

- ตุลาคม 2561 สิ้นสุดกันยายน 2564
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ทำการเก็บรวบรวมบัวตัวห้ำ โดยเก็บจากแปลงปลูกพืชที่มีเปลือกแป้งลงทำลาย เช่น น้อยหน่า ขบา กระเจี๊ยบเขียว พริก มะเขือเปราะ มะเขือพวง มะเขือเทศ ลั่นทม ทานตะวัน เป็นต้น ใส่กล่องนำกลับมาวางในห้องปฏิบัติการ หลังจากนั้นตรวจดูทุกๆ 3 วัน จนกระทั่งพืชที่เก็บมาแห้งเมื่อพบบัวตัวห้ำนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และศึกษาศักยภาพการทำลายเปลือกแป้งตามกรรมวิธี

เอกสารอ้างอิง

- Charles, J.G. 1985. *Diadiplosis koebelei* Koebele (Diptera: Cecidomyiidae), a predator of *Pseudococcus longispinus* T-T (Homoptera: Pseudococcidae), newly recorded from New Zealand. *N Zeal J Zool.* 1985. 12: 3.
- Daane, K. M., M. L. Cooper, S. V. Triapitsyn, V. M. Walton, G. Y. Yokota, D. R. Haviland, W. J. Bentley, K. E. Godfrey and L. R. Wunderlich. 2008. Vineyard managers and researchers seek sustainable Solutions for mealybugs, a changing pest complex in California Agriculture. 62(4): 167-176. DOI 10.3733/ca.v062n04p167. October- December 2008.

ศึกษาชนิดและประเมินศักยภาพแมลงศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผัก

Plutella xylostella L. ในแหล่งปลูกภาคกลาง

Study on Species of Natural Enemies and Their Potentials in Controlling

Plutella xylostella L. in Central Thailand

วิภา ชาติคาร สาทิพย์ มาลี พัชรีวรรณ จงจิตเมตต์

ภัททิรา ศาตร์วงษ์ ณัฐฉิณี ศิริมาจันทร์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

A survey of natural enemies of *Plutella xylostella* L. in cruciferous crops in the 2019 experiment. The result from the study the *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) and *Micraspis discolor* Fabricius in the highest quantity. They were then rearing increase the amount for assess the potential of natural enemies of *Plutella xylostella* L. in the laboratory control. Then, in 2020, the study on their potentials in controlling *Plutella xylostella* L. of *Cotesia plutellae*. The result found that *Cotesia plutellae* parasitism *Plutella xylostella* L. at the highest on day 2, with an average of 4.6 larvae/day and by Day 1 (4.2 larvae/day), 3 (2.2 larvae/day) and 4 (1.6 larvae/day), respectively. And was found that *Cotesia plutellae* was parasitism *Plutella xylostella* L. for more than 4 days until it died. But their potentials in controlling will decrease with time. For evaluating potential of the lady beetle, *Micraspis discolor* Fabricius in feed on the *Plutella xylostella* L. By between male and female, the result found that *Micraspis discolor* Fabricius that female was feed on *Plutella xylostella* L. higher than males. The mean was 4.1 larvae/day. On days 2, 3 and 4 females in feed on larvae 2.6, 2.3 and 2.5 larvae/day, respectively. The males feed on larvae 3.6 larvae/day, on days 2, 3 and 4 the males feed on larvae 2.2, 2 and 2.1 larvae/day, respectively.

Key words: *Plutella xylostella* L., *Cotesia plutellae*, *Micraspis discolor* Fabricius

รหัสการทดลอง 03-05-59-01-00-18-62

บทคัดย่อ

จากการสำรวจแมลงศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผักในแปลงพืชตระกูลกะหล่ำในงานทดลอง ปี 2562 ผลจากการศึกษาพบแตนเบียนหนอนใยผัก *Cotesia plutellae* และด้วงเต่าสีส้ม *Micraspis discolor* Fabricius ในปริมาณสูงที่สุด แล้วนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพื่อประเมินศักยภาพของแมลงศัตรูธรรมชาติในการควบคุมหนอนใยผักในห้องปฏิบัติการ จากนั้นในปี 2563 ได้ทำการศึกษาประเมินศักยภาพแตนเบียนหนอนใยผัก *Cotesia plutellae* ต่อการเบียนหนอนใยผัก พบว่า แแตนเบียนสามารถเบียนหนอนใยผักได้สูงที่สุดในวันที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.6 ตัว/วัน รองลงมาคือวันที่ 1 (4.2 ตัว/วัน), 3 (2.2 ตัว/วัน) และ 4 (1.6 ตัว/วัน) และพบว่าแตนเบียนหนอนใยผักสามารถเบียนหนอนใยผักได้มากกว่า 4 วันจนกว่าจะตาย แต่ศักยภาพการเบียนก็จะลดลงตามระยะเวลา สำหรับการประเมินศักยภาพของด้วงเต่าสีส้ม *Micraspis discolor* Fabricius ในการกินหนอนใยผัก โดยแยกหว่าเพศผู้ และเพศเมีย พบว่าด้วงเต่าสีส้มเพศเมียสามารถกินหนอนใยผักได้สูงกว่าเพศผู้ ในวันที่ 1 ด้วงเต่าสีส้มเพศเมียสามารถกินหนอนใยผักได้สูงที่สุด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.1 ตัว/วัน ส่วนวันที่ 2, 3 และ 4 เพศเมียสามารถกินหนอนใยผักได้ 2.6, 2.3 และ 2.5 ตัว/วัน ส่วนตัวผู้สามารถกินหนอนใยผักได้ 3.6 ตัว/วัน ส่วนวันที่ 2, 3 และ 4 เพศผู้สามารถกินหนอนใยผักได้ 2.2, 2 และ 2.1 ตัว/วัน ตามลำดับ

คำหลัก: หนอนใยผัก แแตนเบียนหนอนใยผัก ด้วงเต่าสีส้ม

คำนำ

หนอนใยผัก (diamondback moth) (DBM), *Plutella xylostella* L. เป็นแมลงศัตรูที่สำคัญที่สุดและก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชผักตระกูลกะหล่ำ เช่น คะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ฯลฯ พบระบาดเป็นประจำตามแหล่งปลูกผักทั่วไปทุกภาค หนอนที่มีขนาดเล็กจะเจาะกินอยู่ภายในผิวด้านล่างของใบผักจนหมดเหลือแต่ผิวใบ เมื่อตัวหนอนมีขนาดใหญ่ขึ้นจะออกมากัดกินใบเป็นรูพรุน ก่อให้เกิดความเสียหายมาก ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ วิธีที่เกษตรกรนิยมใช้ควบคุมจำนวนประชากรหนอนใยผัก คือการใช้สารฆ่าแมลง การใช้สารฆ่าแมลงของเกษตรกรในปริมาณสูงและต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนานนั้น ได้ส่งผลให้หนอนใยผักสร้างความต้านทานได้อย่างรวดเร็วและรุนแรง ดังนั้นเกษตรกรจำเป็นต้องใช้สารฆ่าแมลงที่มีฤทธิ์สูงยิ่งขึ้นไป เพื่อให้ประสบผลสำเร็จในการป้องกันกำจัด ซึ่งปัจจุบันหนอนใยผักได้มีการพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้รวดเร็วและหลายชนิด เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่มักใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด ซึ่งส่งผลให้เกิดความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดแมลงหลายชนิด จึงเป็นการยากต่อการป้องกันกำจัดด้วยการใช้สารฆ่าแมลงชนิดหนึ่งเป็นประจำเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงต้องใช้หลาย ๆ วิธีผสมผสานกัน จึงสามารถลดการระบาดของหนอนใยผักลงได้ ดังนั้นเพื่อจะให้เกิดความยั่งยืนในการผลิตผักตระกูลกะหล่ำ และสนับสนุนในการทำเกษตรอินทรีย์ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งช่วยลดการใช้สารเคมี ดังนั้นความเข้าใจเกี่ยวกับการป้องกันกำจัดหนอนใยผักโดยชีววิธีจึงมีความสำคัญ (Anonymous, 2006)

ปิยรัตน์และคณะ (2542) รายงานว่าหนอนใยผักมีแมลงศัตรูธรรมชาติคอยควบคุมอยู่หลายชนิด จากการศึกษาพบแตนเบียน 4 ชนิด ได้แก่ แตนเบียนไข่ *Trichogramma confusum* Viggiani (Hymenoptera: Trichogrammatidae) พบทำลายไข่หนอนใยผัก ที่แหล่งปลูกบริเวณเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ทำลายไข่หนอนใยผักสูงถึง 78.96% ในช่วงเดือนมิถุนายน และในเขตที่ราบภาคกลางยังพบแตนเบียนไข่อีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ *Trichogrammatoidea bactrae* Nagaraja (Hymenoptera: Trichogrammatidae) พบทำลายไข่หนอนใยผักเป็นครั้งแรกในปี 2531 ที่อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ในปีต่อมาพบในแปลงกล้าคะน้าที่จังหวัดเพชรบุรี และกาญจนบุรี ช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60-74% ประสิทธิภาพในการควบคุมไข่หนอนใยผัก 16.20-45.20% นอกจากนี้ยังพบแตนเบียนหนอน *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) พบทำลายหนอนของหนอนใยผักตลอดทั้งปีในเขตเกษตรที่ราบและที่สูง ช่วงอุณหภูมิ 18-32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60-90% สำหรับในเขตที่สูงพบสูง 69.23% ในช่วงเดือนกรกฎาคม และเขตที่สูง 32.4% สำหรับแตนเบียนดักแด้ที่พบได้แก่ *Thyraeella collaris* (Grav) (Hymenoptera: Ichneumonidae) พบทำลายเฉพาะในเขตเกษตรที่สูงเท่านั้น แตนเบียนชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการทำลายดักแด้ได้สูงถึง 23.28% ในช่วงเดือนมิถุนายน ส่วน Silva and Furlong (2012) ทดสอบการวางไข่และการเจริญเติบโตของหนอนใยผักบนพืชอาศัย ได้แก่ ผักคะน้า ผักกะหล่ำปลี และผักกาดขาว พบว่าผีเสื้อหนอนใยผักสามารถวางไข่ในผักคะน้า และผักกะหล่ำปลี ได้สูงกว่าผักกาดขาว และหนอนใยผักสามารถเจริญเติบโตในผักคะน้า ผักกะหล่ำปลี และผักกาดขาวปลี ได้ถึง 90% ในประเทศไทยมีรายงานแมลงศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผักชนิดต่าง ๆ หลายชนิด ซึ่งศัตรูธรรมชาติเหล่านี้มักถูกทำลายจากการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงอย่างกว้างขวางในการปลูกผัก แต่อย่างไรก็ดี อาจจะมีแมลงศัตรูธรรมชาติบางชนิดหรือบางตัวที่มีคุณสมบัติต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดแมลงบางชนิด สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในบางท้องถิ่น ซึ่งแมลงศัตรูธรรมชาติเหล่านี้จะมีประโยชน์อย่างมากในการช่วยควบคุมประชากรหนอนใยผักในสภาพที่มีการใช้สารป้องกันกำจัดแมลง และหากพัฒนาการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติเหล่านี้ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นจะสามารถนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักโดยวิธีผสมผสานร่วมกับการใช้สารเคมีต่อไป

กิจกรรมวิจัยนี้ ยึดแนวทางการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชโดยชีววิธี คือ แนวทางเกษตรธรรมชาติที่ยั่งยืน โดยคำนึงถึงความสำคัญของแมลงศัตรูธรรมชาติพวกตัวห้ำตัวเบียน โดยจะสำรวจชนิดของแมลงศัตรูธรรมชาติจากแหล่งปลูกผักในภาคกลาง รวมทั้งการศึกษาประสิทธิภาพและประเมินศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ จากนั้นจึงหาแนวทางในการผลิตขยายให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมโดยชีววิธีผสมผสานกับวิธีการอื่น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างแมลง เช่น กระดาษหนังสือพิมพ์ ถุงกระดาษ ถุงพลาสติก ยางรัด แอลกอฮอล์ มีด กรรไกร ที่ดูดแมลง กล่องพลาสติก กล่องเก็บความเย็น
2. พืชอาหาร เช่น ค่ะน้ำ กะหล่ำปลี
3. อุปกรณ์เลี้ยงแมลง ได้แก่ กรงเลี้ยงแมลง กล่องเลี้ยงแมลง ถ้วยพลาสติก ปากคีบ หลอดทดลอง ฝ้ายตาข่าย ฟู่กัน น้ำผึ้ง สำลี ฯลฯ
4. อุปกรณ์ปลูกพืช เช่น กระถางต้นไม้ ถาดหลุม ดิน ปุ๋ย พลั่วมือ
5. เครื่องวัดอุณหภูมิ-ความชื้น (Thermo hygrometer)
6. กล้องถ่ายรูป
7. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1) ศึกษาชนิดแมลงศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผัก (2562)

เก็บรวบรวมหนอนใยผัก ดักแด่แตนเบียน และตัวห้ำที่พบทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย เช่น ตัวง่า แมลงช้าง และมวน เป็นต้น จากแปลงปลูกพืชตระกูลกะหล่ำ (เลือกเก็บจากแปลงที่ทราบประวัติการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงในแปลงปลูก และ/หรือแปลงอินทรีย์) โดยตัดชิ้นส่วนของพืชที่มีหนอนใยผักอาศัยอยู่ในถุงกระดาษหรือห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ แล้วใส่ในถุงพลาสติก สำหรับตัวเต็มวัยแมลงศัตรูธรรมชาติเก็บรวบรวมใส่กล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิดด้วยตาข่าย นำกลับมาเลี้ยงและศึกษาเพื่อประเมินศักยภาพการควบคุมหนอนใยผักต่อในห้องปฏิบัติการ

1.1 แมลงเบียน ใส่หนอนใยผัก ดักแด่แมลงเบียน ที่เก็บรวบรวมมาจากแปลงพร้อมพืชอาหารในกล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิดเป็นตาข่าย แแตนเบียนเฝ้าสังเกตการเจริญเติบโตของหนอนใยผัก หากพบแตนเบียนออกจากตัวอย่าง บางส่วนให้เก็บรวบรวมแตนเบียนลงในแอลกอฮอล์ 75-80% ตรวจสอบจำแนกชนิดของแตนเบียนที่พบ และบางส่วนนำไปทำการศึกษาระเมินศักยภาพการเบียนหนอนใยผักต่อไป

1.2 แมลงห้ำ หากเป็นตัวอ่อนของแมลงห้ำ นำมาเลี้ยงต่อในกล่องพลาสติกใสที่มีฝาปิดเป็นตาข่าย ให้หนอนใยผักเป็นอาหาร เฝ้าสังเกตการเจริญเติบโตของตัวห้ำจนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย เก็บตัวอย่างเพื่อจำแนกชนิด และบางส่วนทำการศึกษาระเมินศักยภาพการกินหนอนใยผักต่อไป

การบันทึกข้อมูล

- ชนิดของพืชอาหารที่พบหนอนใยผัก
- ชนิดและจำนวนของแมลงศัตรูธรรมชาติที่พบ

2) ประเมินศักยภาพของแมลงศัตรูธรรมชาติในการควบคุมหนอนใยผักในห้องปฏิบัติการ (2563)

นำหนอนใยผัก และแมลงศัตรูธรรมชาติที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาดำเนินการ ดังนี้

2.1 แมลงเบียน ใส่หนอนใยผักจำนวน 10 ตัว พร้อมพืชอาหารในหลอดทดลองขนาด 25x150 มิลลิเมตร จากนั้นใส่แมลงเบียนแต่ละชนิด จำนวน 1 คู่ ปิดด้วยผ้าตาข่าย ทำการทดลองกับแตนเบียนจำนวน 10 คู่ ฝัาส่งเกตพฤติกรรมของแตนเบียน หลังจาก 24 ชั่วโมง นำหนอนใยผักออกแล้วนำไปเลี้ยงในหลอดใหม่ แล้วใส่หนอนใยผักเข้าไปใหม่ 10 ตัว ทำเช่นนี้ทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน ตรวจนับจำนวนหนอนใยผักที่ถูกเบียน จำนวนหนอนใยผักและจำนวนวันที่พบแตนเบียนเจาะออกมา เก็บรวบรวมนับจำนวนตัวและจำแนกเพศแตนเบียน

2.2 แมลงห้ำ นำแมลงห้ำแต่ละชนิดมาแยกเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 6.5x9.0x4.5 เซนติเมตร ที่บุฟากกล่องด้วยตาข่าย ใส่หนอนใยผักจำนวน 10 ตัว ให้เป็นอาหาร ใส่แมลงห้ำกล่องละ 1 ตัว ทำการทดลองกับแมลงห้ำเพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว ตรวจนับจำนวนหนอนใยผักที่ถูกกินและใส่เพิ่มเข้าไปให้ครบ 10 ตัว ทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน หรือปรับจำนวนหนอนใยผักที่ใส่ตามศักยภาพการกินของแมลงห้ำแต่ละชนิด

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนหนอนใยผักที่ทดสอบ จำนวนหนอนใยผักที่ถูกเบียน ชนิดพืช
- เพศและจำนวนแตนเบียนที่พบ
- ชนิดของแมลงห้ำ จำนวนหนอนใยผักที่ถูกกิน

สถานที่ทำการทดลอง

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ
- แปลงปลูกผักตระกูลกะหล่ำ จังหวัดนครปฐม นนทบุรี กาญจนบุรี พระนครศรีอยุธยา และปทุมธานี

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การดำเนินการสำรวจแมลงศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผักในงานทดลองปี 2562 ทำให้ได้แมลงเบียนและแมลงห้ำที่มีในธรรมชาติจากแปลงปลูกภาคกลาง ซึ่งแมลงเบียนและแมลงห้ำที่ได้คือแตนเบียนหนอนใยผัก *Cotesia plutellae* และด้วงเต่าสีส้ม *Micraspis discolor* Fabricius (Figure 1) แล้วนำไปสู่งานทดลองปี 2563 โดยทำการเลือกแมลงเบียนและแมลงห้ำอย่างละ 1 ชนิดที่พบมากที่สุดจากการสำรวจมาประเมินศักยภาพของแมลงศัตรูธรรมชาติในการควบคุมหนอนใยผักในห้องปฏิบัติการต่อไป

งานวิจัยปี 2563 ดำเนินการประเมินศักยภาพของแมลงศัตรูธรรมชาติในการควบคุมหนอนใยผักในห้องปฏิบัติการ

แมลงเบียน จากการศึกษาการประเมินศักยภาพแตนเบียนหนอนใยผัก *Cotesia plutellae* ต่อการเบียนหนอนใยผัก โดยนำแตนเบียนหนอนใยผัก *Cotesia plutellae* จำนวน 1 คู่ ใส่ในหลอดทดลองที่มีหนอนใยผักอยู่ภายในหลอด แล้วปิดด้วยผ้าตาข่าย ปล่อยแตนเบียนเบียนหนอนใยผักนาน

24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำหนอนใยผักที่โดนเบียนออกไปเลี้ยงในหลอดใหม่ แล้วใส่หนอนใยผักชุดใหม่ ใส่ในหลอดทดลองที่มีแตนเบียนทำเช่นนี้ทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน พบว่าแตนเบียนสามารถเบียนหนอนใยผักได้สูงที่สุดในวันที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.6 ตัว/วัน รองลงมาคือวันที่ 1 3 และ 4 ซึ่งมีจำนวนค่าเฉลี่ยหนอนใยผักที่โดนเบียนเท่ากับ 4.2 ตัว/วัน 2.2 ตัว/วัน และ 1.6 ตัว/วัน ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์จากการเบียนในวันที่ 1-4 มีค่าเท่ากับ 42%, 46%, 22% และ 16% ตามลำดับ (Table 1) และจากการศึกษาพบว่าหลังจากที่แตนเบียนเบียนหนอนใยผักแล้ว 6-7 วันแตนเบียนในระยะหนอนจะเจาะผนังลำตัวหนอนใยผักเพื่อเข้าดักแด้บริเวณด้านนอกลำตัวของหนอนใยผัก (Figure 2) ซึ่งดักแด้นั้นจะมีลักษณะเป็นสีขาวจำนวนหนอนใยผัก 1 ตัวจะมีดักแด้ 1 ดักแด้เท่านั้น (Figure 3) และใช้เวลา 2-3 วันดักแด้ก็จะฟักออกเป็นตัวเต็มวัย และพบว่าแตนเบียนหนอนใยผักสามารถเบียนหนอนใยผักได้มากกว่า 4 วันจนกว่าจะตาย แต่ศักยภาพการเบียนก็จะลดลงตามระยะเวลา

Seenivasagan *et al.* (2010) ทดสอบการเบียนของแตนเบียน *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) ต่อหนอนใยผักบนพืชอาหารชนิดต่าง ๆ ในสภาพแปลงและห้องปฏิบัติการ พบว่าแตนเบียนสามารถเบียนหนอนใยผักในสภาพแปลงได้ดีว่าห้องปฏิบัติการ 27% และพบว่าในสภาพแปลงแตนเบียนสามารถเบียนหนอนใยผักในแปลงกะหล่ำดอก กะหล่ำปลี และผักมีสตาร์ตได้สูงกว่าพืชทดสอบชนิดอื่น ๆ คือ 56%, 53% และ 45% ตามลำดับ ส่วนการเบียนของแตนเบียนในห้องปฏิบัติการพบว่า แตนเบียนสามารถเบียนหนอนใยผักที่เลี้ยงด้วยผักมีสตาร์ตได้สูงที่สุด (86.3%) รองลงมาคือกะหล่ำดอก (85%) Brussels sprout (77.7%) และกะหล่ำปลี (70.8%)

แมลงห้ำ การประเมินศักยภาพของด้วงเต่าสีส้ม *Micraspis discolor* Fabricius ในการกินหนอนใยผัก โดยแยกระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (Figure 4) พบว่าด้วงเต่าสีส้มเพศเมียสามารถกินหนอนใยผักได้สูงกว่าเพศผู้ ในวันที่ 1 ด้วงเต่าสีส้มเพศเมียสามารถกินหนอนใยผักได้สูงที่สุด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.1 ตัว/วัน ส่วนตัวผู้สามารถกินหนอนใยผักได้ 3.6 ตัว/วัน ส่วนวันที่ 2 3 และ 4 เพศผู้สามารถกินหนอนใยผักได้ 2.2 2 และ 2.1 ตัว/วัน เพศเมียสามารถกินหนอนใยผักได้ 2.6 2.3 และ 2.5 ตัว/วัน ตามลำดับ (Table 2) จากการสังเกตในการทดสอบการกินเหยื่อของด้วงเต่าสีส้มในครั้งนี้ พบว่าจากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วงเต่าสีส้มในห้องปฏิบัติการก่อนนำมาทดสอบโดยให้อาหารด้วงเต่าเป็นหนอนใยผักตั้งแต่ระยะไข่ถึงหนอนวัย 4 จากการสังเกตพบว่า ด้วงเต่าชอบกินเหยื่อในระยะไข่มากกว่าระยะหนอน โดยเฉพาะหนอนใยผักวัยที่ 3-4 ซึ่งมีขนาดลำตัวที่ใหญ่ จากการศึกษาก่อนของ Momnath and Azizur (2014) พบว่าเพศเมียของด้วงเต่า *Micraspis discolor* (F.) และ *Menochilus sexmaculatus* (F.) มีประสิทธิภาพการกินเพลี้ยอ่อนชา ได้สูงกว่าเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจแมลงศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผัก จากแปลงปลูกภาคกลาง ทำการเลือกแมลงเบียนคือ แตนเบียนหนอนใยผัก *Cotesia plutellae* และแมลงห้ำ คือ ด้วงเต่าสีส้ม *Micraspis discolor* Fabricius ที่พบมากที่สุดจากการสำรวจ และงานทดลองของปี 2563 โดยทำการประเมิน

ศักยภาพของแมลงศัตรูธรรมชาติในการควบคุมหนอนใยผักในห้องปฏิบัติการ พบว่า แตนเบียนหนอนใยผัก *Cotesia plutellae* สามารถเบียนหนอนใยผักได้สูงที่สุดในวันที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับวันอื่น ๆ ที่ทดสอบ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.6 ตัว/วัน และแตนเบียนหนอนใยผักสามารถเบียนหนอนใยผักได้มากกว่า 4 วันจนกว่าจะตาย แต่ศักยภาพการเบียนก็จะลดลงตามระยะเวลา ส่วนการประเมินศักยภาพของด้วงเต่าสีส้ม *Micraspis discolor* Fabricius ในการกินหนอนใยผัก โดยแยกระหว่างเพศผู้และเพศเมีย พบว่า ด้วงเต่าสีส้มเพศเมียสามารถกินหนอนใยผักได้สูงกว่าเพศผู้ และในวันที่ 1 เพศเมียสามารถกินหนอนใยผักได้สูงที่สุด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.1 ตัว/วัน ส่วนตัวผู้สามารถกินหนอนใยผักได้ 3.6 ตัว/วัน

เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ นงพร กิจบำรุง จักรพงษ์ พิริยพล ศรีสุดา ไททอง สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น ลัดดาวัลย์ อินทร์สังข์ อรุภาพร ใจเพชร ศรีจันรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย สมรวัย รุ่งรัตนวารี และสัจจะ ประสงค์ทรัพย์. 2542. แมลงศัตรูผัก. เอกสารวิชาการ กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกไม้ประดับ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด จตุจักร กรุงเทพฯ. 97 หน้า.

Anonymous. 2006. Introduction of *Diadegma semiclausum* for the biological control of diamondback moth (*Plutella xylostella*) in Thailand. Department of Agriculture and The Ankhang Agriculture Station Royal Project Foundation. 24 pp.

Momnath, R. and R. Azizur. 2014. A study on the comparative predatory efficiency and development of *Micraspis discolor* (F.) and *Menochilus sexmaculatus* (F.) on tea aphid *Toxoptera urantii* (Boyer de Fons). Zoology and Ecology. Volume 24, 285-287.

Seenivasagan, T., R.G. Gracy and A.V.N. Paul. 2010. Differential parasitism by *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) on *Plutella xylostella* (L.) in artificially infested host plants. Journal of Biological Control. 24(4): 22-27.

Silva, R. and M.J. Furlong. 2012. DBM oviposition: effects of host plant and herbivory. Entomol. Exp. Appl. 143: 218-230.

Table 1 Parasitic potential of *Cotesia plutellae* on diamondback moth larvae under laboratory in 1-4 day.

Day	Mean of parasitism by <i>Cotesia plutellae</i> on diamondback moth larvae	
	Larvae/day	% parasitism/day
1	4.2	42
2	4.6	46
3	2.2	22
4	1.6	16

Table 2 Mean of *Micraspis discolor* Fabricius on eating diamondback moth larvae.

Day	Mean of diamondback moth larvae at eating (larvae/day)	
	Male	Female
1	3.6	4.1
2	2.2	2.6
3	2	2.3
4	2.1	2.5



Figure 1 Adult of *Cotesia plutellae* (A) and *Micraspis discolor* Fabricius (B)



Figure 2 Larvae stage *Cotesia plutellae* penetrate insect body wall to enter pupa stage



Figure 3 Pupa stage *Cotesia plutellae*



Figure 4 Adult stage of *Micraspis discolor* Fabricius Female (A) and Male (B)

การผลิตและการใช้แมลงข้างปีกใส *Chrysoperla carnea* (stephens)
ควบคุมเพลี้ยอ่อน *Aphis* sp. ในสตรอว์เบอร์รี
Mass Rearing and Uses Green Lacewing, *Chrysoperla carnea* for
Control of Aphids on Strawberry

ประภัสสร เขยคำแหง สาทิพย์ มาลี ญัฐิณี ศิริมาจันทร์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การใช้แมลงข้างปีกใสควบคุมเพลี้ยอ่อน โดยปล่อยแมลงข้างปีกใสตามกรรมวิธี พบว่ากรรมวิธีที่ 3 4 และ 5 คือ ปล่อยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสวัย 2 จำนวน 15 20 และ 25 ตัว/ต้น ภายในระยะเวลา 3 วัน สามารถป้องกันกำจัดเพลี้ยอ่อนได้ดีกว่าการปล่อยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสวัย 2 จำนวน 5 และ 10 ตัวต่อต้น และในปี 2564 จะนำผลจากการทดลองนี้ไปใช้ในการควบคุมเพลี้ยอ่อนบนต้นสตรอว์เบอร์รีในสภาพแปลงต่อไป

คำหลัก: แมลงข้างปีกใส เพลี้ยอ่อน สตรอว์เบอร์รี

คำนำ

เพลี้ยอ่อน (Homoptera: Aphididae) เป็นแมลงศัตรูพืชสำคัญที่ลงทำลายพืชหลายๆ ชนิด การใช้สารเคมีในการควบคุมย่อมส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยทั้งผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม สตรอว์เบอร์รีเป็นพืชหนึ่งที่มีแมลงและโรคระบาดมาก ในจำนวนศัตรูพืชหลายชนิดที่ลงทำลายสตรอว์เบอร์รี เช่น เพลี้ยไฟ ไรสองจุด เพลี้ยอ่อน และหนอนต่างๆ เพลี้ยอ่อนจัดเป็นศัตรูพืชที่สำคัญของสตรอว์เบอร์รีเพราะสามารถลงทำลายตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว และมีความเสียหายทางระดับเศรษฐกิจเมื่อพบเพลี้ยอ่อน 45 ตัวต่อใบ สตรอว์เบอร์รี (Strawberry) เป็นสกุลไม้ดอกในวงศ์กุหลาบ ผลสามารถรับประทานได้ ที่นิยมปลูกกันมากคือ สตรอว์เบอร์รีสวน *Fragaria ananassa* มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกาเหนือ และอเมริกาใต้ เป็นพืชเขตหนาว มีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 3 ปี ปัจจุบันประเทศไทยมีการปลูกสตรอว์เบอร์รีหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์พระราชทาน 50 70 72 และ 80 เป็นต้น (คงฤช, 2554) เพลี้ยอ่อน (Aphid) (Homoptera: Aphididae) เป็นแมลงปากดูดทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยทำลายพืชโดยดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบยอด และลำต้น ทำให้การสังเคราะห์แสงลดลงเมื่อเพลี้ยอ่อนถ่ายสารเป็นน้ำหวานออกมาก็จะเป็นอาหารของเชื้อรา ทำให้พืชสกปรกเป็นราดำ

รหัสการทดลอง 03-05-59-02-01-00-37-62

เพลี้ยอ่อนจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มตามส่วนยอด ช่อดอก และขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ตั้งแต่ปี 1996 ทางประเทศในแถบยุโรปมีความนิยมในการปลูกสตรอว์เบอร์รีมากโดยเฉพาะ ประเทศ สเปน และ อิตาลี พบว่าเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงศัตรูสำคัญของสตรอว์เบอร์รี ลงทำลายในโรงเรือนตั้งแต่สตรอว์เบอร์รี อายุ 7-14 วัน จนถึงระยะเก็บเกี่ยว เนื่องจากต้องเก็บผลสดทุกๆ สัปดาห์ การใช้สารเคมีจึงเป็นไปได้ เพราะจะมีสารตกค้าง จึงเป็นครั้งแรกที่มีการนำแมลงข้างปีกใส *C. carnea* มาใช้ควบคุมในปี 1983 (Tommasini *et al.*, 2001) ชนิดของเพลี้ยอ่อนที่พบระบาดมากในสตรอว์เบอร์รีในแถบยุโรปคือ *Macrosiphum euphorbiae* (Thom.) และ *Chaetosiphon fragaefolii* (Cock.) (Benuzzi *et al.*, 1992) และ *Aphis gossypii* Glov. *Myzus persicae* (Sulz.) จะระบาดตาม ในประเทศไทย แมลงศัตรูสำคัญของสตรอว์เบอร์รีที่พบคือ เพลี้ยไฟ ไรสองจุด เพลี้ยอ่อน หนอนด้วงขาว และหนอน กระทุ้ง เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2524) แมลงข้างปีกใส *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) หรือเรียกว่า Aphid-lion เป็นแมลงห้ำที่มีบทบาทสำคัญในการ ควบคุมเพลี้ยอ่อน และแมลงศัตรูพืชอีกหลายชนิด เช่น ไรแมงมุม ไรแดง เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว เพลี้ย แป้ง ไข่และหนอนผีเสื้อขนาดเล็ก (Carrillo and Elanov, 2004) จากผลการทดลองของ Easterbrook *et al.* (2006) รายงานว่า ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ ตัวอ่อนระยะ 2-3 ของแมลง ข้างปีกใส *C. carnea* สามารถกินเพลี้ยอ่อน *Chaetosiphon fragaefolii* ได้ถึง 790 ตัว อัตราการ ปล่อยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสในสภาพแปลง ที่เหมาะสมที่สามารถควบคุมการระบาดได้คือ 8 ตัวต่อต้น จนถึง 25 ตัวต่อต้น ขึ้นกับการระบาดของเพลี้ยอ่อน และในสภาพโรงเรือน มีความแตกต่างทางสถิติ ระหว่างการปล่อย และไม่ปล่อยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใส เช่นเดียวกับงานวิจัยที่เกี่ยวกับความชอบใน เหยื่ออาหารของตัวอ่อนแมลงข้างปีกใส *C. carnea* ระหว่างเพลี้ยไฟ *Frankliniella occidentalis* และเพลี้ยอ่อน *Nasonovia ribisnigri* พบว่าตัวอ่อนของแมลงข้างปีกใส *C. carnea* เข้าทำลายเพลี้ย ไฟได้ถึง 40-90% และเข้าทำลายเพลี้ยอ่อนได้ 52-98% (Govinda and Annie, 2013) พิมลพร (2545) รายงานว่าแมลงข้างปีกใส *C. carnea* เป็นแมลงห้ำที่กินเหยื่อได้หลายชนิด และเหยื่อที่ชอบ มากที่สุดคือเพลี้ยอ่อน แมลงข้างปีกใส *C. carnea* 1 ตัว ตลอดวงจรชีวิตสามารถกินเพลี้ยอ่อนได้ 400-600 ตัว และแมลงข้างปีกใสมีประโยชน์มากในการนำไปปล่อยในโรงเรือนที่ปลูกพืชและได้นำไป ปล่อยควบคุมศัตรูแล้ว เช่น ควบคุมเพลี้ยอ่อนบนกุหลาบ และในถั่วลิ้นเต้าสามารถลดการระบาดได้ดี ดังนั้นเพื่อการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี หรือภายใต้ระบบการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน การนำ แมลงข้างปีกใสไปใช้มีความจำเป็นมากขึ้น การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิต และศักยภาพในการ ผลิตรวมทั้งวิธีการนำไปใช้จึงมีความสำคัญในเบื้องต้น แมลงข้างปีกใสในการควบคุมเพลี้ยอ่อนในพืช ในแถบยุโรปได้นำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมเพลี้ยอ่อนในพืชหลายชนิด ได้แก่ ฟริกไทย มันฝรั่ง มะเขือเทศ และมะเขือชนิดอื่นๆ (Hoffman and Fredsham, 1993) จากผลการวิจัยในต่างประเทศ พบว่ามีการใช้แมลงข้างปีกใสควบคุมเพลี้ยอ่อนในฟริก ใช้ควบคุมไรในแปลงแอปเปิ้ล และยังสามารถ ใช้ควบคุมเพลี้ยจักจั่นในไร่องุ่น โดยใช้อัตราแมลงข้างปีกใส 1-16 ตัวต่อต้น สามารถควบคุมเพลี้ย จักจั่นให้ลดลงถึง 31% (Daana and YoKota, 1997) นอกจากนี้ Tauben and Tauben (1993)

รายงานว่ามีแมลงข้างปีกใสเคยถูกนำไปใช้ในไร่ฝ้ายของรัฐเท็กซัส สามารถลดประชากรของหนอนเจาะสมอฝ้ายได้ถึง 96% และยังสามารถนำไปใช้ในพืชอื่นๆ อีก เช่น ข้าวโพด ถั่ว กะหล่ำปลี และแอปเปิ้ล เพื่อควบคุมเพลี้ยอ่อนในพืชดังกล่าว แต่ต้องปล่อยเป็นปริมาณมาก สำหรับประเทศไทย พิมลพร (2545) รายงานว่ามีแมลงข้างปีกใส เป็นแมลงห้ำหั่วไปกินอาหารได้หลายชนิดเหยื่อที่ชอบมากที่สุดคือเพลี้ยอ่อน แมลงข้างปีกใส 1 ตัว สามารถกินเพลี้ยอ่อนได้ 100-600 ตัว เกษตรกรส่วนใหญ่เลือกใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดเนื่องจากสะดวก แต่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพตามมา ทั้งต่อเกษตรกรผู้ปลูก ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม ที่สำคัญสตอร์วเบอร์รี่เป็นผลไม้ไม่รับประทานสด ปัจจุบันเป็นที่นิยมในการบริโภค เนื่องจากมีประโยชน์ อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยยับยั้งสารก่อมะเร็ง ช่วยป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดอุดตัน และช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันต่อโรคต่างๆ ดังนั้นสตอร์วเบอร์รี่จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศเพิ่มมากขึ้น หลายๆ พื้นที่ในประเทศไทยมีการปลูกสตอร์วเบอร์รี่เพิ่มขึ้น ทั้งทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง สตอร์วเบอร์รี่จึงถูกพิจารณาจัดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ นโยบายของรัฐฯ ส่งเสริมให้ผลิตสตอร์วเบอร์รี่ที่ปลอดภัยจากสารพิษตกค้าง มีระบบการผลิตสตอร์วเบอร์รี่ให้ได้ตามระบบ GAP กรมส่งเสริมการเกษตรจึงแนะนำให้เกษตรกรใช้สารชีวภาพในการป้องกันกำจัด เช่น ใช้เชื้อราบิวเวอเรีย น้ำหมักสมุนไพร สะเดา ข่า เป็นต้น ควบคุมแมลงศัตรูพืชในสตอร์วเบอร์รี่ ดังนั้นแมลงข้างปีกใส *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูในสตอร์วเบอร์รี่ โดยสามารถใช้แบบผสมผสานร่วมกับชีวภัณฑ์อื่นๆ ได้ การวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อหาเทคโนโลยีที่เหมาะสม และอัตราการใช้แมลงข้างปีกใสที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยอ่อนต่อไป เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแมลงข้างปีกใส *C. carnea* ในการควบคุมเพลี้ยอ่อน *Aphis* sp. ในสตอร์วเบอร์รี่

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- แมลงข้างปีกใส *Chrysoperla carnea* (stephens)
- ต้นสตอร์วเบอร์รี่
- ไร่ข้าว
- ปลายข้าวเจ้า
- น้ำตาลทราย
- กล่องขนาด 18x26x10 เซนติเมตร
- กล่องขนาด 8x12x6 เซนติเมตร
- โหลแก้ว
- น้ำบริสุทธิ์
- ผ้าขาวบาง ยางยืด
- กระดาษทิชชู สำลี น้ำผึ้ง

- โรงเรือน

วิธีการ

- **แบบและวิธีการทดลอง** ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 เลี้ยงขยายแมลงข้างปีกใส *C. carnea*

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาอัตราการใช้แมลงข้างปีกใส *C. carnea* ที่เหมาะสมในการควบคุมเพลี้ยอ่อนในเรือนทดลอง

ขั้นตอนที่ 3 ใช้อัตราแมลงข้างปีกใส *C. carnea* ที่เหมาะสม (จากขั้นตอนที่ 2) ไปทดสอบในสภาพไร่

ขั้นตอนที่ 1 เลี้ยงขยายแมลงข้างปีกใส *C. carnea* (2562-2564)

นำตัวเต็มวัยแมลงข้างปีกใส *C. carnea* ใส่ในโหลแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นิ้ว สูง 5 นิ้ว ใส่โหลละ 30 ตัว (ตัวผู้ 10: ตัวเมีย 20) ปิดโหลด้วยผ้าขาวบาง ให้น้ำผึ้ง+ยีสต์ เป็นอาหารตัวเต็มวัย และให้วางสำลีชุบน้ำไว้บนผ้าขาวบางเพื่อให้ความชื้น หลังจากนั้นตัวเต็มวัยจะวางไข่รอบๆ โหล เปลี่ยนยี่ห้อโหลนำตัวเต็มวัยแมลงข้างปีกใสโหลใหม่ให้อาหารและน้ำเหมือนครั้งแรก นำโหลเก่าที่มีไข่แมลงข้างปีกใสไปทำการฟักโดยใช้กระดาษทิชชูฉีกเป็นริ้วๆ ใส่ในโหล แล้วโรยด้วยไข่ฝัเสื้อข้าวสาร เพื่อเป็นอาหารของตัวอ่อน ปิดโหลด้วยผ้าขาวบาง วางไว้จนกระทั่งไข่ฟักเป็นตัวอ่อน ประมาณ 5 วัน ตัวอ่อนระยะ 1 ให้ทำการเปลี่ยนย้ายตัวอ่อนระยะที่ 1 นำไปเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 18x26x10 เซนติเมตร ให้ไข่ฝัเสื้อข้าวสารเป็นอาหารอีก 5 วัน จะเก็บเกี่ยวไปใช้ควบคุมเพลี้ยอ่อนได้ เก็บส่วนหนึ่งเลี้ยงไว้ภายในกล่องจนกระทั่งเข้าดักแด้ เก็บดักแด้ออกมา เตรียมเป็นตัวเต็มวัย นำตัวเต็มวัยไปเลี้ยงในโหลเลี้ยงตัวเต็มวัยเพื่อผลิตตัวอ่อนรุ่นต่อไป

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนแมลงข้างปีกใสที่ผลิตได้
- บันทึกปริมาณไข่ฝัเสื้อข้าวสารที่ใช้
- ต้นทุนการผลิต

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาอัตราการใช้แมลงข้างปีกใส *C. carnea* ที่เหมาะสมในการควบคุมเพลี้ยอ่อน *Aphis sp.* ในสตรอว์เบอร์รี่ในเรือนทดลอง (2562-2563)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

แผนการวิจัย วางแผนแบบ CRD มี 10 ซ้ำ 6 กรรมวิธี คือ

1. ปลอ่ยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสวัย 2 จำนวน 5 ตัว/ต้น
2. ปลอ่ยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสวัย 2 จำนวน 10 ตัว/ต้น
3. ปลอ่ยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสวัย 2 จำนวน 15 ตัว/ต้น
4. ปลอ่ยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสวัย 2 จำนวน 20 ตัว/ต้น
5. ปลอ่ยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสวัย 2 จำนวน 25 ตัว/ต้น
6. ไม่ปลอ่ยแมลงข้างปีกใส

ดำเนินการทดลองในโรงเรือนทดลองอาคารวิจัยแมลงศัตรูธรรมชาติ ใช้ต้นสตรอว์เบอร์รี่ที่ปลูกในกระถางที่มีอายุประมาณ 2 สัปดาห์ที่ใช้ต้นสตรอว์เบอร์รี่กรรมวิธีละ 10 ต้น ทำการระบาดของเพลี้ยอ่อน *Aphis* sp. ตรวจนับจำนวนเพลี้ยอ่อนให้มีการระบาดเท่าๆ กัน 20 ตัวต่อต้น หลังจากนั้น ปล่อยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใส *C. carnea* ตามกรรมวิธี 5 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีแยกโดยใช้ฉากกัน หลังจากปล่อยแล้วตรวจนับปริมาณเพลี้ยอ่อนที่เหลือทุกๆ 12 24 และ 36 ชั่วโมงตามลำดับ

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนเพลี้ยอ่อนที่เหลือ
- บันทึกจำนวนชั่วโมงที่ใช้
- บันทึกผลกระทบต่อพืช

ขั้นตอนที่ 3 ใช้อัตราแมลงข้างปีกใส *C. carnea* ที่เหมาะสม (จากขั้นตอนที่ 2) ไปทดสอบในสภาพไร่ (2564)

ปลูกสตรอว์เบอร์รี่ในแปลงขนาด 1 งาน ระยะปลูกระหว่างต้น 25-30 เซนติเมตร ระหว่างแถว 30-40 เซนติเมตร ปลูกแบบสลับฟันปลา ใช้ต้นสตรอว์เบอร์รี่ประมาณ 200 ต้น ทำการสุ่มสำรวจการระบาดของเพลี้ยอ่อนจำนวน 100 ต้น เมื่อพบการระบาดของเพลี้ยอ่อนเฉลี่ย 5 ตัวต่อต้น เริ่มปล่อยแมลงข้างปีกใส *C. carnea* ตามอัตราที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 ในแปลงปลูกสตรอว์เบอร์รี่เปรียบเทียบกับแปลงที่ไม่ปล่อยแมลงข้างปีกใส *C. carnea* เก็บข้อมูลจำนวนเพลี้ยอ่อนทั้งสองแปลงหลังจากปล่อยทุกๆ สัปดาห์

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนเพลี้ยอ่อนที่พบ
- จำนวนครั้งที่ปล่อย และจำนวนตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสที่ปล่อย
- ผลผลิตที่ได้ น้ำหนัก คุณภาพ เป็นต้น
- บันทึกผลกระทบต่อพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2561 สิ้นสุดกันยายน 2564

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เตรียมปลูกพืชเพื่อเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพลี้ยอ่อน เก็บรวบรวมเพลี้ยอ่อนเพื่อนำมาทดลองปล่อยเพลี้ยอ่อนระบาดบนต้นสตรอว์เบอร์รี่ ปล่อยแมลงข้างปีกใสตามกรรมวิธี พบว่ากรรมวิธีที่ 3 4 และ 5 คือปล่อยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสวัย 2 จำนวน 15 20 และ 25 ตัว/ต้น ภายในระยะเวลา 3 วัน สามารถป้องกันกำจัดเพลี้ยอ่อนได้ดีกว่าการปล่อยตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสวัย 2 จำนวน 5 และ 10 ตัวต่อต้น (ตารางที่ 1) อัตราที่จะใช้ในแปลงทดลองจะขึ้นอยู่กับ การสำรวจประชากรของเพลี้ยอ่อน โดยใช้อัตราที่ได้จากตารางที่ 1 เลือก 3 อัตรา คือปล่อยที่ 15 20 และ 25 ตัวต่อต้น เปรียบเทียบกับไม่ปล่อย

เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2524. การปลูกสตรอว์เบอร์รี่. กรุงเทพฯ โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- คงกฤษ อินทแสน. 2554. การปลูกสตรอว์เบอร์รี่ ศูนย์ส่งเสริมและพัฒนาอาชีพทางการเกษตร จังหวัดกาญจนบุรี (เกษตรที่สูง) ใน: เอกสารวิชาการกรมส่งเสริมการเกษตร.
- พิมลพร นันทะ. 2545. แมลงข้างปีกใส. ใน: ศัตรูธรรมชาติหัวใจของ IPM. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 14-17.
- Benuzzi, M., G. Manzaroli and M. Mosti. 1992. Biological control in protected strawberry In northern Italy. OEPP/EPPO Bulletin 22, 445-448.
- Carrillo, M. and P. Elanov. 2004. The potential of *C. carnea* as a biological control agent of *Myzus persicae* in glass houses. Annl. Appl. Biol. 32: 433-439.
- Daane, K.M., G.Y. Yokota and Y.D. Rasmussen. 1997. Effectiveness of leafhopper control varies with Lacewing release methods. Cal. Ag. 47(6): 19-23.
- Easterbrook M.A., J.D. Fitzgerald and M.G. Solomon. 2006. Suppression of aphids on strawberry by augmentative releases of larvae of the lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) Journal Biocontrol Science and Technology. V.16, 2006 Issue9.
- Govinda, S. and E. Annie. 2013. The Green Lacewing, *Chrysoperla carnea* Preference between Lettuce Aphids, *Nasonovia ribisnigri* and Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis*. J. Insect Sci. 2013; 13:94.
- Hoffman, M.P. and A.C. Frodsham. 1993. Natural Enemies of Vegetable Insect Pests. Cooperative Extension, Cornell University Ithaca, N.Y. 63 pp.
- Tauben, M.J. and C.A. Tauben. 1993. Adaptation to temporal variation in habitats: categorizing, predicting and influencing their evolution in agro ecosystems In: Evolution of insect pest. Pp 103-127. John Wiley&Sons. N.Y.
- Tommasini M.G. and M. Mosti. 2001. Control of aphids by *Chrysoperla carnea* on strawberry in Italy. In Lacewing in the Crop Environment. 481-486.
- Van Lenteren. 2003. Quality control and production of biological control agents' laboratory of entomology Netherland.

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยจำนวนเพลี้ยอ่อนที่มีชีวิต หลังปล่อยแมลงข้างปีกใส วัย 2 ตามกรรมวิธี ภายใน 1 2 และ 3 วัน

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ย จำนวนเพลี้ยอ่อน (ตัว)		
	1 วัน	2 วัน	3 วัน
กรรมวิธีที่ 1	73.8	87.8	75.6
กรรมวิธีที่ 2	76.4	50.4	61.6
กรรมวิธีที่ 3	47.6	29.2	38.2
กรรมวิธีที่ 4	42.8	21.6	21.6
กรรมวิธีที่ 5	35.4	15.0	7.2
กรรมวิธีที่ 6 Control	89.2	105.4	82.6

ต้นแบบผลิตแมลงข้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* อย่างเป็นระบบ
เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน
Pilot Plant of The Effective Green Lacewing, *Plesiochrysa ramburi*
for Sustainable Pest Control

ประภัสสร เขยคำแหง สาทิพย์ มาลี นงนุช ช่างลี
 กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ผลการทดลองในปี 2563 ได้เพิ่มอาหารที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนแมลงข้างปีกใส คือผลฟักทองที่มีเปลือกแบ่งจากกล่องละ 1 ลูก เป็น 2 ลูก เพื่อเป็นอาหารของตัวอ่อนแมลงข้างปีกใส ทำให้ในรอบการผลิตที่ 2 และ 3 ได้จำนวนตัวเต็มวัยแมลงข้างปีกใสเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การฟักเพิ่มขึ้น การเพิ่มลูกฟักทองเป็น 2 ลูก ในกล่องเลี้ยงขนาด 35x45x12 เซนติเมตร และใช้พ่อแม่พันธุ์ 400 ตัว (เพศผู้ 100: เพศเมีย 300) ทำให้ตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสมีอาหารเพียงพอในการเจริญเติบโตมีผลในการผลิตพ่อแม่พันธุ์แมลงข้างปีกใสเพิ่มขึ้น และในรอบ 1 ปี การผลิตตั้งแต่เดือนมกราคม 2563 ถึงสิงหาคม 2563 ได้จำนวนรอบการผลิตเปลือกแบ่งจำนวน 8 รุ่น

คำหลัก : แมลงข้างปีกใส ผลฟักทอง เปลือกแบ่ง

คำนำ

การทำการเกษตรโดยการใช้สารเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารฆ่าแมลง ก่อให้เกิดการตกค้างในผลผลิตและสิ่งแวดล้อม เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้ผลิต และผู้บริโภค อีกทั้งทำให้ระบบนิเวศและสภาพแวดล้อมทางการเกษตรเปลี่ยนแปลงไป ปัจจุบันจึงมีนโยบายส่งเสริมการใช้การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีมากขึ้นเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ โดยการใช้แมลงศัตรูธรรมชาติควบคุมแมลงศัตรูพืชและเครื่องมือ หรืออาวุธที่เราจะใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชก็คือ “แมลงศัตรูธรรมชาติ” แมลงข้างปีกใส (Green Lacewings) เป็นหนึ่งในแมลงศัตรูธรรมชาติ ชนิดตัวห้ำที่มีประโยชน์มากชนิดหนึ่ง เป็นตัวห้ำของแมลงศัตรูพืชที่มีผนังลำตัวอ่อนนุ่ม เช่น เปลือกแบ่ง เปลือกอ่อน เปลือกไฟ ไรศัตรูพืช แมลงหวี่ขาวไข่ และตัวหนอนผีเสื้อขนาดเล็กหลายชนิด เป็นต้น โดยเฉพาะแมลงข้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* (Schneider) จัดอยู่ในอันดับ Neuroptera วงศ์ Chrysopidae เป็นตัวห้ำที่ช่วยควบคุมเปลือกแบ่งได้เป็นอย่างดี สามารถควบคุมเปลือกแบ่งได้หลายชนิด และได้ทุกระยะของเปลือกแบ่ง

รหัสการทดลอง 03-05-62-04-00-00-02-62

(ประภัสสรและคณะ, 2560) นอกจากนี้รายงานของ Mehra (1966) พบว่าแมลงข้างปีกใส *Plesiochrysa* spp. เป็นตัวทำที่ใช้ในการกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม Homoptera ในแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในประเทศ บราซิล เปรู และอินเดีย ต่อมา Tauder *et al.* (2001) ได้รายงานพบว่าแมลงข้างปีกใสในวงศ์ Chrysopidae อีกชนิดหนึ่ง คือ *Plesiochrysa brazileinsis* ที่น่าจะมียาพิษสำคัญนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ ดังนั้นการศึกษาการจากระบบการผลิต เพื่อให้ประสิทธิภาพในการผลิตแมลงข้างปีกใส *P. ramburi* มีมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ประโยชน์ และมีอย่างต่อเนื่องตลอดปี เหมาะสมต่อการระบาดของศัตรูพืชจึงเป็นเรื่องที่สำคัญ Van Lenteren (2003) ได้กล่าวไว้ว่าการผลิตแมลงศัตรูธรรมชาติ หรือแมลงที่มีประโยชน์จำนวนมาก จะต้องผลิตขึ้นเป็นระบบอย่างเหมาะสม ต้องคำนึงถึงชนิดของแมลงศัตรูธรรมชาติ พันธุกรรม อาหาร สภาพแวดล้อมที่มีการควบคุม รวมถึงการตรวจสอบคุณภาพแมลงศัตรูธรรมชาติ บรรจุภัณฑ์ และการนำแมลงศัตรูธรรมชาติไปใช้ด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- แมลงข้างปีกใส
- เปลี๋ยแบ่ง
- ฟักทอง
- กล่องขนาด 35x45x12 เซนติเมตร
- กล่องขนาด 18x26x10 เซนติเมตร
- กล่องขนาด 8x12x6 เซนติเมตร
- น้ำบริสุทธิ์
- ผ้าขาวบาง ยางยืด
- กระดาษทิชชู สาลี น้ำผึ้ง

วิธีการ

- แบบและวิธีการทดลอง

ดำเนินการวิเคราะห์และจัดทำรูปแบบกระบวนการผลิต หรือจัดการแก้ไขให้ได้รูปแบบที่เหมาะสมสำหรับผลิตขยายแมลงข้างปีกใสและเหยื่ออาหาร โดยวิเคราะห์ถึงประสิทธิภาพ คุณภาพ และต้นทุนผลิตระยะเวลาการผลิต

- วิธีปฏิบัติการทดลอง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน

1. เก็บรวบรวมแมลงข้างปีกใส *P. ramburi* และเปลี๋ยแบ่งจากธรรมชาติ
2. การจัดการระบบการเลี้ยงเปลี๋ยแบ่งเพื่อใช้เลี้ยงแมลงข้างปีกใส
3. การจัดการระบบการผลิตแมลงข้างปีกใสให้มีปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง

ขั้นตอนที่ 1 เก็บรวบรวมแมลงข้างปีกใส *P. ramburi* และเปลี๋ยแบ่งจากธรรมชาติ (2562-2563)

เก็บรวบรวมไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยแมลงข้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* จากแปลงพืชต่างๆ ที่มีการระบาดของศัตรูพืช เช่น เพลี้ยแป้ง และเก็บเพลี้ยแป้งเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงตัวอ่อนแมลงข้างปีกใส เลี้ยงไข่ ตัวอ่อน และดักแด้ของแมลงข้างปีกใสที่เก็บจากธรรมชาติจนเป็นตัวเต็มวัย ทำการคัดเลือกตัวเต็มวัยแมลงข้างปีกใสที่สมบูรณ์เพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การจัดการระบบการเลี้ยงเพลี้ยแป้งเพื่อใช้เลี้ยงแมลงข้างปีกใส (2562-2564)

1. เก็บรวบรวมเพลี้ยแป้งในแหล่งที่มีการระบาด
2. เตรียมผลฟักทองซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเพลี้ยแป้ง เลือกฟักทองผลขนาดเล็ก มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 17-20 เซนติเมตร ผลสดสีเขียว ล้างดินออกให้สะอาด ผึ่งให้แห้งสนิท
3. นำฟักทองวางลงในกล่องพลาสติกขนาด 35×45×12 เซนติเมตร รองผลฟักทองด้วยจานรองเพื่อชะลอการเน่าและของผลฟักทอง ประมาณ 4-5 ผล/กล่อง
4. นำเพลี้ยแป้งที่เก็บมาวางบนผลฟักทอง คลุมกล่องด้วยผ้าตาข่ายไนลอนเพื่อระบายอากาศ
5. นำกล่องเลี้ยงเพลี้ยแป้งวางบนภาชนะที่หล่อน้ำไว้ เพื่อเป็นการป้องกันมิให้เกิดการแพร่กระจายของเพลี้ยแป้งไปยังที่อื่นๆ จากนั้นประมาณ 15 วัน เพลี้ยแป้งจะย้ายจากพืชเดิมลงไปอยู่บนผลฟักทอง
6. ปลอ่ยให้เพลี้ยแป้งเจริญเติบโตเต็มผลฟักทองประมาณ 10 วัน และจะนำมาใช้เลี้ยงตัวอ่อนของแมลงข้างปีกใสต่อไป

การบันทึกข้อมูล

- ต้นทุนที่ใช้เลี้ยงเหยื่ออาหาร (เพลี้ยแป้ง) ในแต่ละรุ่น

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการระบบการผลิตแมลงข้างปีกใสให้มีปริมาณมากอย่างต่อเนื่อง (2563-2564)

1. นำตัวเต็มวัยพ่อแม่พันธุ์ แมลงข้างปีกใส *P. ramburi* ใส่กล่องขนาด 18×26×10 เซนติเมตร รองพื้นกล่องด้วยกระดาษจำนวน 2 กล่องๆ ละ 100 ตัว เป็นเพศผู้ 40: เพศเมีย 60 ตัว
2. ปิดกล่องด้วยผ้าขาวบาง ภายในกล่องวางน้ำผึ้งผสมยีสต์บนกระดาษไข เพื่อเป็นอาหารของพ่อแม่พันธุ์แมลงข้างปีกใส
3. วางแผ่นสำลีชุ่มน้ำไว้ด้านบนผ้าขาวบางเพื่อให้ความชื้น แมลงข้างปีกใสเพศเมียจะวางไข่ไว้ในกล่อง
4. ย้ายพ่อแม่พันธุ์แมลงข้างปีกใสออกจากกล่องเดิมไปยังกล่องใหม่ทุกๆ 3 วัน จำนวน 6 ครั้ง
5. นำฟักทองที่มีเพลี้ยแป้งจากขั้นตอนที่ 1 ใส่ในกล่องที่มีไข่ของแมลงข้างปีกใสที่ย้ายตัวเต็มวัยออกแล้ว เพื่อเลี้ยงตัวอ่อนแมลงข้างปีกใส
6. โรยกระดาษทิชชูที่ตัดเป็นริ้วๆ ลงในกล่อง ปิดกล่องด้วยผ้าขาวบาง วางไว้ประมาณ 5-10 วัน ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนและเจริญเติบโต จนกระทั่งเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2-3 ที่สามารถนำไปใช้ควบคุมศัตรูพืชต่อไป

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนฟักทองที่ใช้เลี้ยงแมลงข้างปึกใสในแต่ละรุ่น
- จำนวนตัวอ่อนที่ได้ในแต่ละรุ่น
- คุณภาพตัวอ่อนโดยสุ่มวัดจากน้ำหนักตัวอ่อนในแต่ละรุ่น
- ต้นทุนในการผลิต

เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2561 สิ้นสุดกันยายน 2564

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองในปี 2563 ได้เพิ่มอาหารที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนแมลงข้างปึกใส คือผลฟักทองที่มีเปลือกแบ่งจากกล่องละ 1 ลูก เป็น 2 ลูก เพื่อเป็นอาหารของตัวอ่อนแมลงข้างปึกใส ทำให้ในรอบการผลิตที่ 2 และ 3 ได้จำนวนตัวเต็มวัยแมลงข้างปึกใสเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การฟักเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) การเพิ่มผลฟักทองเป็น 2 ลูก ในกล่องเลี้ยงขนาด 35x45x12 เซนติเมตร และใช้พ่อแม่พันธุ์ 400 ตัว (เพศผู้ 100: เพศเมีย 300) ทำให้ตัวอ่อนแมลงข้างปึกใสมีอาหารเพียงพอในการเจริญเติบโตมีผลในการผลิตพ่อแม่พันธุ์แมลงข้างปึกใสเพิ่มขึ้น และในรอบ 1 ปี การผลิตตั้งแต่เดือนมกราคมถึงสิงหาคม 2563 ได้จำนวนรอบการผลิตเปลือกแบ่งจำนวน 8 รุ่น

ต้นทุนเฉพาะฟักทองเปลือกแบ่งในแต่ละรุ่น (ในการเลี้ยง 5 กล่อง) และใช้ผลิตเหยื่ออาหารต่อเดือน ใช้ 40 ลูกๆ ละ 30 บาท เป็นเงิน 1,200 บาท

เอกสารอ้างอิง

- ประภัสสร เขยคำแหง รจนา ไวยเจริญ และสาทิพย์ มาลี. 2560. การพัฒนาเทคนิคการผลิตขยายแมลงข้างปึกใส *Plesiochrysa ramburi*. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม กรมวิชาการเกษตร ปี 2560.
- Mehra, B.P. 1966. Biology of *Chrysopa lacciperda* Kimmins. Journal of Bombay Natural History Society. 63: 215-219.
- Tauder, C.A., M.J. Tauder and G.S. Albuquerque. 2001. *Plesiochrysa brazileinsis* (Neuroptera: Chrysopidae): Larval Stages, Biology, and Taxonomic Relationships. Annals of the Entomological Society of America. 94: 858-865.
- Van Lenteren, J.C. 2003. Commercial availability of biological control agents. In: van Lenteren, J.C. (Ed.), Quality Control and Production of Biological Control Agents, Theory and Testing Procedures, CABI Publishing, Cambridge, MA, pp. 167-179.

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนพ่อแม่พันธุ์แมลงข้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* ที่ผลิตได้โดยใช้ตัวเต็มวัยแมลงข้างปีกใส 400 ตัวต่อกล่องต่อรุ่น (เพศผู้ 100: เพศเมีย 300) ระหว่างเดือนมกราคมถึงสิงหาคม 2563 ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ

รอบการผลิต (เดือน)	ตัวอ่อนที่ ผลิต (กล่อง)	จำนวน ฟักทอง (ลูก)	จำนวน ดักแด้	เปอร์เซ็นต์ การฟัก(%)	แมลงข้างปีกใส (ตัว)	พ่อแม่พันธุ์	
						เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)
มกราคม	5	5	853	86.87	741	319	422
กุมภาพันธ์	5	10	2,272	91.68	2,083	808	1,275
มีนาคม	5	10	2,491	91.61	2,282	1,019	1,263
เมษายน	5	10	2,878	89.89	2,587	915	1,672
พฤษภาคม	5	10	3,524	90.01	3,173	1,234	1,939
มิถุนายน	5	10	3,322	89.91	2,987	1,005	1,982
กรกฎาคม	5	10	3,048	75.03	2,287	1,025	1,262
สิงหาคม	5	10	3,118	79.76	2,487	1,102	1,385

เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีในกระเจี๊ยบเขียวแบบผสมผสาน
Integrated Application Technology of Biological Control Agent
for Control Pests of Okra

ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี นันทนัช พินศรี
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการสำรวจข้อมูลของเกษตรกรที่เพาะปลูกกระเจี๊ยบเขียวในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี และสุพรรณบุรี จำนวน 62 ราย พบว่าผู้ตอบแบบสอบถามเป็นเพศหญิงร้อยละ 75.81 เพศชายร้อยละ 24.19 มีสมาชิกในครอบครัวที่เพาะปลูกกระเจี๊ยบเขียว 1-7 คน เกษตรกรบางรายมีการจ้างแรงงานเป็นครั้งคราว เกษตรกรเป็นสมาชิกของกลุ่มสหกรณ์หรือธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตร จำนวน 26 ราย เป็นสมาชิกของกลุ่มเกษตรกรจำนวน 25 ราย แหล่งเงินทุนในการปลูกกระเจี๊ยบเขียว จากเงินกู้ของธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตรร้อยละ 32.26 ยืมเงินญาติพี่น้องร้อยละ 24.19 เงินทุนส่วนตัวร้อยละ 22.58 กู้เงินจากกองทุนหมู่บ้านร้อยละ 9.68 กู้เงินจากสหกรณ์การเกษตรร้อยละ 6.45 และกู้เงินจากพ่อค้าท้องถิ่นร้อยละ 4.48 เกษตรกรได้รับความรู้จากการบรรยาย สาธิต และฝึกอบรมเกี่ยวกับการปลูกกระเจี๊ยบเขียวจากเจ้าหน้าที่บริษัทเอกชนมากที่สุด รองลงมาได้แก่ญาติพี่น้องหรือเพื่อนบ้าน เจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตรของรัฐ และบางส่วนได้รับข้อมูลจากวิทยุ โทรทัศน์ และเอกสารเผยแพร่ พันธุ์กระเจี๊ยบเขียวที่ใช้ ได้แก่ Dwarf Green, Belle, GKRA 068 กรีนโกโรเวอร์ แมลงศัตรูที่สำคัญของกระเจี๊ยบเขียวได้แก่ เพลี้ยจักจั่นฝ้าย รองลงมาคือเพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยอ่อน หนอนกระทู้หอม และไรแดง ตามลำดับ เกษตรกรมีข้อเสนอแนะให้ภาครัฐมีการแนะนำวิธีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกระเจี๊ยบเขียวโดยชีววิธีเพื่อลดต้นทุนการผลิต ร่วมมือกับผู้ประกอบการหาสารที่มีประสิทธิภาพและไม่เป็นอันตรายกับผู้บริโภค เกษตรกรต้องการคำแนะนำการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกระเจี๊ยบเขียวโดยชีววิธี และต้องการทราบช่องทางการติดต่อหน่วยงานภาครัฐที่จำหน่ายสารชีวภัณฑ์ ต้องการให้มีการอบรมวิธีผลิตสารชีวภัณฑ์หรือต่อเชื้อ เพื่อนำไปใช้ในกรกำจัดแมลง ต้องการคำแนะนำในการปลูกกระเจี๊ยบเขียวจากภาครัฐ ต้องการให้ภาครัฐช่วยเหลือให้ราคาผลผลิตสูงขึ้น ทำแปลงทดลองกระเจี๊ยบเขียวในจังหวัดนครปฐม โดยเป็นแปลงเกษตรกรจำนวน 2 แปลง และเป็นแปลงผสมผสานเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชในกระเจี๊ยบเขียวแบบผสมผสานจำนวน 2 แปลง เมื่อตรวจนับประชากรแมลงที่ลงทำลายต้นกระเจี๊ยบเขียวพบหนอนชอนใบ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยจักจั่นฝ้าย แมลงหรีวขาว เพลี้ยแป้ง

รหัสการทดลอง 03-05-59-03-00-00-03-62

หนอนกระพุ่มผัก โดยแมลงศัตรูที่สำคัญของกระเจี๊ยบเขียวได้แก่ เพลี้ยจักจั่นฝ้าย รองลงมาคือเพลี้ยแมลงหรีวขาว ซึ่งสามารถเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสในกระเจี๊ยบเขียวได้ เมื่อพบการระบาดเกินระดับเศรษฐกิจและฉีดพ่นด้วยน้ำสบู่อัตรา 150 มิลลิกรัม/น้ำ 20 ลิตร สามารถควบคุมตัวอ่อนของเพลี้ยจักจั่น และควบคุมแมลงหรีวขาวได้ การฉีดพ่นเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* สามารถลดประชากรของเพลี้ยจักจั่นทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยได้ แต่ต้องฉีดพ่นน้ำเพิ่มความชื้นก่อนพ่นเชื้อรา การใช้สารชีวภัณฑ์ในการฉีดพ่นกระเจี๊ยบเขียวในระยะเก็บเกี่ยวมีความปลอดภัย นอกจากนี้พบศัตรูธรรมชาติ เช่น ตัวง่ามสีส้ม ตัวง่ามลายหยัก ตัวง่ามกระดก เป็นต้น รวมถึงส่งเสริมให้เกษตรกรใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาในการคลุมเมล็ดก่อนปลูก หรือฉีดพ่นในระยะต้นอ่อนเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวในกระเจี๊ยบเขียว

คำหลัก : ผสมผสาน แมลงศัตรูพืช กระเจี๊ยบเขียว

คำนำ

กระเจี๊ยบเขียว (Okra) เป็นพืชผักที่สำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดของไทย สามารถปลูกได้ทั่วไป มีแหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ในภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่แหล่งผลิตส่วนใหญ่ทั้งสองพืชจะอยู่ในภาคกลางเป็นหลัก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี พืชทั้งสองชนิดนอกจากจะผลิตเพื่อบริโภคในประเทศแล้วยังเป็นพืชส่งออกที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ดังนั้นเรื่องคุณภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะปัญหาเรื่องพิษตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค เนื่องจากพืชทั้งสองชนิดมีแมลงศัตรูพืชเข้าทำลายหลายชนิด ดังนั้นการดูแลรักษาผลผลิตจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ แมลงศัตรูพืชที่พบ ได้แก่ แมลงหรีวขาว เพลี้ยไฟ เพลี้ยจักจั่น หนอนกระพุ่มหอม หนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระพุ่มผัก เป็นต้น (ปิยะรัตน์ และคณะ, 2542)

การนำศัตรูธรรมชาติมาควบคุมแมลงศัตรูพืช เป็นวิธีที่มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและธรรมชาติ รวมถึงผลผลิต และสุขอนามัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค ข้อสำคัญการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธี เป็นองค์ประกอบสำคัญของการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน โดยอาศัยปัจจัยทางธรรมชาติ ได้แก่ แมลงศัตรูธรรมชาติจำพวก แมลงห้ำ แมลงเบียน และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลงศัตรูพืช (กองกัญและสัตววิทยา, 2544)

แมลงห้ำ (Predators) เป็นสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตอย่างอิสระ ไม่ต้องอาศัยอยู่ภายในเหยื่อ (prey) ด้วยการกินเหยื่อหรือศัตรูพืช โดยทั่วไปตัวห้ำจะกินเหยื่อได้หลายชนิด กินได้ทุกวัยและต่างชนิดกัน นอกจากนี้ตัวห้ำอีกหลายชนิดสามารถหาอาหารเสริมได้จากพืช เช่น น้ำหวานดอกไม้ เกสรดอกไม้ โดยไม่ได้ก่อความเสียหายแก่พืช แมลงห้ำส่วนมากจะกินเหยื่อในระยะตัวอ่อนในจำนวนมากๆ เพื่อให้เจริญเติบโต (รัตนา, 2544; Frank and Slosser, 1996) ตัวอย่างของแมลงห้ำ ได้แก่ มวนเพชฌฆาต มวนตัวห้ำ แมลงช้างปีกใส เป็นต้น

แมลงเบียน (Parasites) เป็นแมลงจำพวกหนึ่งที่ตัวอ่อนอาศัยและกินเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น แมลงศัตรูพืชต่างๆ แมลงเบียนส่วนใหญ่เป็นแมลงเบียนภายใน (endoparasitoids) เติบโตใน

เหยื่อ แต่ก็มีบางชนิดที่เจริญเติบโตบนเหยื่อหรือนอกตัวเหยื่อ เรียกว่า แมลงเบียนภายนอก (ectoparasitoids) ชนิดที่สำคัญได้แก่ แตนเบียนไข่ Trichogramma หรือ แตนตาแดง เป็นแมลงอยู่ในอันดับ Hymenoptera วงศ์ Trichogrammatidae มีลักษณะเป็นแมลงขนาดเล็กเมื่อโตเต็มที่มีลำตัวยาว 0.5 มม. โดยแมลงเบียนเพศเมียใช้อวัยวะวางไข่แทงลงไปไข่ของผีเสื้อ และตัวอ่อนจะเจาะดูดกินของเหลวภายในไข่ของผีเสื้อ และเจริญเติบโตจนเข้าดักแด้อยู่ภายใน ทำให้ไข่ของผีเสื้อที่ถูกเบียนนี้ตายไปในที่สุด (สฤติย์, 2544)

จุลินทรีย์กำจัดแมลง (Entomopathogen) เป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ สามารถก่อให้เกิดโรคกับแมลงชนิดต่างๆ ได้โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืช จึงได้มีการค้นคว้าวิจัยนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาใช้ประโยชน์ ปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาป้องกันกำจัดแมลงได้หลายชนิด ได้แก่ ไวรัส เอ็นพีวี แบคทีเรียบีที ไล้เดือนฝอย และราชนิดต่างๆ

การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเป็นการป้องกันกำจัดศัตรูพืชอีกวิธีหนึ่งซึ่งเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปทั้งในและต่างประเทศ เนื่องจากมีความปลอดภัยสูงทั้งต่อเกษตรกร และผู้บริโภค ผลผลิตทางการเกษตร รวมถึงไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นการนำสิ่งที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ เช่น ตัวห้ำ ตัวเบียน จุลินทรีย์กำจัดแมลงต่างๆ มาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช แต่การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น เห็นผลช้า ผลผลิตอาจมีเสียหายบ้าง เนื่องจากต้องใช้เวลาหนึ่งในการออกฤทธิ์ ต่างกับสารฆ่าแมลงที่ออกฤทธิ์เร็วและหาได้ง่ายกว่า จึงทำให้เกษตรกรนำไปใช้ในวงจำกัด แต่ในความเป็นจริงแล้ว เมื่อพิจารณาในระยะยาว การนำวิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีไปใช้อย่างต่อเนื่องแล้ว จะช่วยให้เกษตรกรได้รับผลประโยชน์ที่มากกว่า โดยการประยุกต์ใช้ด้วยหลักการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานแล้ว จะช่วยให้การกำจัดแมลงศัตรูพืชมีประสิทธิภาพมากขึ้น ลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช ช่วยลดต้นทุนที่เกิดจากการใช้สารฆ่าแมลงที่มีราคาสูงและพิษตกค้างได้เป็นอย่างดี การศึกษานี้มุ่งเน้นเพื่อแก้ปัญหาแมลงศัตรูพืชของกระเจี๊ยบเขียว ด้วยการนำการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีมาใช้แทนการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ใช้อยู่เดิม โดยใช้ตัวห้ำ ตัวเบียน และจุลินทรีย์กำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ ตามชนิดของศัตรูพืชที่ระบาดในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของพืชตลอดฤดูกาลผลิต เพื่อประเมินศักยภาพของศัตรูธรรมชาติเหล่านี้เปรียบเทียบกับวิธีปฏิบัติที่เกษตรกรใช้อยู่ โดยเกษตรกรมีส่วนร่วมในการดำเนินการ เพื่อจะได้นำไปพัฒนาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีอย่างยั่งยืนให้แก่เกษตรกรต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์บันทึกข้อมูล เช่น แบบสอบถาม ปากกา ดินสอ สมุด
2. อุปกรณ์สำรวจแมลงศัตรูพืช เช่น กระดาษ ปากกา สมุดบันทึก แวนชวย กล้องถ่ายรูป เป็นต้น

3. อุปกรณ์ควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่น ถังพ่นยา ปีกเกอร์ กระบอกตวง ไม้พาย น้ำเปล่า ถุงมือ น้ำสบู เชื้อรา *M. anisopliae* เป็นต้น

ขั้นตอนที่ 1 สำรวจสถานะการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกระเจี๊ยบเขียวและเก็บรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นของเกษตรกร

1.1 จัดทำบัญชีรายชื่อเกษตรกรผู้ปลูกกระเจี๊ยบเขียวในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี และสุพรรณบุรี แล้วสุ่มตัวอย่างเกษตรกรจำนวน 50 ราย

1.2 สร้างแบบสอบถามเกี่ยวกับการปลูกกระเจี๊ยบเขียวโดยเน้นแมลงศัตรูกระเจี๊ยบเขียวแล้วทดสอบแบบสอบถามพร้อมปรับแก้ให้เหมาะสมก่อนนำไปใช้สำรวจเกษตรกร

1.3 เก็บรวบรวมข้อมูลด้วยแบบสัมภาษณ์ โดยใช้วิธีสัมภาษณ์จากเกษตรกรผู้ปลูกกระเจี๊ยบเขียวที่สุ่มเลือกมาจากข้อ 1.1 จำนวน 50 ราย

1.4 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป เพื่อหาค่าสถิติพื้นฐาน ได้แก่ ค่าร้อยละ ค่าเฉลี่ย ค่าสูงสุด-ค่าต่ำสุด และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แล้วสรุปประเมินผลเพื่อกำหนดแนวทางการดำเนินงานและคัดเลือกพื้นที่เป้าหมายสำหรับดำเนินการต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 หลังจากที่ทราบปัญหาของแมลงศัตรูพืชในกระเจี๊ยบเขียวในขั้นตอนที่ 1 จึงได้นำปัญหามาสังเคราะห์ แล้วทำแปลงทดสอบเพื่อสังเคราะห์เทคโนโลยี โดยใช้เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดแมลงโดยชีววิธี

2.1 คัดเลือกเกษตรกรผู้ปลูกกระเจี๊ยบเขียวจากข้อ 1 จำนวน 2 ราย มาชี้แจงทำความเข้าใจโดยอธิบายรายละเอียดของโครงการ พร้อมทั้งถ่ายทอดความรู้หลักการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธี

2.2 ดำเนินการสังเคราะห์เทคโนโลยีป้องกันกำจัดแมลงโดยชีววิธีในแปลงเกษตรกรทั้ง 2 ราย โดยแบ่งแปลงของเกษตรกรในแต่ละรายออกเป็น 2 ส่วน คือ

2.2.1 แปลงสังเคราะห์ ดำเนินงานโดยใช้พื้นที่แปลงละ 0.5-1 ไร่ จำนวน 2 แปลง อยู่ในจังหวัดนครปฐม โดยทำการตรวจนับแมลงศัตรูพืชทุกสัปดาห์ เมื่อพบแมลงศัตรูพืชให้ปฏิบัติดังนี้

เพลี้ยไฟหรือเพลี้ยจักจั่น เมื่อพบมากกว่า 1 ตัว/ใบ

- ปลอ่ยมวนตัวห้า *Orius* sp. อัตรา 800-1,000 ตัวต่อไร่
- หรือพ่นน้ำสบูกำจัดแมลง อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

แมลงหวี่ขาว เมื่อพบตัวเต็มวัยหรือตัวอ่อนในแปลง

- ปลอ่ยมวนตัวห้า *Orius* sp. อัตรา 800-1,000 ตัวต่อไร่
- หรือพ่นน้ำสบูกำจัดแมลง อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

หนอนกระทู้ผัก

- สำรวจกลุ่มไข่หนอนกระทู้ผักทุกสัปดาห์ เมื่อพบกลุ่มไข่หนอนมากกว่า 1 กลุ่มต่อ 2 ต้น หลังจากนั้นประมาณ 3 วัน ให้พ่นด้วยแบคทีเรียบีทีอัตรา 60 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือพ่นด้วยเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก อัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร เนื่องจากหนอนจะฟักออกจากไข่ประมาณ 2-3 วัน หากพบประชากรหนอนกระทู้ผักมากกว่า 1 ตัวต่อ 2 ต้น ให้ปลอ่ยมวนเพชฌฆาตด้วย

3 อัตรา 3,200 ตัวต่อไร่ สลับกับการพ่นด้วยแบคทีเรียบีทีอัตรา 60 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือพ่นด้วยเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นติดต่อกัน 2 ครั้ง ทุกสัปดาห์ หยุดพ่นสารก่อนเก็บเกี่ยว 1 วัน

หนอนกระทู้หอม

- สำรวจกลุ่มไข่หนอนกระทู้หอมทุกสัปดาห์ เมื่อพบกลุ่มไข่หนอนมากกว่า 1 กลุ่มต่อต้น หลังจากนั้นประมาณ 3 วัน ให้พ่นด้วยแบคทีเรียบีทีอัตรา 60 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือพ่นด้วยเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมอัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร เนื่องจากหนอนจะฟักออกจากไข่ประมาณ 2-3 วัน

- หากพบว่าประชากรหนอนกระทู้หอมเกิน 1 ตัวต่อต้น จึงเริ่มพ่นด้วยแบคทีเรียบีทีอัตรา 60 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือพ่นด้วยเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม อัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นติดต่อกัน 2 ครั้ง ทุกสัปดาห์ หยุดพ่นสารก่อนเก็บเกี่ยว 1 วัน

หนอนเจาะสมอฝ้าย

- สำรวจไข่หนอนเจาะสมอฝ้ายทุกสัปดาห์ เมื่อพบไข่หนอนมากกว่า 1 ฟองต่อต้น ให้เริ่มปล่อยแตนเบียนไข่ *Trichogramma* spp. อัตรา 40,000-60,000 ตัวต่อไร่ จำนวน 4-6 ครั้งต่อฤดู

- หากพบหนอนมากกว่า 1 ตัวต่อ 2 ต้น ให้พ่นเชื้อบีทีในอัตรา 60 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือพ่นเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนเจาะสมอฝ้าย อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นติดต่อกัน 2 ครั้ง ทุกสัปดาห์ สลับกับการปล่อยมวนเพชฌฆาตด้วย 3 อัตรา 3,200 ตัวต่อไร่ เมื่อพบปริมาณหนอนในแปลงสูง

การปฏิบัติดูแลป้องกันกำจัดโรคพืชและวัชพืชในแปลงสังเคราะห์ให้ปฏิบัติตามคำแนะนำในเอกสารระบบการจัดการคุณภาพ : GAP กระจับเขียว ปี 2550 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์การเกษตร

2.2.2 แปลงเกษตรกร ใช้พื้นที่ของเกษตรกรรายเดียวกับที่ใช้เป็นแปลงสังเคราะห์ โดยใช้พื้นที่ขนาดแปลงละ 1 ไร่ จำนวน 2 แปลงเช่นเดียวกัน แต่ให้เกษตรกรเป็นผู้ดูแลปฏิบัติตามวิธีที่ตนเองปฏิบัติอยู่เดิม โดยทำการตรวจนับแมลงศัตรูพืชในแปลงทุกสัปดาห์

การเก็บข้อมูล

- บันทึกรายละเอียดการใช้ศัตรูธรรมชาติและการใช้สารเคมีกำจัดแมลงของเกษตรกร ทุกครั้งตลอดระยะเวลาทดลอง

- บันทึกผลผลิตที่ได้ทั้งหมดจากแปลงสังเคราะห์และแปลงเกษตรกรเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบแต่ละปัจจัยระหว่างแปลงสาธิตกับแปลงเกษตรกร โดยใช้สถิติทดสอบ T-test ด้วยโปรแกรมสถิติ

เวลาและสถานที่ : ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเกษตรกรในเขตภาคกลาง

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจข้อมูลของเกษตรกรที่เพาะปลูกกระเจี๊ยบเขียวในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี และสุพรรณบุรี โดยสอบถามข้อมูลเบื้องต้น เช่น พื้นที่ปลูก ระยะเวลาในการปลูก การเก็บเกี่ยว สายพันธุ์ ปัญหาที่พบ แมลงศัตรูพืช วิธีการจัดการศัตรูพืช ราคา สถานที่จำหน่ายผลผลิต เป็นต้น จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการจัดทำแบบสอบถาม และติดต่อกับกลุ่มเกษตรกร เพื่อเตรียมแจกจ่ายแบบสอบถามให้กับเกษตรกรจำนวน 62 ราย จากการสำรวจข้อมูลเกษตรกรผู้ปลูกกระเจี๊ยบเขียวพบว่าผู้ตอบแบบสอบถามเป็นเพศหญิงร้อยละ 75.81 เพศชายร้อยละ 24.19 มีอายุต่ำกว่าหรือเท่ากับ 30 ปี ร้อยละ 3.23 อายุ 31-40 ปี ร้อยละ 16.13 อายุ 41-50 ปี ร้อยละ 35.48 และอายุ 51 ปีขึ้นไป ร้อยละ 45.16 จบการศึกษาระดับประถมศึกษาร้อยละ 74.19 ระดับมัธยมศึกษาร้อยละ 22.58 ระดับปวช./ปวส. ร้อยละ 1.61 และระดับปริญญาตรีร้อยละ 1.61 มีสมาชิกในครอบครัวที่เพาะปลูกกระเจี๊ยบเขียว 1-7 คน เกษตรกรบางรายมีการจ้างแรงงานเป็นครั้งคราว

เกษตรกรผู้ปลูกกระเจี๊ยบเขียวเป็นสมาชิกของกลุ่มสหกรณ์หรือธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตรจำนวน 26 ราย เป็นสมาชิกของกลุ่มเกษตรกรจำนวน 25 ราย แหล่งเงินทุนในการปลูกกระเจี๊ยบเขียวจากเงินกู้ของธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตรร้อยละ 32.26 ยืมเงินญาติพี่น้องร้อยละ 24.19 เงินทุนส่วนตัวร้อยละ 22.58 กู้เงินจากกองทุนหมู่บ้านร้อยละ 9.68 กู้เงินจากสหกรณ์การเกษตรร้อยละ 6.45 และกู้เงินจากพ่อค้าท้องถิ่นร้อยละ 4.48

ที่ผ่านมาเกษตรกรเคยได้รับความรู้จากการบรรยาย สาธิต และฝึกอบรมเกี่ยวกับการปลูกกระเจี๊ยบเขียวจำนวน 0-10 ครั้ง โดยได้รับข้อมูลข่าวสารเกี่ยวกับการปลูกกระเจี๊ยบเขียวจากเจ้าหน้าที่บริษัทเอกชนมากที่สุด รองลงมาได้แก่ญาติพี่น้องหรือเพื่อนบ้าน เจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตรของรัฐ และบางส่วนได้รับข้อมูลจากวิทยุ โทรทัศน์ และเอกสารเผยแพร่

การใช้ประโยชน์ในพื้นที่ก่อนปลูกกระเจี๊ยบเขียวส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ปลูกพืชผัก บางแปลงมีการปลูกพืชชนิดอื่นๆ เช่น อ้อย ข้าวโพด ไม้ผล หน่อ และบางแปลงเป็นป่าหรือพื้นที่รกร้าง

พันธุ์กระเจี๊ยบเขียวที่ใช้ ได้แก่ Dwarf Green, Belle, GKRA 068 กรีนโกรเวอร์ โดยส่วนใหญ่บริษัทที่รับซื้อกระเจี๊ยบเขียวจะเป็นผู้จัดหาเมล็ดพันธุ์มาขายให้กับเกษตรกร เนื่องจากคุณสมบัติของผลผลิตกระเจี๊ยบเขียวที่ได้จะตรงกับความต้องการ เช่น สี ขนาดผลกระเจี๊ยบเขียว เกษตรกรส่วนใหญ่ขายผลผลิตกระเจี๊ยบเขียวให้กับบริษัทรับซื้อซึ่งส่งออกไปขายในต่างประเทศ

แมลงศัตรูที่สำคัญของกระเจี๊ยบเขียวได้แก่ เพลี้ยจักจั่นฝ้าย รองลงมาคือเพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยอ่อน หนอนกระทู้หอม และไรแดง ตามลำดับ การป้องกัน

กำจัดแมลงส่วนใหญ่ฉีดพ่นสารเคมีที่บริษัทรับซื้อแนะนำหรืออนุญาตให้ใช้เนื่องจากผลผลิตกระเจี๊ยบเขียวต้องผ่านการตรวจสอบสารพิษตกค้างก่อนส่งออก หากไม่ปฏิบัติตามจะไม่สามารถขายผลผลิตให้กับทางบริษัทได้

ทัศนคติของเกษตรกรผู้ปลูกกระเจี๊ยบเขียวในด้านความเข้าใจในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกระเจี๊ยบเขียวโดยชีววิธี การนำวิธีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกระเจี๊ยบเขียวโดยชีววิธีไปใช้ในแปลงปลูก การได้รับความรู้เกี่ยวกับการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกระเจี๊ยบเขียวโดยชีววิธีจากหน่วยงานราชการ การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูโดยชีววิธีจะช่วยเพิ่มราคาผลผลิตให้ดีขึ้น ช่วยลดต้นทุนการผลิต และโครงการนี้สอดคล้องตามความต้องการและความคาดหวังของเกษตรกรในระดับปานกลาง

เกษตรกรมีข้อเสนอแนะให้ภาครัฐมีการแนะนำวิธีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกระเจี๊ยบเขียวโดยชีววิธีเพื่อลดต้นทุนการผลิต ร่วมมือกับผู้ประกอบการหาสารที่มีประสิทธิภาพและไม่เป็นอันตรายกับผู้บริโภค เกษตรกรต้องการคำแนะนำการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกระเจี๊ยบเขียวโดยชีววิธีและต้องการทราบช่องทางการติดต่อหน่วยงานภาครัฐที่จำหน่ายสารชีวอินทรีย์ ต้องการให้มีการอบรมวิธีผลิตสารชีวอินทรีย์หรือต่อเชื้อ เพื่อนำไปใช้ในการกำจัดแมลง ต้องการคำแนะนำในการปลูกกระเจี๊ยบเขียวจากภาครัฐ ต้องการให้ภาครัฐช่วยเหลือให้ราคาผลผลิตสูงขึ้น

ทำแปลงทดลองโดยปลูกกระเจี๊ยบเขียวในจังหวัดนครปฐม โดยเป็นแปลงเกษตรกรขนาด 0.5 ไร่ จำนวน 2 แปลง และเป็นแปลงผสมผสานเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชในกระเจี๊ยบเขียวแบบผสมผสานขนาด 0.5 ไร่ จำนวน 2 แปลง เนื่องจากเกษตรกรต้องรอเมล็ดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวจากบริษัทธานียาม่า เพื่อปลูกในช่วงเวลาที่บริษัทกำหนด เนื่องจากการปลูกกระเจี๊ยบเขียวเพื่อส่งออก เมื่อทำการสำรวจและควบคุมประชากรแมลงโดยใช้กับดักกาวเหนียวสีฟ้า พบเพลี้ยจักจั่น เพลี้ยไฟ ผีเสื้อ แมลงวัน เพลี้ยกระโดด เป็นต้น และพบศัตรูธรรมชาติหลายชนิด เช่น ตัวง่าสัสสม แมลงหางหนีบ แมลงช้างปีกใส ตัวก้นกระดก แตนเบียนขนาดเล็ก เมื่อตรวจนับประชากรแมลงที่ลงทำลายต้นกระเจี๊ยบเขียวพบหนอนชอนใบ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยจักจั่นฝ้าย แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้ง หนอนกระทู้ผัก โดยแมลงศัตรูที่สำคัญของกระเจี๊ยบเขียวได้แก่ เพลี้ยจักจั่นฝ้าย รองลงมาคือเพลี้ยแมลงหวี่ขาว ซึ่งสามารถเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสในกระเจี๊ยบเขียวได้ เมื่อพบการระบาดเกินระดับเศรษฐกิจและฉีดพ่นด้วยน้ำสบู่อัตรา 150 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร สามารถควบคุมตัวอ่อนของเพลี้ยจักจั่น และควบคุมแมลงหวี่ขาวได้ การฉีดพ่นเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถลดประชากรของเพลี้ยจักจั่นทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยได้ แต่ต้องพ่นในช่วงเย็นหลัง 16.00 น. สภาพแปลงต้องมีความชื้นสูงด้วยการรดน้ำหรือฉีดพ่นน้ำเพิ่มความชื้นก่อนพ่นเชื้อรา การใช้สารชีวภัณฑ์ในการฉีดพ่นกระเจี๊ยบเขียวในระยะเก็บเกี่ยวมีความปลอดภัย ผักกระเจี๊ยบเขียวถูกนำไปตรวจสอบสารพิษตกค้างก่อนส่งออก ไม่พบการตกค้างของสารพิษ สามารถส่งออกได้ตามปกติ เกษตรกรมีความพึงพอใจต่อการใช้สารชีวภัณฑ์ นอกจากนี้พบหนอนเจาะยอด และหนอนเจาะฝักกระเจี๊ยบเขียวต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจจึงไม่ดำเนินการป้องกันกำจัด แต่มีการตรวจนับประชากรแมลงทุกสัปดาห์เพื่อติดตามการระบาด นอกจากนี้พบศัตรูธรรมชาติ เช่น

ด้วงเต่าสีส้ม ด้วงเต่าลายหยัก ด้วงก้นกระดก เป็นต้น รวมถึงส่งเสริมให้เกษตรกรใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาในการคลุมเมล็ดก่อนปลูก หรือฉีดพ่นในระยะต้นอ่อนเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวในกระเจี๊ยบเขียว

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจข้อมูลเกษตรกรผู้ปลูกกระเจี๊ยบเขียวในจังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี และสุพรรณบุรี ด้วยแบบสอบถามจำนวน 62 ราย พบว่าการใช้ประโยชน์ในพื้นที่ก่อนปลูกกระเจี๊ยบเขียวส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ปลูกพืชผัก บางแปลงมีการปลูกพืชชนิดอื่นๆ เช่น อ้อย ข้าวโพด ไม้ผล ที่นา และบางแปลงเป็นป่าหรือพื้นที่รกร้าง พันธุ์กระเจี๊ยบเขียวที่ใช้ ได้แก่ Dwarf Green, Belle, GKRA 068 กรีนโกรเวอร์ แมลงศัตรูที่สำคัญของกระเจี๊ยบเขียวได้แก่ เพลี้ยจักจั่นฝ้าย รองลงมาคือเพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยอ่อน หนอนกระทู้หอม และไรแดง ตามลำดับ การป้องกันกำจัดแมลงส่วนใหญ่ฉีดพ่นสารเคมีที่บริษัทรับซื้อแนะนำหรืออนุญาตให้ใช้เนื่องจากผลผลิตกระเจี๊ยบเขียวต้องผ่านการตรวจสอบสารพิษตกค้างก่อนส่งออก

สำรวจแปลงกระเจี๊ยบเขียวของเกษตรกรในจังหวัดนครปฐม จำนวน 2 ราย พบการระบาดของแมลงศัตรูพืช เช่น แมลงหวี่ขาว เพลี้ยจักจั่นฝ้าย เพลี้ยอ่อน เพลี้ยแป้ง หนอนเจาะยอด ฉีดพ่นน้ำสบู่ และเชื้อรา *M. anisopliae* เมื่อพบการระบาดของเพลี้ยจักจั่นฝ้ายเกินระดับเศรษฐกิจ พบว่าสามารถลดจำนวนแมลงศัตรูพืช ได้แก่ เพลี้ยจักจั่นฝ้าย เพลี้ยอ่อน และแมลงหวี่ขาวได้ นอกจากนี้พบศัตรูธรรมชาติ เช่น ด้วงเต่าสีส้ม ด้วงเต่าลายหยัก ด้วงก้นกระดก เป็นต้น รวมถึงส่งเสริมให้เกษตรกรใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาในการคลุมเมล็ดก่อนปลูก หรือฉีดพ่นในระยะต้นอ่อนเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวในกระเจี๊ยบเขียว

เอกสารอ้างอิง

- กองกัญและสัตววิทยา. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 317 หน้า.
- นางลักษณ์ วิรัชชัย และสุวิมล ว่องวาณิช. 2545. การสังเคราะห์งานวิจัยทางการศึกษาด้วยการวิเคราะห์ทอภิมานและการวิเคราะห์เนื้อหา. สำนักงานคณะกรรมการการศึกษาแห่งชาติ สำนักนายกรัฐมนตรี กรุงเทพฯ.
- ปิยรัตน์ เขียนมีสุข กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ นงพร กิจบำรุง จักรพงศ์ พิริยพล ศรีสุตา ไท่ทอง สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมัน ลัดดาวัลย์ อินทรสังข์ อรุภาพร ใจเพชร ศรีจันทรรจ พิษิตสุวรรณชัย สมรวย รุ่งรัตนาวรี และสังจะ ประสงค์ทรัพย์. 2542. แมลงศัตรูผัก. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 97 หน้า
- รัตนา นชะพงษ์. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงห้ำ. ใน การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. น. 87-110.

- รัตนา นชะพงษ์. 2548. อนุกรมวิธานมวนในสกุล *Sycanus* และ *Polytoxus* วงศ์ Reduviidae และ การเก็บรักษา. รายงานผลการวิจัยฉบับย่อ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- วัชรีย์ สมสุข และวิไลวรรณ เวชยันต์. 2547. ประสิทธิภาพการเข้าทำลายหนอนผีเสื้อของไล่เดือนฝอย ศัตรูแมลง. ใน การประชุมวิชาการประจำปี 2547 ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์ แห่งชาติ. 22-25 มิถุนายน 2547 ณ โรงแรมโนโวเทล โคลาเรีย ริมเพ อ.แกลง จ.ระยอง.
- วัชรีย์ สมสุข และวิไลวรรณ เวชยันต์. 2547. ประสิทธิภาพการเข้าทำลายหนอนผีเสื้อของไล่เดือนฝอย ศัตรูแมลง. ใน การประชุมวิชาการประจำปี 2547 ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์ แห่งชาติ. 22-25 มิถุนายน 2547 ณ โรงแรมโนโวเทล โคลาเรีย ริมเพ อ.แกลง จ.ระยอง.
- สกลิต ปฐมรัตน์. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา. ใน การควบคุม แมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. น. 65-86.
- สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี อิศเรศ เทียนทัต และภัทรพร สรรพนุเคราะห์. 2556. การควบคุมแมลงศัตรูพืช ด้วยไวรัส เอ็นพีวี. ใน เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตร แมลง-สัตว์ศัตรูพืชและการป้องกัน กำจัด ครั้งที่ 16. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 202 หน้า
- สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น อูราพร หนูนารถ สมรวัย รวมชัยอภิกุล และศรีจันทร์ ศรีจันทร์. 2554. แมลง ศัตรูผัก เห็ด และไม้ดอก. กลุ่มบริหารศัตรูพืช/กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการ อารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- อัจฉรา ตันติโชดก. 2537. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย. หน้า 9-37. ใน : การควบคุม แมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตว วิทยา และสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่. กรมวิชาการเกษตร.
- อุทัย เกตุนุติ และอัจฉรา ตันติโชดก. 2537. การใช้เชื้อไวรัส NPV ควบคุมหนอนกระทู้ออมบน ดาวเรือง. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยประจำปี 2537. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทาง ชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 65-71.
- อุทัย เกตุนุติ อัจฉรา ตันติโชดก และไพศาล รัตเสถียร. 2538. การใช้เชื้อไวรัส NPV ควบคุมหนอน เจาะสมอฝ้ายในองุ่น. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยประจำปี 2538. กลุ่มงานวิจัยการปราบ ศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- อุทัย เกตุนุติ. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส NPV. น. 141-177. ใน เอกสารวิชาการ การ ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี เพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการ เกษตร พิมพ์ที่โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ.
- อุทัย เกตุนุติ อัจฉรา ตันติโชดก จารุวัฒน์ แต่กุล และพิมพ์พร นันทะ. 2543. การพัฒนาการผลิตไวรัส NPV ปัญหาและแนวทางแก้ไข. การประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ประจำปี 2543. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 543-559.

- Buecher, E.J. and I. Popiel. 1989. Liquid culture of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. *Journal of Nematology* 21(4): 500-504.
- Cooper, H.M. and L.V. (Eds.) Hedges. (1994). *The handbook of research synthesis*. New York: The Russell Sage Foundation.
- Dittrich, V., S. Uk, and G.H. Ernst. 1990. Chemical control and insecticide resistance of whiteflies. Pp. 263-285. In D. Gerling (ed.) *Whiteflies: Their Bionomics, Pest Status and Management*. Intercept Ltd.
- El-Guidny, M.A., S.M. Madi, M.E. Keddis, Y.H. Issa and M.M. Abdel-Sattar. 1982. Development of resistance to pyrethroids in field populations of the Egyptian Cotton Leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *International Pest Control* 124: 6-11.
- Entwistle, P.F. 1998. A world survey of virus control of insect pests, p.186-201 *In* *Insect viruses and pest management* edits: Frances R. Hunter-Fujita, Philip F. Entwistle, Hugh F. Evans and Norman E. Crook.
- Frank, W.A. and J.E. Slosser. 1996. *An Illustrated Guide To The Predaceous Insects of the Northern Texas Rolling Plains*. Texas Agricultural Experiment Station.
- Friendman, M.J. 1990. Commercial production and development, pp. 153-173. *In*: Gaugler, R.A., and Kaya, H.K. (eds.) *Entomopathogenic Nematodes in Biological control*. Boca Raton, Florida CRC Press
- Hansen, E.A., J.E. Funderburk, S.R. Reitz, S. Ramachandran, J.E. Eger and H. Mcauslane. 2003. Within-plant distribution of *Frankliniella* species (Thysanoptera: Thripidae) and *Orius insidiosus* (Heteroptera: Anthocoridae) ub field peper. *Environ. Entomol.* 32(5): 1035-1044.
- Mead, F.W. 2001. Big-Eyed Bugs, *Geocoris* spp. (Insecta: Hemiptera Lygaeidae). Available Source: [http:// entomology. ifas. Ufl./creatures](http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures). December 16, 2013.
- Mound, L.A. and S.H. Helsey. 1978. *Whitefly of the World; A systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) wih host plant and natural enemy data*. British Museum (Natural History) and John Wiley & Sons. Chichester. 340 pp.
- Sweet II, M.H. 2000. Economic importance of predation big-eyed bugs (Geocoridae). *In* *Heteroptera of economic importance*. Schaefer, C.W. and A.R. Panizzi (eds.) pp. 713-724. CRCPress, New York.
- 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).

Tavella L., A. Alma, A. Conti and A. Arzone. 1996. Evaluation of the effectiveness of *Orius* spp. In controlling *Frankliniella occidentalis*. *Acta Horticulturae*, 431: 499-506.

Wood, B.J. 1982. Progressive the Control of Tropical field rats. *In*. Proc. Intl. Conf. Pl. Prot. In Tropiccs, eds. K.L.Heong, B.S.Lee, T.M.Lin, C.H.Teoh, Ibrahim, M.Y. p423-448.

Yasunaga, T. and S. Miyamoto. 1993. Three anthocorid species (Hemiptera: Anthocoridae), Predator of *Thrips palmi* (Thysanoptera) in eggplant gardens of Thnailand. *Appl. Entomol Zool.* 28(2): 232-277.



Figure 1 Cotton leafhopper



Figure 2 Insects inspection



Figure 3 Spray for insects control

ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคต้นเน่าแห้งของกล้วยไม้
สาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Efficacy of Fungicides for Control of Orchid Stem Rot Disease
Caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc.

สุณิรัตน์ สีมะเต็อ อมรรักษ์ คัดใจเดียว พงนา ตระกูลสุขรัตน์ ชนินทร ดวงสอาด
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The experiment was conducted to determine the efficacy of some fungicides to control orchid stem rot disease caused by *Sclerotium rolfsii*. The two experiments were conducted at Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok. during June - September 2020. The experiment was designed as RCB with each four replications of eight treatments. The treatments consisted of carboxin 75% WP at rate 15 g/20 L of water, tolclofos-methyl 50% WP at rate 20 g/20 L of water, etridiazole 24% W/V EC at rate 20 ml/20 L of water, etridiazole + quintozone 6% + 24% W/V EC at rate 40 ml/20 L of water, penthiopyrad 20% W/V SC at rate 20 ml/20 L of water, iprodione 50% WP at rate 30 g/20 L of water, flutriafol 12.5% W/V SC at rate 30 ml/20 L of water, and water spraying (control treatment). The fungicides were sprayed firstly after 2 days *S. rolfsii* inoculation. Spraying of fungicides was done repeatedly 5 days for 4 times. The result of two trials indicated that carboxin 75% WP at rate 15 g/20 L of water was the best effective fungicide for control orchid stem rot disease and followed by tolclofos-methyl 50% WP at rate 20 g/20 L of water, penthiopyrad 20% W/V SC at rate 20 ml/20 L of water and iprodione 50% WP at rate 30 g/20 L of water, respectively. The cost of use those fungicides were 19.50, 22.80, 78.00 and 28.20 THB/20 liters solution of fungicide, respectively. However, all tested fungicides have not showed a phytotoxicity to orchid plant.

Keywords : chemical control, stem rot disease, orchid, *Sclerotium rolfsii*

รหัสการทดลอง 03-32-60-01-02-00-38-62

บทคัดย่อ

ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการป้องกันกำจัดโรคต้นเน่าแห้งของกล้วยไม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* จำนวน 2 แปลงทดลอง ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ ดำเนินการระหว่างเดือนมิถุนายน – กันยายน 2563 วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ มี 8 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีพ่นสาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร etridiazole 24% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร etridiazole+quintozene 6% + 24% W/V EC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ flutriafol 12.5% W/V SC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร โดยมีกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ พ่นสารจำนวน 4 ครั้ง ห่างกันทุก 5 วัน ผลการทดลองทั้งสองแปลง พบว่า carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคต้นเน่าแห้งในกล้วยไม้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ถัดมา คือ iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร โดยมีต้นทุนการใช้สาร 19.50 22.80 78.00 และ 28.20 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร ตามลำดับ และทุกกรรมวิธีที่พ่นสารทดลองไม่พบความเป็นพิษต่อพืช

คำหลัก : สารป้องกันกำจัดโรคพืช, โรคต้นเน่าแห้ง, กล้วยไม้, *Sclerotium rolfsii*

คำนำ

กล้วยไม้ (Orchid) เป็นพืชวงศ์ Orchidaceae มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีมูลค่าการส่งออกสูงประมาณ 90% ของมูลค่าการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับ หรือประมาณ 3,000 ล้านบาท และประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกดอกกล้วยไม้เขตร้อนมากเป็นอันดับ 1 ของโลก ปริมาณการส่งออกมากกว่า 80.23% ส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้สกุลหวาย รองลงมา คือ สกุลม็อคคาร่า อะแรนด้า อะแรนเธอร่า อะแรคนิส ออนซิเดียม แวนด้า และซิมบิเดียม ส่วนที่เหลืออีก 19.77% เป็นการส่งออกต้นกล้วยไม้ ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ฟาแลนนอพซิส และซิมบิเดียม ตลาดส่งออกที่สำคัญ แบ่งเป็น ตลาดเอเชีย ได้แก่ ญี่ปุ่น จีน และเกาหลีใต้ ตลาดยุโรป ได้แก่ อิตาลี และเนเธอร์แลนด์ ส่วนตลาดอื่น ๆ คือ สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย สำหรับคู่แข่งที่สำคัญ คือ มาเลเซีย และสิงคโปร์ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) พื้นที่ปลูกกล้วยไม้ในประเทศไทย ในปี 2561 มี 21,631 ไร่ และผลผลิต 48,145 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) แหล่งปลูกกล้วยไม้ที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ กรุงเทพมหานคร นนทบุรี นครปฐม ราชบุรี และสมุทรสาคร รวมถึงจังหวัดกาญจนบุรี ปทุมธานี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา และชลบุรี เนื่องจากมีสภาพภูมิอากาศเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ มีแหล่งน้ำที่สมบูรณ์ และการคมนาคมขนส่งสะดวก (จินตน์กานต์, 2556) ปัญหาหนึ่งที่

สำคัญของการผลิตกล้วยไม้ คือ การเกิดโรคต้นเน่าแห้ง ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc. โรคสามารถเข้าทำลายกล้วยไม้ได้หลายสกุล เช่น แวนด้า หวาย ออนซิเดียม ฟาแลนอปซิส และกล้วยไม้ดินบางชนิด แพร่ระบาดง่ายและเกิดความเสียหายมากในฤดูฝน กล้วยไม้จะแสดงอาการใบเหลือง ร่วง หากอาการรุนแรงจะทำให้ต้นเน่าและแห้งตาย จะพบเส้นใยสีขาวของเชื้อราปกคลุมบริเวณโคนต้น เชื้อราสร้างเม็ด sclerotium ลักษณะกลมสีน้ำตาลคล้ายเมล็ดผักกาด ที่บริเวณรากและลำต้น หรือบริเวณที่เชื้อเข้าทำลาย ซึ่งทนต่อการทำลายของสารเคมีและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ทำให้มีชีวิตอยู่ในเศษซากพืช และในดินได้เป็นเวลานาน ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตกล้วยไม้เป็นอย่างมาก (ธีระและปราณี, 2517; กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2553) จึงควรรหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งการป้องกันกำจัดโรคโดยใช้สารเคมีเป็นวิธีหนึ่งที่ได้ผลดี เห็นผลเร็ว และปัจจุบันได้มีการพัฒนาและผลิตสารป้องกันกำจัดโรคพืชใหม่หลายชนิด บางชนิดมีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดโรคและมีพิษตกค้างต่ำ ดังนั้นจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการป้องกันกำจัดโรคต้นเน่าแห้งของกล้วยไม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfsii* เพื่อให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพสำหรับเป็นคำแนะนำในการป้องกันกำจัดโรคต้นเน่าแห้งของกล้วยไม้ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นกล้วยไม้ สกุลหวาย พันธุ์บอม
2. เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรคต้นเน่าแห้งของกล้วยไม้
3. อาหารเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA) และ เมล็ดข้าวฟ่าง
4. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานเลี้ยงเชื้อ cork borer และเข็มเขี่ย
5. อุปกรณ์การเกษตร เช่น กระจ่างปลูกพืช กาบมะพร้าวสับ และเครื่องพ่นสารสะพាយหลังแบบวัดแรงดันได้
6. สารป้องกันกำจัดโรคพืชที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ carboxin 75% WP tolclofos-methyl 50% WP etridiazole 24% W/V EC etridiazole+ quinzoxifen 6% + 24% W/V EC penthiopyrad 20% W/V SC iprodione 50% WP และ flutriafol 12.5% W/V SC
7. อุปกรณ์การตวง วัด และเครื่องชั่งสาร
8. ป้ายแสดงชื่อซ้ำและกรรมวิธีทดลอง
9. อุปกรณ์สำหรับการบันทึกข้อมูล

วิธีการ

1. เตรียมพืชทดสอบ

เตรียมต้นกล้วยไม้สกุลหวาย พันธุ์บอม ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว ใช้กาบมะพร้าวเป็นวัสดุปลูก อายุ 5-6 เดือน จำนวน 320 ต้น ดูแลรดน้ำวันละ 2 ครั้ง ในช่วงเช้าและเย็น

2. เตรียมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรค

เลี้ยงเชื้อรา *S. rolfsii* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดวงอาหารบริเวณส่วนปลายเส้นใยของเชื้อรา ย้ายชิ้นวงเชื้อราลงเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างหุงสุกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยบรรจุข้าวฟ่างหุงสุก 300 กรัม ใส่เชื้อจำนวน 3 ชิ้น บ่มที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งเชื้อราจะเจริญเต็มบนเมล็ดข้าวฟ่าง จึงนำไปใช้ทดสอบ

3. ทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการป้องกันกำจัดโรคต้นเน่าแห้งของกล้วยไม้

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block (RCB) จำนวน 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธี มี 10 ต้นต่อซ้ำ กรรมวิธีการทดลอง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	พ่นสาร carboxin 75% WP	อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2	พ่นสาร tolclofos-methyl 50% WP	อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3	พ่นสาร etridiazole 24% W/V EC	อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4	พ่นสาร etridiazole+quintozene 6% + 24% W/V EC	อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5	พ่นสาร penthiopyrad 20% W/V SC	อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6	พ่นสาร iprodione 50% WP	อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7	พ่นสาร flutriafol 12.5% W/V SC	อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 8	พ่นน้ำเปล่า (กรรมวิธีควบคุม)	

- ปลูกเชื้อรา *S. rolfsii* สาเหตุโรค โดยใส่เชื้อราในรูปเส้นใยที่เจริญบนข้าวฟ่างที่เตรียมไว้ตามข้อ 2 จำนวน 2 กรัม บริเวณโคนต้นกล้วยไม้ ที่เตรียมจากข้อ 1 อายุ ประมาณ 5-6 เดือน รดน้ำตามปกติ วันละ 2 ครั้ง

- พ่นสารทดลองตามกรรมวิธีที่กำหนดด้วยเครื่องพ่นสารสะพายหลังแบบวัดแรงดันได้ โดยพ่นสารลงบริเวณโคนต้นกล้วยไม้ให้ชุ่มทั่ววัสดุปลูก พ่นสารครั้งแรก หลังปลูกเชื้อ 2 วัน พ่นสารจำนวน 4 ครั้ง ห่างกันทุก 5 วัน

- ประเมินการเกิดโรคของกล้วยไม้ ก่อนพ่นสารทดลองทุกครั้ง และหลังจากพ่นสารทดลองครั้งสุดท้ายที่ 5, 10, 20 และ 30 วัน โดยนับและบันทึกจำนวนต้นกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคต้นเน่าแห้ง คือ ต้นที่มีอาการใบเหลือง เน่า หรือต้นตาย และต้นปกติ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และวิเคราะห์ผลทางสถิติ เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

- บันทึกผลกระทบของสารทดลองต่อพืช

- คำนวณต้นทุนการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนต้นกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคต้นเน่าแห้ง และต้นปกติ
- บันทึกผลกระทบของสารทดลองต่อพืช
- บันทึกต้นทุนการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2563

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการป้องกันกำจัดโรคต้นเน่าแห้งของกล้วยไม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc. จำนวน 2 แปลงทดลอง ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

แปลงทดลองที่ 1 ดำเนินการระหว่างเดือนมิถุนายน – สิงหาคม 2563 (ตารางที่ 1)

ก่อนพ่นสารครั้งที่ 1 และ 2 ทุกกรรมวิธีต้นกล้วยไม้ไม่แสดงอาการโรค แต่พบเชื้อรา *S. rolfsii* เจริญบนวัสดุปลูกและบริเวณโคนต้นกล้วยไม้

ก่อนพ่นสารครั้งที่ 3 และ 4 พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากัน คือ 20.00 ซึ่งต่ำกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 65.00 ในขณะที่กรรมวิธีพ่นสาร etridiazole 24% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร สาร etridiazole+quintozene 6% + 24% W/V EC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร สาร iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ สาร flutriafol 12.5% W/V SC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 42.50, 60.00, 47.50 และ 65.00 ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า

หลังพ่นสารครั้งสุดท้าย (ครั้งที่ 4) ที่ 5 วัน พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 75.00 โดยกรรมวิธีพ่นสาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุด คือ 25.00 รองลงมาได้แก่ tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม้มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 27.50 และ 30.00 ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และถัดมา คือ iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม้มี

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 50.00 ในขณะที่กรรมวิธีพ่นสาร etridiazole 24% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร etridiazole+quintozene 6% + 24% W/V EC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ flutriafol 12.5% W/V SC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 57.50 60.00 และ 67.50 ตามลำดับ ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า

หลังพ่นสารครั้งสุดท้าย (ครั้งที่ 4) ที่ 10, 20 และ 30 วัน พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 80.00 โดยกรรมวิธีพ่นสาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุด คือ 25.00 รองลงมาได้แก่ tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 27.50 และ 30.00 ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และถัดมา คือ iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 50.00 ในขณะที่กรรมวิธีพ่นสาร etridiazole 24% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร etridiazole+quintozene 6% + 24% W/V EC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ flutriafol 12.5% W/V SC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 57.50 60.00 และ 67.50 ตามลำดับ ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า

แปลงทดลองที่ 2 ดำเนินการระหว่างเดือนกรกฎาคม – กันยายน 2563 (ตารางที่ 2)

ก่อนพ่นสารครั้งที่ 1 และ 2 ทุกกรรมวิธีต้นกล้วยไม้ไม่แสดงอาการโรค แต่พบเชื้อรา *S. rolfisii* เจริญบนวัสดุปลูกและบริเวณโคนต้นกล้วยไม้

ก่อนพ่นสารครั้งที่ 3 และ 4 พบว่า ทุกกรรมวิธีที่พ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืช กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวิธีพ่นน้ำเปล่า ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 75.00 โดยกรรมวิธีพ่นสาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุด คือ 15.00 รองลงมา ได้แก่ penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร etridiazole+quintozene 6% + 24% W/V EC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร etridiazole 24% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ flutriafol 12.5% W/V SC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 20.00 25.00 30.00 40.00 47.50 และ 55.00 ตามลำดับ

หลังพ่นสารครั้งสุดท้าย (ครั้งที่ 4) ที่ 5 วัน พบว่า ทุกกรรมวิธีที่พ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืช กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวิธีพ่นน้ำเปล่า ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 87.50 โดยกรรมวิธีพ่นสาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุด คือ 15.00 รองลงมา ได้แก่ tolclofos-methyl 50% WP

อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากัน คือ 35.00 ถัดมา คือ etridiazole+quintozene 6% + 24% W/V EC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค เท่ากัน คือ 55.00 และ etridiazole 24% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ flutriafol 12.5% W/V SC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากัน คือ 62.50

หลังพ่นสารครั้งสุดท้าย (ครั้งที่ 4) ที่ 10, 20 และ 30 วัน พบว่า กรรมวิธีพ่นสาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 90.00 โดยกรรมวิธีพ่นสาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุด คือ 27.50 รองลงมาได้แก่ tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 42.50 และ 40.00 ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และถัดมา คือ iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 62.50 ในขณะที่กรรมวิธีพ่นสาร etridiazole 24% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร etridiazole+quintozene 6% + 24% W/V EC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ flutriafol 12.5% W/V SC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กล้วยไม่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 67.50 70.00 และ 72.50 ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า

ความเป็นพิษต่อพืช พบว่า ทั้งสองแปลงทดลอง ทุกกรรมวิธีที่พ่นสารทดลองไม่พบความเป็นพิษต่อพืช

ต้นทุนการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช (ตารางที่ 3)

คำนวณต้นทุนการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืชต่อน้ำ 20 ลิตร (ราคาซื้อเมื่อ ธันวาคม 2561) ได้ดังนี้

สาร carboxin 75% WP ใช้อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร มีต้นทุนการใช้สาร 19.50 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร

สาร tolclofos-methyl 50% WP ใช้อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร มีต้นทุนการใช้สาร 22.80 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร

สาร etridiazole 24% W/V EC ใช้อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีต้นทุนการใช้สาร 19.20 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร

สาร etridiazole + quintozene 6% + 24% W/V EC ใช้อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีต้นทุนการใช้สาร 20.00 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร

สาร penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีต้นทุนการใช้สาร 78.00 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร

สาร iprodione 50% WP ใช้อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร มีต้นทุนการใช้สาร 28.20 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร

สาร flutriafol 12.5% W/V SC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีต้นทุนการใช้สาร 56.00 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการทดลองทั้งสองแปลง พบว่า สาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคต้นเน่าแห้งในกล้วยไม้ที่ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ สาร tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และ penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไม่แตกต่างกันทางสถิติกับ สาร carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ถัดมา คือ สาร iprodione 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร โดยมีต้นทุนการใช้สาร 19.50 22.80 78.00 และ 28.20 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร ตามลำดับ ส่วนสาร etridiazole 24% W/V EC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร etridiazole + quinterozone 6% + 24% W/V EC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และ flutriafol 12.5% W/V SC อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการพ่นน้ำเปล่า และทุกกรรมวิธีที่พ่นสารทดลองไม่พบความเป็นพิษต่อพืช

จากผลการทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการป้องกันกำจัดโรคต้นเน่าแห้งในกล้วยไม้ ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfsii* ในครั้งนี้ แนะนำให้ใช้สารที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดและต้นทุนการใช้สารต่ำตามลำดับ คือ carboxin 75% WP อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ซึ่งมีต้นทุนการใช้สาร 19.50 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร รองลงมา คือ สาร tolclofos-methyl 50% WP อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ซึ่งมีต้นทุนการใช้สาร 22.80 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร และสาร penthiopyrad 20% W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีต้นทุนการใช้สาร 78.00 บาทต่อน้ำ 20 ลิตร

เนื่องจากเชื้อรา *S. rolfsii* สามารถเข้าทำลายพืชได้อย่างรวดเร็ว และสร้างเมล็ดสเคลอโรเทียมอยู่รอดในดิน วัสดุปลูก และซากพืชได้เป็นเวลานาน ดังนั้น ควรหมั่นตรวจแปลงปลูกกล้วยไม้อย่างสม่ำเสมอ หากพบเชื้อรา *S. rolfsii* ให้รีบพ่น หรือรดสารป้องกันกำจัดโรคพืชลงบริเวณที่พบเชื้อราและบริเวณใกล้เคียงทันที

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยโรคพืช. 2553. โรคไม้ดอกไม้ประดับ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด ถนนพหลโยธิน. 163 น.

จินตน์กานต์ งามสุทธา. 2556. กล้ายไม้ไทยไต้หวันพระบารมี. *วารสารจดหมายข่าวผลิใบ* 15(12) : 12-15.

ธีระ สูตะบุตร และปราณี สมุทรสินธุ์. 2517. โรคของกล้ายไม้. *วิทย.สภข* 2. น. 231-243.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. *ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตร ป 2558*. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 215 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. *สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2561*. ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 186 หน้า.

Table 1 Efficacy of fungicides for control of orchid stem rot disease caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. The first experiment was done at Plant Pathology Research Group, DOA, Bangkok during June – August 2020.

Treatment	Rate of Application (g, mL/20 L of Water)	Disease Incidence (%) ^{1/}							
		Before Application				After 4 th Application			
		1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 Days	10 Days	20 Days	30 Days
1. carboxin 75% WP	15	0.00	0.00	20.00 a ^{2/}	20.00 a	25.00 a	25.00 a	25.00 a	25.00 a
2. tolclofos-methyl 50% WP	20	0.00	0.00	20.00 a	20.00 a	27.50 ab	27.50 ab	27.50 ab	27.50 ab
3. etridiazole 24% W/V EC	20	0.00	0.00	42.50 ab	42.50 ab	57.50 cd	57.50 cd	57.50 cd	57.50 cd
4. etridiazole + quintozone 6% + 24% W/V EC	40	0.00	0.00	60.00 b	60.00 b	60.00 cd	60.00 cd	60.00 cd	60.00 cd
5. penthiopyrad 20% SC	20	0.00	0.00	20.00 a	20.00 a	30.00 ab	30.00 ab	30.00 ab	30.00 ab
6. iprodione 50% WP	30	0.00	0.00	47.50 b	47.50 b	50.00 bc	50.00 bc	50.00 bc	50.00 bc
7. flutriafol 12.5% SC	40	0.00	0.00	65.00 b	65.00 b	67.50 cd	67.50 cd	67.50 cd	67.50 cd
8. water (control)	-	0.00	0.00	65.00 b	65.00 b	75.00 d	80.00 d	80.00 d	80.00 d
CV (%)		-	-	38.34	38.34	31.26	29.35	29.35	29.35

^{1/} Means of four replications

^{2/} Means followed by the same letter within a column are not significantly different at P = 0.05 according to Duncan's Multiple Range Test

Table 2 Efficacy of fungicides for control of orchid stem rot disease caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. The second experiment was done at Plant Pathology Research Group, DOA, Bangkok during July – September 2020.

Treatment	Rate of Application (g, mL/20 L of Water)	Disease Incidence (%) ^{1/}							
		Before Application				After 4 th Application			
		1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 Days	10 Days	20 Days	30 Days
1. carboxin 75% WP	15	0.00	0.00	15.00 a ^{2/}	15.00 a	15.00 a	27.50 a	27.50 a	27.50 a
2. tolclofos-methyl 50% WP	20	0.00	0.00	25.00 ab	25.00 ab	35.00 ab	42.50 ab	42.50 ab	42.50 ab
3. etridiazole 24% W/V EC	20	0.00	0.00	47.50 cd	47.50 cd	62.50 c	67.50 cd	67.50 cd	67.50 cd
4. etridiazole + quintozone 6% + 24% W/V EC	40	0.00	0.00	40.00 bcd	40.00 bcd	55.00 bc	70.00 cd	70.00 cd	70.00 cd
5. penthiopyrad 20% SC	20	0.00	0.00	20.00 ab	20.00 ab	35.00 ab	40.00 ab	40.00 ab	40.00 ab
6. iprodione 50% WP	30	0.00	0.00	30.00 abc	30.00 abc	55.00 bc	62.50 bc	62.50 bc	62.50 bc
7. flutriafol 12.5% SC	40	0.00	0.00	55.00 d	55.00 d	62.50 c	72.50 cd	72.50 cd	72.50 cd
8. water (control)	-	0.00	0.00	75.00 e	75.00 e	87.50 d	90.00 d	90.00 d	90.00 d
CV (%)		-	-	32.81	32.81	28.79	26.81	26.81	26.81

^{1/} Means of four replications

^{2/} Means followed by the same letter within a column are not significantly different at P = 0.05 according to Duncan's Multiple Range Test

Table 3 Cost of fungicides application for the control of orchid stem rot disease caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc.

Fungicides	Package Size (g, ml)	Cost/Unit ^{1/} (Baht)	Rate of Application/20 L of Water (g, ml)	Cost (Bath /20 L of Water)
1. carboxin 75% WP	500	650	15	19.50
2. tolclofos-methyl 50% WP	500	570	20	22.80
3. etridiazole 24% W/V EC	1,000	960	20	19.20
4. etridiazole + quintozone 6% + 24% W/V EC	1,000	500	40	20.00
5. penthiopyrad 20% SC	500	1,950	20	78.00
6. iprodione 50% WP	500	470	30	28.20
7. flutriafol 12.5% SC	500	700	40	56.00

^{1/} price in December 2018

สถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชของวัชพืชในแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญ
และการจัดการ

Situation of Herbicide-resistant Weeds in Pineapple
Plantation and Management

สิริชัย สารวิจารณ์

กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Repeated used of the same herbicide continuously increases cases of herbicide-resistance (HR) in weeds. The objectives of this experiment were to investigate the situation of HR weeds in pineapple plantations and management methods. The experiment was conducted in the greenhouse at Weed Science Research Group and pineapple fields during October 2017 – September 2020, with 3 sub experiments i.e. 1) study on situation of pre-emergence HR weeds in pineapple plantations of Thailand 2) study on situation of post-emergence HR weeds in pineapple plantations of Thailand and 3) herbicides testing for HR weed management in pineapple fields. The results found 1) the frequency of *Dactyloctenium aegyptium* and *Eleusine indica* resistance to pre-emergence; hexazinone/diuron, atrazine, ametryn, pendimethalin and diuron between 47.83-100.00 and 47.83-100.00 percent, respectively. 2) The frequency of *Dactyloctenium aegyptium* and *Eleusine indica* resistance to post-emergence; bromacil and ametryn between 82.61-95.65 and 78.26-86.96 percent, respectively. However, the frequency of herbicide resistance was not found to haloxyfop-R-methyl and fluazifop-P-butyl herbicide and 3) On efficiency of herbicides in controlling HR weeds in pineapple fields, it was found that treatments of oxyfluorfen+pendimethalin followed by ametryn rate 24+165, 400 g ai/rai, flumioxazin followed by bromacil+diuron rate 20, 400+400 g ai/rai, indaziflam followed by bromacil+diuron rate 12, 400+400 g ai/rai, alachlor+diuron followed by bromacil rate 320+320, 400 g ai/rai, topramezone+atrazine followed

รหัสการทดลอง 03-29-60-01-01-00-07-61

by bromacil+ametryn rate 5.6+15, 400+400 g ai/rai, pendimethalin+diuron followed by bromacil+atrazine rate 165+320, 400+400 g ai/rai, metribuzin followed by bromacil+atrazine rate 140, 400+400 g ai/rai, bromacil+diuron followed by diuron+ametryn rate 400+400, 400+400 g ai/rai and acetochlor+atrazine followed by bromacil+diuron rate 250+360, 400+400 g ai/rai were completely effective to control *Eleusine indica*, *Brachiaria reptans*, *Digitaria sanguinalis*, *Digitaria sacchariflora*, *Praxelis clematidea*, *Euphorbia heterophylla* and *Trianthema portulacastrum* without crop injury and this does not affect growth.

Keyword: Weed control, Weed management, Herbicide-resistant Weeds, Pineapple

บทคัดย่อ

การใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดเดิมซ้ำๆ กันอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดปัญหาวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อทราบสถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชของวัชพืชในแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญและวิธีการจัดการ ดำเนินการทดลองในสภาพโรงเรือนและแปลงทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2560 – กันยายน 2563 ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน 1) ศึกษาสถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอกที่สำคัญในแหล่งปลูกสับปะรด 2) ศึกษาสถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอกที่สำคัญในแหล่งปลูกสับปะรด และ 3) ทดสอบวิธีการจัดการวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชในแปลงปลูกสับปะรด ผลการทดลอง พบว่า 1) พบหญ้าปากควายและหญ้าตีนกา มีความถี่ของการเกิดการต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ได้แก่ hexazinone/diuron, atrazine, ametryn, pendimethalin และ diuron อยู่ระหว่าง 47.83-100.00 และ 47.83-100.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ 2) พบหญ้าปากควายและหญ้าตีนกา มีความถี่ของการเกิดการต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก bromacil และ ametryn อยู่ระหว่าง 82.61-95.65 และ 78.26-86.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่พบความถี่ของการเกิดการต้านทานสารกำจัดวัชพืช haloxyfop-R-methyl และ fluazifop-P-butyl และ 3) กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช oxyfluorfen+pendimethalin อัตรา 24+165 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย ametryn อัตรา 400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช flumioxazin อัตรา 20 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil+diuron อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช indaziflam อัตรา 12 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil+diuron อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืชalachlor+diuron อัตรา 320+320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil อัตรา 400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช topramezone+atrazine อัตรา 5.6+15 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil+ametryn อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช pendimethalin+diuron

อัตรา 165+320 ตามด้วย bromacil+atrazine อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช metribuzin อัตรา 140 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil+atrazine อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช bromacil+diuron อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย diuron+ametryn อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ และกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช acetochlor+atrazine อัตรา 250+360 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil+diuron อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืช ได้แก่ หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) หญ้าตีนติด (*Brachiaria reptans* (L.) C.A.Gardner & C.E.Hubb.) หญ้าตีนนก (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.) หญ้าตีนนก (*Digitaria sacchariflora* (Nees) Henrard) สาบม่วง (*Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M.King & H.Rob.) หญ้ายาง (*Euphorbia heterophylla* L.) และผักเบี้ยหิน (*Trianthema portulacastrum* L.) ได้ดี ถึงสมบูรณ์ ไม่เป็นพิษต่อพืชปลูก ส่งผลให้สับปะรดมีการเจริญเติบโตที่ดี

คำหลัก : การควบคุมวัชพืช การจัดการวัชพืช วัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช สับปะรด

คำนำ

สับปะรด เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้ปลูกอุตสาหกรรมอาหาร และภาคส่วนที่เกี่ยวข้องเป็นจำนวนมาก ในปี 2561 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกสับปะรด 5.57 แสนไร่ ปริมาณผลผลิต 2.35 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2563) การผลิตสับปะรดต้องประสบกับปัญหาการเข้าทำลายผลผลิตของศัตรูพืชมากมายหลายชนิด และหนึ่งในนั้นคือวัชพืช วัชพืชสามารถสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับการส่งออกอีกด้วย หากไม่มีการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ และยังเป็นแหล่งอาศัยของแมลงศัตรูพืช ซึ่งแมลงบางชนิดยังเป็นพาหะของโรคพืชอีกด้วย โดยวัชพืชที่พบมากและเป็นปัญหาในการปลูกสับปะรด มีทั้งประเภทวัชพืชอายุปีเดียวและวัชพืชข้ามปี ทั้งออกจากเมล็ดและรากเหง้าหรือส่วนของวัชพืช อาทิเช่น หญ้าตีนนก หญ้าตีนติด หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนกา หญ้าปากควาย หญ้ายาง ผักเบี้ยหิน หญ้ากำมะหยี่ ผักโขม เป็นต้น (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2554) การจัดการวัชพืชสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้แรงงานคน การใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตร และการใช้สารกำจัดวัชพืช ซึ่งการใช้สารกำจัดวัชพืชเป็นวิธีการที่เกษตรกรนิยมมากที่สุด เนื่องจากสะดวก และประหยัดต้นทุนเมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (2554) ได้แนะนำสารกำจัดวัชพืชที่ใช้ในข้าวโพด คือ paraquat, glyphosate, acetochlor, alachlor, isoxaflutole, metolachlor, pendimethalin, 2,4-D amine, atrazine, fluroxypyr และ nicosulfuron

จากการลงพื้นที่แหล่งปลูกสับปะรด พบว่า สารกำจัดวัชพืชที่เกษตรกรนิยมใช้มากที่สุด คือ bromacil/diuron atrazine นอกจากนี้ยังพบวัชพืชหลายชนิดที่พ่นสารกำจัดวัชพืชแล้วไม่สามารถควบคุมได้ อาทิเช่น หญ้าตีนกา หญ้าปากควาย กระจ่างจาม หญ้าไข่มุก และบาทยา เป็นต้น การที่

สารกำจัดวัชพืชไม่สามารถควบคุมวัชพืชได้ตามคำแนะนำอาจมาจากหลายสาเหตุ แต่หนึ่งในสาเหตุที่น่าจะมีความเป็นไปได้ คือ การเกิดปัญหาวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช เนื่องจากเกษตรกรใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดเดิมอย่างต่อเนื่องและเป็นเวลานาน ซึ่งปัญหานี้กำลังเพิ่มขึ้นในประเทศไทยและทั่วโลก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Heap (2020) ว่าขณะนี้มียารายงานการต้านทานสารกำจัดวัชพืชของวัชพืชจำนวน 514 ฉบับที่ไม่ซ้ำกัน โดยพบวัชพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช 262 ชนิด แบ่งเป็นประเภทไบเล็ยคู่ 152 ชนิด และประเภทไบเล็ยเดี่ยว 110 ชนิด วัชพืชมีการพัฒนาความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช จำนวน 23 กลไก จาก 26 กลไกการออกฤทธิ์ของสารกำจัดวัชพืช และมีจำนวนสารกำจัดวัชพืชที่วัชพืชต้านทานมากถึง 167 ชนิด มีการรายงานในพืชปลูก 93 ชนิด จาก 77 ประเทศทั่วโลก สารกำจัดวัชพืช 15 ลำดับแรก ที่พบว่ามีความต้านทานมากที่สุด คือ atrazine, imazethapyr, tribenuron-methyl, imazamox, chlorsulfuron, metsulfuron-methyl, glyphosate, iodosulfuron-methyl-sodium, fenoxaprop-P-ethyl, simazine, paraquat, bensulfuron-methyl, thifensulfuron-methyl, fluazifop-P-butyl และ pyrosulfuron-ethyl

จากฐานข้อมูลของ International Survey of Herbicide Resistance Weeds พบว่า สารกำจัดวัชพืช atrazine เป็นสารกำจัดวัชพืชที่พบวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชมากที่สุดเป็นอันดับหนึ่ง จำนวน 66 ชนิด โดยชนิดของวัชพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช atrazine ที่มีในประเทศไทย อาทิเช่น หญ้าตีนนก หญ้ากสีชมพู หญ้าข้าวนก ผักโขม จ้อย และมะแว้งนก เป็นต้น ส่วนสารกำจัดวัชพืช paraquat พบวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช จำนวน 30 ชนิด ซึ่งมากเป็นอันดับที่ 11 โดยชนิดของวัชพืชที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช paraquat ที่มีในประเทศไทย อาทิเช่น หญ้าตีนกา ลำพาลี มะแว้งนก และจ้อย เป็นต้น และมีรายงานวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชในประเทศไทย จำนวน 4 เรื่องในฐานข้อมูล ประกอบด้วย หญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli*) ต้านทานสารกำจัดวัชพืชแบบ Multiple Resistance: 2 Sites of Action ประกอบด้วย PSII inhibitor (Ureas and amides) (C2/7) และ Long chain fatty acid inhibitors (K3/15) ผักปอดนา (*Sphenoclea zeylanica*) ต้านทานสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Synthetic Auxins (O/4) หญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* var. *crus-galli*) และหญ้าดอกขาว (*Leptochloa chinensis*) ต้านทานสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม ACCase inhibitors (A/1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ สิริชัย (2557) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอกในอ้อย พบว่า สารกำจัดวัชพืช atrazine อัตรา 600 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ไม่สามารถควบคุมหญ้าตีนนก (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.) ได้อาจเกิดจากความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช เพราะพื้นที่แปลงทดลองนี้มีการใช้สารกำจัดวัชพืช atrazine ต่อเนื่องเป็นระยะเวลายาวนาน

ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาสถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชของวัชพืชในแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญ พร้อมทั้งทดสอบเพื่อหาสารกำจัดวัชพืช ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช เพื่อเป็นคำแนะนำในการเลือกใช้สารกำจัดวัชพืชให้กับเกษตรกร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เมล็ดวัชพืช 2 ชนิด ประกอบด้วย หญ้าปากควาย และหญ้าตีนกา จากแหล่งปลูกสับปะรด (ตารางที่ 1)
- หน่อสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย
- สารกำจัดวัชพืช ได้แก่ hexazinone/diuron 60% WG, atrazine 80% WP, ametryn 80% WP, pendimethalin 33% EC, diuron 80% WP, bromacil 80% WP, ametryn 80% WP, haloxyfop-R-methyl 10.8% EC, fluazifop-P-butyl 15% EC
- ดินปลูก
- ถาดเพาะกล้าขนาด 104 หลุม (ขนาด กว้าง×ยาว×ลึก = 36×55×4.5 เซนติเมตร)
- กระบะพลาสติก ขนาด 20×30 เซนติเมตร
- ป้ายปักแปลง
- เครื่องพ่นสารกำจัดวัชพืชแบบสับโยกสะพายหลัง (knapsack sprayer)
- หัวพ่นสารแบบพัด (fan nozzle)
- อุปกรณ์ชั่ง ตวง วัด

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 สถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก (pre-emergence) ที่สำคัญในแหล่งปลูกสับปะรด

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธี	กลุ่มสาร (HRAC)	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่)
1. hexazinone/diuron 60% WG	C1/C2	450
2. atrazine 80% WP	C1	320
3. ametryn 80% WP	C1	320
4. pendimethalin 33% EC	K1	198
5. diuron 80% WP	C2	320
6. untreated control	-	-

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เก็บเมล็ดวัชพืช จำนวน 2 ชนิด ชนิดละ 23 ประชากร รวม 46 ประชากร ประกอบด้วย หญ้าตีนกา และหญ้าปากควาย จากแปลงปลูกสับปะรดในแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศ อาทิเช่น จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และราชบุรี และเก็บเมล็ดวัชพืชแต่ละชนิดจากแปลงที่ไม่มีประวัติการใช้สารกำจัดวัชพืช เพื่อนำมาเป็นตัวเปรียบเทียบ (susceptible check)

2. ตากเมล็ดวัชพืชให้แห้งและทำความสะอาด
3. ทดสอบเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดวัชพืช เพื่อให้ได้ตัวอย่างเมล็ดวัชพืชที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอกมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับใช้ในการทดลอง
4. เพาะเมล็ดวัชพืชแต่ละชนิดในถาดเพาะ จำนวน 100 เมล็ดต่อถาด จำนวน 1 ถาดต่อซ้ำ
5. พ่นสารกำจัดวัชพืชตามกรรมวิธี ในขณะที่ดินมีความชื้น โดยใช้เครื่องพ่นสารแบบสายพาน ประกอบหัวพ่นแบบพัด ปริมาณน้ำ 80 ลิตร/ไร่
6. นับจำนวนต้นวัชพืชที่รอดตาย ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช
7. คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดตายของวัชพืช โดยเปรียบเทียบกับจำนวนต้นของประชากรเดียวกันที่ไม่พ่นสาร โดยแบ่งระดับความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชเป็น 4 ระดับ ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การรอดตาย	ระดับความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช
0	ประชากรอ่อนแอ (susceptible population)
1-20	ประชากรที่กำลังพัฒนาความต้านทาน (developing resistance population)
21-50	ประชากรต้านทาน (resistant population)
50-100	ประชากรต้านทานระดับสูง (highly resistant population)

8. คำนวณหาค่าความถี่ในการเกิดวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\text{ความถี่การเกิดวัชพืชต้านทาน} = \frac{\text{จำนวนแปลงที่พบการเกิดวัชพืชต้านทาน}}{\text{จำนวนแปลงทั้งหมดที่ทำการสำรวจ}} \times 100$$

การบันทึกข้อมูล

1. จำนวนต้นวัชพืชที่รอดตาย
2. เปอร์เซ็นต์การรอดตายของวัชพืช
3. ค่าความถี่ในการเกิดวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช

ขั้นตอนที่ 2 สถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังออก (post-emergence) ที่สำคัญในแหล่งปลูกสับปะรด

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธี	กลุ่มสาร (HRAC)	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่)
1. bromacil 80% WP	C1	320.00
2. ametryn 80% WP	C1	320.00
3. haloxyfop-R-methyl 10.8% EC	A	12.96
4. fluazifop-P-butyl 15% EC	A	24.00
5. untreated control	-	-

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เก็บเมล็ดวัชพืช จำนวน 2 ชนิด ชนิดละ 23 ประชากร รวม 46 ประชากร ประกอบด้วย หญ้าตีนกา และหญ้าปากควาย จากแปลงปลูกสับปรดในแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศ อาทิเช่น จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และราชบุรี และเก็บเมล็ดวัชพืชแต่ละชนิดจากแปลงที่ไม่มีประวัติการใช้สารกำจัดวัชพืช เพื่อนำมาเป็นตัวเปรียบเทียบ (susceptible check)
2. ตากเมล็ดวัชพืชให้แห้งและทำความสะอาด
3. ทดสอบเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดวัชพืช เพื่อให้ได้ตัวอย่างเมล็ดวัชพืชที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอกมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับใช้ในการทดลอง
4. เพาะเมล็ดวัชพืชแต่ละชนิดในถาดเพาะ จำนวน 100 เมล็ดต่อถาด จำนวน 1 ถาดต่อซ้ำ
5. พ่นสารกำจัดวัชพืชตามกรรมวิธี เมื่อวัชพืชมีจำนวนใบ 3-5 ใบ โดยใช้เครื่องพ่นสารแบบสายพาน ประกอบหัวพ่นแบบพัด ปริมาณน้ำ 80 ลิตร/ไร่
6. นับจำนวนต้นวัชพืชที่รอดตาย ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช
7. คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดตายของวัชพืช โดยเปรียบเทียบกับจำนวนต้นของประชากรเดียวกันที่ไม่พ่นสาร โดยแบ่งระดับความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชเป็น 4 ระดับ ดังนี้

เปอร์เซ็นต์การรอดตาย	ระดับความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช
0	ประชากรอ่อนแอ (susceptible population)
1-20	ประชากรที่กำลังพัฒนาความต้านทาน (developing resistance population)
21-50	ประชากรต้านทาน (resistant population)
50-100	ประชากรต้านทานระดับสูง (highly resistant population)

8. คำนวณหาค่าความถี่ในการเกิดวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\text{ความถี่การเกิดวัชพืชต้านทาน} = \frac{\text{จำนวนแปลงที่พบการเกิดวัชพืชต้านทาน}}{\text{จำนวนแปลงทั้งหมดที่ทำการสำรวจ}} \times 100$$

การบันทึกข้อมูล

1. จำนวนต้นวัชพืชที่รอดตาย
2. เปอร์เซ็นต์การรอดตายของวัชพืช
3. ค่าความถี่ในการเกิดวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืช

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบวิธีการจัดการวัชพืชด้านทานสารกำจัดวัชพืชในแปลงปลูกสับปะรด

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ มี 11 กรรมวิธี ได้แก่

ลำดับที่	กรรมวิธี	กลุ่มสาร (HRAC)	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่)
1	oxyfluorfen+pendimethalin ตามด้วย ametryn	E+K1, C1	24+165, 400
2	flumioxazin ตามด้วย bromacil+diuron	E, C1+C2	20, 400+400
3	indaziflam ตามด้วย bromacil+diuron	L, C1+C2	12, 400+400
4	alachlor+diuron ตามด้วย bromacil	K3+C2, C1	320+320, 400
5	topramezone+atrazine ตามด้วย bromacil+ametryn	- +C1, C1+C1	5.6+15, 400+400
6	pendimethalin+diuron ตามด้วย bromacil+atrazine	K1+C2, C1+C1	165+320, 400+400
7	metribuzin ตามด้วย bromacil+atrazine	C1, C1+C1	140, 400+400
8	bromacil+diuron ตามด้วย diuron+ametryn	C1+C2, C2+C1	400+400, 400+400
9	acetochlor+atrazine ตามด้วย bromacil+diuron	K3+C1, B1+C2	250+360, 400+400
10	กำจัดวัชพืชด้วยมือ	-	-
11	ไม่กำจัดวัชพืช	-	-

ปฏิบัติการทดลอง

1. เลือกแปลงทดลองจากแปลงเกษตรกรผู้ปลูกสับปะรด ที่มีปัญหาวัชพืชด้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอกและสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก

2. การปลูกและดูแลรักษา ไถแปลงตากดินให้แห้ง พรวนดิน และคาดเศษวัชพืชออก เตรียมแปลงทดลองย่อยขนาด 6x6 เมตร ปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย แบบแถวคู่ ระยะปลูก 50x50x80 เซนติเมตร โดยชุบน้ำด้วยสารป้องกันเชื้อรา (fosetyl-aluminium 80% WP) สาเหตุโรคเน่าก่อนปลูก

3. พ่นสารกำจัดวัชพืชตามกรรมวิธี โดยแบ่งการพ่นสารกำจัดวัชพืชแบ่งออกเป็นสองช่วงเวลา คือ สารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก (pre-emergence) และสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก (post-emergence) พ่นเมื่อวัชพืชเริ่มขึ้น จำนวนใบ 3-5 ใบ ใช้เครื่องพ่นสารแบบสูบโยก ประกอบหัวพ่นแบบหัวพัด ปริมาณน้ำ 60-80 ลิตร/ไร่

4. การประเมินความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชต่อพืชปลูก ตามมาตรฐานการทดสอบประสิทธิภาพศัตรูพืช กรมวิชาการเกษตร: ให้คะแนนโดยวิธีประเมินด้วยสายตา ตามระบบ 0-10 ตามลักษณะที่ปรากฏดังนี้ โดย 0 = ไม่เป็นพิษ 1-3 = เป็นพิษเล็กน้อย 4-6 = เป็นพิษปานกลาง 7-9 = เป็นพิษรุนแรง และ 10 = พืชปลูกตาย บันทึกข้อมูล ที่ระยะ 15, 30 และ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช

5. การประเมินประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืช ตามมาตรฐานการทดสอบประสิทธิภาพ ศัตรูพืช กรมวิชาการเกษตร: ให้คะแนนโดยวิธีประเมินด้วยสายตา ตามระบบ 0-10 ตามลักษณะที่ปรากฏดังนี้ โดย 0 = ไม่สามารถควบคุมได้ 1-3 = ควบคุมได้เล็กน้อย 4-6 = ควบคุมได้ปานกลาง 7-9 = ควบคุมได้ดี และ 10 = ควบคุมได้สมบูรณ์ บันทึกข้อมูล ที่ระยะ 30 และ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช

6. สุ่มเก็บตัวอย่างวัชพืช แยกชนิด นับจำนวน และชั่งน้ำหนักแห้ง วัชพืชจากทุกกรรมวิธี ๑ ละ 4 จุด แต่ละจุดมีขนาด 0.5×0.5 เมตร ที่ระยะ 30 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช โดยแยกเป็นชนิด ประเภทวัชพืชใบแคบวงศ์หญ้า ประเภทใบกว้าง และประเภทกก

7. วัดความสูงและขนาดทรงพุ่มของพืชปลูก โดยสุ่มจากจำนวน 10 ต้น ที่เป็นตัวแทนของ สับปะรดในแต่ละกรรมวิธี บันทึกข้อมูล 2 ครั้ง ที่ระยะ 30, 60, 90 และ 120 วัน หลังปลูก

การบันทึกข้อมูล

1. ความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชต่อพืชปลูก
2. ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืช
3. ชนิด จำนวน และน้ำหนักแห้งวัชพืช
4. การเจริญเติบโต
5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Sirichai Statistics 7.0

เวลาและสถานที่

- ตุลาคม 2560 – กันยายน 2563
- เรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
- แปลงปลูกสับปะรด อำเภอสามร้อยยอด และอำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ผลการทดลองและวิจารณ์

สถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก (pre-emergence) ที่สำคัญ ในแหล่งปลูกสับปะรด

การทดสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอกของหญ้าปากควาย จำนวน 23 ประชากร ต่อสารกำจัดวัชพืช จำนวน 5 ชนิด พบว่า ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช การพ่นสารกำจัดวัชพืช hexazinone/diuron 60% WG อัตรา 450 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีหญ้าปากควาย จำนวน 16 ประชากร ที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืช atrazine 80% WP อัตรา 320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีหญ้าปากควายจำนวน 19 ประชากร ที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืช ametryn 80% WP อัตรา 320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีหญ้าปากควายจำนวน 22 ประชากร ที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืช pendimethalin 33% EC อัตรา 198 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีหญ้าปากควายจำนวน 11 ประชากร ที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช และ สารกำจัดวัชพืช diuron 80% WP อัตรา 320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ หญ้าปากควายทุกประชากร

เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าปากควายหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสาร พบว่า หญ้าปากควายที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืชทุกชนิดมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดระหว่าง 1.32-25.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประชากรของวัชพืชดังกล่าวมีระดับความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในระดับประชากรที่กำลังพัฒนาความต้านทาน (developing resistance population) ยกเว้นหญ้าปากควาย 1 ประชากร ที่อยู่ในระดับประชากรต้านทาน (resistant population) ต่อสารกำจัดวัชพืช ametryn 80% WP (ตารางที่ 3)

การทดสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอกของหญ้าตีนกา จำนวน 23 ประชากร ต่อสารกำจัดวัชพืช จำนวน 5 ชนิด พบว่า ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช การพ่นสารกำจัดวัชพืช hexazinone/diuron 60% WG อัตรา 450 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีหญ้าตีนกาจำนวน 17 ประชากร ที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืช atrazine 80% WP อัตรา 320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ หญ้าตีนกาทุกประชากรเหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืช ametryn 80% WP อัตรา 320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีหญ้าตีนกาจำนวน 22 ประชากร ที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืช pendimethalin 33% EC อัตรา 198 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีหญ้าตีนกาจำนวน 11 ประชากร ที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช และสารกำจัดวัชพืช diuron 80% WP อัตรา 320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ หญ้าตีนกาทุกประชากรเหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช (ตารางที่ 4) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าตีนกาหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสาร พบว่า หญ้าตีนกาที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืชทุกชนิดมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดระหว่าง 1.10-15.91 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประชากรของวัชพืชดังกล่าวมีระดับความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในระดับประชากรที่กำลังพัฒนาความต้านทาน (developing resistance population) (ตารางที่ 5)

เมื่อพิจารณาความถี่ในการเกิดวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก พบว่า ความถี่ของการเกิดหญ้าปากควายและหญ้าตีนกา ต้านทานสารกำจัดวัชพืช hexazinone/diuron, atrazine, ametryn, pendimethalin และ diuron อยู่ระหว่าง 47.83-100.00 และ 47.83-100.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

สถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก (post-emergence) ที่สำคัญในแหล่งปลูกสับปะรด

การทดสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอกของหญ้าปากควาย จำนวน 23 ประชากร ต่อสารกำจัดวัชพืช จำนวน 4 ชนิด พบว่า ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช การพ่นสารกำจัดวัชพืช bromacil 80% WP อัตรา 320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีหญ้าปากควายจำนวน 22 ประชากร ที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืช ametryn 80% WP อัตรา 320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีหญ้าปากควายจำนวน 19 ประชากร ที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืช haloxyfop-R-methyl 10.8% EC อัตรา 12.96 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ และสารกำจัด

วัชพืช fluazifop-P-butyl 15% EC อัตรา 24 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ สามารถควบคุมหญ้าตีนกาได้สมบูรณ์ ไม่พบหญ้าตีนกาเหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช (ตารางที่ 6) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าปากควายหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสาร พบว่า หญ้าปากควายที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืชทุกชนิดมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดระหว่าง 3.00-26.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประชากรของวัชพืชดังกล่าวมีระดับความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มประชากรที่กำลังพัฒนาความต้านทาน (developing resistance population) ยกเว้นหญ้าปากควาย 4 ประชากร ที่มีระดับความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช bromacil 80% WP ในระดับประชากรต้านทาน (resistant population) (ตารางที่ 7)

การทดสอบความต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอกของหญ้าตีนกา จำนวน 23 ประชากร ต่อสารกำจัดวัชพืช จำนวน 4 ชนิด พบว่า ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช การพ่นสารกำจัดวัชพืช bromacil 80% WP อัตรา 320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีหญ้าตีนกาจำนวน 20 ประชากร ที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืช ametryn 80% WP อัตรา 320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีหญ้าตีนกาจำนวน 17 ประชากร ที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช สารกำจัดวัชพืช haloxyfop-R-methyl 10.8% EC อัตรา 12.96 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ และสารกำจัดวัชพืช fluazifop-P-butyl 15% EC อัตรา 24 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ สามารถควบคุมหญ้าตีนกาได้สมบูรณ์ ไม่พบหญ้าตีนกาเหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืช (ตารางที่ 8) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าตีนกาหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสาร พบว่า หญ้าตีนกาที่เหลือจากการพ่นสารกำจัดวัชพืชทุกชนิดมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดระหว่าง 1.00-25.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประชากรของวัชพืชดังกล่าวมีระดับความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่มประชากรที่กำลังพัฒนาความต้านทาน (developing resistance population) ยกเว้นหญ้าตีนกา 7 ประชากร ที่มีระดับความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช bromacil 80% WP ในระดับประชากรต้านทาน (resistant population) (ตารางที่ 9)

เมื่อพิจารณาความถี่ในการเกิดวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก พบว่า ไม่พบความถี่ของการเกิดหญ้าปากควายและหญ้าตีนกาต้านทานสารกำจัดวัชพืช haloxyfop-R-methyl และ fluazifop-P-butyl แต่พบความถี่ของการเกิดหญ้าปากควายและหญ้าตีนกาต้านทานสารกำจัดวัชพืช bromacil และ ametryn อยู่ระหว่าง 82.61-95.65 และ 78.26-86.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ทดสอบวิธีการจัดการวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชในแปลงปลูกสับปะรด

จากการสุ่มวัชพืชที่ระยะ 30 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช ในกรรมวิธีที่ไม่กำจัดวัชพืช พบว่าแปลงทดลอง อำเภอสามร้อยยอด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบวัชพืช จำนวน 6 ชนิด ประกอบด้วยหญ้าตีนกา หญ้าตีนติด หญ้าตีนนก (*D. sanguinalis*) หญ้าตีนนก (*D. sacchariflora*) สาบม่วง และผักเบี้ยหิน จำนวน 60, 35, 15, 23, 35 และ 11 ต้นต่อตารางเมตร คิดเป็น 33.52, 19.55, 8.38, 12.85, 19.55 และ 6.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

สำหรับแปลงทดลอง อำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบวัชพืช จำนวน 7 ชนิด ประกอบด้วย หญ้าตีนกา หญ้าตีนติด หญ้าตีนนก (*D. sanguinalis*) หญ้าตีนนก (*D. sacchariflora*) สาบม่วง หญ้ายาง และผักเบี้ยหิน จำนวน 12, 30, 38, 75, 22, 11 และ 14 ต้นต่อตารางเมตร คิดเป็น 5.97, 14.93, 18.91, 37.31, 10.95, 4.98 และ 6.97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 13)

ความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอกต่อพืชปลูก จากการประเมินด้วยสายตา พบว่า กรรมวิธีการพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก flumioxazin, indaziflam และ bromacil+diuron ที่ระยะ 30 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช สับปรดแสดงอาการเป็นพิษ โดยการพ่นสารกำจัดวัชพืช flumioxazin สับปรดแสดงอาการใบไหม้บริเวณใบยอด มีระดับคะแนนความเป็นพิษ 4 คะแนน การพ่นสารกำจัดวัชพืช indaziflam สับปรดแสดงอาการใบยอดขาวซีด มีระดับคะแนนความเป็นพิษ 2 คะแนน ส่วนการพ่นสารกำจัดวัชพืช bromacil+diuron สับปรดแสดงอาการใบเหลืองบริเวณใบยอด มีระดับคะแนนความเป็นพิษ 1 คะแนน ที่ระยะ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช อาการเป็นพิษดังกล่าวลดลง ใบใหม่ที่แตกออกมาปกติ แต่สำหรับการพ่นสารกำจัดวัชพืช flumioxazin สับปรดยังคงแสดงอาการเป็นพิษเล็กน้อย ที่ระยะ 90 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืชมีระดับคะแนนความเป็นพิษ 1 คะแนน โดยความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชทั้งสองแปลงทดลอง สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน (ตารางที่ 14)

ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืช จากการประเมินด้วยสายตา ที่ระยะ 30 และ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช กรรมวิธีการทดลองที่มีการกำจัดวัชพืชทุกกรรมวิธีสามารถควบคุมวัชพืชได้สมบูรณ์ มีระดับคะแนน 10 คะแนน ทั้งสองแปลงทดลอง ส่วนที่ระยะ 90 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก oxyfluorfen+pendimethalin, flumioxazin และ pendimethalin+ diuron มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชลดลง แต่ยังคงควบคุมวัชพืชได้ดี มีคะแนนอยู่ระหว่าง 8-9 คะแนน ส่วนกรรมวิธีการทดลองที่มีการกำจัดวัชพืชอื่นสามารถควบคุมวัชพืชได้สมบูรณ์ โดยประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชทั้งสองแปลงทดลองสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน (ตารางที่ 15)

น้ำหนักแห้งวัชพืชโดยรวม พบว่า ที่ระยะ 30, 60 และ 90 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ระยะ 90 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก oxyfluorfen+pendimethalin, flumioxazin และ pendimethalin+diuron มีน้ำหนักแห้งวัชพืชโดยรวม เท่ากับ 14.00, 18.75 และ 16.25 กรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ ในแปลงทดลองอำเภอสามร้อยยอด ส่วนแปลงทดลองอำเภอปราณบุรี มีน้ำหนักแห้งวัชพืชโดยรวม เท่ากับ 18.75, 17.25 และ 19.50 กรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 16) ซึ่งน้ำหนักแห้งของวัชพืชสอดคล้องกับคะแนนประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืช

เมื่อประสิทธิภาพของสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอกหมดลงและมีวัชพืชขึ้น พ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอกตามกรรมวิธี โดยจากการสุ่มวัชพืชที่ระยะ 30 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช ในกรรมวิธีที่ไม่กำจัดวัชพืช พบว่า แปลงทดลอง อำเภอสามร้อยยอด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบวัชพืช

จำนวน 6 ชนิด ประกอบด้วย หญ้าตีนกา หญ้าตีนติด หญ้าตีนนก (*D. sanguinalis*) หญ้าตีนนก (*D. sacchariflora*) สาบม่วง และผักเบี้ยหิน จำนวน 53, 40, 12, 50, 45 และ 10 ต้นต่อตารางเมตร คิดเป็น 25.24, 19.05, 5.71, 23.81, 21.42 และ 4.76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 17)

สำหรับแปลงทดลอง อำเภอลำลูกเกด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบวัชพืช จำนวน 6 ชนิด ประกอบด้วย หญ้าตีนกา หญ้าตีนติด หญ้าตีนนก (*D. sanguinalis*) หญ้าตีนนก (*D. sacchariflora*) สาบม่วง และผักเบี้ยหิน จำนวน 15, 45, 35, 80, 35 และ 6.25 ต้นต่อตารางเมตร คิดเป็น 6.70, 20.09, 15.63, 35.71, 15.63 และ 6.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

ความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอกต่อพืชปลูก จากการประเมินด้วยสายตา พบว่า กรรมวิธีการพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอกทุกกรรมวิธี ที่มีสารกำจัดวัชพืช ametryn และ bromacil ในกรรมวิธี ที่ระยะ 30 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช สับปรดแสงอาการเป็นพิษเล็กน้อย ใบเหลืองซีด มีระดับคะแนน 1-2 คะแนน และอาการเป็นพิษดังกล่าวหมดไปที่ระยะ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช โดยความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชทั้งสองแปลงทดลองสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน (ตารางที่ 19)

ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชของสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก จากการประเมินด้วยสายตา ที่ระยะ 30 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช กรรมวิธีการทดลองที่มีการกำจัดวัชพืชทุกกรรมวิธีและกรรมวิธีกำจัดวัชพืชด้วยมือ สามารถควบคุมวัชพืชได้สมบูรณ์ มีระดับคะแนน 10 คะแนน ทั้งสองแปลงทดลอง ส่วนที่ระยะ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอกที่มีสารกำจัดวัชพืช bromacil เป็นส่วนประกอบในกรรมวิธี และกรรมวิธีกำจัดวัชพืชด้วยมือ สามารถควบคุมวัชพืชได้สมบูรณ์ มีระดับคะแนน 10 คะแนน ส่วนกรรมวิธีการพ่นสารกำจัดวัชพืช ametryn และ diuron+ametryn สามารถควบคุมวัชพืชได้ดี มีระดับคะแนน 9 คะแนน โดยประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืชทั้งสองแปลงทดลองสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน (ตารางที่ 20)

น้ำหนักแห้งวัชพืชโดยรวม พบว่า แปลงอำเภอสามร้อยยอดและอำเภอลำลูกเกด ที่ระยะ 30 และ 60 วันหลังพ่นสารกำจัดวัชพืช มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ระยะ 30 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอกทุกกรรมวิธีและกรรมวิธีกำจัดวัชพืชด้วยมือ มีน้ำหนักแห้งวัชพืชโดยรวมเท่ากับ 0 กรัมต่อตารางเมตร ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีไม่พ่นสารกำจัดวัชพืชที่มีน้ำหนักแห้งวัชพืช 398.75 และ 408.75 กรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ ส่วนที่ระยะ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช พบว่า กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอกที่มีสารกำจัดวัชพืช bromacil เป็นส่วนประกอบในกรรมวิธี และกรรมวิธีกำจัดวัชพืชด้วยมือ มีน้ำหนักแห้งวัชพืชโดยรวมเท่ากับ 0 กรัมต่อตารางเมตร ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช ametryn, diuron+ametryn และกรรมวิธีไม่กำจัดวัชพืช ที่มีน้ำหนักแห้งวัชพืช 23.75-438.75 และ 19.25-427.5 กรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 21)

การเจริญเติบโตของสับปรด พบว่า ที่ระยะ 30 และ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยแปลงทดลองอำเภอสามร้อยยอด พบว่า

ที่ระยะ 30 และ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช สับปะรดมีความสูงอยู่ระหว่าง 45.50-51.75 และ 52.00-57.25 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยกรรมวิธีการพ่นสารกำจัดวัชพืช flumioxazin สับปะรดมีความสูงที่ระยะ 30 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช น้อยที่สุด เท่ากับ 45.50 เซนติเมตร และที่ระยะ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช กรรมวิธีการพ่นสารกำจัดวัชพืช indaziflam สับปะรดมีความสูงน้อยที่สุด เท่ากับ 52.00 เซนติเมตร สำหรับแปลงทดลองอำเภอปราณบุรี พบว่า ที่ระยะ 30 และ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช สับปะรดมีความสูงอยู่ระหว่าง 42.25-45.75 และ 46.75-51.00 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยกรรมวิธีการพ่นสารกำจัดวัชพืช flumioxazin สับปะรดมีความสูงที่ระยะ 30 และ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช น้อยที่สุด เท่ากับ 42.25 และ 46.75 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับคะแนนความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชต่อสับปะรด (ตารางที่ 22)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. พบหญ้าปากควายและหญ้าตีนกา มีความถี่ของการเกิดการต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ประเภทก่อนงอก ได้แก่ hexazinone/diuron, atrazine, ametryn, pendimethalin และ diuron อยู่ระหว่าง 47.83-100.00 และ 47.83-100.00 เปอร์เซ็นต์

2. พบหญ้าปากควายและหญ้าตีนกา มีความถี่ของการเกิดการต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช ประเภทหลังงอก bromacil และ ametryn อยู่ระหว่าง 82.61-95.65 และ 78.26-86.96 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความถี่ของการเกิดการต้านทานสารกำจัดวัชพืช haloxyfop-R-methyl และ fluazifop-P-butyl

3. กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช oxyfluorfen+pendimethalin อัตรา 24+165 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย ametryn อัตรา 400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช flumioxazin อัตรา 20 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil+diuron อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช indaziflam อัตรา 12 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil+diuron อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืชalachlor+diuron อัตรา 320+320 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil อัตรา 400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช topramezone+atrazine อัตรา 5.6+15 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil+ametryn อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช pendimethalin+diuron อัตรา 165+320 ตามด้วย bromacil+atrazine อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช metribuzin อัตรา 140 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil+atrazine อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่, กรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช bromacil+diuron อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย diuron+ametryn อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ และกรรมวิธีพ่นสารกำจัดวัชพืช acetochlor+atrazine อัตรา 250+360 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ ตามด้วย bromacil+diuron อัตรา 400+400 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ มีประสิทธิภาพในการควบคุมวัชพืช ได้แก่ หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) หญ้าตีนตีด (*Brachiaria reptans* (L.) C.A.Gardner & C.E.Hubb.) หญ้าตีนนก (*Digitaria*

sanguinalis (L.) Scop.) หญ้าตีนนก (*Digitaria sacchariflora* (Nees) Henrard) สาบม่วง (*Praxelis clematidea* (Griseb.) R.M.King & H.Rob.) หญ้าแยง (*Euphorbia heterophylla* L.) และผักเบี้ยหิน (*Trianthema portulacastrum* L.) ได้ดีถึงสมบูรณ์ ไม่เป็นพิษต่อพืชปลูก ส่งผลให้ สับประตมีการเจริญเติบโตที่ดี

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการดำเนินการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- สิริชัย สารวิจารณ์. 2557. ประสิทธิภาพของสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอกสำหรับการควบคุมวัชพืชในแปลงปลูกอ้อย. ใน การประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช “ประเทศก้าวหน้า อารักขาพืชก้าวไกล คืนความสุขให้เกษตรกร” ระหว่างวันที่ 3-5 กันยายน 2557 ณ โรงแรม เดอะกรีนเนอรี รีสอร์ท อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา. หน้า 157-168.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2563. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2562. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 195 หน้า.
- สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 2554. คำแนะนำการควบคุมวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืช ปี 2554. กรุงเทพฯ 149 หน้า.
- Heap, I. 2016. International Survey of Herbicide-Resistant Weeds. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <http://www.weedscience.org/> (วันที่ 3 มิถุนายน 2559)
- Llewellyn RS, Powles SB (2001) High levels of herbicide resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum* L.) in the wheat belt of Western Australia. *Weed Technol.*, 15: 242–248.

ตารางที่ 1 ตำแหน่งที่เก็บเมล็ดวัชพืชจากแปลงสับปะรดในพื้นที่ต่างๆ

CODE	Location (GPS)		ที่ตั้ง
	°N	°E	
หญ้าปากควาย (<i>Dactyloctenium aegyptium</i> (L.) Willd.); DCTAE			
DCTAE 01	11 46 57	99 46 46	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
DCTAE 02	11 47 4	99 46 23	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
DCTAE 03	11 45 46	99 40 54	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
DCTAE 04	11 45 52	99 42 39	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
DCTAE 05	11 45 20	99 44 9	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
DCTAE 06	13 33 18	99 16 25	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
DCTAE 07	13 31 12	99 21 34	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
DCTAE 08	13 31 6	99 21 31	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
DCTAE 09	13 31 13	99 21 46	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
DCTAE 10	13 29 48	99 23 37	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
DCTAE 11	13 30 9	99 23 33	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
DCTAE 12	13 28 30	99 24 50	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
DCTAE 13	13 28 52	99 25 5	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
DCTAE 14	13 28 32	99 24 47	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
DCTAE 15	13 32 53	99 20 5	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
DCTAE 16	13 29 58	99 25 10	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
DCTAE 17	13 26 50	99 26 9	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
DCTAE 18	13 27 20	99 24 39	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
DCTAE 19	13 27 16	99 24 34	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
DCTAE 20	13 22 58	99 25 50	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
DCTAE 21	13 23 4	99 25 42	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
DCTAE 22	12 36 13	99 46 27	อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์
DCTAE 23	12 35 36	99 47 2	อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์

ตารางที่ 1 ตำแหน่งที่เก็บเมล็ดวัชพืชจากแปลงสับปรดในพื้นที่ต่างๆ (ต่อ)

CODE	Location (GPS)		ที่ตั้ง
	°N	°E	
หญ้าตีนกา (<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.); ELUIN			
ELUIN 01	11 46 57	99 46 46	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
ELUIN 02	11 47 4	99 46 23	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
ELUIN 03	11 45 46	99 40 54	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
ELUIN 04	11 45 52	99 42 39	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
ELUIN 05	11 45 20	99 44 9	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
ELUIN 06	13 33 18	99 16 25	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
ELUIN 07	13 31 12	99 21 34	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
ELUIN 08	13 31 6	99 21 31	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
ELUIN 09	13 31 13	99 21 46	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
ELUIN 10	13 29 48	99 23 37	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
ELUIN 11	13 30 9	99 23 33	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
ELUIN 12	13 28 30	99 24 50	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
ELUIN 13	13 28 52	99 25 5	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
ELUIN 14	13 28 32	99 24 47	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
ELUIN 15	13 32 53	99 20 5	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
ELUIN 16	13 29 58	99 25 10	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
ELUIN 17	13 26 50	99 26 9	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
ELUIN 18	13 27 20	99 24 39	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
ELUIN 19	13 27 16	99 24 34	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
ELUIN 20	13 22 58	99 25 50	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
ELUIN 21	13 23 4	99 25 42	อ.บ้านคา จ.ราชบุรี
ELUIN 22	12 36 13	99 46 27	อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์
ELUIN 23	12 35 36	99 47 2	อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์

ตารางที่ 2 จำนวนต้นหญ้าปากควายที่เหลือหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสาร

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	จำนวนต้นวัชพืช (ต้น)											
		DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1. hexazinone/diuron 60% WG	450	3	2	0	7	5	6	0	3	5	0	8	11
2. atrazine 80% WP	320	2	7	2	3	0	4	2	0	0	2	3	5
3. ametryn 80% WP	320	2	11	0	9	13	12	9	5	3	7	8	12
4. pendimethalin 33% EC	198	0	2	3	0	3	0	1	0	5	2	0	2
5. diuron 80% WP	320	7	4	8	6	6	14	9	11	8	10	6	12
6. untreated control	-	85	72	90	75	84	91	76	80	82	92	87	88

หมายเหตุ: หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.); DCTAE

ตารางที่ 2 จำนวนต้นหญ้าปากควายที่เหลือหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสาร (ต่อ)

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	จำนวนต้นวัชพืช (ต้น)											
		DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	susceptibl
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	e check
1. hexazinone/diuron 60% WG	450	1	0	0	3	5	0	2	2	0	11	5	0
2. atrazine 80% WP	320	3	4	6	11	7	2	5	0	7	13	8	0
3. ametryn 80% WP	320	8	16	14	18	6	11	9	2	5	9	10	0
4. pendimethalin 33% EC	198	0	0	2	0	0	0	3	0	1	0	2	0
5. diuron 80% WP	320	3	6	7	9	3	5	5	11	4	14	8	0
6. untreated control	-	75	93	96	72	85	80	91	79	68	94	82	85

หมายเหตุ: หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.); DCTAE

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าปากควายหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสาร

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากร (เปอร์เซ็นต์)											
		DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1. hexazinone/diuron 60% WG	450	3.53	2.78	0.00	9.33	5.95	6.59	0.00	3.75	6.10	0.00	9.20	12.50
2. atrazine 80% WP	320	2.35	9.72	2.22	4.00	0.00	4.40	2.63	0.00	0.00	2.17	3.45	5.68
3. ametryn 80% WP	320	2.35	15.28	0.00	12.00	15.48	13.19	11.84	6.25	3.66	7.61	9.20	13.64
4. pendimethalin 33% EC	198	0.00	2.78	3.33	0.00	3.57	0.00	1.32	0.00	6.10	2.17	0.00	2.27
5. diuron 80% WP	320	8.24	5.56	8.89	8.00	7.14	15.38	11.84	13.75	9.76	10.87	6.90	13.64
6. untreated control	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

หมายเหตุ: หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.); DCTAE

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าปากควายหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสาร (ต่อ)

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากร (เปอร์เซ็นต์)											
		DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	susceptible
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	check
1. hexazinone/diuron 60% WG	450	1.33	0.00	0.00	4.17	5.88	0.00	2.20	2.53	0.00	11.70	6.10	0.00
2. atrazine 80% WP	320	4.00	4.30	6.25	15.28	8.24	2.50	5.49	0.00	10.29	13.83	9.76	0.00
3. ametryn 80% WP	320	10.67	17.20	14.58	25.00	7.06	13.75	9.89	2.53	7.35	9.57	12.20	0.00
4. pendimethalin 33% EC	198	0.00	0.00	2.08	0.00	0.00	0.00	3.30	0.00	1.47	0.00	2.44	0.00
5. diuron 80% WP	320	4.00	6.45	7.29	12.50	3.53	6.25	5.49	13.92	5.88	14.89	9.76	0.00
6. untreated control	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

หมายเหตุ: หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.); DCTAE

ตารางที่ 4 จำนวนต้นหญ้าตีนกาที่เหลือหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสาร

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	จำนวนต้นวัชพืช (ต้น)											
		ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1. hexazinone/diuron 60% WG	450	2	0	1	3	2	3	2	0	0	0	1	2
2. atrazine 80% WP	320	2	5	3	2	7	3	9	2	4	7	6	2
3. ametryn 80% WP	320	10	8	6	9	11	7	12	13	7	0	5	3
4. pendimethalin 33% EC	198	3	0	5	11	0	6	0	8	0	0	0	1
5. diuron 80% WP	320	11	9	7	14	3	11	10	8	3	2	7	8
6. untreated control	-	89	92	95	88	85	90	83	82	78	81	89	92

หมายเหตุ: หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.); ELUIN

ตารางที่ 4 จำนวนต้นหญ้าตีนกาที่เหลือหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสาร (ต่อ)

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	จำนวนต้นวัชพืช (ต้น)											
		ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	susceptible
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	check
1. hexazinone/diuron 60% WG	450	0	0	1	1	4	6	2	2	2	5	1	0
2. atrazine 80% WP	320	3	1	1	3	1	5	7	7	2	3	7	0
3. ametryn 80% WP	320	1	9	6	8	7	6	1	6	4	5	4	0
4. pendimethalin 33% EC	198	0	5	4	0	2	1	0	0	0	2	0	0
5. diuron 80% WP	320	3	4	8	5	9	9	2	6	8	4	5	0
6. untreated control	-	87	86	93	88	93	91	89	92	97	95	89	92

หมายเหตุ: หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.); ELUIN

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าตีนกาหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสาร

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากร (เปอร์เซ็นต์)											
		ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1. hexazinone/diuron 60% WG	450	2.25	0.00	1.05	3.41	2.35	3.33	2.41	0.00	0.00	0.00	1.12	2.17
2. atrazine 80% WP	320	2.25	5.43	3.16	2.27	8.24	3.33	10.84	2.44	5.13	8.64	6.74	2.17
3. ametryn 80% WP	320	11.24	8.70	6.32	10.23	12.94	7.78	14.46	15.85	8.97	0.00	5.62	3.26
4. pendimethalin 33% EC	198	3.37	0.00	5.26	12.50	0.00	6.67	0.00	9.76	0.00	0.00	0.00	1.09
5. diuron 80% WP	320	12.36	9.78	7.37	15.91	3.53	12.22	12.05	9.76	3.85	2.47	7.87	8.70
6. untreated control	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

หมายเหตุ: หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.); ELUIN

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าตีนกาหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก ที่ระยะ 21 วัน หลังพ่นสาร (ต่อ)

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากร (เปอร์เซ็นต์)											
		ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	susceptible
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	check
1. hexazinone/diuron 60% WG	450	0.00	0.00	1.08	1.14	4.30	6.59	2.25	2.17	2.06	5.26	1.12	0.00
2. atrazine 80% WP	320	3.45	1.16	1.08	3.41	1.08	5.49	7.87	7.61	2.06	3.16	7.87	0.00
3. ametryn 80% WP	320	1.15	10.47	6.45	0.09	7.53	6.59	1.12	6.52	4.12	5.26	4.49	0.00
4. pendimethalin 33% EC	198	0.00	5.81	4.30	0.00	2.15	1.10	0.00	0.00	0.00	2.11	0.00	0.00
5. diuron 80% WP	320	3.45	4.65	8.60	5.68	9.68	9.89	2.25	6.52	8.25	4.21	5.62	0.00
6. untreated control	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

หมายเหตุ: หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.); ELUIN

ตารางที่ 6 จำนวนต้นหญ้าปากควายที่เหลือหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสาร

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	จำนวนต้นวัชพืช (ต้น)											
		DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1. bromacil 80% WP	320.00	12	9	0	22	11	9	18	11	22	18	15	6
2. ametryn 80% WP	320.00	8	5	0	3	4	11	7	15	9	11	8	5
3. haloxyfop-R-methyl 10.8% EC	12.96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4. fluazifop-P-butyl 15% EC	24.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5. untreated control	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

หมายเหตุ: หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.); DCTAE

ตารางที่ 6 จำนวนต้นหญ้าปากควายที่เหลือหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสาร (ต่อ)

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	จำนวนต้นวัชพืช (ต้น)											
		DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	susceptible
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	check
1. bromacil 80% WP	320.00	12	26	17	16	9	3	12	19	20	12	17	0
2. ametryn 80% WP	320.00	0	8	6	7	5	0	8	7	12	5	0	0
3. haloxyfop-R-methyl 10.8% EC	12.96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4. fluazifop-P-butyl 15% EC	24.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5. untreated control	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

หมายเหตุ: หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.); DCTAE

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าปากควายหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสาร

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากร (เปอร์เซ็นต์)											
		DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1. bromacil 80% WP	320.00	12.00	9.00	0.00	22.00	11.00	9.00	18.00	11.00	22.00	18.00	15.00	6.00
2. ametryn 80% WP	320.00	8.00	5.00	0.00	3.00	4.00	11.00	7.00	15.00	9.00	11.00	8.00	5.00
3. haloxyfop-R-methyl 10.8% EC	12.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4. fluazifop-P-butyl 15% EC	24.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5. untreated control	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

หมายเหตุ: หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.); DCTAE

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าปากควายหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสาร (ต่อ)

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากร (เปอร์เซ็นต์)												suscepti ble check
		DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTA	DCTA	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTAE	DCTA		
		13	14	15	16	E 17	E 18	19	20	21	22	E 23		
1. bromacil 80% WP	320.00	12.00	26.00	17.00	16.00	9.00	3.00	12.00	19.00	20.00	12.00	17.00	0.00	
2. ametryn 80% WP	320.00	0.00	8.00	6.00	7.00	5.00	0.00	8.00	7.00	12.00	5.00	0.00	0.00	
3. haloxyfop-R-methyl 10.8% EC	12.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4. fluazifop-P-butyl 15% EC	24.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
5. untreated control	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	

หมายเหตุ: หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd.); DCTAE

ตารางที่ 8 จำนวนต้นหญ้าตีนกาที่เหลือหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสาร

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	จำนวนต้นวัชพืช (ต้น)											
		ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1. bromacil 80% WP	320.00	18	22	23	7	15	0	8	0	14	17	22	22
2. ametryn 80% WP	320.00	3	5	0	0	1	0	5	0	6	8	6	12
3. haloxyfop-R-methyl 10.8% EC	12.96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4. fluazifop-P-butyl 15% EC	24.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5. untreated control	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

หมายเหตุ: หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.); ELUIN

ตารางที่ 8 จำนวนต้นหญ้าตีนกาที่เหลือหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสาร (ต่อ)

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	จำนวนต้นวัชพืช (ต้น)											
		ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	susceptible
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	check
1. bromacil 80% WP	320.00	8	0	11	11	9	24	22	15	16	25	18	0
2. ametryn 80% WP	320.00	7	0	5	8	12	9	3	9	7	11	13	0
3. haloxyfop-R-methyl 10.8% EC	12.96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4. fluazifop-P-butyl 15% EC	24.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5. untreated control	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

หมายเหตุ: หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.); ELUIN

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าตีนกาหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสาร

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากร (เปอร์เซ็นต์)											
		ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	ELUIN 12
1. bromacil 80% WP	320.00	18.00	22.00	23.00	7.00	15.00	0.00	8.00	0.00	14.00	17.00	22.00	22.00
2. ametryn 80% WP	320.00	3.00	5.00	0.00	0.00	1.00	0.00	5.00	0.00	6.00	8.00	6.00	12.00
3. haloxyfop-R-methyl 10.8% EC	12.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4. fluazifop-P-butyl 15% EC	24.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5. untreated control	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

หมายเหตุ: หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.); ELUIN

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากรหญ้าตีนกาหลังจากพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก ที่ระยะ 14 วัน หลังพ่นสาร (ต่อ)

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (g ai/rai)	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของประชากร (เปอร์เซ็นต์)												
		ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	ELUIN	susceptible
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	check	
1. bromacil 80% WP	320.00	8.00	0.00	11.00	11.00	9.00	24.00	22.00	15.00	16.00	25.00	18.00	0.00	
2. ametryn 80% WP	320.00	7.00	0.00	5.00	8.00	12.00	9.00	3.00	9.00	7.00	11.00	13.00	0.00	
3. haloxyfop-R-methyl 10.8% EC	12.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
4. fluazifop-P-butyl 15% EC	24.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
5. untreated control	-	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	

หมายเหตุ: หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.); ELUIN

ตารางที่ 10 ความถี่ในการเกิดวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก

สารกำจัดวัชพืช	ความถี่ (เปอร์เซ็นต์)	
	หญ้าปากควาย	หญ้าตีนกา
1. hexazinone/diuron 60% WG	69.57	73.91
2. atrazine 80% WP	82.61	100.00
3. ametryn 80% WP	95.65	95.65
4. pendimethalin 33% EC	47.83	47.83
5. diuron 80% WP	100.00	100.00

ตารางที่ 11 ความถี่ในการเกิดวัชพืชต้านทานสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก

สารกำจัดวัชพืช	ความถี่ (เปอร์เซ็นต์)	
	หญ้าปากควาย	หญ้าตีนกา
1. bromacil 80% WP	95.65	86.96
2. ametryn 80% WP	82.61	78.26
3. haloxyfop-R-methyl 10.8% EC	0.00	0.00
4. fluazifop-P-butyl 15% EC	0.00	0.00

ตารางที่ 12 ชนิดและจำนวนวัชพืช ที่ระยะ 30 วัน หลังปลูก แปลงทดลอง อำเภอสามร้อยยอด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ชนิดวัชพืช	จำนวน (ต้น/ตารางเมตร)	เปอร์เซ็นต์
หญ้าตีนกา (<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.)	60	33.52
หญ้าตีนตีด (<i>Brachiaria reptans</i> (L.) C.A.Gardner & C.E.Hubb.)	35	19.55
หญ้าตีนนก (<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.)	15	8.38
หญ้าตีนนก (<i>Digitaria sacchariflora</i> (Nees) Henrard)	23	12.85
สาบม่วง (<i>Praxelis clematidea</i> (Griseb.) R.M.King & H.Rob.)	35	19.55
ผักเบี้ยหิน (<i>Trianthema portulacastrum</i> L.)	11	6.15
รวม	179	100.00

ตารางที่ 13 ชนิดและจำนวนวัชพืช ที่ระยะ 30 วัน หลังปลูก แปลงทดลอง อำเภอปรางบุรี จังหวัด
ประจวบคีรีขันธ์

ชนิดวัชพืช	จำนวน (ต้น/ตารางเมตร)	เปอร์เซ็นต์
หญ้าตีนกา (<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.)	12	5.97
หญ้าตีนติด (<i>Brachiaria reptans</i> (L.) C.A.Gardner & C.E.Hubb.)	30	14.93
หญ้าตีนนก (<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.)	38	18.91
หญ้าตีนนก (<i>Digitaria sacchariflora</i> (Nees) Henrard)	75	37.31
สาบม่วง (<i>Praxelis clematidea</i> (Griseb.) R.M.King & H.Rob.)	22	10.95
หญ้ายาง (<i>Euphorbia heterophylla</i> L.)	11	4.98
ผักเบี้ยหิน (<i>Trianthema portulacastrum</i> L.)	14	6.97
รวม	201	100.00

ตารางที่ 14 ความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก (pre-emergence) ที่ระยะ 30, 60 และ 90 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช จากการประเมินด้วยสายตา

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่)	ความเป็นพิษ					
		อ.สามร้อยยอด			อ.ปราณบุรี		
		30 วัน	60 วัน	90 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
oxyfluorfen+pendimethalin ตามด้วย ametryn	24+165, 400	0	0	0	0	0	0
flumioxazin ตามด้วย bromacil+diuron	20, 400+400	4	3	1	4	3	1
indaziflam ตามด้วย bromacil+diuron	12, 400+400	2	1	0	2	1	0
alachlor+diuron ตามด้วย bromacil	320+320, 400	0	0	0	0	0	0
topramezone+atrazine ตามด้วย bromacil+ametryn	5.6+15, 400+400	0	0	0	0	0	0
pendimethalin+diuron ตามด้วย bromacil+atrazine	165+320, 400+400	0	0	0	0	0	0
metribuzin ตามด้วย bromacil+atrazine	140, 400+400	0	0	0	0	0	0
bromacil+diuron ตามด้วย diuron+ametryn	400+400, 400+400	1	1	0	1	1	0
acetochlor+atrazine ตามด้วย bromacil+diuron	250+360, 400+400	0	0	0	0	0	0
กำจัดวัชพืชด้วยมือ	-	0	0	0	0	0	0
ไม่กำจัดวัชพืช	-	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ: 0 = ไม่เป็นพิษ 1-3 = เป็นพิษเล็กน้อย 4-6 = เป็นพิษปานกลาง 7-9 = เป็นพิษรุนแรง และ 10 = พืชปลูกตาย

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชโดยรวม ของสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนงอก (pre-emergence) ที่ระยะ 30, 60 และ 90 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช จากการประเมินด้วยสายตา

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่)	ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชโดยรวม					
		อ.สามร้อยยอด			อ.ปราณบุรี		
		30 วัน	60 วัน	90 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
oxyfluorfen+pendimethalin ตามด้วย ametryn	24+165, 400	10	10	9	10	10	9
flumioxazin ตามด้วย bromacil+diuron	20, 400+400	10	10	8	10	10	8
indaziflam ตามด้วย bromacil+diuron	12, 400+400	10	10	10	10	10	10
alachlor+diuron ตามด้วย bromacil	320+320, 400	10	10	10	10	10	10
topramezone+atrazine ตามด้วย bromacil+ametryn	5.6+15, 400+400	10	10	10	10	10	10
pendimethalin+diuron ตามด้วย bromacil+atrazine	165+320, 400+400	10	10	9	10	10	8
metribuzin ตามด้วย bromacil+atrazine	140, 400+400	10	10	10	10	10	10
bromacil+diuron ตามด้วย diuron+ametryn	400+400, 400+400	10	10	10	10	10	10
acetochlor+atrazine ตามด้วย bromacil+diuron	250+360, 400+400	10	10	10	10	10	10
กำจัดวัชพืชด้วยมือ	-	10	10	10	10	10	10
ไม่กำจัดวัชพืช	-	0	0	0	0	0	0

หมายเหตุ: 0 = ควบคุมไม่ได้ 1-3 = ควบคุมได้เล็กน้อย 4-6 = ควบคุมได้ปานกลาง 7-9 = ควบคุมได้ดี และ 10 = ควบคุมได้สมบูรณ์

ตารางที่ 16 น้ำหนักแห้งวัชพืชโดยรวม ที่ระยะ 30, 60 และ 90 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่)	น้ำหนักแห้งวัชพืชโดยรวม (กรัม/ตารางเมตร)					
		อ.สามร้อยยอด			อ.ปราณบุรี		
		30 วัน	60 วัน	90 วัน	30 วัน	60 วัน	90 วัน
oxyfluorfen+pendimethalin ตามด้วย ametryn	24+165, 400	0.00 a ^{1/}	0.00 a	14.00 b	0.00 a	0.00 a	18.75 b
flumioxazin ตามด้วย bromacil+diuron	20, 400+400	0.00 a	0.00 a	18.75 b	0.00 a	0.00 a	17.25 b
indaziflam ตามด้วย bromacil+diuron	12, 400+400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
alachlor+diuron ตามด้วย bromacil	320+320, 400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
topramezone+atrazine ตามด้วย bromacil+ametryn	5.6+15, 400+400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
pendimethalin+diuron ตามด้วย bromacil+atrazine	165+320, 400+400	0.00 a	0.00 a	16.25 b	0.00 a	0.00 a	19.50 b
metribuzin ตามด้วย bromacil+atrazine	140, 400+400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
bromacil+diuron ตามด้วย diuron+ametryn	400+400, 400+400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
acetochlor+atrazine ตามด้วย bromacil+diuron	250+360, 400+400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
กำจัดวัชพืชด้วยมือ	-	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
ไม่กำจัดวัชพืช	-	103.75 b	168.75 b	297.00 c	129.50 b	208.75 b	335.50 c
C.V. %		52.81	16.78	23.21	29.31	47.64	28.39

^{1/} ตัวเลขในสตมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 17 ชนิดและจำนวนวัชพืช ที่ระยะ 30 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังออก แปลง
ทดลอง อำเภอสามร้อยยอด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ชนิดวัชพืช	จำนวน (ต้น/ตารางเมตร)	เปอร์เซ็นต์
หญ้าตีนกา (<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.)	53	25.24
หญ้าตีนติด (<i>Brachiaria reptans</i> (L.) C.A.Gardner & C.E.Hubb.)	40	19.05
หญ้าตีนนก (<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.)	12	5.71
หญ้าตีนนก (<i>Digitaria sacchariflora</i> (Nees) Henrard)	50	23.81
สาบม่วง (<i>Praxelis clematidea</i> (Griseb.) R.M.King & H.Rob.)	45	21.43
ผักเบี้ยหิน (<i>Trianthema portulacastrum</i> L.)	10	4.76
รวม	210	100.00

ตารางที่ 18 ชนิดและจำนวนวัชพืช ที่ระยะ 30 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังออก
แปลงทดลอง อำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ชนิดวัชพืช	จำนวน (ต้น/ตารางเมตร)	เปอร์เซ็นต์
หญ้าตีนกา (<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.)	15	6.70
หญ้าตีนติด (<i>Brachiaria reptans</i> (L.) C.A.Gardner & C.E.Hubb.)	45	20.09
หญ้าตีนนก (<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.)	35	15.63
หญ้าตีนนก (<i>Digitaria sacchariflora</i> (Nees) Henrard)	80	35.71
สาบม่วง (<i>Praxelis clematidea</i> (Griseb.) R.M.King & H.Rob.)	35	15.63
ผักเบี้ยหิน (<i>Trianthema portulacastrum</i> L.)	14	6.25
รวม	224	100.00

ตารางที่ 19 ความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก (post-emergence) ที่ระยะ 30 และ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช จากการประเมินด้วยสายตา

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่)	ความเป็นพิษ			
		อ.สามร้อยยอด		อ.ปราณบุรี	
		30 วัน	60 วัน	30 วัน	60 วัน
oxyfluorfen+pendimethalin ตามด้วย ametryn	24+165, 400	1	0	1	0
flumioxazin ตามด้วย bromacil+diuron	20, 400+400	2	0	2	0
indaziflam ตามด้วย bromacil+diuron	12, 400+400	2	0	2	0
alachlor+diuron ตามด้วย bromacil	320+320, 400	2	0	2	0
topramezone+atrazine ตามด้วย bromacil+ametryn	5.6+15, 400+400	2	0	2	0
pendimethalin+diuron ตามด้วย bromacil+atrazine	165+320, 400+400	2	0	2	0
metribuzin ตามด้วย bromacil+atrazine	140, 400+400	2	0	2	0
bromacil+diuron ตามด้วย diuron+ametryn	400+400, 400+400	1	0	1	0
acetochlor+atrazine ตามด้วย bromacil+diuron	250+360, 400+400	2	0	2	0
กำจัดวัชพืชด้วยมือ	-	0	0	0	0
ไม่กำจัดวัชพืช	-	0	0	0	0

หมายเหตุ: 0 = ไม่เป็นพิษ 1-3 = เป็นพิษเล็กน้อย 4-6 = เป็นพิษปานกลาง 7-9 = เป็นพิษรุนแรง และ 10 = พืชปลูกตาย

ตารางที่ 20 ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชโดยรวม ของสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก (post-emergence) ที่ระยะ 30 และ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช จากการประเมินด้วยสายตา

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่)	ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืชโดยรวม			
		อ.สามร้อยยอด		อ.ปราณบุรี	
		30 วัน	60 วัน	30 วัน	60 วัน
oxyfluorfen+pendimethalin ตามด้วย ametryn	24+165, 400	10	9	10	9
flumioxazin ตามด้วย bromacil+diuron	20, 400+400	10	10	10	10
indaziflam ตามด้วย bromacil+diuron	12, 400+400	10	10	10	10
alachlor+diuron ตามด้วย bromacil	320+320, 400	10	10	10	10
topramezone+atrazine ตามด้วย bromacil+ametryn	5.6+15, 400+400	10	10	10	10
pendimethalin+diuron ตามด้วย bromacil+atrazine	165+320, 400+400	10	10	10	10
metribuzin ตามด้วย bromacil+atrazine	140, 400+400	10	10	10	10
bromacil+diuron ตามด้วย diuron+ametryn	400+400, 400+400	10	9	10	9
acetochlor+atrazine ตามด้วย bromacil+diuron	250+360, 400+400	10	10	10	10
กำจัดวัชพืชด้วยมือ	-	10	10	10	10
ไม่กำจัดวัชพืช	-	0	0	0	0

หมายเหตุ: 0 = ควบคุมไม่ได้ 1-3 = ควบคุมได้เล็กน้อย 4-6 = ควบคุมได้ปานกลาง 7-9 = ควบคุมได้ดี และ 10 = ควบคุมได้สมบูรณ์

ตารางที่ 21 น้ำหนักแห้งวัชพืชโดยรวม ที่ระยะ 30 และ 60 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืชประเภทหลังงอก

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่)	น้ำหนักแห้งวัชพืชโดยรวม (กรัม/ตารางเมตร)			
		อ.สามร้อยยอด		อ.ปราณบุรี	
		30 วัน	60 วัน	30 วัน	60 วัน
oxyfluorfen+pendimethalin ตามด้วย ametryn	24+165, 400	0.00 a ^{1/}	56.25 c	0.00 a	27.75 b
flumioxazin ตามด้วย bromacil+diuron	20, 400+400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
indaziflam ตามด้วย bromacil+diuron	12, 400+400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
alachlor+diuron ตามด้วย bromacil	320+320, 400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
topramezone+atrazine ตามด้วย bromacil+ametryn	5.6+15, 400+400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
pendimethalin+diuron ตามด้วย bromacil+atrazine	165+320, 400+400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
metribuzin ตามด้วย bromacil+atrazine	140, 400+400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
bromacil+diuron ตามด้วย diuron+ametryn	400+400, 400+400	0.00 a	23.75 b	0.00 a	19.25 b
acetochlor+atrazine ตามด้วย bromacil+diuron	250+360, 400+400	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
กำจัดวัชพืชด้วยมือ	-	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
ไม่กำจัดวัชพืช	-	398.75 b	438.75 d	408.75 b	427.50 c
C.V. %		35.99	20.93	23.97	18.97

^{1/} ตัวเลขในสตมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 22 ความสูงสับปะรด ที่ระยะ 30, 60 และ 90 วัน หลังพ่นสารกำจัดวัชพืช

กรรมวิธี	อัตราการใช้ (กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่)	ความสูง (เซนติเมตร)			
		อ.สามร้อยยอด		อ.ปราณบุรี	
		30 วัน	60 วัน	30 วัน	60 วัน
oxyfluorfen+pendimethalin ตามด้วย ametryn	24+165, 400	50.75 abc ^{1/}	55.25 a	45.25 a	49.75 ab
flumioxazin ตามด้วย bromacil+diuron	20, 400+400	45.50 e	52.50 bc	42.25 c	46.75 c
indaziflam ตามด้วย bromacil+diuron	12, 400+400	47.25 d	52.00 c	43.25 bc	48.00 bc
alachlor+diuron ตามด้วย bromacil	320+320, 400	51.00 abc	56.25 a	45.00 ab	50.00 a
topramezone+atrazine ตามด้วย bromacil+ametryn	5.6+15, 400+400	49.25 c	54.50 abc	45.25 a	50.00 a
pendimethalin+diuron ตามด้วย bromacil+atrazine	165+320, 400+400	49.75 bc	55.00 ab	45.50 a	50.75 a
metribuzin ตามด้วย bromacil+atrazine	140, 400+400	50.75 abc	55.50 a	44.75 ab	49.75 ab
bromacil+diuron ตามด้วย diuron+ametryn	400+400, 400+400	51.25 ab	56.00 a	45.75 a	50.75 a
acetochlor+atrazine ตามด้วย bromacil+diuron	250+360, 400+400	51.00 abc	56.00 a	45.50 a	50.25 a
กำจัดวัชพืชด้วยมือ	-	51.75 a	56.75 a	45.50 a	51.00 a
ไม่กำจัดวัชพืช	-	51.25 ab	57.25 a	45.50 a	50.75 a
C.V. %		2.34	3.05	2.82	2.45

^{1/} ตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธี DMRT

การผลิตและการใช้ไรตัวห้ำ *Amblyseius* spp. ควบคุมเพลี้ยไฟ
 Mass Production and Utilization of Predatory Mites, *Amblyseius* spp.
 for Controlling Thrips

อทิติยา แก้วประดิษฐ์ พิเชฐ เขาวนวัฒน์วงศ์ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง
 อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล วิมลวรรณ โชติวงศ์
 กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The predaceous mite, *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) was introduced from the Netherlands to Thailand in May 2016 to study its biology, life cycle, biological attributes, rate of release, and predation efficiency on thrips in the quarantine laboratory and the greenhouse. The study when using *Scirtothrips dorsalis* as food, the duration of egg stage, protonymph, deutonymph and adult averaged 1.50 ± 0.28 , 0.67 ± 0.04 , 0.88 ± 0.72 , 1.00 ± 0.13 and 4.05 ± 1.17 days, respectively. Adult female laid 3.63 ± 0.65 egg per day, totaling 52.25 ± 5.25 eggs during the oviposition period of 18.19 ± 3.34 days. Study and analysis of the life table for the biological attributes using larvae and nymphs of *S. dorsalis*, eggs of *Corcyra cephalonica* and pollens from *Typha angustifolia* revealed the net reproductive rate of increase (R_0) = 12.54, 20.02 and 4.53; the cohort generation time (T_c) = 14.83, 14.99 and 14.22 days; the capacity of increase (r_c) = 0.17, 0.19 and 0.10 เท่า and the finite rate of increase (λ) = 1.18, 1.22 and 1.11, respectively. Study on the predation efficiency of *A. swirskii* using larvae as prey of *S. dorsalis*, *C. phaseoli* and *T. palmi* as prey showed the highest consumption on *T. palmi* were averaging 66.50 ± 5.54 larvae per day which is statistically different ($P < 0.05$) from 60.80 ± 4.16 larvae per day in *S. dorsalis* and 58.40 ± 4.81 larvae per day in *C. phaseoli*.: Study on the rate of release of *A. swirskii* it was found that 4 mites could control all 20 *T. palmi* on the eggplant in 3 days. On the use of *A. swirskii* to control

รหัสการทดลอง 03-05-59-02-01-00-08-59

T. palmi on the eggplant in the greenhouse, It was found that after 14 days, the use of 30 mites could reduce the number of thrips with no statistically significant difference from from spraying with spinetoram. And after 21 days, it was found that the number of thrips reduced by the use of 10, 20 and 30 mites showed no significant difference from spraying with spinetoram.

Keyword : predaceous mite, *Amblyseius swirskii* life cycle, prey and food, biological attributes, rate of release, consumption efficiency

บทคัดย่อ

นำไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii* เข้ามาในประเทศไทย เมื่อเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2559 เพื่อศึกษา วงจรชีวิต คุณลักษณะทางชีววิทยา อัตราการปลดปล่อย และประสิทธิภาพการกินเพลี้ยไฟ ในห้องปฏิบัติการกักกันและโรงเรือนทดลอง การศึกษาวงจรชีวิตเมื่อเลี้ยงด้วยเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* พบว่าช่วงเวลาของระยะไข่ ตัวอ่อน protonymph, deutonymph และตัวเต็มวัย มีค่าเฉลี่ย 1.50 ± 0.28 , 0.67 ± 0.04 , 0.88 ± 0.72 , 1.00 ± 0.13 และ 4.05 ± 1.17 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ 3.63 ± 0.65 ฟองต่อวัน วางไข่รวม 52.25 ± 5.25 ฟอง ในช่วงเวลาการวางไข่ 18.19 ± 3.34 วัน การศึกษาคุณลักษณะทางชีววิทยา โดยการวิเคราะห์ตารางชีวิต เมื่อใช้ตัวอ่อนเพลี้ยไฟพริก *S. dorsalis* ไข่ผีเสื้อข้าวสาร *Corcyra cephalonica* และเกสรต้นธูปฤๅษี *Typha angustifolia* เป็นอาหาร พบว่า อัตราการเจริญขยายพันธุ์สุทธิ (R_0) เท่ากับ 12.54, 20.02 และ 4.53 เท่า ชั่วอายุของกลุ่ม (T_c) เท่ากับ 14.83, 14.99 และ 14.22 วัน อัตราการเพิ่มทางกรรมพันธุ์ (r_c) เท่ากับ 0.17, 0.19 และ 0.10 เท่า และอัตราการเพิ่มแท้จริง (λ) เท่ากับ 1.18, 1.22 และ 1.11 เท่า ตามลำดับ การศึกษาประสิทธิภาพการกินเหยื่อ คือตัวอ่อนของเพลี้ยไฟพริก *S. dorsalis* เพลี้ยไฟถั่ว *Caliothrips phaseoli* และ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* พบว่า *A. swirskii* กินเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ได้มากที่สุดเฉลี่ย 66.50 ± 5.54 ตัวต่อวัน และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับ 60.80 ± 4.16 ตัวต่อวัน ในเพลี้ยไฟพริก *S. dorsalis* และ 58.40 ± 4.81 ตัวต่อวัน ในเพลี้ยไฟถั่ว *C. phaseoli* การศึกษาอัตราการปลดปล่อยไรตัวห้ำ *A. swirskii* พบว่าการปล่อยไร 4 ตัว สามารถกินเพลี้ยไฟฝ้าย 20 ตัว บนต้นมะเขือเปราะได้หมดใน 3 วัน และ ในการใช้ไรตัวห้ำ *A. swirskii* ควบคุมเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* บนต้นมะเขือเปราะในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่าหลังการทดลอง 14 วัน การปล่อยไรตัวห้ำ 30 ตัว สามารถลดจำนวนเพลี้ยไฟลงได้ โดยนัยความสำคัญทางสถิติ ไม่แตกต่างกับการพ่นสาร spinetoram. และหลังทำการทดลอง 21 วัน พบว่าจำนวนเพลี้ยไฟฝ้ายที่ลดลงในกรรมวิธีที่ปล่อยไรตัวห้ำ 10, 20 และ 30 ตัว ทั้งหมด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีที่พ่นสาร spinetoram

คำสำคัญ : ไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii* วงจรชีวิต เหยื่อและอาหาร คุณลักษณะทางชีววิทยา อัตราการปลดปล่อย ประสิทธิภาพการกิน

คำนำ

เพลี้ยไฟเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของพืชหลายชนิด การปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้ในการควบคุมเป็นอุปสรรคหนึ่ง ในการผลิตจำหน่ายและการบริโภคในประเทศ รวมทั้งทำให้การผลิตพืชส่งออกมีปัญหาและการกีดกันทางการค้า นอกจากนี้ ยังมี การดื้อยาของแมลงศัตรูพืช เช่น เพลี้ยไฟ และแมลงหริ่งขาว ที่มีการระบาดต่อเนื่อง ในพื้นที่ที่มีการใช้สารฆ่าแมลงทำให้ต้องมีการหาแนวทางลดการระบาดของเพลี้ยไฟโดยไม่ใช้สารเคมี เช่น โดยการอนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติ (natural enemy conservation) หรือโดยการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) โดยการเพาะเลี้ยงศัตรูธรรมชาติทั้งตัวห้ำ และ/หรือ ตัวเบียนที่มีประสิทธิภาพ ที่มีอยู่แล้วในท้องถิ่น หรือ ศัตรูธรรมชาติที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ให้มีปริมาณเพียงพอ นำไปปลดปล่อยในภาคสนามเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชในเป้าหมาย โดยอาจเป็นการควบคุมโดยชีววิธีแบบเพาะเชื้อ (inoculative release) โดยการใช้ตัวควบคุมในปริมาณต่ำ หรือ การควบคุมโดยชีววิธีแบบท่วมท้น (inundative release) โดยการใช้ตัวควบคุมในปริมาณสูง (Eilenberg *et al.*, 2001; Hajek, 2004)

ไรตัวห้ำในสกุล *Amblyseius* มีมากกว่า 280 ชนิด ทั่วโลก และมีการนำมาใช้เป็นตัวห้ำควบคุมแมลงและไรศัตรูพืชประมาณ 25 ชนิด (Sabelis and van Rijn, 1997) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไรตัวห้ำ *Swirski mite, Amblyseius swirskii* (Athias-Henriot) (Acari: Phytoseiidae) ซึ่งมีชื่อพ้อง (synonym) คือ *Amblyseius rykei*, *Neoseiulus swirskii* และ *Typhlodromips swirskii* (Doğramaci *et al.*, 2016) โดย *A. swirskii* ถูกจัดให้เป็นไรตัวห้ำแบบกินอาหารทั่วไป (diet generalist) หรือ กินทั่วไปแบบที่ III (Type III generalist) ไม่เป็นแบบกินเฉพาะ (diet specialist หรือ Type I & II specialists) (McMurtry and Croft, 1997; Croft *et al.*, 2004) ชอบกินเหยื่อศัตรูพืชที่มีลำตัวอ่อนขนาดเล็ก รวมทั้งละอองเกสรพืช และ เมือก (exudates) ที่ขับออกมาโดยต้นพืช มีการนำ *A. swirskii* ไปใช้ในการควบคุมเพลี้ยไฟ แมลงหริ่งขาว และไรศัตรูพืช ในพืชที่ปลูกในโรงเรือน และ ในแปลงกล้าพืช และมีการเพาะเลี้ยงเพื่อจำหน่ายเป็นการค้าในยุโรปและอเมริกาเหนือ (Doğramaci *et al.*, 2016) ไรตัวห้ำ *A. swirskii* มีถิ่นเดิมอยู่ในประเทศแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนตะวันออก ในอิสราเอล และอียิปต์ อิตาลี ไชปรัส กรีซ และตุรกี เป็นไรตัวห้ำที่มีประสิทธิภาพสูง ถ้ามีการนำเข้ามาในประเทศไทย สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมเพลี้ยไฟ และแมลงหริ่งขาวที่เป็นแมลงชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่รุกรานได้หลายชนิด (Anonymous, 2018) รวมทั้งการควบคุมเพลี้ยไฟชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทยด้วย

โครงการวิจัยนี้ ได้นำไรตัวห้ำ *A. swirskii* เข้ามาประเทศไทย โดยการซื้อจาก Koppert Biological Systems ประเทศเนเธอร์แลนด์ เมื่อเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2559 มาทำการศึกษาชีววิทยา และทดสอบประสิทธิภาพ เพื่อนำไปใช้เป็นตัวห้ำที่เป็นตัวควบคุมโดยชีววิธี (Biological control agent - BCA) ของเพลี้ยไฟ และสามารถที่จะแนะนำให้เกษตรกรนำไปใช้ควบคุมเพลี้ยไฟที่เป็นศัตรูพืชในโรงเรือนเพาะปลูก หรือ นำไปปล่อย (release) ในแปลงปลูกภาคสนาม ให้สามารถตั้งรกรากได้ในระบบนิเวศ นอกเหนือไปจากศัตรูธรรมชาติของเพลี้ยไฟที่พบในประเทศไทยหลายชนิด เช่น แตน

เบียนไข่ *Megaphragma* sp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) แตนเบียนตัวหนอน *Ceranisus menes* (Hymenoptera: Eulophidae) และ แมลงตัวห้าหลายชนิด รวมทั้งไรตัวห้า 2 ชนิด คือ *Amblyseius* sp. และ *Phytoseius* sp. (Aarina: Phytoseiidae) (Hirose *et al.*, 1989, 1993; Hirose, 1990; Okajima *et al.*, 1992) รวมทั้งเพลี้ยไฟตัวห้า (predatory thrips) อีกมากกว่า 10 ชนิดใน 5 สกุล ในวงศ์ Phlaeothripidae เช่น *Aleurodothrips fasciapennis*, *Androthrips flavipes*, *Androthrips ramachandrai*, *Karnyothrips flavipes*, *Karnyothrips* spp., *Leptothrips* sp. *Podothrips lucasseni* และ *Podothrips* spp. (Saengyot, 2016) เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของโครงการคือ ศึกษาชีววิทยา วงจรชีวิต ความสามารถในการวางไข่ เหยื่อและอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยง โดยการวิเคราะห์คุณลักษณะทางชีววิทยาจากตารางชีวิต เมื่อใช้เหยื่อชนิดต่าง ๆ ของไรตัวห้า *A. swirskii* อัตราการปลดปล่อย และประสิทธิภาพในการกินเพลี้ยไฟชนิดต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการกักกัน (quarantine laboratory) และโรงเรือนทดลอง ตามเงื่อนไขของการอนุญาตนำสิ่งต้องห้ามเข้ามาในราชอาณาจักรเพื่อการทดลองหรือวิจัย ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ.2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม ภายใต้กรมวิชาการเกษตร ก่อนที่จะนำไปใช้ควบคุมเพลี้ยไฟในโรงเรือนและแปลงปลูกพืชในภาคสนามต่อไป

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

การเก็บรักษาแหล่งสำรองของไรตัวห้า *A. swirskii*

นำไรตัวห้า *A. swirskii* เข้ามา โดยการสั่งซื้อจากบริษัท Koppert Biological Systems ประเทศเนเธอร์แลนด์ เมื่อเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2559 จำนวนประมาณ 50,000 ตัว นำมาทำการเก็บรักษาและเพาะเลี้ยงให้เป็นแหล่งสำรอง (stock culture) ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกใส ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.0 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร รองพื้นด้วยขี้เลื่อยละเอียด ให้เป็นที่หลบซ่อนตัวรวม 5 จาน โดยให้ไข่ของผีเสื้อข้าวสาร *Corcyra cephalonica* เป็นอาหาร วางไว้ไม่ให้ถูกแสงโดยตรง บนชั้นวางของในห้องปฏิบัติการกักกัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 80 ± 10 เปอร์เซ็นต์ และ ช่วงแสง 14D:10L เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาทดลองและทดสอบต่าง ๆ

1. การศึกษาชีววิทยาและวงจรชีวิตของไรตัวห้า *A. swirskii*

ทำการศึกษาชีววิทยาวงจรชีวิตของไรตัวห้า *A. swirskii* ในสภาพห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิเฉลี่ย 27 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 ± 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อไรตัวผู้และตัวเมียจำนวน 20 คู่ ลงบนใบมะเขือเปราะขนาด 4.5x4.5 เซนติเมตร ที่วางบนแผ่นสำลิจับน้ำ ในจานพลาสติกใส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร ปล่อยให้ตัวเมียวางไข่ 1 วัน ต่อจากนั้น นำไข่ที่ได้ 50 ฟอง มาแยกเลี้ยงเดี่ยว ๆ บนใบมะเขือเปราะ ที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 2.5x2.5 เซนติเมตร วางบนแผ่นสำลิจับน้ำ ในจานพลาสติกใส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร เมื่อไข่ฟักออกมา ใส่ตัวอ่อนเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* ให้เป็นอาหาร บันทึก

ช่วงเวลาของการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะไข่ ระยะตัวอ่อน จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย และบันทึกความสามารถในการวางไข่ของไรตัวห้ำตัวเมียด้วย

2. การศึกษาชนิดของอาหารหรือเหยื่อที่เหมาะสมโดยใช้ค่าของคุณลักษณะทางชีววิทยา

ในการศึกษาชนิดของอาหารหรือเหยื่อที่เหมาะสมของไรตัวห้ำ *A. swirskii* ในห้องปฏิบัติการ ใช้ค่าของคุณลักษณะทางชีววิทยา (biological attribute) ต่าง ๆ จากการวิเคราะห์ตารางชีวิต (life table) ที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารหรือเหยื่อที่ใช้ ให้เป็น ตัวกำหนด (parameter) เพื่อการเปรียบเทียบ โดยอาหารหรือเหยื่อ 3 ชนิดที่ใช้ คือ ตัวอ่อนเพลี้ยไฟพริก *S. dorsalis* ไข่ของผีเสื้อข้าวสาร *C. cephalonica* และ ละอองเกสรของต้นธูปฤๅษี *Typha angustifolia* (Typhaceae) โดยในการใช้อาหารหรือเหยื่อแต่ละชนิดทั้งสามชนิด ใช้ไข่ของไรตัวห้ำจากแหล่งสำรอง 100 ฟอง มาแยกเลี้ยงเดี่ยว ๆ บนใบหม่อนที่ตัดเป็นแผ่นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 เซนติเมตร วางบนแผ่นสำลีชุ่มน้ำลงในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 เซนติเมตร สูง 1.5 เซนติเมตร เมื่อไข่ในแต่ละจานฟักออกมา ให้อาหารที่ต้องการทดสอบ คือตัวอ่อนของเพลี้ยไฟพริก ไข่ของผีเสื้อข้าวสาร และ ละอองเกสรต้นธูปฤๅษี ทุกวัน จนเป็นตัวเต็มวัย แล้วนำไรตัวห้ำเพศผู้และเพศเมียมาผสมพันธุ์กัน และบันทึกจำนวนไข่ของไรตัวห้ำที่วางในแต่ละวันทุก ๆ วัน จนกระทั่งไรตัวห้ำตาย ต่อจากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างตารางชีวิตแบบชีววิทยา (biological life table) ตามวิธีของ Napompeth (1973) อินทวัฒน์ และบรรพต (2521) และอินทวัฒน์ (2548) และวิเคราะห์หาค่าของคุณลักษณะทางชีววิทยาต่าง ๆ คือ อัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_0) ช่วงอายุขัยของกลุ่ม (T_c) อัตราการเพิ่มทางกรรมพันธุ์ (r_c) และ อัตราการเพิ่มแท้จริง (λ) ของไรตัวห้ำ ที่ได้รั้จากการเลี้ยงด้วยอาหารหรือเหยื่อแต่ละชนิด

3. การศึกษาศักยภาพในการกินเพลี้ยไฟชนิดต่าง ๆ

ในการทดลองเพื่อเปรียบเทียบความสามารถของไรตัวห้ำ *A. swirskii* ในการกินเพลี้ยไฟ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด หรือ แบบการสุ่มตัวอย่างเข้าสู่กลุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely randomized design - CRD) 3 กรรมวิธี (เหยื่อ 3 ชนิด) คือตัวอ่อนของเพลี้ยไฟพริก *S. dorsalis* เพลี้ยไฟถั่ว *Caliothrips phaseoli* และ เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* โดยแต่ละกรรมวิธีมี 20 ซ้ำ หน่วยการทดลองคือ จานทดลอง 1 จาน (ไรตัวห้ำ 1 ตัว ต่อ 1 จาน ที่มีเหยื่อ 20 ตัว) ต่อกรรมวิธีต่อซ้ำ เป็นการทดลองแบบไม่มีตัวเลือก (no-choice test) โดยให้เหยื่อวันละ 20 ตัว ในเวลาเดียวกันทุกวัน บันทึกจำนวนเหยื่อแต่ละชนิดที่ไรตัวห้ำกินทั้งหมด และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์นัยสำคัญทางสถิติ และเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan multiple range test (DMRT)

4. การศึกษาประสิทธิภาพของไรตัวห้ำ *A. swirskii* เพื่อควบคุมเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ในสภาพโรงเรือนทดลอง

ในการศึกษาประสิทธิภาพของไรตัวห้ำ *A. swirskii* เพื่อควบคุมเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด หรือ แบบการสุ่มตัวอย่างเข้าสู่กลุ่มโดยสมบูรณ์ (CRD) มีทั้งหมด 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ปล่อยไรตัวห้ำ ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control)

กรรมวิธีที่ 2 ปล่อยไรตัวอ่อนวัยที่ 2 (protonymph)

กรรมวิธีที่ 3 ปล่อยไรตัวอ่อนวัยที่ 3 (deutonymph)

กรรมวิธีที่ 4 ปล่อยไรตัวเต็มวัยเพศเมีย

ปล่อยไรตัวห้ำจำนวน 1 ตัวต่อต้นมะเขืออายุประมาณ 1 เดือน 1 ต้น เป็น 1 หน่วยการทดลอง ต่อกรรมวิธีต่อซ้ำ ใส่เปลือกไฟฟ้าระยะตัวอ่อน 20 ตัว/ต้นมะเขือ ทุกกรรมวิธี นำต้นมะเขือประมาณอายุ 1 เดือน จำนวน 1 ต้น วางในถ้วยพลาสติกขนาด 12 ออนซ์ และปิดด้วยฝาโดมที่เจาะรูเพื่อระบายอากาศ โดยทุกต้นอยู่ในกรงขนาด 50X50X70 เซนติเมตร คลุมด้วยผ้าขาวบาง เพื่อป้องกันไรตัวห้ำหลบหนีออกไปยังต้นอื่น บันทึกจำนวนเปลือกไฟฟ้า หลังจากการปล่อยไรตัวห้ำ ทุก 24 ชั่วโมง จนกระทั่งเปลือกไฟฟ้าตายหมด รวมทั้งความชื้น และอุณหภูมิภายในโรงเรือนทุกวัน ตลอดระยะเวลาทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

5. การศึกษาอัตราการปลดปล่อยไรตัวห้ำ *A. swirskii* เพื่อควบคุมเปลือกไฟฟ้า *T. palmi* บนต้นมะเขือเปราะในสภาพโรงเรือนทดลอง

ปล่อยไรตัวห้ำตามกรรมวิธีดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม กรรมวิธีที่ 2 ปล่อยไรตัวห้ำ 1 ตัว ต่อเปลือกไฟฟ้า 20 ตัว กรรมวิธีที่ 3 ปล่อยไรตัวห้ำ 2 ตัว ต่อเปลือกไฟฟ้า 20 ตัว กรรมวิธีที่ 4 ปล่อยไรตัวห้ำ 3 ตัว ต่อเปลือกไฟฟ้า 20 ตัว และกรรมวิธีที่ 5 ปล่อยไรตัวห้ำ 4 ตัว ต่อเปลือกไฟฟ้า 20 ตัว กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ

นำต้นมะเขือเปราะอายุ 1 เดือน จำนวน 1 ต้น วางในถ้วยพลาสติกขนาด 12 ออนซ์ ใส่เปลือกไฟฟ้าระยะตัวอ่อน 20 ตัว/ต้นมะเขือเปราะ ทุกกรรมวิธี และปล่อยไรตัวห้ำลงไปตามกรรมวิธีข้างต้น จากนั้นปิดด้วยฝาโดมที่เจาะรูเพื่อระบายอากาศ บันทึกจำนวนเปลือกไฟฟ้าที่ไรตัวห้ำกิน ทุก 24 ชั่วโมง จนกระทั่งเปลือกไฟฟ้าตายหมด นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ผลทางสถิติ

6. การใช้ไรตัวห้ำ *A. swirskii* ควบคุมเปลือกไฟฟ้า *T. palmi* ในโรงเรือน

วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized complete block design - RCBD) หรือ Randomized block design - RBD) 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปล่อยไรตัวห้ำในอัตรา 10 ตัว/ต้น

กรรมวิธีที่ 2 ปล่อยไรตัวห้ำในอัตรา 20 ตัว/ต้น

กรรมวิธีที่ 3 ปล่อยไรตัวห้ำในอัตรา 30 ตัว/ต้น

กรรมวิธีที่ 4 พ่นสารฆ่าแมลง spinetoram 12% SC อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ตัวเปรียบเทียบ (control)

ดำเนินการทดลองในโรงเรือนตาข่ายขนาด 3x3x3 เมตร โดยวางต้นมะเขือเปราะที่ปลูกในถ้วยพลาสติก บนพาเลทพลาสติกสีดำขนาด 100x100x15 เซนติเมตร พาเลทละ 20 ต้น จำนวน 4 พาเลท โดยแต่ละพาเลทมี 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ

เริ่มปล่อยไรตัวห้ำและฉีดพ่นสารสไปนีโทแรมเมื่อพบเปลือกไฟฟ้าโดยเฉลี่ย 1 ตัวต่อต้น ทำการปล่อยไรตัวห้ำและพ่นสาร 1 ครั้ง ตรวจสอบเปลือกไฟฟ้าทุกกรรมวิธีโดยนับทั้งต้น ก่อนปล่อยไรตัวห้ำ

และก่อนฟ่นสาร 1 วัน และหลังปล่อยไรตัวห้ำและหลังฟ่นสาร 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน นำข้อมูลจำนวนเพลี้ยไฟฟ่ายมาวิเคราะห์ทางสถิติ

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2563

สถานที่ ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดลองของกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาชีววิทยาและวงจรชีวิตของไรตัวห้ำ *A. swirskii*

ไรตัวห้ำ *A. swirskii* เมื่อเลี้ยงด้วยเพลี้ยไฟฟริก *S. dorsalis* พบว่าลำตัวมีสีขาวนวลเหลือง ขึ้นอยู่กับอาหารที่ไรตัวห้ำกิน ไข่มีรูปร่างยาวรีสีขาวใสขนาด กว้าง 0.17 มิลลิเมตร ยาว 0.22 มิลลิเมตร และเปลี่ยนเป็นสีขาวนวลเมื่อใกล้ฟัก มีระยะการเจริญเติบโต 5 ระยะ คือ ระยะไข่ ตัวอ่อนวัย 1 (larva) ตัวอ่อนวัย 2 (protonymph) ตัวอ่อนวัย 3 (deutonymph) และระยะตัวเต็มวัย (ภาพที่ 1) ขนาดในระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโต แสดงไว้ใน ตารางที่ 1 และช่วงเวลาของการเจริญเติบโตในระยะไข่ ตัวอ่อนวัย 1 (larva) ตัวอ่อนวัย 2 (protonymph) ตัวอ่อนวัย 3 (deutonymph) คือ 1.50 ± 0.28 , 0.67 ± 0.04 , 0.88 ± 0.72 , 1.00 ± 0.13 วัน ตามลำดับ ช่วงระยะไข่ถึงตัวเต็มวัยนาน 4.05 ± 1.17 วัน ตัวเต็มวัยตัวเมียและตัวผู้ มีอายุ (longevity) 18.19 ± 3.34 และ 8.95 ± 1.85 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ตัวเมียวางไข่ได้ 3.63 ± 0.65 ฟอง/ต่อวัน และ 52.25 ± 5.25 ฟอง ตลอดช่วงเวลาการวางไข่ (oviposition period)

Park *et al.* (2010) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงด้วยไรกำมะหยี่ tomato russet mite *Aculops lycopersici* (Acari: Eriophyidae) ไรตัวห้ำ *A. swirskii* จะเจริญเติบโตครบวงจรชีวิตภายใน 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้คือ 4.05 ± 1.17 วัน นอกจากนั้น Park *et al.* (2011) ยังรายงานว่าไรตัวห้ำ *A. swirskii* เจริญเติบโตได้เร็วกว่าเมื่อเลี้ยงด้วยเหยื่อที่มีชีวิต และวางไข่ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงด้วยละอองเกสรของต้นธูปฤๅษี *Typha latifolia* แต่ในขณะเดียวกัน Goleva and Zebitz (2013) ในการศึกษาการใช้ละอองเกสรของพืชชนิดต่าง ๆ 21 ชนิด ซึ่งมีคุณค่าทางอาหารแตกต่างกัน เป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงไรตัวห้ำ *A. swirskii* รายงานว่าละอองเกสรของพืชบางชนิดเป็นพืชสูง บางชนิดเป็นอาหารเสริมที่ดี โดยในภาพรวมพบว่าละอองเกสรของพืช 18 ชนิด เช่น ละหุ่ง และ ทานตะวัน มีคุณสมบัติใกล้เคียงหรือดีกว่าละอองเกสรต้นธูปฤๅษี ซึ่งไม่เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ แต่น่าที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมได้ในอนาคต

2. การศึกษาชนิดของอาหารหรือเหยื่อที่เหมาะสมโดยใช้ค่าของคุณลักษณะทางชีววิทยา

จากการศึกษาตารางชีวิตแบบชีววิทยา (biological life table) ของไรตัวห้ำ เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ ตัวอ่อนเพลี้ยไฟฟริก *S. dorsalis* ไข่ฝั่สั่ข้าวสาร *C. cephalonica* และละอองเกสรต้นธูปฤๅษี *T. angustifolia* นำข้อมูลมาคำนวณค่าคุณลักษณะทางชีววิทยาของไรตัวห้ำ พบว่า

ไรตัวห้ำ ให้ค่าของคุณลักษณะทางชีววิทยา คือ อัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (net reproductive rate, R_0) ช่วงอายุขัยของกลุ่ม (cohort generation time, T_c) อัตราการเพิ่มทางกรรมพันธุ์ (capacity for increase, r_c) และ อัตราการเพิ่มแท้จริง (finite rate of increase, λ) ของไรตัวห้ำที่เลี้ยงด้วยตัวอ่อนเพลี้ยไฟพริก *S. dorsalis* มีค่าเท่ากับ 12.54, 14.83, 0.17 และ 1.18 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงด้วยไข่ฝิเสื้อข้าวสาร *C. cephalonica* มีค่าเท่ากับ 20.02, 14.99, 0.19 และ 1.22 ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงด้วยละอองเกสรต้นธูปฤๅษี *T. angustifolia* มีค่าเท่ากับ 4.53, 14.22, 0.10 และ 1.11 ตามลำดับ ซึ่งทุกค่าของคุณลักษณะทางชีววิทยาของไรตัวห้ำที่เลี้ยงด้วยไข่ฝิเสื้อข้าวสาร *C. cephalonica* มีค่าสูงกว่าไรตัวห้ำที่เลี้ยงด้วยเพลี้ยไฟพริก และ ละอองเกสรต้นธูปฤๅษี (ตารางที่ 3) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าไข่ฝิเสื้อข้าวสาร เป็นอาหารที่มีความเหมาะสมในการนำมาเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ

3. การศึกษาศักยภาพในการกินเพลี้ยไฟชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาพบว่า ตัวเต็มวัยเพศเมียของไรตัวห้ำ กินตัวอ่อนของเพลี้ยไฟพริก *S. dorsalis* เพลี้ยไฟถั่ว *C. phaseoli* และเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ได้วันละ 3.8, 3.6 และ 4.1 ตัวต่อวัน ตามลำดับ และตลอดอายุขัยของตัวเต็มวัยเพศเมียของไรตัวห้ำกินตัวอ่อนของเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ได้มากที่สุดโดยเฉลี่ย 66.5 ± 5.54 ตัว ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับเพลี้ยไฟพริก และเพลี้ยไฟถั่ว (ตารางที่ 4) ซึ่งค่าเฉลี่ยของตัวอ่อนของเพลี้ยไฟทั้ง 3 ชนิด ที่ถูกกินในเวลา 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 16 วัน ได้แสดงไว้ในภาพที่ 3

Xu and Annie (2010) ทำการทดสอบประสิทธิภาพการกินเพลี้ยไฟของไรตัวห้ำ *A. swirskii* รายงานว่าไรตัวห้ำระยะ protonymph และระยะ deutonymph สามารถกินตัวอ่อนเพลี้ยไฟได้ 4.71 และ 4.33 ตัวต่อวัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลของการศึกษาครั้งนี้

4. การศึกษาประสิทธิภาพของไรตัวห้ำ *A. swirskii* เพื่อควบคุมเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ในสภาพโรงเรือนทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า ไรตัวห้ำตัวอ่อนวัยที่ 2 (Protonymph) ตัวอ่อนวัยที่ 3 (deutonymph) และ ระยะเต็มวัยเพศเมีย สามารถกินเพลี้ยไฟได้เฉลี่ย 2.14 ± 1.76 , 2.68 ± 1.80 และ 3.58 ± 2.12 ตัวต่อวัน ตามลำดับ ระยะตัวเต็มวัยเพศเมียกินเพลี้ยไฟได้มากกว่าระยะตัวอ่อนวัยที่ 2 และ 3 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5)

5. การศึกษาอัตราการปลดปล่อยไรตัวห้ำ *A. swirskii* เพื่อควบคุมเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* บนต้นมะเขือเปราะในสภาพโรงเรือนทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการปล่อยไรตัวห้ำ จำนวนประชากรของเพลี้ยไฟฝ้ายจะลดลงจนหมด เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่ปล่อยไรตัวห้ำ อัตราที่ปลดปล่อยไรตัวห้ำ 4 ตัว ต่อเพลี้ยไฟฝ้าย 20 ตัว สามารถลดปริมาณเพลี้ยไฟฝ้ายได้มากที่สุดภายใน 3 วัน (ภาพที่ 3)

6. การใช้ไรตัวห้ำ *A. swirskii* ควบคุมเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* ในสภาพโรงเรือนทดลอง

ก่อนการทดลอง พบว่า จำนวนเพลี้ยไฟฝ้ายในทุกกรรมวิธี เฉลี่ย 1.06-1.37 ตัว/ต้น ความแตกต่างแตกต่างกันไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ หลังวันที่ 3, 5, และ 7 วัน พบว่า กรรมวิธีพ่นสารสาร

spinetoram มีจำนวนเพลี้ยไฟน้อยกว่า และความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ และหลัง 14 วันพบว่าจำนวนเพลี้ยไฟในกรรมวิธีที่ปล่อยไรตัวห้ำ 30 ตัว และกรรมวิธีที่พ่นสารสาร-spinetoram ไม่มีความแตกต่างกันที่มีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังทำการทดลอง 21 วัน พบจำนวนเพลี้ยไฟในกรรมวิธีที่ปล่อยไรตัวห้ำ 10, 20 และ 30 ตัว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีที่พ่นสาร (ตารางที่ 6)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ในการศึกษาได้ข้อมูลของการเจริญเติบโตของไรตัวห้ำ *A. swirskii* ในระยะต่าง ๆ ตั้งแต่ระยะไข่จนถึงระยะตัวเต็มวัย และ ช่วงเวลาของวงจรชีวิต และความสามารถในการวางไข่ พบว่ามีวงจรชีวิตสั้น จากไข่เป็นตัวเต็มวัยใช้เวลานาน 4.05 ± 1.17 วัน ระยะการวางไข่ 18.19 ± 3.34 วัน วางไข่เฉลี่ย 52.25 ± 5.25 ฟอง การเลือกอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณไรตัวห้ำ โดยการเปรียบเทียบคุณลักษณะทางชีววิทยา พบว่าไข่ฝีเสื้อข้าวสาร ให้อัตราการขยายพันธุ์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 20.05 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวอ่อนของเพลี้ยไฟพริก และ ละอองเกสรของต้นรูปฤๅษีเป็นเหยื่อและอาหาร ทางด้านประสิทธิภาพในการกินเหยื่อที่เป็นเพลี้ยไฟในห้องปฏิบัติการ พบว่าตลอดอายุขัย ไรตัวห้ำเพศเมียสามารถกินเพลี้ยไฟพริก เพลี้ยไฟถั่ว และเพลี้ยไฟฝ้าย ได้ 60.80 ± 4.16 , 58.40 ± 4.81 และ 66.50 ± 5.54 ตัว ตามลำดับ การศึกษาประสิทธิภาพและอัตราในการกินเพลี้ยไฟฝ้ายในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่า ระยะตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถกินเพลี้ยไฟได้ประมาณวันละ 3.58 ตัว มีการแนะนำให้ปล่อยไรตัวห้ำเพศเมีย จำนวน 4 ตัว ต่อต้น เพื่อพบเพลี้ยไฟ 20 ตัว ต่อต้นมะเขือเปราะอายุ 1 เดือน และการใช้ไรตัวห้ำ *A. swirskii* ในการควบคุมเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* บนต้นมะเขือเปราะในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีที่ปล่อยไรตัวห้ำจำนวน 30 ตัว หลังทำการทดลอง 14 วัน มีจำนวนเพลี้ยไฟลดลงไม่ต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กับกรรมวิธีพ่น spinetoram และหลังทำการทดลอง 21 วัน พบว่าจำนวนเพลี้ยไฟฝ้ายที่ลดลงในกรรมวิธีที่ปล่อยไรตัวห้ำ 10, 20 และ 30 ตัว ทั้งหมด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีที่พ่นสาร spinetoram

ผลของการศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการกักกันและสภาพโรงเรือนทดลอง ซึ่งเป็นข้อกำหนดภายใต้เงื่อนไขของการอนุญาตนำสิ่งต้องห้ามเข้ามาในราชอาณาจักรเพื่อการทดลองหรือวิจัย ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ.2507 และที่แก้ไขเพิ่มเติม ภายใต้กรมวิชาการเกษตร ก่อนที่จะได้รับการอนุญาตให้นำไรห้ำ ไปใช้ประโยชน์ในการปลดปล่อยในการปลูกพืชในสภาพโรงเรือนเพาะปลูก หรือในสภาพไรต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตร ด้านกีฏวิทยา ดร.มานิตา คงชื่นสิน ที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตรด้านกีฏวิทยา ที่ให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอขอบคุณ คุณอิทธิพล บรรณาการ นักกีฏวิทยาชำนาญการ กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง ที่ให้ความอนุเคราะห์จำแนกชนิดของเพลี้ยไฟและภาพถ่ายภาพทางวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัย คุณสำลี เหลือทรัพย์ และคุณอภิสิทธิ์ แซ่มักดี เจ้าหน้าที่ กลุ่มงานวิจัยโรและแมลงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ช่วยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงเป็นไปตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- อินทวัฒน์ บุรีคำ. 2548. นิเวศวิทยาวิเคราะห์ทางกีฏวิทยา. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน, นครปฐม. 180 หน้า.
- อินทวัฒน์ บุรีคำ และ บรรพต ฌ ป้อมเพชร. 2521. คุณลักษณะทางชีววิทยาของมวนตัวห้ำ *Cantheconidea furcellata* (Wolff) (Hemiptera: Pentatomidae). เอกสารวิชาการฉบับที่ 4. ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 13 หน้า.
- Anonymous. 2018. Biological control: Beneficial insects and mites: Swirskii-System Available at URL <https://www.allaboutswirskii.com/home/>. Accessed on 08/09/2018
- Croft, B.A., J.S. Blackwood, and J.A. McMurtry. 2004. Classifying life-style types of phytoseiid mites: Diagnostic traits. *Experimental and Applied Acarology* 33: 247-260.
- Doğramaci, M., G. Kakkar, V. Kumar, J. Chen, and S. Arthurs. 2016. Swirski mite (suggested common name) *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Arachnida: Mesostigmata: Phytoseiidae). *Featured creatures UF/IFAS. University of Florida.* 9 pp.
- Eilenberg, J., A. Hajek, and C. Lomer. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387-400.
- Goleva, I., and C.P. Zebitz. 2013. Suitability of different pollen as alternative food for the predatory mite *Amblyseius swirskii* (Acari, Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology* 61: 259-283.
- Hajek, A. 2004. Natural enemies. *An Introduction to biological control.* Cambridge University Press, Cambridge, UK. 378 pp.

- Hirose, Y. 1990. Prospective use of natural enemies to control *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae). In: The use of natural enemies to control agricultural pests. FFTC Book, Series No. 40. p. 135-141.
- Hirose, Y., H. Kajita, M. Takagi, S. Okajima, B. Napompeth and S. Buranapanichpan. 1989. Exploration for natural enemies of *Thrips palmi*, an important pest of vegetable crop in the Orient and Pacific Islands: Discovery of its effective parasitoid in Thailand. Abstracts. International Vedula Symposium on Biological Control: A Century of Success. March 27-30, 1989. Riverside, California.
- Hirose, Y., H. Kajita, M. Takagi, S. Okajima, B. Napompeth, and S. Buranapanichpan. 1993. Natural enemies of *Thrips palmi* and their effectiveness in the native habitat, Thailand. *Biological Control* 3(1): 1-15.
- McMurtry, J.A., and B.A. Croft. 1997. Life-styles of phytoseiid mites and their roles in biological control. *Annual Review of Entomology* 42: 291-321.
- Napompeth, B. 1973. Ecology and population dynamics of the corn planthopper, *Peregrinus maidis* (Ashmead) (Homoptera: Delphacidae), in Hawaii. Ph.D. Dissertation. University of Hawaii. Honolulu, Hawaii. 257 pp.
- Okajima, S., Y. Hirose, H. Kajita, M. Takagi, B. Napompeth, and S. Buranapanichpan. 1992. Thrips on fruit vegetables in Southeast Asia. *Applied Entomology & Zoology* 27: 300-303.
- Park, N.H., L. Shipp, and R. Buitenhuis. 2010. Predation, development and oviposition by the predatory mite *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) on tomato russet mite (Acari: Eriophyidae). *Journal of Economic Entomology* 103: 563-569.
- Park, N.H., L. Shipp, R. Buitenhuis, and J.J. Ahn. 2011. Life history parameters of commercially available *Amblyseius swirskii* (Acari: Phytoseiidae) fed on cattail (*Typha latifolia*) pollen and tomato russet mite (*Aculops lycopersici*). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14: 497-501.
- Saengyot, S. 2016. Predatory thrips species composition, their prey and host plant association in Northern Thailand. *Agriculture and Natural Resources* 50: 380-387.
- Sabelis, M.W., and P.C.J. van Rijn. 1997. Predation by insects and mites, pp. 259-354. In: *Thrips as crop pests*. T. Lewis (ed.). CAB International, Wallingford, UK.

Xu, X., and E. Annie. 2010. Prey preference of the predatory mite, *Amblyseius swirskii* between first instar western flower thrips *Frankliniella occidentalis* and nymphs of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Journal of Insect Science* 1: 1-11.

ตารางที่ 1 ขนาดของไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii* ในระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโต เมื่อเลี้ยงด้วยตัวอ่อนของเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* ในสภาพห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิเฉลี่ย 27 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 ± 2 เปอร์เซ็นต์

ระยะของการเจริญเติบโต	ขนาด (มม.)	
	ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	
	กว้าง	ยาว
ระยะไข่	0.17±0.01	0.22±0.02
ตัวอ่อนวัยที่ 1 (larva)	0.18±0.02	0.23±0.02
ตัวอ่อนวัยที่ 2 (protonymph)	0.18±0.02	0.26±0.01
ตัวอ่อนวัยที่ 3 (deutonymph)	0.20±0.01	0.32±0.02
ตัวเต็มวัย	0.22±0.01	0.39±0.03

ตารางที่ 2 ช่วงเวลาการเจริญเติบโตในแต่ละวัยและตัวเต็มวัยของไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii* เมื่อเลี้ยงด้วยตัวอ่อนของเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* ในสภาพห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิเฉลี่ย 27 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 ± 2 เปอร์เซ็นต์

ระยะของการเจริญเติบโต	ช่วงเวลาการเจริญเติบโต (วัน) ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ระยะไข่	1.50±0.28
ตัวอ่อนวัยที่ 1 (larva)	0.67±0.04
ตัวอ่อนวัยที่ 2 (protonymph)	0.88±0.72
ตัวอ่อนวัยที่ 3 (deutonymph)	1.00±0.13
ระยะไข่ – ตัวเต็มวัย	4.05±1.17
ตัวเต็มวัย : เพศเมีย	18.19±3.34
เพศผู้	8.95±1.85

ตารางที่ 3 คุณลักษณะทางชีววิทยาของไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii* เมื่อเลี้ยงด้วยเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* ไซพีเสื่อข้าวสาร *Corcyra cephalonica* และละอองเกสรต้น ธิพพา *Typha angustifolia* ในสภาพห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิเฉลี่ย 27 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 ± 2 เปอร์เซ็นต์

คุณลักษณะทางชีววิทยา	เหยื่อและอาหารที่ใช้เลี้ยงไรตัวห้ำ <i>A. swirskii</i>		
	<i>S. dorsalis</i>	<i>C. cephalonica</i>	<i>T. angustifolia</i>
อัตราการขยายพันธุ์สุทธิ (R_0)	12.54	20.02	4.53
ชั่วอายุขัยของกลุ่ม (T_c)	14.83	14.99	14.22
อัตราการเพิ่มทางกรรมพันธุ์ (r_c)	0.17	0.19	0.10
อัตราการเพิ่มแท้จริง (λ)	1.18	1.22	1.11

ตารางที่ 4. ศักยภาพการกินเหยื่อของตัวเต็มวัยเพศเมียของไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii* เมื่อกินตัวอ่อนของเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* เพลี้ยไฟถั่ว *Caliothrips phaseoli* และเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* ในสภาพห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิเฉลี่ย 27 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 75 ± 2 เปอร์เซ็นต์

เหยื่อ	N	จำนวนเพลี้ยไฟที่ไรตัวห้ำกิน ^{1/}
		ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
<i>Scirtothrips dorsalis</i>	20	60.80±4.16b
<i>Caliothrips phaseoli</i>	20	58.40±4.81b
<i>Thrips palmi</i>	20	66.50±5.54a

^{1/}ค่าเฉลี่ยในแถวแนวคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษร (a, b, c และ d) ที่ต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ด้วยวิธี DMRT.

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii* ในการกินเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* ในสภาพโรงเรือนทดลอง ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 37 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 40 ± 2 เปอร์เซ็นต์

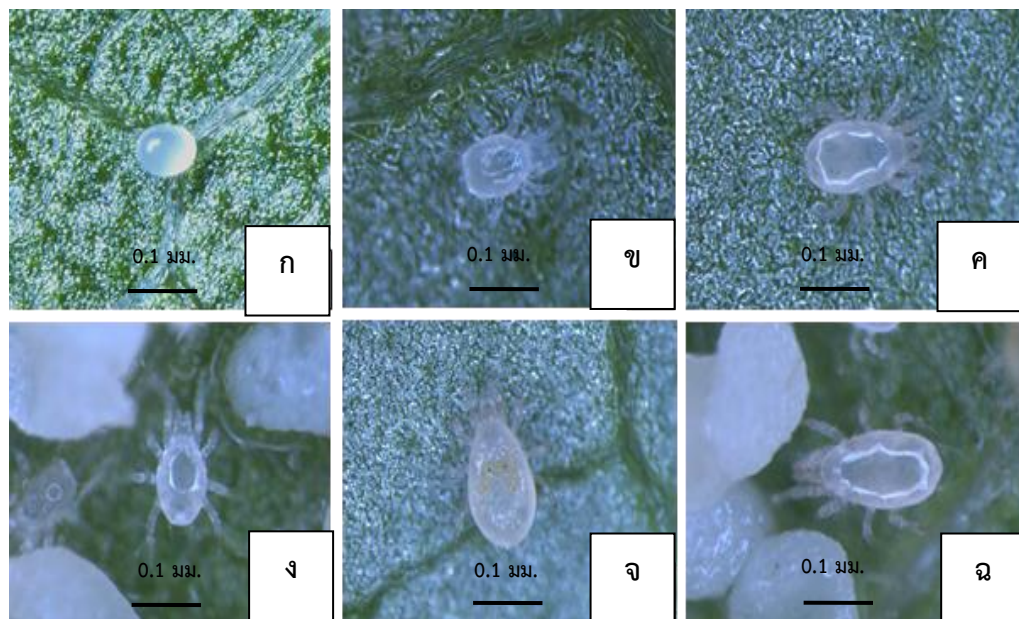
กรรมวิธี	จำนวนเพลี้ยไฟที่ไรตัวห้ำกินต่อวัน ^{1/}
กรรมวิธีที่ 1 ไม่ปล่อยไรตัวห้ำ	0
กรรมวิธีที่ 2 ตัวอ่อนวัยที่ 2 (protonymph)	2.14±1.76 b
กรรมวิธีที่ 3 ตัวอ่อนวัยที่ 3 (deutonymph)	2.68±1.80 b
กรรมวิธีที่ 4 ตัวเต็มวัยเพศเมีย	3.58±2.12 a

^{1/}ค่าเฉลี่ยในแถวแนวคอลัมน์เดียวกันที่มีตัวอักษร (a, b, c และ d) ที่ต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ด้วยวิธี DMRT.

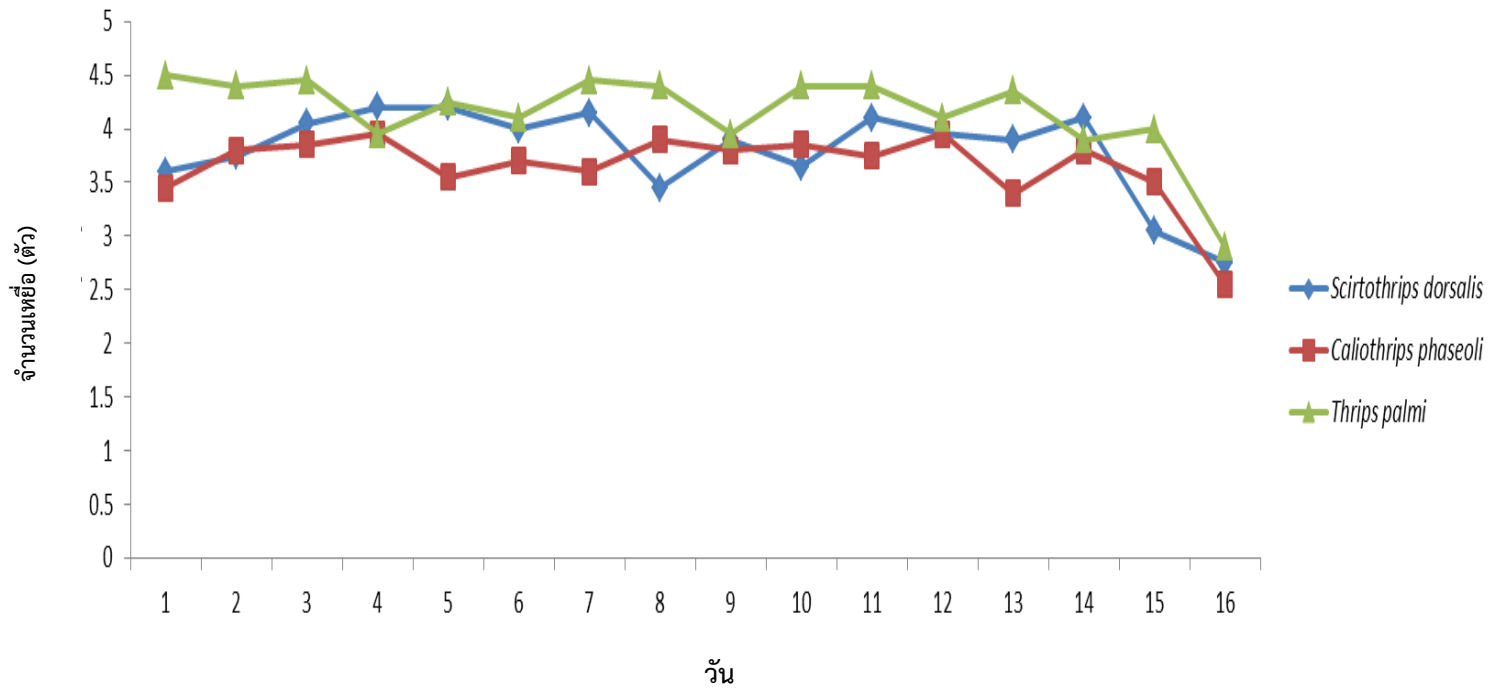
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบจำนวนเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* จากการทดสอบประสิทธิภาพของไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii* กับสารกำจัดแมลง-spinetoram เปรียบเทียบในแต่ละกรรมวิธี ในสภาพโรงเรือนทดลอง ($35\pm 2^{\circ}\text{C}$ และ $65\pm 2\% \text{RH}$)

กรรมวิธี	จำนวนเพลี้ยไฟ ก่อนทดลอง	จำนวนเพลี้ยไฟหลังดำเนินการทดลอง ^{1/}					
		1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน
ปล่อยไรตัวห้ำ 10 ตัว	1.25a	1.17a	0.93b	0.87c	0.74c	1.06b	1.25b
ปล่อยไรตัวห้ำ 20 ตัว	112a	0.92a	0.75b	0.56bc	0.48bc	0.62b	0.93ab
ปล่อยไรตัวห้ำ 30 ตัว	1.18a	0.79a	0.56b	0.50b	0.30b	0.25a	0.56a
พ่นสาร spinetoram	1.37a	0a	0a	0a	0a	0.50a	1.06ab
ตัวเปรียบเทียบ (control)	1.06a	1.34a	2.06c	2.18d	2.48d	3.12c	2.68c
CV (%)	40.9	24.3	67.9	29.4	19.3	27.4	23.4

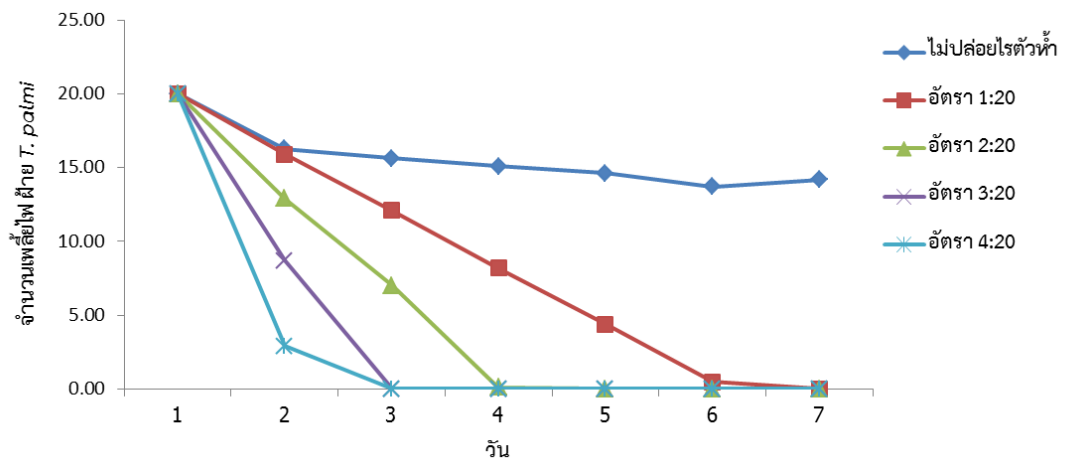
^{1/}ค่าเฉลี่ยในแถวแนวนอนเดียวกันที่มีตัวอักษร (a, b, c และ d) ที่ต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ด้วยวิธี DMRT.



ภาพที่ 1 ระยะเวลาเจริญเติบโตของไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii* เมื่อเลี้ยงด้วยเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* ไข่ (ก) ตัวอ่อนวัยที่ 1 (ข) ตัวอ่อนวัยที่ 2 (ค) ตัวอ่อนวัยที่ 3 (ง) ตัวเต็มวัยเพศเมีย (จ) และ ตัวเต็มวัยเพศผู้ (ฉ)



ภาพที่ 2 จำนวนค่าเฉลี่ยของตัวอ่อน เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* เพลี้ยไฟถั่ว *Caliothrips phaseoli* และเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* ที่ไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii* กินทุก 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 อัตราการกินเพลี้ยไฟฝ้ายของไรตัวห้ำ *Amblyseius swirskii* ในสภาพโรงเรือนทดลองที่ อุณหภูมิเฉลี่ย 37 ± 2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 40 ± 2 เปอร์เซ็นต์

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกแมงมุมวงศ์ Salticidae
DNA Barcoding for Identification Spider Fauna in Family Salticidae

วิมลวรรณ โชติวงศ์^{1/} กาญจนา วาระวิชณี^{2/} พิเชฐ เขาวนวัฒนามวงศ์^{3/}
พลอยชมพู กรวิภาสเรือง^{1/} อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล^{1/} อติติยา แก้วประดิษฐ์^{1/}
^{1/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{3/}รักษาการผู้เชี่ยวชาญด้านศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แมงมุมวงศ์ Salticidae หรือแมงมุมกระโดด (jumping spider) เป็นแมงมุมขนาดเล็กถึงขนาดกลาง และมีระบบสายตาดูที่สูงสุดในบรรดาแมงมุมทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีจำนวนชนิดและปริมาณมากที่สุด เป็นแมงมุมที่ท่องเที่ยวโดยไม่มีจุดหมายที่แน่นอน ไม่สร้างเส้นใย มีลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยา พฤติกรรม และ ความสัมพันธ์เชิงนิเวศที่มีความหลากหลาย พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และในพืชเศรษฐกิจ เนื่องจากมีรูปร่างทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลายและคล้ายคลึงกัน ตลอดจนมีลักษณะโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ที่คล้ายกันหรือเหมือนกัน ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดแมงมุมโดยวิธีสัณฐานวิทยา ดังนั้นการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดช่วยในการวินิจฉัยชนิด ทำให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ การใช้ลักษณะทางพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำแนกและยืนยันชนิดแมงมุมวงศ์ Salticidae โดยเก็บตัวอย่างแมงมุมกระโดดจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย และสกัด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง COX1 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับบนฐานข้อมูล GenBank (standard nucleotide BLAST) พบแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae จำนวน 6 สกุล 8 ชนิด ได้แก่ *Myrmaplata plataleoides*, *Plexippus paykulli*, *Plexippus petersi*, *Phintella vittata*, *Phintelloides versicolor*, *Telamonia dimidiata*, *Telamonia festiva* และ *Thiania bhamoensis* และจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อช่วยยืนยันการจำแนกแมงมุมวงศ์ Salticidae โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของตำแหน่ง COX1 จาก 60 ตัวอย่าง ได้แก่ *Myrmaplata plataleoides* จำนวน 15 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 10 ตัวอย่าง *Plexippus petersi* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 20 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 8 ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ด้วย Neighbor

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-13-61

Joining และ Maximum Likelihood พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกันโดยแต่ละสกุลมีการแยกออกจากกันอย่างชัดเจน และความสัมพันธ์ภายในแต่ละกลุ่มมีลักษณะเป็น monophyletic ในขณะที่กลุ่มของ *Telamonia* ยังไม่สามารถแยกออกมาจากกลุ่มเดียวกันอย่างชัดเจน หากต้องการศึกษาการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้นจะต้องใช้จำนวนยีนที่มาศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้น ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมกระโดดแต่ละสกุลมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ แมงมุมวงศ์ Salticidae ในประเทศไทย แต่การจำแนกชนิด ต้องมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มข้อมูลของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์

คำหลัก: แมงมุมกระโดด สันฐานวิทยา ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Abstract

Spider family Salticidae or jumping spider is wandering spider and diverse bodyforms, behaviors and ecological relationships. They are common found in the nature and economic crops. Unfortunately, species of this genus are difficult to identify using morphology. Molecular diagnostic tools provide valuable support for the rapid and accurate identification of morphologically indistinct salticids species. DNA barcoding of the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COX1) gene could be employed to increase the accuracy of Spider Family Salticidae identifications. The samples were collected from all regions of Thailand. A 652 -bp portion of COX1 was sequenced from 60 spider specimens. Sequences were analysed using a 'barcode' approach and also phylogenetic analysis. Species were identified using standard nucleotide BLAST from GENBANK. BLAST sequence similarity searches of GenBank showed 99-100% similarity to each other / GENBANK sequences for 6 genus 8 species of the Salticidae spiders; *Myrmaplata plateleoides*, *Plexippus paykulli*, *Plexippus petersi*, *Phintella vittata*, *Phintelloides versicolor*, *Telamonia dimidiata*, *Telamonia festiva* and *Thiania bhamoensis* species were found. Phylogenetic analyses (Neighbor Joining and Maximum Likelihood) of the sequences gave consistent results. Neighbor-joining distance and Maximum Likelihood analyses were used to investigate patterns of clustering of the salticids spiders sequences with outgroup. Cox1 proved effective in resolving each genus clearly separated meanwhile *Telamonia* groups were not clearly distinguished from the same group. This study provides basic information on the number of species of spider family Salticidae present in Thailand. However, an

understanding of the classification within the salticids group will requires further study making use of additional genes, including the potentially informative ITS and ribosomal RNA.

Keywords: Jumping spider, morphology, DNA barcoding

คำนำ

แมงมุมกระโดด (jumping spider) เป็นแมงมุมที่อยู่ในวงศ์ Salticidae นับว่าเป็นแมงมุมที่มีขนาดเล็กและมีระบบสายตาดูที่ชัดที่สุดในบรรดาแมงมุมทั้งหมด ลักษณะเด่นคือตากกลางคู่หน้ามีขนาดใหญ่มากและมีตาข้างขนาดเล็ก 3 คู่ ทำให้สามารถมองเห็นได้รอบทิศ มีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยาและพฤติกรรมอย่างมาก เป็นตัวห้ำที่ออกหากินในเวลากลางวันโดยการสะกดรอยตามและตะครุบเหยื่อ (Foelix, 1996) สามารถพบได้ทั่วไปในพื้นที่เขตรักษาพันธุ์ต่างๆ ตามต้นไม้ บนหญ้า และพื้นดิน และมีบทบาทสำคัญในการช่วยควบคุมประชากรแมลงศัตรูพืชหลายๆ ชนิด เช่น *Zeuxippus* sp. นิสัยว่องไว จับเหยื่อกินโดยตรง ได้แก่ แมลงวัน ตัวง และผีเสื้อหนอนกอข้าว ซึ่งพบทั่วไปในนาข้าว นอกจากนี้วิภาดา (2539) รายงานว่า *Lyssomanes* sp. พบจับเหยื่อที่บริเวณใบกล้วยไม้, *Myrmarachne plataleoides* จากการศึกษาพบว่าสามารถกินแมลงวัน มวน และตัวอ่อนของมด, *Heliophanus* sp. หากินในเวลากลางวันบริเวณใบกล้วยไม้ พบว่าสามารถกินผีเสื้อ และเพลี้ยจักจั่น, *Evarcha flavocincta* หากินบริเวณใบกล้วยไม้ในเวลากลางวัน พบว่าสามารถกินผีเสื้อ และแมลงวันผลไม้, *Evarcha* sp. พบว่าสามารถกินผีเสื้อ และแมลงวันผลไม้ ปัจจุบันทั่วโลกพบทั้งสิ้น 658 สกุล 6,356 ชนิด (NMBE, 2021) โดยในแถบทวีปเอเชียเช่นในประเทศไทยพบแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae จำแนกได้ 70 สกุล 281 ชนิด (Song *et al.*, 1999) ประเทศญี่ปุ่นจำแนกได้ 41 สกุล 92 ชนิด (Ono, 2009) ในสิงคโปร์ จำแนกได้ 45 สกุล 78 ชนิด (Koh, 1989; Song *et al.*, 2002 และ Zhang *et al.*, 2003)

ไม่นานมานี้มีการศึกษาแมงมุมกระโดดในประเทศไทย ได้แก่ Benjamin (2004, 2010) Logunov and Hereward (2006) Logunov and Azarkina (2007) Chotwong and Tanikawa (2013) Yamasaki and Ahmad (2013) Logunov and Marusik (2014) และ Zábka and Gardzińska (2017) สำหรับในประเทศไทยพบแมงมุมกระโดด 42 ชนิด (Azarkina, 2019)

งานวิจัยด้านวิวัฒนาการแมงมุมกระโดดในสมัยก่อนได้แบ่งออกเป็น 3 สาย ได้แก่ Lyssomanines, Spartaeines และ Salticids โดย Lyssomanines, Spartaeines เป็นกลุ่มที่มีวิวัฒนาการต่ำ สำหรับ Salticids จัดเป็นกลุ่มที่มีวิวัฒนาการสูง (Wanless, 1980, 1984; Maddison, 1988) ซึ่งลักษณะทาง monophyletic (สายวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน) ของกลุ่ม Lyssomanines ยังไม่แน่ชัด ดังนั้นสมาชิกส่วนใหญ่ประมาณ 90% จึงตกไปอยู่กลุ่มของ Salticids ซึ่งกลุ่มนี้ได้จัดขึ้นเป็น new taxon ชื่อว่า Salticoida ต่อมาได้มีการถกเถียงถึงการตั้งเป็น subfamily

ซึ่งยังหาข้อสรุปไม่ได้ นอกจากนี้ยังมีอีกหลายชนิดที่ยังหาข้อสรุปไม่ได้ โดยในแต่ละกลุ่มสายวิวัฒนาการจะมีลักษณะโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ตลอดจนสีสันบนลำตัวที่คล้ายกันหรือเหมือนกัน

การจำแนกชนิดแมงมุมโดยใช้วิธีสัณฐานวิทยานั้นจะศึกษาแมงมุมระยะที่เป็นตัวเต็มวัยเท่านั้น และมักใช้เวลาานาน ส่วนมากแมงมุมที่พบมักจะอยู่ในระยะตัวอ่อนทำให้มีปัญหาในการจำแนกเนื่องจากอวัยวะเพศยังพัฒนาการไม่สมบูรณ์ทำให้วินิจฉัยชนิดผิด และแมงมุมบางกลุ่มจะมีลักษณะที่ตัวผู้และตัวเมียมีขนาดรูปร่างที่แตกต่างกันทำให้ขาดข้อมูลในการวินิจฉัยชนิด ซึ่ง Platnick (2009) รายงานว่า ตัวอย่างแมงมุมที่ได้จากการจัดจำแนก 46% พบเพียงแค่เพศเดียวเท่านั้น และอีก 1.5% เป็นแมงมุมที่อยู่ในระยะตัวอ่อนโดยอาจจะเป็นแมงมุมที่เป็นชนิดใหม่ (new species) แต่การจำแนกโดยใช้ DNA barcoding สามารถการจำแนกชนิดแมงมุมในระยะตัวอ่อนได้ด้วย

ดังนั้นการใช้ DNA Barcoding จึงเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่สำคัญ ทำให้ทราบถึงชนิดและเขตการแพร่กระจายของแมงมุมที่เป็นข้อมูลล่าสุดที่มีความถูกต้องและทันสมัย อีกทั้งยังเป็นข้อมูลที่ต่างประเทศยอมรับกันทั่วโลกนอกจากนี้ยังเป็นการรวบรวมและเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุมของกรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิง สืบค้น ตามหลักมาตรฐานสากล

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง หลอดแก้วทดลอง ขวดตองตัวอย่างแมงมุม ขนาดต่างๆ กล่องพลาสติกใสขนาดต่างๆ กระดาษทิชชู ปากคีบ พู่กัน ถังพลาสติกใสขนาดต่างๆ สารเคมี ได้แก่ alcohol 95%, ethyl acetate
- อุปกรณ์ในการจำแนกชนิด ได้แก่ lactic acid, 10% KOH, จานแก้ว petridish, ซิลิกาเจลสีขาวสำหรับใช้ใน column chromatography, กล้องจุลทรรศน์ (stereomicroscope), หลอดแก้วขนาดเล็ก
- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอ เช่น ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Bioline, Australia), Agarose gel (Bioline, Australia) และ TBE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), MyTag (Bioline, Australia), MgCl₂, RNase A (0.5g/ml) และ Proteinase K Solution (0.3g/ml)
- สารเคมี และ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2560-2562)

วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยแมงมุมกระโดดเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

- การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมงมุมกระโดดจากพื้นที่แปลงมันสำปะหลัง สวนชมพู แปลงเกษตรกร และป่า ในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างหลายวิธีการดังนี้

- การมองหาและจับโดยตรง (visual search) วิธีนี้เหมาะสำหรับจับแมงมุมทุกเวลาและสถานที่ จับแมงมุมโดยใช้หลอดทดลอง ข่าแมงมุมโดยใส่ก่อนสำลีในกล่องพลาสติกที่เลี้ยงแมงมุมหยดเอทิลอะซิเตต 2-3 หยดลงบนก้อนสำลีเพื่อให้แมงมุมสลบ ดองแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75% เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างและนำไปจำแนกชนิดต่อไป

- การใช้ Beating tray โดยเขย่ากิ่งไม้ที่มีขนาดเล็กลงบนตัวภาตสำหรับรองรับแมงมุมจากนั้นแมงมุมจะตกลงในภาต โดยภาตที่ใช้ทำมาจากผ้าดิบสีขาว รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 80x80 ซม. โดยนำไม้ไผ่ หรือท่ออลูมิเนียม ทำเป็นโครงรูปกากบาท นอกจากผ้าดิบที่นำมาทำภาตแล้วอาจจะใช้ร่มแทนข่าและรักษาตัวอย่างแมงมุมดังข้อ 1

- การใช้สวิงโฉบ (Sweep net) ใช้สวิงจับแมลงโฉบแมงมุมที่อาศัยตามวัชพืช แมงมุมจะติดในสวิง จากนั้นเทแมงมุมบนกระดาษขาวที่ปูบนพื้นดิน ใช้หลอดแก้วค่อยๆ จับแมงมุมใส่ในหลอดแก้วที่เตรียมไว้ ข่าและเก็บตัวอย่างแมงมุมเพื่อนำไปรักษาตัวอย่างดังข้อ 1

1.1 นำตัวอย่างที่ได้มาฆ่าด้วยขวดน็อคแมลงที่บรรจุด้วยสารเอทิลอะซิเตต จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 95% เพื่อนำไปศึกษาดีเอ็นเอ สำหรับตัวอย่างที่ต้องการเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ให้เก็บรักษาในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75%

1.2 บันทึกชื่อแมงมุม วันที่จับ สถานที่จับ ชื่อผู้เก็บ ลงในป้ายกระดาษขาวแผ่นเล็กๆ แล้วใส่ลงในหลอดแก้วที่ดองแมงมุม

1.3 เก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมที่ศึกษาดีเอ็นเอไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอและนำไปใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน (ดำเนินการปี 2560-2562)

- วิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างออกจากขวดจากนั้นโดยใช้พู่กัน forceps และ needles ยึดขาแมงมุมให้กางออกให้ตรงจากนั้นนำตัวอย่างมาวางไว้ในจาน petridish ที่มีทรายวิทยาศาสตร์สีขาวที่ถูกแช่ด้วยแอลกอฮอล์ให้เต็ม นำไปตั้งไว้ใต้กล้อง Olympus SZH-ILLD stereomicroscope สำหรับ epigynum (อวัยวะเพศเมีย) จะใช้ needles เจาะรอบๆ epigynum จากนั้นจึงดึงออกมาแล้วแล้วนำไปแช่ใน proteinase K ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ต้องการออกไป แล้วจึงนำไปล้างในน้ำสะอาด เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจึงนำไปใส่ในสไลด์หลุมแล้วปิดด้วย cover slip แล้วนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม ส่วน pedipalps (อวัยวะเพศผู้) จะถูกดึงออกทางด้านซ้าย จากนั้นจึงแล้วนำไปต้มด้วย 10% KOH ที่อุณหภูมิ 60°C ประมาณ 5-10 นาที จนกระทั่ง pedipalp ขยายออก จึง

นำไปศึกษาดูรายละเอียดใต้กล้อง stereomicroscope เมื่อจำแนกชนิดเสร็จแล้วจะนำ pedipalps (อวัยวะเพศผู้) ใส่ใน tube ขนาดเล็กแล้วนำไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม

- การจำแนกชนิด

นำตัวอย่างแมงมุม epigynum (อวัยวะเพศเมีย) และ pedipalps (อวัยวะเพศผู้) มาเปรียบเทียบกับตำราต่างๆ โดยเฉพาะจากเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในแถบทวีปเอเชีย เช่น The Spiders of China (Song *et al.*, 1999), The Spiders of Japan (Ono, 2009) และ Six new and one newly recorded species of salticidae (Arachnida: Araneae) from Singapore and Malaysia (Zhang *et al.*, 2003), Chinese spiders illustrated (Zhang, 2017), Salticidae of Thailand. Part 1, genera Plexippus C. L. Koch, 1846 and Burmattus Prószyński, 1992. (Żabka and Gardzińska, 2017) และ Borneo spiders (Koh and Bay 2019) โดยใช้รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความยาวของขา การจัดเรียงของตา และแหล่งที่อยู่อาศัย ในการจำแนก จากนั้นบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน และทำคู่มือการจัดจำแนกชนิด (key) เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจำแนก ถ่ายรูปแมงมุมและอวัยวะเพศของแมงมุม เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ดำเนินการปี 2562-2563)

3.1 นำตัวอย่างแมงมุมกระโดดที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตามคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit; Favorgen, Taiwan) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยใช้คีมคีบดึงขาด้านขวาของแมงมุมจำนวนหนึ่งข้าง (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ข้ามคืน (ตัวอย่างแมงมุมที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็น Voucher specimen) เติม FATG1 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และ Proteinase K Solution (0.3g/ml) ปริมาณ 20 ไมโครลิตรปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วยพาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติม RNase A (0.5g/ml) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร แล้วเติม FATG2 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เขย่าให้สม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute alcohol) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน FATG Mini Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยง) เติม W1 Buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer ปริมาณ 750 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีอีกครั้ง ย้ายหลอด FATG Mini Column มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) 1.5 ไมโครลิตร และชะล้าง

อีเอ็นเอด้วยสารละลาย Elution Buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

3.2 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่มือต่อไปนี้

Primer Name	Sequence	Base
C1J1718	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC	26
C1N2191	CCCGGTAAAATTAATATAAACTTC	23

แมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae เตรียมปฏิกิริยา PCR ปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

		1 reaction (ไมโครลิตร)
Dream Taq Green		15
PCR Master mix		3
ddH ₂ O		2
Primer Forward	C1J1718	2
Primer Reverse	C1N2776	2
DNA		3
Total		25

นำปฏิกิริยา PCR ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial-denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 30 รอบ) จากนั้น final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยหยดผลิตภัณฑ์ PCR ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.2% และให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 400 mp เป็นเวลา 45 นาที

3.4 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของแมงมุมกระโดดที่ได้ไปทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

3.5 นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน Cox1 ที่ผ่านการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมกระโดดที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (assemble) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงมุมกระโดดแต่ละชนิด ด้วยโปรแกรม ClustalW (Thomson *et al.*, 1994) ศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ภายในและระหว่างชนิด ด้วยโปรแกรม MEGA version 7.0 (Kumar, S., Stecher G. and Tamura K. 2016) และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor Joining (NJ) และ Maximum Likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7.0 (Kumar, S., Stecher G. and Tamura K, 2016)

3.6 บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดนำผลที่ได้มาตรวจสอบชนิด กับฐานข้อมูล Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ รวบรวมฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยใช้โปรแกรม BLASTn (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul *et al.*, 1990) และ BOLD (Barcode of Life Data System; <http://www.boldsystems.org>) โดยข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้จะถูกเก็บบันทึกเพื่อจัดเตรียมฐานข้อมูลและใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงตรวจสอบความถูกต้องของชนิดแมงมุมในสกุลนี้ รวมทั้งนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาอื่นๆ สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมงมุม กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- 2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมงมุมกระโดดที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่างแมงมุมกระโดดแต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง
- 3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของแมงมุมกระโดด เขตการแพร่กระจาย และแนวทางการวินิจฉัยชนิด

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2560-กันยายน 2563

สถานที่ : 1) พื้นที่ 11 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ภาคเหนือได้แก่ จังหวัดพิษณุโลกแพร่ และน่าน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ จังหวัดขอนแก่น ภาคตะวันออกได้แก่ ระยอง จันทบุรี และตราด ภาคกลางได้แก่ จังหวัดสมุทรสาครและพิษณุโลก ภาคตะวันตกได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรี ราชบุรี

- 2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมกระโดด

ผลจากการสำรวจชนิดแมงมุมกระโดดในประเทศไทยตามพื้นที่การเกษตร ได้แก่ สวนชมพู สวนมะม่วงสวนยางพารา พื้นที่ป่าธรรมชาติ เช่น ป่าข้างทาง ขอบชายป่า วัชพืช และน้ำตก (table 1) ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2563 ในพื้นที่ 11 จังหวัด พบแมงมุมกระโดดในประเทศไทย 6 สกุล 8 ชนิด ได้แก่ สกุล *Myrmaplata* จำนวน 1 ชนิด คือ *Myrmaplata plataleoides* สกุล *Plexippus* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Plexippus paykulli* และ *Plexippus petersi* สกุล *Phintella* จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Phintella vittata* สกุล *Phintelloides* จำนวน 1 ชนิด คือ *Phintelloides versicolor* สกุล *Telamonia* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Telamonia dimidiata* และ *Telamonia festiva* สกุล *Thiania* จำนวน 1 ชนิด คือ *Thiania bhamoensis* และจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อช่วยยืนยันการจำแนกแมงมุมวงศ์ Salticidae โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของตำแหน่ง COX1 จาก 60 ตัวอย่าง ได้แก่ 60 ตัวอย่าง ได้แก่ *Myrmaplata plataleoides* จำนวน 15 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 10 ตัวอย่าง *Plexippus petersi* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 20 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยแมงมุมแต่ละสกุลมีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา พฤติกรรม และบทบาทการเป็นผู้ล่าในระบบนิเวศวิทยาแตกต่างกันเช่น สกุล *Myrmarachne* และ *Myrmaplata* มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะและกิริยาท่าทางคล้ายมดแดงเพื่อล่ามดแดงเป็นอาหาร เนื่องจากสกุล *Myrmarachne* และ *Myrmaplata* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากทำให้ยากต่อการจำแนกชนิด เช่นเดียวกับกับสกุล *Phintella* และสกุล *Phintelloides* อีกทั้งจากการสำรวจพบว่าประชากรของแมงมุมกระโดดลดลงอย่างเห็นได้ชัดจากพื้นที่เดิม โดยสาเหตุเกิดมาจากแหล่งอาศัยเดิมได้มีการเปลี่ยนแปลงไป การใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชเพิ่มขึ้น ผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ (climate change)

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมกระโดดในประเทศไทยเพื่อจำแนกชนิด ตัวอย่างแมงมุมทั้งหมดที่เก็บได้ในห้องปฏิบัติการโดยการใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะการจัดเรียงของตา ลักษณะของ endite ลักษณะของ fovea ระยะห่างระหว่างตา ลักษณะ sternum labium maxillae ความยาวของขา ลักษณะรูปร่างและลวดลายบนด้านหลังของส่วนท้อง ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย และแหล่งที่อยู่อาศัย พบแมงมุมในวงศ์ Salticidae ทั้งหมด 6 สกุล 8 ชนิด สามารถจำแนกชนิดได้ 8 ชนิด ได้แก่ *Myrmaplata plataleoides* (O. Pickard-Cambridge, 1869), *Plexippus paykulli* (Audouin, 1826), *Plexippus petersi* (Karsch, 1878), *Phintella vittata* (C. L. Koch, 1846), *Phintelloides versicolor* (C. L. Koch, 1846), *Telamonia dimidiata* (Simon, 1899) และ *Telamonia*

festiva Thorell, 1887 และ *Thiania bhamoensis* Thorell, 1887 จากการศึกษาโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ของ *Myrmarachne* และ *Myrmaplata* พบว่า Spermathecal ของเพศเมีย มีลักษณะเป็นท่อยาวและบาง ซึ่งแตกต่างจากสกุล *Myrmarachne* โดยไม่มีท่อตามเส้นขวางซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ PRÓSZYŃSKI (2016)

เนื่องด้วยกลุ่มแมงมุมกระโดดหลายชนิดมีสีสันและลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกัน (sibling species) และยังมีอีกหลายตัวอย่างที่มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาทำก้ำกึ่งกันระหว่างสกุล *Myrmarachne* และ *Myrmaplata* หรือสกุล *Phintella* และสกุล *Phintelloides* จึงทำการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป

สำหรับคู่มือการวินิจฉัยชนิดที่ใช้ในการจำแนกและลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมกระโดดในวงศ์ Salticidae แต่ละวงศ์มีดังนี้

1. Retromargin of chelicerae with one tooth----- 2
 - Retromargin of chelicerae with more than one tooth----- 3
2. Cephalothorax flattened----- 3
 - Cephalothorax not flattened----- 5
3. Ant like; cephalic - thoracic region distinctly marked by a constriction; pedicel long, conspicuous, visible from above----- *Myrmarachne* MacLeay, 1839
 - Not ant like; ----- 4
4. Abdomen metallic, slender, ovoid with flat setae-----*Thiania* C. L. Koch, 1846
 - Abdomen with different pattern -----5
5. Cephalothorax circular or U shaped-----
 - Cephalothorax neither circular nor U shaped----- 6
6. Cephalothorax swollen or spherical, with horn like tuft of long, stiff, slightly curved bristles lateral to anterolateral eyes-----7
 - Cephalothorax otherwise, without any hornlike tuft of long, stiff, curved bristles---- 8
7. Abdomen of female pale with a pair of longitudinal dark lines, male slender with mid dorsal white band on abdomen-----*Telamonia* Thorell, 1887
 - Abdomen with different pattern----- 11
8. Cephalothorax convex with cephalic margins nearly parallel; abdomen of female pale with series of chevron marks and white bands, in male such bands extending throughout the body----- *Plexippus* C. L. Koch, 1846
 - Cephalothorax otherwise-----9

9. Abdomen often with gray, indistinct, linear pattern and covered with shiny metallic colouration ----- *Phintella* Strand, 1906

- Abdomen is lighter in colouration ----*Phintelloides* Kanesharatnam & Benjamin, 2019

วงศ์ Salticidae Blackwall, 1841 (แมงมุมกระโดด, jumping spiders)

แมงมุมกระโดดมีการจัดเรียงตาที่เป็นเอกลักษณ์ที่มีลักษณะโดดเด่นไม่เหมือนกับแมงมุมวงศ์อื่น โดยมีการจัดเรียงเป็น 3 แถว มองดูแล้วเกือบเป็นเส้นวงกลม มีการจัดเรียงตาคือ 4-2-2 โดยตากลางคู่หน้าจะมีขนาดใหญ่มากกว่าคู่อื่นๆ ซึ่งตาหลังคู่กลางและตาหลังด้านข้างจะมีขนาดเล็กมาก Koh and Ming (2013) รายงานเพิ่มเติมว่าตากลางคู่หน้าที่มีขนาดใหญ่จะทำหน้าที่เป็นเลนส์ Telescopic (เลนส์ส่องทางไกล) ตาข้างทำหน้าที่เป็นเลนส์ stereoscopic wide-angle (มุกกว้างสามมิติ) เนื่องจากมีการจัดเรียงตาเกือบเป็นเส้นวงกลมและมีทั้งเลนส์ telescopic และ stereoscopic จึงทำให้แมงมุมวงศ์นี้มีสายตาดีมากและมองเห็นเกือบ 360 องศา ส่วนใหญ่มีกลุ่มของเส้นขนยาวบริเวณรอบๆ พื้นที่ตา แมงมุมวงศ์นี้ส่วนใหญ่ไม่สร้างใยดักเหยื่อแต่จะสร้างเส้นใยที่มีลักษณะคล้ายถุงเพื่อซ่อนตัวในเวลาที่ถูกคราบ วางไข่ และผสมพันธุ์ มีนิสัยออกหากินในเวลากลางวัน Song *et al.* (1999) กล่าวว่า เป็นวงศ์ที่มีลำตัวขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ (3-17 มิลลิเมตร) เพศผู้และเพศเมียมีรูปร่างทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน (World Spider Catalog, 2021) รายงานว่าเป็นวงศ์ที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดในโลก ประกอบด้วยสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วจำนวน 658 สกุล 6,356 ชนิด ซึ่ง Davies & Zabka (1989) รายงานว่าโดยทั่วไปแมงมุมกระโดดจะมีความยาวอยู่ระหว่าง 4-8 มิลลิเมตร ไม่ค่อยพบที่มีความยาวน้อยกว่า 2 มิลลิเมตร เพศผู้ส่วนมากจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมียซึ่งแตกต่างจากแมงมุมทั่วไปโดยแมงมุมทั่วไปเพศเมียมักมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้

แต่ละสกุลมีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา พฤติกรรม และบทบาทการเป็นผู้ล่าในระบบนิเวศวิทยาแตกต่างกัน (Foelix, 1996; Jackson & Pollard, 1996) เช่น สกุล *Myrmarachne* และ *Myrmaplata* มีรูปร่างลักษณะและกิริยาท่าทางคล้ายมดแดง เช่นมี pedicel หรือเอวให้ยาวขึ้นเหมือนมด ส่วน cephalothorax มีขนาดยาวขึ้นเพื่อให้มองเหมือนว่าร่างกายแบ่งออกเป็น 3 ส่วนเหมือนมด ส่วนท้องมีลักษณะคอดลงไม่กลมป่อง มักหากินปะปนอยู่กับฝูงมดเพื่อคอยจับตัวอ่อนของมดกินเป็นอาหาร การที่มันมีรูปร่างลักษณะและกิริยาคล้ายมดก็เป็นวิธีป้องกันตัวชนิดหนึ่ง นั่นคือมดจะไม่มารุมทำร้ายเพราะคิดว่าเป็นพวกเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีพฤติกรรมเลียนแบบมดเช่นมีการยกขา คู่หน้า 1 คู่ เพื่อเลียนแบบหนวดของมด Koh and Bay (2019) รายงานว่านอกจากสกุล *Myrmarachne* แล้วยังมีสกุล *Agorius* และ *Bocus* ที่มีรูปร่างลักษณะลักษณะคล้ายมดอีกด้วย Whyte and Andersonn (2017) รายงานเพิ่มเติมว่าแมงมุมกระโดดไม่ได้เลียนแบบมดเพียงชนิดเดียวแต่ยังสามารถเลียนแบบด้วงเต่าที่มีลักษณะสีดำทั้งตัวได้อีกด้วย เช่น *Coccorchestes ferrea*

สกุล *Myrmaplata* Prószyński, 2016

Type: *Salticus plataleoides* O. Pickard-Cambridge, 1869 เพศเมีย

ชื่อพ้อง :

เดิม ถูก ตั้งชื่อเป็น *Salticus plataleoides* เป็นชื่อพ้องกับ *Myrmarachne daitarensis* (Prószyński, 1992) และ *Myrmarachne plataleoides* (Edmunds & Prószyński (2003) ต่อมาได้ถูกย้ายไปเป็นสกุล *Myrmaplata* และเป็นชื่อพ้องกับ *Myrmarachne megachelae* (Ganesh Kumar & Mohanasundaram, 1998) แต่ปัจจุบันได้ถูกเปลี่ยนไปเป็น *Myrmaplata plataleoides* มีสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วทั้งหมด 5 ชนิด

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

PRÓSZYŃSKI (2016) รายงานว่า Spermathecal ของเพศเมีย มีลักษณะเป็นท่อยาวและบาง ซึ่งแตกต่างจากสกุล *Myrmarachne* โดยไม่มีท่อตามเส้นขวาง และส่วนปลายสุดของส่วนหน้าจะมีลักษณะกลม หรือ ช่องรูปไข่ขนาดเล็กซึ่งมีหนามอยู่ภายใน (Figure 2D) เพศผู้มีลักษณะแตกต่างจาก MYRMARACHNINES โดย embolus มีฐานที่กว้างและค่อยๆ แคบลง เช่น ใน *Myrmaplata plataleoides* มี loop ของ embolus สั้นกว่าโดยซ่อนทับเฉพาะครึ่งด้านหน้าของ bulbus Tibial apophysis สั้น ตรง และเป็นทรงกรวย เพศผู้มีลำตัวยาวมากและมีการบีบรัดส่วนบริเวณ cephalothorax และ abdomen พื้นที่ส่วนหัวสูงกว่าส่วนอกถึง 2 เท่า Chelicerae ยาวและพองออกที่บริเวณส่วนปลาย pedicel ยาว ขณะที่เพศเมียมีส่วนท้องเป็นรูปไข่โดยด้านปลายเรียวยาวและไม่มีการบีบรัดส่วนที่บริเวณส่วนท้อง

Myrmaplata plataleoides (O. Pickard-Cambridge, 1869) (Figure 1)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย O. Pickard-Cambridge ในปี 1869 โดยจำแนกชนิดเป็น *Salticus plataleoides* ต่อมา Simon (1901) ได้เปลี่ยนเป็นสกุล *Myrmarachne plataleoides* Prószyński (2016) ได้พยายามแยกออกไปเป็นสกุลใหม่คือสกุล *Myrmaplata* โดยใช้ลักษณะของ Spermatheca ที่มีลักษณะแตกต่างกันในการจำแนก กระนั้นก็ตาม Caleb (2016) ได้นำกลับมาอยู่สกุลเดิมคือ *Myrmarachne* เนื่องจาก *M. plataleoides* ส่วนใหญ่มีลำตัวสีดำแต่ตัวอย่างที่สำรวจพบจากเมืองเจนไน ประเทศอินเดีย เป็นตัวอ่อนและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย แต่อย่างไรก็ตาม Caleb (2020) ได้ยอมรับและใช้เป็นสกุล *Myrmaplata* ตาม Prószyński เนื่องจากงานที่เขาตีพิมพ์ในปี 2016 พบว่า *Myrmarachne megachelae* มีรูปร่างลักษณะเหมือนกับ *Myrmaplata plataleoides* ในรูปแบบสีของลำตัวที่เป็นสีดำ จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจำนวนฟันบน chelicerae พบว่าเป็นชนิดเดียวกัน ดังนั้น *M. megachelae* จึงเป็น junior synonym ของ *M. plataleoides*

ชื่อพ้อง :*Salticus plataleoides* O. Pickard-Cambridge, 1869*Salticus plataleoides* Peckham & Peckham, 1892*Myrmarachne plataleoides* Simon, 1901*Myrmarachne daitarensis* Prószyński, 1992*Myrmarachne megachelae* Ganesh Kumar & Mohanasundaram, 1998*Myrmaplata plataleoides* Prószyński, 2016*Myrmarachne plataleoides* Caleb, 2016*Myrmaplata plataleoides* Caleb, 2020**ชื่อสามัญ: Ant-mimicking Spider****ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)****ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย:** เพศผู้ 6-7 มิลลิเมตร เพศเมีย 7 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): สีน้ำตาลส้มถึงน้ำตาลดำ มีความยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง ส่วนหัวและอกมีความยาวเท่ากันและมีการแบ่งสัดส่วนระหว่างส่วนหัวและส่วนอกอย่างชัดเจนโดยส่วนหัวจะยกอยู่สูงกว่าส่วนอก ส่วนนอกรูปร่างเป็นรูปไข่ ไม่มี thoracic groove ตา 8 ตา เป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4-2-2 แบบ recurve โดยแถวหน้าเรียงโค้งมากกว่าแถวหลัง labium และ sternum ยาว มีฟันแถวบน จำนวน 3 ซี่ ฟันแถวล่างขนาดเล็กจำนวน 10 ซี่ เพศผู้มักจะมีขนาด chelicerae ที่เรียวยาวกว่าเพศเมีย ฟองออกที่ด้านปลายและยื่นไปทางด้านหน้าของลำตัวเสมอ ส่วนด้านปลายที่ฟองออกจะมีสีออกดำทั้งสองฝั่งและมีจุดดำลักษณะคล้ายดวงตา ขาสีส้มมีลักษณะเรียวยาวโดยปล้อง tibia มีความยาวมากที่สุด มีขนน้อย ความยาวขา 4 ขา เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 4, 1, 3, 2

ท้อง (Abdomen): สีน้ำตาลส้มถึงน้ำตาลดำ เอว (pedicel) มีลักษณะเป็นปล้องเชื่อมต่อระหว่างส่วนcephalothorax (ส่วนหัวและอก) และ abdomen (ส่วนท้อง) ส่วนท้องมีลักษณะคล้ายรูปไข่ยาวเรียว สีส้มและมีความยาวเท่ากับส่วนอก ด้านปลายท้องตัด Epigynum และ vulva ดังรูป 1D สำหรับmale palp มี embolus ซี่ไปทางด้านปลายของ tegulum ดังรูป 1E และ 1F

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย ศรีลังกา จีน สิงคโปร์ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาค ภาคเหนือ ได้แก่ น่าน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ ภาคกลาง ได้แก่ กรุงเทพมหานคร สมุทรสาคร ปทุมธานี พิษณุโลก ภาคตะวันออก ได้แก่ ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี

โดยพบทั่วไปไม่มีความแปรผันของสีสรรสูงตั้งแต่สีน้ำตาลสว่างจนกระทั่งถึงสีน้ำตาลดำ พบในส่วนที่มีรังมดแดง หรือมดแดงที่เดินเป็นแถว แมงมุมจะซุ่มดักจับมดแดงที่เดินออกนอกแถวเป็นอาหาร และทำรังนอนอยู่ห่างไกลจากรังมดแดง มักมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและพฤติกรรมให้คล้ายกับมด คือ

มีลักษณะสีน้ำตาลแดงเข้ม มีการแบ่งสัดส่วนส่วนหัวให้แยกออกจากส่วนนอกอย่างชัดเจน โดยส่วนหัวจะยกอยู่สูงกว่าส่วนนอก และยังคงจำนวนขาจาก 4 คู่ เหลือ 3 คู่ได้อย่างแนบเนียนและใช้ขาหน้าชูขึ้น โบกไปมาเหมือนกับหนวดของมด ตัวเมียจะเลียนแบบพฤติกรรมและท่าทางของมดงาน แต่ตัวผู้มีลักษณะแตกต่างจากตัวเมีย คือ ส่วนรยางค์จับเหยื่อยืดยาวออกมา เชื่อว่าการที่มีส่วนรยางค์จับเหยื่อยืดยาวออกมาเป็นการเลียนแบบมดงานที่กำลังขนอะไรบางอย่างอยู่ (encumbered ant) ซึ่งลักษณะเช่นนี้ทำให้มดงานคิดว่าเป็นพวกเดียวกันที่กำลังแบกซากเพื่อนกลับรัง เพื่อเป็นเกราะป้องกันไม่ให้มดเข้ามาทำร้าย

สกุล *Plexippus* C. L. Koch, 1846

Type: *Plexippus paykulli* (Audouin, 1826) เพศผู้

NB: ในปี 1951 Charitonov ได้พิจารณาว่าเป็น senior synonym ของ *Hissarinus kondarensis* (Charitonov, 1951) ในปี 1975 Andreeva ได้ย้าย type species เป็น *Plexippus condarensis* (Charitonov, 1951) ต่อมาในปี 1995 Ledoux & Hallé ได้พิจารณาและจำแนกชนิดว่า *Apamamia* Roewer 1944 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับ *Plexippus* C.L. Koch 1846

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

สกุลนี้ค้นพบครั้งแรกโดย C. L. Koch ในปี 1846 โดยใช้ *Plexippus ligo* เป็นตัวต้นแบบในการจำแนกชนิดสกุลนี้แต่ปัจจุบันได้กลายเป็น synonymy ของ *Plexippus paykulli* (Audouin, 1826) ซึ่งแมงมุมในสกุลนี้ถูกจำแนกแล้วทั้งสิ้น 45 ชนิด (NMBE, 2021) ส่วนใหญ่มีรูปร่างลักษณะที่คล้ายกัน มีขนาดกลางจนถึงขนาดใหญ่ cephalothorax (ส่วนหัวและส่วนอก) ยกสูงชัน ความยาวพื้นที่ตาน้อยกว่าความยาวครึ่งหนึ่งของ carapace ความยาวของ cephalothorax มากกว่าความกว้าง ตาหลังคู่กลาง (posterior median eyes) ตั้งอยู่ตรงกลางระหว่างตาหน้าด้านข้างและด้านหลังด้านข้าง ทั้งส่วนหัวและส่วนอก และส่วนท้องจะมีแถบลวดลายอย่างชัดเจน ส่วนใหญ่มีแถบสีขาวที่ส่วนท้อง ส่วนหัวและอก ขาหนาและแข็งแรง

Plexippus petersi (Karsch, 1878) (Figure 2)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Ferdinand Anton Franz Karsch ในปี 1878 โดยจำแนกชนิดเป็น *Euophrys petersii* ต่อมา Simon (1903) ได้จำแนกชนิดและเปลี่ยนเป็นสกุล *Plexippus petersi* ในปี 1968 Chrysanthus ได้จำแนกชนิดผิดเป็น *Plexippus paykulli* ตั้งแต่ปี 1985 จนกระทั่งถึงปี 2021 ได้มีการสำรวจและจำแนกแมงมุมสายพันธุ์นี้และได้รายงานพบ new record ในประเทศจีน ไต้หวัน เนปาล ภูฏาน เวียดนาม เกาหลี และไทย

ชื่อพ้อง :

Euophrys petersii Karsch, 1878

Plexippus petersi Simon, 1903

ชื่อสามัญ: Common Housefly Catcher

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 6-7 มิลลิเมตร เพศเมีย 7-9 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; สีน้ำตาล มีแถบสีน้ำตาลเข้มออกดำที่ด้านข้างทั้ง 2 ด้านของส่วนอกตั้งแต่ด้านท้ายของส่วนหัวจนกระทั่งถึงตาแถวที่ 3 ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4-2-2 ความกว้างของพื้นที่ตามีมากกว่าความยาวของพื้นที่ตา chelicerae มีฟันแถวหน้า 2 ซี่ แถวหลัง 1 ซี่ maxillae ขนานกัน labium มีความกว้างมากกว่าความยาว sternum ยาวมากกว่ากว้าง ขาอ้วนมีขนและหนามกระจายอยู่ทั่วไป เพศเมีย; สีน้ำตาลยกเว้นบริเวณขอบตาที่มีสีดำ

ท้อง (Abdomen): เพศผู้; สีครีม มีแถบสีน้ำตาลเข้มออกดำขนานกันที่ด้านข้างลำตัวทั้ง 2 ด้านตั้งแต่ด้านหน้าของส่วนท้องจนกระทั่งเลยกึ่งกลางมาทางด้านท้าย ที่ปลายของส่วนท้องมี spinnerets จำนวน 6 อัน เพศเมีย; สีน้ำตาลและมีลวดลายสีน้ำตาลเข้มที่ที่ด้านข้างทั้ง 2 ข้าง Epigynum และ vulva ดังรูป 3C สำหรับ male palp ดังรูป 2D และ 2E

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): ถูกนำเข้าจากเอเชียไปยังแอฟริกา และหมู่เกาะแปซิฟิก สำหรับในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาคตามบ้านเรือน ภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ น่านแพร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ บุรีรัมย์ ภาคกลาง ได้แก่ กรุงเทพมหานคร ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ภาคตะวันออก ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ ภาคใต้ ได้แก่ สุราษฎร์ธานี

Plexippus paykulli (Audouin, 1826) (Figure 3)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Par Victor Audouin ในปี 1826 โดยจำแนกชนิดเป็น *Attus paykullii* ต่อมา Walckenaer (1837) จำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงตั้งชื่อว่า *Attus ligo* ต่อมา C. L. Koch (1846) ได้พยายามแยกออกไปเป็นสกุลใหม่คือสกุล *Plexippus* และได้ตั้งชื่อใหม่ว่า *Plexippus ligo* Lucas (1846) ได้จำแนกชนิดผิดเป็น *Salticus vaillantii* ในปี 1886 Peckham & Peckham ได้นำตัวอย่าง *Plexippus ligo* ของ C. Koch (1846), *Menemerus culicivorus* ของ Thorell (1877), *Menemerus paykulli* ของ Thorell (1881) มาอธิบายและบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาใหม่และเปลี่ยนชื่อตัวอย่างเหล่านี้เป็น *Plexippus paykulli* จากนั้นได้มีรายงานการพบแมงมุมชนิดนี้ในประเทศต่างๆ มากมาย เช่น จีน (Chamberlin (1924), Chen and Gao (1990)) ออสเตรเลีย (Davies and Zabka, 1989) เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Barrion and Litsinger, 1995) เกาหลี (Cho and Kim (2002)) เกาหลี (Namkung (2002), (Kim and Lee, 2014) ยุโรป (Wunderlich (2008) ญี่ปุ่น (Baba and Tanikawa, 2015) อียิปต์ (El-Hennawy, Mohafez and El-Gendy, 2015) อินเดีย (Dhali, Saha and Raychaudhuri, 2017) อิหร่าน (Tabrizi, Rad and Hedayati, 2014.)

ชื่อพ้อง :

Attus paykullii Audouin, 1826

Attus ligo Walckenaer, 1837
Euophrys vetusta C. L. Koch, 1846
Plexippus ligo C. L. Koch, 1846
Plexippus paykulli Peckham & Peckham, 1886
Plexippus culicivorus Thorell, 1887
Plexippus paykulli Bösenberg & Strand, 1906
Menemerus crassus Hogg, 1922
Hyllus mimus Chamberlin, 1924
Plexippus paykulli Petrunkevitch, 1930
Plexippus quadriguttatus Mello-Leitão, 1946
Marpissa bengalensis Tikader, 1974
Marpissa mandali Tikader, 1974
Euophrys vetusta Prószyński, 1987
Plexippus paykulli Żabka & Gardzińska, 2017

ชื่อสามัญ: The Pantropical Jumper

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 7-8 มิลลิเมตร เพศเมีย 7-9 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; สีน้ำตาล มีแถบสีครีมออกเหลืองตามยาวตั้งแต่ส่วนหัวลงมาถึงส่วนอก และมีแถบสีน้ำตาลเข้มออกดำที่ด้านข้างทั้ง 2 ด้าน มี 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4-2-2 maxillae ขนานกัน labium มีความกว้างมากกว่าความยาว sternum ยาวมากกว่ากว้าง palpi มีขนปุกปุย ขาสีน้ำตาลอ่อนขาปล้องหน้าจะมีสีน้ำตาลเข้มออกดำ ขาปล้องที่ 3 และ 4 มีแถบสีดำ เพศเมีย; สีน้ำตาล

ท้อง (Abdomen): เพศผู้; ด้านบนส่วนท้องมีแถบยาวสีครีมตรงกลาง มีแถบสีน้ำตาลเข้มออกดำขนานกันที่ด้านข้างลำตัวทั้ง 2 ด้านตั้งแต่ด้านหน้าของส่วนท้องจนกระทั่งเลยกึ่งกลางมาทางด้านท้าย มีแถบสีน้ำตาลเข้มรูปสามเหลี่ยมที่ด้านปลายของส่วนท้อง spinnerets จำนวน 6 อัน เพศเมีย; สีน้ำตาลมีลวดลายสีน้ำตาลเข้มที่ด้านข้างทั้ง 2 ข้างและมีจุดสีขาวที่ด้านท้ายของลำตัวจำนวน 4 จุด Epigynum และ vulva ดังรูป 3C สำหรับmale palp ดังรูป 3D และ 3E

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): ถูกนำเข้าจากแอฟริกาไปยังสหรัฐอเมริกา ยุโรป ตะวันออกกลาง อินเดีย จีน ญี่ปุ่น เกาหลี ฟิลิปปินส์ ปาปัวนิวกินี ออสเตรเลีย หมู่เกาะแปซิฟิก สำหรับในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาคตามบ้านเรือน

สกุล *Phintelloides* Kanesharatnam & Benjamin, 2019

Type: *Chrysilla jesudasi* Caleb & Mathai, 2014 เพศผู้

In synonymy:

Phintelloides albiociput (Bösenberg & Strand, 1906)

Phintelloides davidi (Schenkel, 1963)

Phintelloides dimorphus (Dönitz & Strand, 1906)

Phintelloides munita (Bösenberg & Strand, 1906)

Phintelloides munita chinesica (Strand, 1907)

Phintelloides tschekiagensis (Schenkel, 1963)

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

เป็นสกุลที่ถูกยกขึ้นมาเป็นสกุลใหม่โดย Kanesharatnam & Benjamin ในปี 2019 เป็นการรวมคำระหว่าง “Phintell” ซึ่งมาจากสกุล *Phintella* และ “oides” แปลว่ามีรูปแบบของ ชื่อสกุลนี้มีความหมายว่าสกุลนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *Phintella* มากกว่า สกุล *Chryssilla* โดยสมาชิกเกือบทั้งหมดของสกุล *Chryssilla* ถูกปกคลุมด้วยเกล็ดขนที่มีสีส้มหรือสีดำเมทัลลิก สำหรับสมาชิกของสกุล *Phintella* บางชนิดถูกปกคลุมด้วยเกล็ดขนที่มีสีเมทัลลิกแวววาว อย่างไรก็ตามสมาชิกในสกุล *Phintelloides* กลับมีสีที่อ่อนกว่า Clypeus ของเพศผู้ *Phintelloides* ถูกปกคลุมไปด้วยปอยขนที่เป็นเกล็ดสีขาวเรียงเป็นแถว นอกจากนี้เพศผู้มีแถบตามยาวที่ด้านบนของส่วนท้องซึ่งไม่พบลักษณะแถบยาวแบบนี้ในเพศเมีย

Phintelloides versicolor (C. L. Koch, 1846) (Figure 4)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Carl Ludwig Koch ในปี 1846 โดยจำแนกชนิดเป็น *Plexippus versicolor* ในปี 1846 ได้จำแนกชนิดผิดเป็น *Maevia picta* ต่อมาปี 1894 Workman and Workman ใช้ตัวอย่างจาก C. L. Koch ที่จำแนกไว้แล้วได้แก่ *Plexippus versicolor* (1846) และ *Maevia picta* (1848) มาอธิบายบรรยายลักษณะสัณฐานวิทยาใหม่และเปลี่ยนเป็นชื่อ *Chryssilla versicolor* ในปี 1906 Bösenberg & Strand ได้ทำการสำรวจและจำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงตั้งชื่อใหม่เป็น *Lotus munitus* ต่อมาจึงมีคนตั้งชื่อผิดตามได้แก่ Strand ในปี 1907, Yaginuma ในปี 1955, Lee ในปี 1966, Yin & Wang ในปี 1979 และ Hu ในปี 1984 หลังจากปี 1985 จนกระทั่งถึงปี 2018 ได้มีการสำรวจแมงมุมกระโดดในประเทศญี่ปุ่น เกาหลี จีน และจำแนกชนิดเป็น *Phintella versicolor* แต่ในปี 2019 Kanesharatnam & Benjamin ได้แก้ไขการจัดกลุ่มสมาชิกแมงมุมกระโดดในทวีปเอเชียใต้สกุล *Chryssilla* และ *Phintella* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมและสัณฐานวิทยา ผลจากการวิเคราะห์พบว่าทั้ง 2 สกุลมีสายวิวัฒนาการที่ต่างกันดังนั้นเขาจึงกำหนดสกุลใหม่ขึ้นว่าชื่อว่า *Phintelloides*

ชื่อพ้อง :

Plexippus versicolor C. L. Koch, 1846

Maevia picta C. L. Koch, 1846

Attus versicolor Walckenaer, 1847
Chrysilla picta Thorell, 1891
Chrysilla picta Workman & Workman, 1894
Chrysilla versicolor Simon, 1901
Phintella versicolor Prószyński, 1983
Phintella davidi Prószyński, 1983
Phintella versicolor Prószyński, 1983
Phintella tschekiangensis Prószyński, 1983
Jotus munitus Hu, 1984
Phintella caprina Prószyński, 1984
Phintelloides versicolor Kanesharatnam & Benjamin, 2019
Phintella versicolor Peng, 2020

ชื่อสามัญ: Multi-coloured Metallic Jumper

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 6-7 มิลลิเมตร เพศเมีย 5-6 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; สีดำ ส่วนหัวมีแต้มขนสีขาว 3 จุด ที่ตรงกลาง ด้านซ้ายและด้านขวา มีเส้นขอบสีขาวที่ด้านท้ายของหัวและอกส่วนนอก ส่วนหัวและอกมีความยาวมากกว่าความกว้างเล็กน้อย ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4-2-2 ความกว้างของพื้นที่ตามีมากกว่าความยาวของพื้นที่ตา clypeus มีขนสีน้ำตาลเข้มกระจายอยู่และมีกระจุกขนสีขาวยื่นออกมาอยู่ใต้ฐานของ chelicerae มีฟันแกวหน้า 2 ซี่ แกวหลังฟันขนาดใหญ่ 1 ซี่ chelicerae สีน้ำตาลเข้มและมีสีสว่างที่ด้านปลาย maxillae และ labium สีน้ำตาล maxillae ขนานกัน ขาคู่ที่ 1 สีน้ำตาลเข้มและมีขนสีขาวลักษณะเหมือนเกล็ดกระจายอยู่ทั่วไป ขาคู่ต่อๆ มาจะซีดลง ขาปล้องที่ 1 และ 2 มีสีขาวย่นๆ เพศเมีย; สีครีมและมีแถบสีน้ำตาลบริเวณส่วนหัวและบริเวณส่วนอกมีลวดลายคล้ายเลข 6 สีน้ำตาลเข้ม ด้านซ้าย และด้านขวาซึ่งเป็นเลข 6 กลับด้าน

ท้อง (Abdomen): เพศผู้; มีแถบยาวสีเหลืองขุ่นที่ด้านข้างของส่วนท้องทั้ง 2 ด้าน และมีแถบสีน้ำตาลเข้ม 1 แถบอยู่ตรงกลาง spinnerets มีสีเหลืองขุ่น เพศเมีย; สีครีมและมีลวดลายสีน้ำตาลที่ไม่เป็นระเบียบที่ด้านข้างทั้ง 2 ข้าง แต่แถบตรงกลางไม่มีลวดลาย Epigynum และ vulva ดังรูป 4 B

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย พม่า ไทย มาเลเซีย จีน เกาหลี ไต้หวัน ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย (สุมาตรา) และถูกนำเข้าไปที่ฮาวาย สำหรับในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาคภาคเหนือ ได้แก่ ลำปาง น่าน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ

บุรีรัมย์ ภาคกลาง ได้แก่ กรุงเทพมหานคร นครปฐม พิษณุโลก ภาคตะวันออก ได้แก่ ระยอง ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตก ได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ ได้แก่ เพชรบุรี

สกุล *Phintella* Strand, 1906

Type: *Phintella typica* Strand, 1906 เพศเมีย

In synonymy:

Phintella aequipes longirostris (Lessert, 1925)

Phintella aninotata (Bösenberg & Strand, 1906)

Phintella bilineata (Saito, 1939)

Phintella clara (Peckham & Peckham, 1903)

Phintella crucifer (Dönitz & Strand 1906)

Phintella difficilis (Bösenberg & Strand, 1906)

Phintella lesserti (Schenkel, 1963)

Phintella lucai Zabka, 1985

Phintella mellotteei (Simon, 1888)

Phintella pallicolor (Bösenberg & Strand, 1906)

Phintella pupus (Karsch, 1879)

Phintella ranjita (Tikader, 1967)

Phintella solers (Peckham & Peckham, 1903)

Phintella typica Strand, 1906

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

เป็นแมงมุมขนาดกลางถึงขนาดเล็ก มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับสกุล *Chrysilla* ซึ่งสมาชิกของสกุลนี้ส่วนใหญ่เคยอยู่ในสกุล *Chrysilla*, *Telamonia*, *Icius*, และ *Jotus* มาก่อนแต่ปัจจุบันได้ถูกย้ายออกมาอยู่ในสกุล *Phintella* แทน แมงมุมสกุลนี้บางชนิดมีเกล็ดขนที่เป็นสีเมทัลลิกแวววาว clypeus ถูกปกคลุมไปด้วยเกล็ดขนสีดำมันวาวหรือสีออกน้ำตาลเข้มออก เช่น บริเวณส่วนอกของ *Phintella vittata* ถูกปกคลุมไปด้วยเกล็ดขนที่เป็นสีฟ้าออกเขียวแวววาว แต่ *P. argentea* ถูกปกคลุมไปด้วยเกล็ดขนที่เป็นสีเงิน ลักษณะส่วนท้องของเพศผู้และเพศเมียจะกว้างทางด้านส่วนหน้าและเรียวยาวไปทางด้านปลายของส่วนท้องและมีแถบเกล็ดขนสีเงินแวววาวด้านขวาง

Phintella vittata (C. L. Koch, 1846) (Figure 5)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Carl Ludwig Koch ในปี 1846 โดยจำแนกชนิดเป็น *Plexippus vittatus* ในปี 1864 Simon ได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Thiania vittata* ปี 1891 Thorell ได้สำรวจเก็บตัวอย่างแมงมุมที่ปีนัง ประเทศมาเลเซียได้จำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงได้ตั้งชื่อใหม่ว่า *Maevia alternans* ต่อมาปี 1894 Workman & Workman ได้ทำการเปรียบเทียบตัวอย่างแมงมุมที่

เขาสำรวจพบกับตัวอย่าง *Plexippus vittatus* C. L. Koch, 1846, *Hyllus alternans* C. L. Koch, 1846 และ *Maevia alternans* Thorell, 1891 และได้จำแนกชนิดเป็น *Maevia alternans* ปี 1901 Simon ได้อธิบายบรรยายลักษณะความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาและพยายามย้ายไปเป็นสกุล *Telamonia vittata* ในปี 1967 Tikader สำรวจแมงมุมที่ประเทศอินเดียและจำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงตั้งชื่อใหม่เป็น *Salticus ranjitus* ต่อมาปี 1971 Prószyński ได้ย้ายจากสกุล *Telamonia* ไปเป็นสกุล *Chrysilla vittata* ตั้งแต่ปี 1985 จนกระทั่งถึงปี 2020 ได้มีการค้นพบแมงมุมชนิดนี้ในหลายๆ ประเทศ เช่น อินเดีย จีน และเอเชียใต้ และได้มีการตั้งชื่อเป็น *Phintella vittata*

ชื่อพ้อง :

Plexippus vittatus C. L. Koch
Hyllus alternans C. L. Koch, 1846
Thiania vittata Simon, 1864
Maevia alternans Thorell, 1891
Maevia vittata Thorell, 1892
Maevia alternans Workman & Workman, 1894
Telamonia vittata Simon, 1901
Salticus ranjitus Tikader, 1967
Chrysilla vittata Prószyński, 1971
Salticus ranjitus Tikader & Biswas, 1981
Phintella vittata Żabka, 1985
Phintella vittata Peng, 2020

ชื่อสามัญ: Banded Phintella

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 3-4 มิลลิเมตร เพศเมีย 4-5 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; สีดำ มีแถบขนสีเขียวยาวเหลือบแวววาว ตา 8 ตา สีเหมือนกัน และเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4-2-2 ตาแถวที่ 2 มีขนาดเล็กมากตั้งอยู่ใกล้กับตาข้างแถวที่ 1 chelicerae มีฟันแถวหน้าจำนวน 2 ซี่ และแถวหลังจำนวน 1 ซี่ fang ลักษณะยาว maxillae มีขนาดอ้วนปลายตัดและมี scopulae labium มีขอบหนามีความกว้างมากกว่าความยาว sternum มีความยาวมากกว่าความกว้าง ขาสีดำ มีแถบขนสีเขียวยาวเหลือบแวววาว

ท้อง (Abdomen): มีแถบขนสีเขียวยาวเหลือบแวววาวและมีแถบสีดำขวางที่ด้านบนส่วนท้อง 1 แถบ ตรงกลาง 1 แถบ และที่ส่วนด้านท้ายอีก 1 แถบ สำหรับ male palp ดังรูป 5B และ 5C

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย จีน และฟิลิปปินส์ สำหรับในประเทศไทยสามารถพบที่จังหวัดนครปฐม เพชรบุรี ระยอง ตรวด และชุมพร

สกุล *Telamonia* Thorell, 1887

Type: *Telamonia festiva* Thorell, 1887 เพศเมีย

ชื่อพ้อง :

Telamonia pateli (Tikader, 1974)

Telamonia sikkimensis (Tikader, 1967)

Telamonia terebrifera (Thorell, 1892)

Telamonia trinotata (Thorell, 1895)

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

เป็นแมงมุมขนาดกลาง ค้นพบครั้งแรกโดย Tamerlan Thorell ในปี 1846 โดยใช้ *Telamonia festiva* เป็นตัวต้นแบบในการจำแนกชนิดสกุลนี้ ซึ่งแมงมุมในสกุลนี้ถูกจำแนกแล้วทั้งสิ้น 41 ชนิด (NMBE, 2021)

Telamonia dimidiata (Simon, 1899) (Figure 6)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Simon ในปี 1899 โดยจำแนกชนิดเป็น *Viciria dimidiata* ต่อมาปี 1974 Tikader ได้ทำการสำรวจแมงมุมสกุล *Phidippus* จากประเทศอินเดีย และได้เปลี่ยนเป็นสกุล *Phidippus pateli* ซึ่ง Prószyński (1984) ได้ศึกษาตัวอย่างแมงมุม *Viciria dimidiata* ของ Simon ในปี 1899 และได้พบว่าสกุล *Viciria* จำนวน 58 ชนิด มีความแตกต่างทางด้านสัณฐานวิทยา และต้องถูกแยกออกเป็นอย่างน้อย 6 สกุล และได้ตัดสินใจเปลี่ยนชื่อจาก *Viciria dimidiata* เป็น *Telamonia dimidiata*

ชื่อพ้อง :

Viciria dimidiata Simon, 1899

Phidippus pateli Tikader, 1974

Phidippus pateli Tikader & Malhotra, 1978

Phidippus pateli Tikader & Biswas, 1981

Telamonia dimidiata Sen et al., 2015

ชื่อสามัญ: Two Striped Jumping Spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 7 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4-2-2 พื้นที่ตาถูกล้อมรอบไปด้วยเกล็ดขนสีน้ำตาลออกแดง มีแถบสีขาวออกเหลืองใต้บริเวณตากกลางคู่หน้าลากผ่านทั้งสองข้างยาวไปจนกระทั่งถึงด้านท้ายของ carapace ดังรูป 6B ตาแถวหน้าเรียงเป็น recurve ตาหน้าด้านข้างและตาหลังมีขนาดเกือบเท่ากัน chelicerae มีฟันแถวหน้าจำนวน 1 ซี่ และแถวหลังจำนวน 2 fovea มี

ลักษณะเป็นหลุมลึกขนาดเล็ก maxilla มีขน scopula แบบหนา ขาคู่ที่ 1 และ 2 แข็งแรงกว่าขาคู่ที่ 3 และ 4

ท้อง (Abdomen): ขนาดยาวมากกว่ากว้างและชี้ไปทางด้านปลายของส่วนท้อง ปกคลุมไปด้วยขนละเอียดขนาดสั้นและขนาดยาว มีแถบขนสีดำเป็นรูปตัววี สำหรับ male palp ดังรูป 6C

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): ปากีสถาน อินเดีย เนปาล ภูฏาน มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย (สุมาตรา) สำหรับในประเทศไทยสามารถพบที่จังหวัดกาญจนบุรี เพชรบุรี ปทุมธานี และ นครราชสีมา

Telamonia festiva Thorell, 1887 (Figure 7)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1887 โดยจำแนกชนิดเป็น *Telamonia festiva* ต่อมาในปี 1895 Thorell ได้สำรวจแมงมุมในพม่าและจำแนกชนิดผิดเป็น *Bathippus trinotatus* ปี 1899 Simon สำรวจแมงมุมในสุมาตราและคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงตั้งชื่อใหม่ว่า *Viciria signata* ปี 1967 Prószyński ได้ทำการตรวจสอบตัวอย่างต้นแบบของ Thorell และอธิบายบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาใหม่ Zabka ได้ทำการสำรวจเก็บตัวอย่างแมงมุมในเวียดนามและพบแมงมุมชนิดนี้ครั้งแรกในประเทศเวียดนามในปี 1985 ต่อมาปี 2004 Logunov ได้ตรวจสอบตัวอย่างของ Tikader ที่พบแมงมุมชนิดนี้ในปี 1967 และจำแนกชนิดเป็นสกุลอื่นเป็น *Lyssomanes sikkimensis* หลังจากได้ตรวจสอบตัวอย่างแล้วจึงได้ย้ายตัวอย่างนี้กลับมาอยู่ในสกุล *Telamonia* เหมือนเดิม นอกจากนี้ยังได้มีการพบในประเทศจีนและในพื้นที่ปลูกชาในประเทศอินเดีย จนกระทั่งปี 2017 Prószyński ได้จัดทำคู่มือการจำแนกชนิดแมงมุมกระโดดและได้จัดทำเว็บไซต์คู่มือการจำแนกชนิดแมงมุมกระโดดทั่วโลกไว้อีกด้วย

ชื่อพ้อง :

Telamonia festiva Thorell, 1887

Viciria terebrifera Thorell, 1890

Bathippus trinotatus Thorell, 1895

Viciria signata Simon, 1899

Viciria terebrifera Simon, 1903

Viciria terebrifera Reimoser, 1925

Telamonia festiva Prószyński, 1967

Lyssomanes sikkimensis Tikader, 1967

Telamonia terebrifera Prószyński, 1976

Telamonia festiva Prószyński, 1984

Telamonia sikkimensis Logunov, 2004

Telamonia festiva Yin et al., 2012

ชื่อสามัญ: Jolly *Telamonia*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 6.5 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้; มีแถบขนสีดำรูปครึ่งวงกลมลักษณะคล้ายเกือกม้าจากด้านท้ายของ carapace ไปจนถึงส่วนด้านหน้า ส่วนกลางของ carapace มีแถบขนสีขาวเป็นแถบยาวตั้งแต่ด้านหน้าของ carapace ไปจนถึงตาแถวที่ 3 และมีแถบขนสีขาวพาดยาวตั้งแต่ขอบล่างด้านซ้ายของ carapace ไปจนถึงขอบล่างด้านขวา ดังรูป 7 A ตา 8 ตา สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4-2-2 clypeus แคบ มีฟันแถวหน้าจำนวน 2 ซี่ และแถวหลังจำนวน 1 ซี่ ขาเรียวยาวและมีขนกระจายทั่วทั้งขา ขาปล้องที่ 4 มีหนามสั้น

ท้อง (Abdomen): เรียวยาว มีแต้มขนสีขาวครีมกระจายตามยาวตั้งแต่ด้านบนของส่วนท้องไปจนกระทั่งด้านท้ายของส่วนท้อง spinneret ผอมและเรียวยาว สำหรับ male palp ดังรูป 7B และ 7C

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย เนปาล จีน พม่า เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย สำหรับในประเทศไทยพบที่จังหวัด เพชรบุรี และเชียงใหม่

สกุล *Thiania* C. L. Koch, 1846

Type: *Thiania pulcherrima* C. L. Koch, 1846 เพศเมีย

ชื่อพ้อง :

Thiania chiriatapuensis (Tikader, 1977)

Thiania oppressa (Thorell, 1892)

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

สกุลนี้ค้นพบครั้งแรกโดย C. L. Koch ในปี 1846 โดยใช้ *Thiania pulcherrima* เป็นตัวต้นแบบในการจำแนกชนิดสกุลนี้แต่ปัจจุบันได้กลายเป็น senior synonym ของ *Nicylla* (Thorell, 1890) ซึ่งแมงมุมในสกุลนี้ถูกจำแนกแล้วทั้งสิ้น 22 ชนิด (NMBE, 2021) สมาชิกส่วนใหญ่มีcephalothorax (ส่วนหัวและส่วนอก) กว้างและแบน ส่วนท้องผอมเรียวยาว เพศผู้ มี Palpal หนา และมี apophysis ค่อนข้างใหญ่

Thiania bhamoensis Thorell, 1887 (Figure 8)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1887 จากประเทศพม่าโดยจำแนกชนิดเป็น *Thiania bhamoensis* ต่อมา Thorell (1891) ได้จำแนกชนิดผิดคิดว่าเป็นแมงมุมชนิดใหม่จึงตั้งชื่อใหม่ว่า *Marptusa oppressa* ในปี 1977 และ 1981 (Tikader, Tikader & Biswas) ได้จำแนกชนิดแมงมุมจากประเทศอินเดียเป็น *Euophrys chiriatapuensis* ตั้งแต่ปี 1983 จนกระทั่งถึงปี 2020 ได้จำแนก

ชนิดเป็น *Thiania bhamoensis* โดย Chotwong and Tanikawa พบ new record ในประเทศไทย
ในปี 2013

ชื่อพ้อง :

Thiania bhamoensis Thorell, 1887

Marptusa oppressa Thorell, 1891

Thiania oppressa Simon, 1901

Euophrys chiriatapuensis Tikader & Biswas, 1981

Thiania bhamoensis Prószyński & Deeleman-Reinhold, 2010

Thiania bhamoensis Chotwong & Tanikawa, 2013

ชื่อสามัญ: Fighting Spider

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 6-7 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): เพศผู้: ลักษณะกว้างและแบนราบ พื้นที่อยู่รอบๆ ตา มีสีน้ำตาลเข้ม
ออกดำ มีขนสีขาวออกหม่นๆ ลักษณะแหววาวหนาแน่นบริเวณรอบตาแถวแรก ตา 8 ตา
สีเหมือนกันและเป็นแบบ diurnal eyes มีการจัดเรียงตา 3 แถว คือ 4-2-2 ความกว้างของพื้นที่ตามี
มากกว่าความยาวของพื้นที่ตา chelicerae สีน้ำตาลอ่อนและมีฟันแถวหน้าจำนวน 2 ซี่ และแถวหลัง
จำนวน 1 ซี่ Clypeus สีออกน้ำตาลและมีขนแข็งสีขาวจำนวนมาก maxillae, labium และ
sternum สีออกเหลือง sternum สีน้ำตาลอ่อนมีความยาวมากกว่าความกว้างเล็กน้อย labium
มีความกว้างมากกว่าความยาว ขาคู่ที่ 1 สีน้ำตาลเข้มออกดำมีลักษณะบวมเล็กน้อยและความยาว
มากกว่าขาคู่อื่นๆ ขาคู่ที่ 2 ครึ่งหนึ่งทางด้านส่วนปลายของขาปล้องที่ 3 มีสีค่อนข้างเหลืองและ
ครึ่งหนึ่งทางด้านส่วนปลายของขาปล้องที่ 4 และ 5 มีสีน้ำตาลเข้ม ขาปล้องที่ 6 และ 7 มีสีน้ำตาลอ่อน
ขาคู่ที่ 3 และ 4 มีสีซีดกว่าขาคู่ที่ 2 ซึ่งขาแต่ละข้างจะมีขนที่มีลักษณะเป็นเกล็ดสีฟ้าอมเขียวแหววาว
บนขาปล้องที่ 4 และ 5

ท้อง (Abdomen): เพศผู้: เรียวยาว มีแถบของเกล็ดขนที่มีสีฟ้าอมเขียวแหววาวที่ขอบ
ด้านบน แถบกลาง และด้านล่าง Spinnerets สีออกดำ Palpal organ ไม่มี conductor (ภาพที่ 8B
และ 8C)

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): จีน อินเดีย พม่า เวียดนาม ลาว อินโดนีเซีย (สุ
มาตราและบาห์ลี) ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ ฮองกง ศรีลังกา มาเลเซีย ฮาวาย สำหรับในประเทศไทย
สามารถพบได้ที่จังหวัดราชบุรี และกาญจนบุรี

การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การศึกษาครั้งนี้ทำการสกัดดีเอ็นเอของแมงมุมกระโดด 60 ตัวอย่าง ได้แก่ *Myrmaraplata
plataleoides* จำนวน 15 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 10 ตัวอย่าง *Plexippus petersi*
จำนวน 2 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 20 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2

ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 8 ตัวอย่างเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน COX1 ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากแมงมุมกระโดด ได้แก่ *Myrmaraplata plataleoides* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Plexippus petersi* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 5 ตัวอย่าง บันทึกผลนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode (ภาคผนวกที่ 1) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมงมุมกระโดดที่ทำการศึกษามาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมกระโดดที่รายงานในฐานข้อมูลสากล คือ Gen Bank เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมกระโดดที่ทำการศึกษามีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลสูงถึง 99-100%

จากการศึกษารั้วนี้พบว่าแมงมุมกระโดดบางตัวอย่างเมื่อนำ PCR product (ผลผลิต PCR) มาทำการตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยวิธีการ Gel electrophoresis กลับไม่แสดงแถบแบนบนแผ่นเจล จึงได้ปรับเปลี่ยนวิธีตั้งแต่เปลี่ยนอุณหภูมิในขั้นตอน Denaturation, Annealing และ Extension จำนวนรอบของ cycle จนกระทั่งเปลี่ยน primer ซึ่ง primer ที่สามารถทำให้ผลผลิต PCR แสดงแถบแบนบนแผ่นเจลได้คือ

C1J1718 GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA GTT CC และ

C1N2776 GGA TAA TCA GAA TAT CGT CGA GG (Simon *et al.*, 1994)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae

ลักษณะรูปร่างของตาและการจัดเรียงของตาของแมงมุมกระโดดเป็นลักษณะที่สืบทอดมาจากบรรพบุรุษ โดยเฉพาะตากกลางคู่หน้าที่มีขนาดใหญ่ มีรูปร่างเป็นหลอด มีเรตินาที่เป็นแถบๆ และเป็นชั้นๆ ซึ่งลักษณะนี้เป็นลักษณะที่ใช้ร่วมกันกับบรรพบุรุษ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae เพื่อใช้ยืนยันข้อมูลการจัดจำแนกชนิด โดยทำการวิเคราะห์ sequences ของตำแหน่ง COX1 จาก 27 ตัวอย่าง ได้แก่ *Myrmaraplata plataleoides* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 6 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 5 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 1 ตัวอย่าง และสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COX1 ของแมงมุมปวงศ์ Thomisidae *Xysticus lanio* จำนวน 1 ชนิด เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย Neighbor Joining (NJ) และ Maximum Likelihood (ML) พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน (Figure 11-12) โดยแมงมุมกระโดด สกุล *Myrmaplata*, *Plexippus*, *Phintella*, *Phintelloides*, *Telamonia* และ *Thiania* มีการแยกเคลดอย่างชัดเจน และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มแมงมุมวงศ์ Salticidae พบว่าแต่ละสกุลมีความสัมพันธ์ภายใน

กลุ่มที่มีลักษณะเป็น monophyletic ส่วนสกุล *Plexippus paykulli* มีตัวอย่าง 1 ตัวอย่างที่ถูกแยกออกไปจากกลุ่ม จากการที่มีความสัมพันธ์เป็น monophyletic ทำให้มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่เหมือนกันนั่นคือเป็นชนิดเดียวกัน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae สามารถจัดจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ แต่การจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มต้องเพิ่มข้อมูลของดีเอ็นเอของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์ ซึ่งยีนตำแหน่ง COX1 สามารถจำแนกได้เพียงความแตกต่างในระดับกลุ่มของ สกุล *Myrmaplata*, *Plexippus*, *Phintella*, *Phintelloides*, เท่านั้น แต่สกุล *Telamonia* และ *Thiania* ยังอยู่ใกล้ชิดกัน อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae ในประเทศไทย แต่การยืนยันชนิดหรือจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มของสกุล *Telamonia* และ *Thiania* นั้นต้องมีการศึกษาต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากแปลงมันสำปะหลังสวนชมพู แปลงเกษตรกร และขอบชายป่า ในประเทศไทย จากพื้นที่ภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ พบแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae จำนวน 110 ตัวอย่าง และในการจำแนกทางอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบแมงมุมกระโดด 6 สกุล 8 ชนิด ได้แก่ สกุล *Myrmaplata* จำนวน 1 ชนิด คือ *Myrmaplata plataleoides* สกุล *Plexippus* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Plexippus paykulli* และ *Plexippus petersi* สกุล *Phintella* จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Phintella vittata* สกุล *Phintelloides* จำนวน 1 ชนิด คือ *Phintelloides versicolor* สกุล *Telamonia* จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Telamonia dimidiata* และ *Telamonia festiva* สกุล *Thiania* จำนวน 1 ชนิด คือ *Thiania bhamoensis* จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอ ทำการสกัดดีเอ็นเอและพีซีอาร์ บริเวณยีน COX1 ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมงมุมกระโดด 60 ตัวอย่าง ได้แก่ *Myrmaplata plataleoides* จำนวน 15 ตัวอย่าง *Plexippus paykulli* จำนวน 10 ตัวอย่าง *Plexippus petersi* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Phintella vittata* จำนวน 20 ตัวอย่าง *Phintelloides versicolor* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia dimidiata* จำนวน 2 ตัวอย่าง *Telamonia festiva* จำนวน 1 ตัวอย่าง และ *Thiania bhamoensis* จำนวน 8 ตัวอย่าง

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลทางชีวโมเลกุลของแมงมุมกระโดดที่มีความซับซ้อนหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นการยากที่จะใช้เพียงลักษณะสัณฐานภายนอกมาเป็นตัวจัดจำแนก และยืนยันว่า COX1 เป็นยีนที่สามารถใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแมงมุมกระโดดกลุ่ม complex ได้ เนื่องจากยีน COX1 มีความแตกต่างมากพอที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้ เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve area) มีขนาดนิวคลีโอไทด์มีความเหมาะสมคือประมาณ 500-800 คู่เบส ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้น โพรเมอร์ที่เป็น universal primer จะสามารถเข้ามาจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้ง่ายและรวดเร็ว นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของยีน

COX1 ยังสามารถแยกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย และการเลือกบริเวณที่จะนำมาใช้เป็นนั้นมีความสำคัญมาก เพราะหากเลือกขนาดและบริเวณที่นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาจะทำให้สามารถนำไปใช้ได้ง่ายสะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อใช้ COX1 มีบางตัวอย่างที่ไม่สามารถแสดงผลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมงมุมกระโดดได้เลย ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ C1J1718 และ C1N2191 เพื่อให้สามารถแสดงผลผลิต PCR แสดงแถบแบนบนแผ่นเจล นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีการ Neighbor Joining และ Maximum Likelihood พบว่าแมงมุมกระโดดแต่ละสกุลมีการแยกเคลดอย่างชัดเจน ในขณะที่สกุล *Telamonia* ยังไม่สามารถแยกออกมาจากกลุ่มเดียวกันอย่างชัดเจน หากต้องการศึกษาการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้นจะต้องใช้จำนวนยีนที่มากขึ้นเพิ่มเติมมากขึ้น ดังเช่นงานวิจัยของ Hedin and Maddison (2001) ที่ใช้ยีนศึกษามากกว่า 1 ชนิด เช่น (COX1, ND1, 16S และ 28S) ซึ่งในปี 2008 Maddison *et al.* ได้ใช้ยีนตำแหน่งเดิม 4 ชนิดมาใช้ในการศึกษา (COX1, 28S, 18S, 16S-ND1)

นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ยังช่วยยืนยันจำนวนชนิดของแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae ในประเทศไทย ให้มีความสอดคล้องและทันสมัยเทียบเท่าระดับสากล ดังเช่นงานวิจัยของ Maddison *et al.* (2008) ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมกระโดดในประเทศออสเตรเลียโดยได้จัดกลุ่มความสัมพันธ์ใหม่

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนายพงศ์พัฒนา วิวรรธนาวิณ ช่วยอนุเคราะห์ถ่ายภาพ และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุมที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- วิภาดา วังศิลาบัตร. 2539. การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในกล้วยไม้. รายงานผลการวิจัยกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม, กองกัญและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. หน้า 1-76.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990. "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Azarkina, G.N. 2019. A new species of *Aelurillus* Simon, 1884 (Aranei: Salticidae) from Thailand, with the first description-416.
- Baba, Y.G. and A. Tanikawa. 2015. The handbook of spiders. Bun-ichi Sogo Shuppan, Tokyo. 112 pp.
- Barrion, A.T. and J.A. Litsinger. 1995. Riceland spiders of South and Southeast Asia. CAB International, Wallingford, UK. 700 pp.

- Benjamin, S.P. 2004. Taxonomic revision and phylogenetic hypothesis for the jumping spider subfamily Ballinae (Araneae, Salticidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 142(1): 1-82.
- Benjamin, S.P. 2010. Revision and cladistic analysis of the jumping spider genus *Onomastus* (Araneae: Salticidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 159(3): 711-745.
- Chen, X.E. and J.C. Gao. 1990. The Sichuan farmland spiders in China. Sichuan Science and Technology Publishing House, Chengdu. 226 pp.
- Cho, J. H. and J.P. Kim. 2002. A revisional study of family Salticidae Blackwall, 1841 (Arachnida, Araneae) from Korea. *Korean Arachnology*. 18: 85-169.
- Caleb, J.T.D. 2020. Spider (Arachnida: Araneae) fauna of the scrub jungle in the Madras Christian College campus, Chennai, India. *Journal of Threatened Taxa*. 12(7): 15711-15766.
- 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.
- Chotwong, W. and A. Tanikawa. 2013. Four spider species of the families Theridiidae, Araneidae, and Salticidae (Arachnida; Araneae) new to Thailand. *Acta Arachnologica*. 62(1): 1-5.
- Davies, V.T. and M. Zabka. 1989. Illustrated keys to the genera of jumping spiders (Araneae: Salticidae) in Australia. *Memoirs of the Queensland Museum*. 27: 189-266.
- Dhali, D.C., S. Saha and D. Raychaudhuri. 2017. Litter and ground dwelling spiders (Araneae: Arachnida) of reserve forests of Dooars, West Bengal. *World Scientific News*. 63: 1-242.
- El-Hennawy, H.K., M.A. Mohafez and A.A. El-Gendy. 2015. The first record of *Plexippus clemens* (O.P.-Cambridge, 1872) (Araneae: Salticidae) in Egypt. *Serket*. 14(3): 128-133.
- Foelix R.F. 1996. *Biology of spiders*, 2nd ed. New York: Oxford Thieme. 330 pp.
- 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.

- Hedin, M.C. and W.P. Maddison. 2001. A combined molecular approach to phylogeny of the jumping spider family Dendryphantinae (Araneae: Salticidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 18: 386-403.
- Jackson, R.R. and S.D. Pollard. 1996. Predatory behavior of jumping spiders. *Annu Rev Entomol.* 41: 287-308.
- Kanesharatnam, N. and S.P. Benjamin. 2019. Multilocus genetic and morphological phylogenetic analysis reveals a radiation of shiny South Asian jumping spiders (Araneae, Salticidae). *ZooKeys*. 839: 1-81.
- Kim, S.T. and S.Y. Lee. 2014. Arthropoda: Arachnida: Araneae: Clubionidae, Corinnidae, Salticidae, Segestriidae. Spiders. *Invertebrate Fauna of Korea*. 21(31): 1-186.
- Koch, C. L. 1846. Die Arachniden. J. L. Lotzbeck, Nürnberg, Dreizehnter Band, pp. 1-234, pl. 433-468 (f. 1078-1271); Vierzehnter Band, pp. 1-88, pl. 467-480.
- Koh, J.K.H. 1989. A Guide to Common Singapore Spiders. Singapore: Singapore Science Center. 160 pp.
- Koh, J.H. and L.T. Ming. 2013. Biodiversity in the Heart of Borneo: Spiders of Brunei Darussalam. Natural History Publications (Borneo) ISBN: 978-983-812-145-3367 pp.
- Koh, J.H. and B. Nicky. 2019. Borneo Spiders A Photographic Field Guide. Sabah Forestry Department, Kota Kinabalu. ISBN: 9789670180205
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7):1870-1874.
- Logunov D.V. and G.N. Azarkina. 2007. New species of and records for jumping spiders of the subfamily Spartaeinae (Aranei: Salticidae). *Arthropoda Selecta*. 16 (2): 97-114.
- Logunov, D.V. and Y.M. Marusik. 2014. Taxonomic notes on the genus *Eupoa* Zabka, 1985 (Arachnida, Araneae, Salticidae). *ZooKeys*. 410: 63-93.
- Lucas, H. 1846. Histoire naturelle des animaux articulés. In: Exploration scientifique de l'Algérie pendant les années 1840, 1841, 1842 publiée par ordre du Gouvernement et avec le concours d'une commission académique. Paris, Sciences physiques, Zoologie. 1, 89-271, pl. 1-17.

- Maddison W.P. 1988. A revision of jumping spider species groups formerly placed in the genus *Metaphidippus*, with a discussion of salticid phylogeny (Araneae). PhD thesis, Harvard University.
- Maddison W.P. and M.C. Hedin. 2003. Jumping spider phylogeny (Araneae: Salticidae). *Invertebrate Systematics*. 17: 529-549.
- Maddison W.P., M.R. Bodner and K.M. Needham. 2008. Salticid spider phylogeny revisited, with the discovery of a large Australasian clade (Araneae: Salticidae). *Zootaxa*. 1893: 49-64.
- Namkung, J. 2002. The spiders of Korea. Kyo-Hak Publishing Co., Seoul, 648 pp.
- Ono, H. 2009. The spiders of Japan with keys to the families and genera and illustrations of the species. Tokai University Press. p 558-588.
- Peckham, G.W. and E.G. Peckham. 1886. Genera of the family Attidae: with a partial synonymy. *Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts and Letters*. 6: 255-342.
- Platnick NI. 1998. *Advances in spider taxonomy 1992-1995, with redescriptions 1940-1980*. New York: Entomol. Soc. Am. Mus. Nat. Hist. 976 pp.
- Platnick, N.I. 2009. The world spider catalog, version 10.0. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>
- Prószyński, J. 1984. Remarks on *Viciria* and *Telamonia* (Araneae, Salticidae). *Annales Zoologici, Warszawa*. 37: 417-436.
- Prószyński, J. 2016. Delimitation and description of 19 new genera, a subgenus and a species of Salticidae (Araneae) of the world. *Ecologica Montenegrina*. 7: 4-32.
- Saito, S. 1959. *The Spider Book Illustrated in Colours*. Hokuryukan, Tokyo. 194 pp.
- Song, D.X., Z. Mingsheng and C. Jun. 1999. *The Spiders of China*. Hebei Science and Technology Publishing House. p. 398-401p.
- Tabrizi, S.S., S.P. Rad and Z. Hedayati. 2014. A faunistic study on the spiders of several metropolis parks in Tehran, Iran. *Indian Journal of Arachnology*. 3(2): 28-39.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 24: 1596-1599p.

- Thomson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680 p.
- Walckenaer, C.A. 1837. *Histoire naturelle des insectes. Aptères. Tome premier.* Roret, Paris, 682 pp., pl. 1-15.
- Wanless, F.R. 1980. A revision of the spider genera *Asemonea* and *Pandisus* (Araneae: Salticidae) *Bull. Br. Mus. Nat. (Zool.) London*, 39(4): 213-257.
- Wanless F.R. 1984a. A review of the spider subfamily Spartaeinae nom. n. (Araneae: Salticidae) with description of six new genera. *Bull. Br. Mus. Nat. (Zool.) London*. 46(2): 135-198.
- Whyte, R. and G.H. Anderson. 2017. *A Field Guide to Spiders of Australia.* CSIRO Publishing. ISBN: 9780643107076
- World Spider Catalog. 2021. World Spider Catalog, Version 22.5. Natural History Museum Bern. Available at URL <http://wsc.nmbe.ch> (Accessed on 20/09/2021).
- Workman, T. and M.E. Workman. 1894. *Malaysian spiders.* Belfast. pp. 9-24.
- Wunderlich, J. 2008. Identification key to the European genera of the jumping spiders (Araneae: Salticidae). *Beiträge zur Araneologie*. 5: 698-719, 868.
- Yamasaki, T. and A.H. Ahmad. 2013. Taxonomic study of the genus *Myrmarachne* of Borneo (Araneae: Salticidae). *Zootaxa* 3710: 501-556.
- Żabka, M. and J. Gardzińska. 2017. Salticidae of Thailand. Part 1, genera *Plexippus* C. L. Koch, 1846 and *Burmattus* Prószyński, 1992. *Annales Zoologici, Warszawa* 67(2): 229-242.
- Zhang, J.X., D.X. Song and D. Li. 2003. Six new and one newly recorded species of salticidae (Arachnida: Araneae) from Singapore and Malaysia. *The Raffles bulletin of Zoology*. 51(2): 187-195.

Table 1 Spider Fauna in Family Salticidae found in Thailand between 2017 until 2020.

Scientific name	Habitus	Location	GPS	Reference
<i>Myrmaplata</i> <i>plataleoides</i> (O. Pickard- Cambridge, 1869)	dry evergreen forest	Nakron Rachasima	14°40.065",101°26.630"	W. Chotwong
	mango	Khon Kaen	16°33'13.2474", 102°56'53.4438"	W. Chotwong
	Restaurant	Sisaket	14°27'39.7188", 104°43'4.3458"	J. Bangtha
	along forest	Bangkok	13°50'50", 100°34'24"	J. Bangtha
	along forest	Pathum thani		J. Bangtha
	Cassava field	Kamphaeng Phet	16°28'9.4146", 99°31'38.8050"	J. Bangtha
	tree near restaurant	Phitsanulok	16°51'11.5668", 100°36'41.3676"	W. Chotwong
	Rose apple orchard	Phetchaburi	12°53'45.0", 99°50'57.8"	W. Chotwong
	forest	Kanchanaburi	14° 2' 21.4614",99°30'44.6466"	W. Chotwong
	forest	Prachuap Khiri Khan	12° 23' 39.3468",99°58'51.6684"	W. Chotwong
	along forest	ChiangMai	12°53'45.0", 99°50'57.8"	W. Chotwong
	Rose apple orchard	Rachaburi	13°33'40.8990", 100°3'33.3498"	J. Bangtha
	forest	Surat Thani	07° 28.618" , 099° 21.'393"	J. Bangtha
	forest	Nan	18° 37'31.67" , 100° 44.'17.50"	J. Bangtha
	mango	Chachoengsao	13°42'54.6510", 101°13'2.4708"	W. Chotwong
	mango	Chachoengsao	13°42'54.6510", 101°13'2.4708"	W. Chotwong
	Rose apple orchard	Samut Sakhon	13° 33'41" , 100° 3.'33"	W. Chotwong
<i>Plexippus</i> <i>paykulli</i> (Audouin, 1826)	Restaurant	Sisaket	14°27'39.7188", 104°43'4.3458"	J. Bangtha
	Rose apple orchard	Phetchaburi	13°8'8", 99°56'56"	W. Chotwong
	forest around paddy field	Chainat	15° 17'17.6994" , 100° 1'56.7480"	J. Bangtha
	along forest	ChiangMai	19°57'57.5496", 99°9'17.4060"	J. Bangtha

Table 1 Spider Fauna in Family Salticidae found in Thailand between 2017 until 2020. (continued)

Scientific name	Habitus	Location	GPS	Reference
<i>Plexippus paykulli</i>	Waterfall	ChiangMai	18°32'48.7", 98°30'56.4"	J. Bangtha
(Audouin, 1826)	forest	Nan	18° 45'15.4908" , 100° 47'24.7194"	W. Chotwong
<i>Plexippus petersi</i>	forest	Kanchanaburi	14° 50' 0.9" , 98° 39' 51.4"	W. Chotwong
(Karsch, 1878)	forest	Prachuap Khiri Khan	12° 23' 39.3468", 99°58'51.6684"	W. Chotwong
	house	Phitsanulok	16° 51'11.5668" , 100° 36'41.3676"	W. Chotwong
	market	Surat Thani	09° 1'46.0158" , 98° 56'46.0890"	W. Chotwong
	house	Phrae	17° 56'31.5666" , 100° 3'47.3220"	W. Chotwong
	forest	Nan	18° 45'15.4908" , 100° 47'24.7194"	W. Chotwong
	forest	ChiangMai	19°57'57.5496", 99°9'17.4060"	J. Bangtha
	along forest	Bangkok	13°50'50", 100°34'24"	J. Bangtha
	house	Buriram	14°36'25.7508", 103°7'41.3502"	J. Bangtha
<i>Phintella vittata</i>	cassava	Rayong	14°30'26.6580", 101°55'39.3312"	W. Chotwong
(C. L. Koch, 1846)	Rose apple orchard	Phetchaburi	12°53'45.0", 99°50'57.8"	W. Chotwong
	Palm plantation	Chumphon	10°51'46.3500", 99°25'35.7492"	W. Chotwong
	corn	Nakron Pathom	14°1'28.8300", 99°52'38.5566"	W. Chotwong
	forest	Trat	12°3'45.8382", 102°18'38.2134"	J. Bangtha
<i>Phintelloides versicolor</i>	mango	Rayong	14°30'26.6580", 101°55'39.3312"	W. Chotwong
(C. L. Koch, 1846)	Rose apple orchard	Phetchaburi	12°53'45.0", 99°50'57.8"	J. Bangtha
	corn	Kanchanaburi	13°57'42.7386", 99°38'57.5766"	J. Bangtha

Table 1 Spider Fauna in Family Salticidae found in Thailand between 2017 until 2020. (continued)

Scientific name	Habitus	Location	GPS	Reference	
<i>Phintelloides versicolor</i> (C. L. Koch, 1846)	forest	Prachuap Khiri Khan	12° 23' 39.3468", 99°58'51.6684"	W. Chotwong	
	corn	Nakron Pathom	14°01'28.8300", 99°52'38.5566"	W. Chotwong	
	along forest	Bangkok	13°50'50", 100°34'24"	J. Bangtha	
	forest	Surat Thani	09° 44'18.2724" , 100° 0'5.5476"	J. Bangtha	
	tree near restaurant	Phitsanulok	16°51'11.5668", 100°36'41.3676"	W. Chotwong	
	mango	Phrae	17° 56'31.5666" , 100° 3'47.3220"	J. Bangtha	
	forest	Nan	18° 45'15.4908" , 100° 47'24.7194"	W. Chotwong	
	mango	Chachoengsao	13°42'54.6510", 101°13'2.4708"	W. Chotwong	
	forest	Rachaburi	13°35'12.5442", 99°23'33.7992"	J. Bangtha	
	dry evergreen forest	Nakron Rachasima	14°40.065",101°26.630"	W. Chotwong	
	mango	Khon Kaen	16°33'13.2474", 102°56'53.4438"	W. Chotwong	
	tree near house	Buriram	14°36'25.7508", 103°7'41.3502"	J. Bangtha	
	tree near Restaurant	Sisaket	14°27'39.7188", 104°43'4.3458"	J. Bangtha	
	<i>Telamonia dimidiata</i> (Simon, 1899)	Gas Station	Nakhon Ratchasima	14°400.65", 101°26.630'	W. Chotwong
		corn	Kanchanaburi	13°57'42.7386", 99°38'57.5766"	W. Chotwong
tree		Phetchaburi	13°8'25.8900", 99°56'52.8930"	W. Chotwong	
<i>Telamonia festiva</i> Thorell, 1887	along forest	Pathum thani		J. Bangtha	
	forest	ChiangMai	12°53'45.0", 99°50'57.8"	W. Chotwong	
<i>Thiania bhamoensis</i> Thorell, 1887	forest	Phetchaburi	12°53'45.0", 99°50'57.8"	J. Bangtha	
	grass	Rachaburi	13°35'12.5442", 99°23'33.7992"	J. Bangtha	
	grass	Kanchanaburi	14°10'31.7892", 99°7'42.4200"	J. Bangtha	



Figure 1 *Myrmaplata plataleoides* (O. Pickard-Cambridge, 1869); female abdomen dorsal view (A), male (B), chelicerae and fang; lateral view (C), epigyne; ventral view (D), left palp; ventral view (E), lateral view (F)



Figure 2 *Plexippus petersi* (Karsch, 1878); female abdomen dorsal view (A), male (B), epigyne; ventral view (C), left palp; ventral view (D), lateral view (E)



Figure 3 *Plexippus paykulli* (Audouin, 1826); female abdomen dorsal view (A), male abdomen dorsal view (B), epigyne; ventral view (C), left palp; ventral view (D), lateral view (E)



Figure 4 *Phintelloides versicolor* (C. L. Koch, 1846); female abdomen dorsal view (A), epigyne; ventral view (B)



Figure 5 *Phintella vittata* (C. L. Koch, 1846); male abdomen dorsal view (A), left palp; ventral view (B), lateral view (C)



Figure 6 *Telamonia dimidiata* (Simon, 1899); male abdomen dorsal view (A), chelicera and carapace (B), left palp; ventral view (B)



Figure 7 *Telamonia festiva* Thorell, 1887; male abdomen dorsal view (A), left palp; ventral view (B), lateral view (C)



Figure 8 *Thiania bhamoensis* Thorell, 1887; male abdomen dorsal view (A), left palp; ventral view (B), lateral view (C)

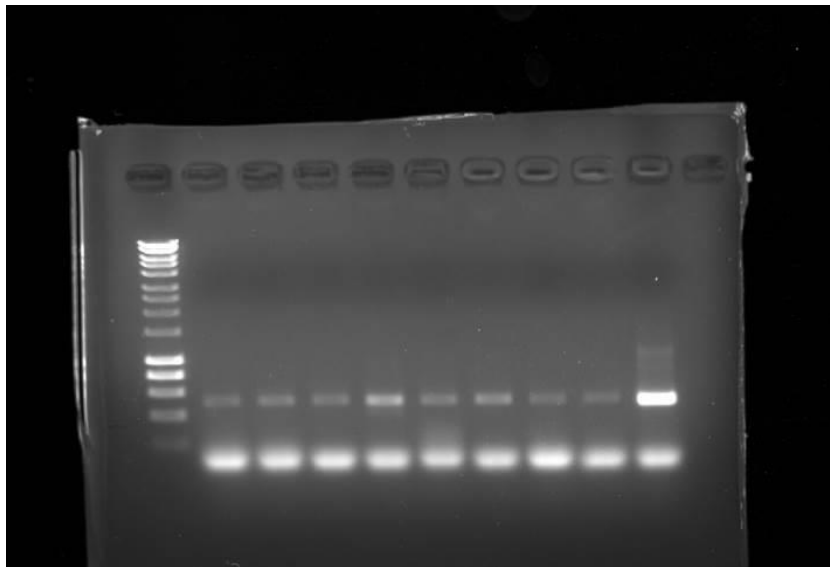


Figure 9 PCR product จาก ยีน COX1 จากแมงมุมกระโดด *Myrmaplata plataleoides* (ตัวอย่าง 1) *Plexippus petersi* (ตัวอย่าง 2) *Plexippus paykulli* (ตัวอย่าง 3) *Phintelloides versicolor* (ตัวอย่าง 4) *Phintella vittata* (ตัวอย่าง 5) *Telamonia dimidiata* (ตัวอย่าง 6) *Thiania bhamoensis* (ตัวอย่าง 7-8) และ positive (ตัวอย่าง 9)

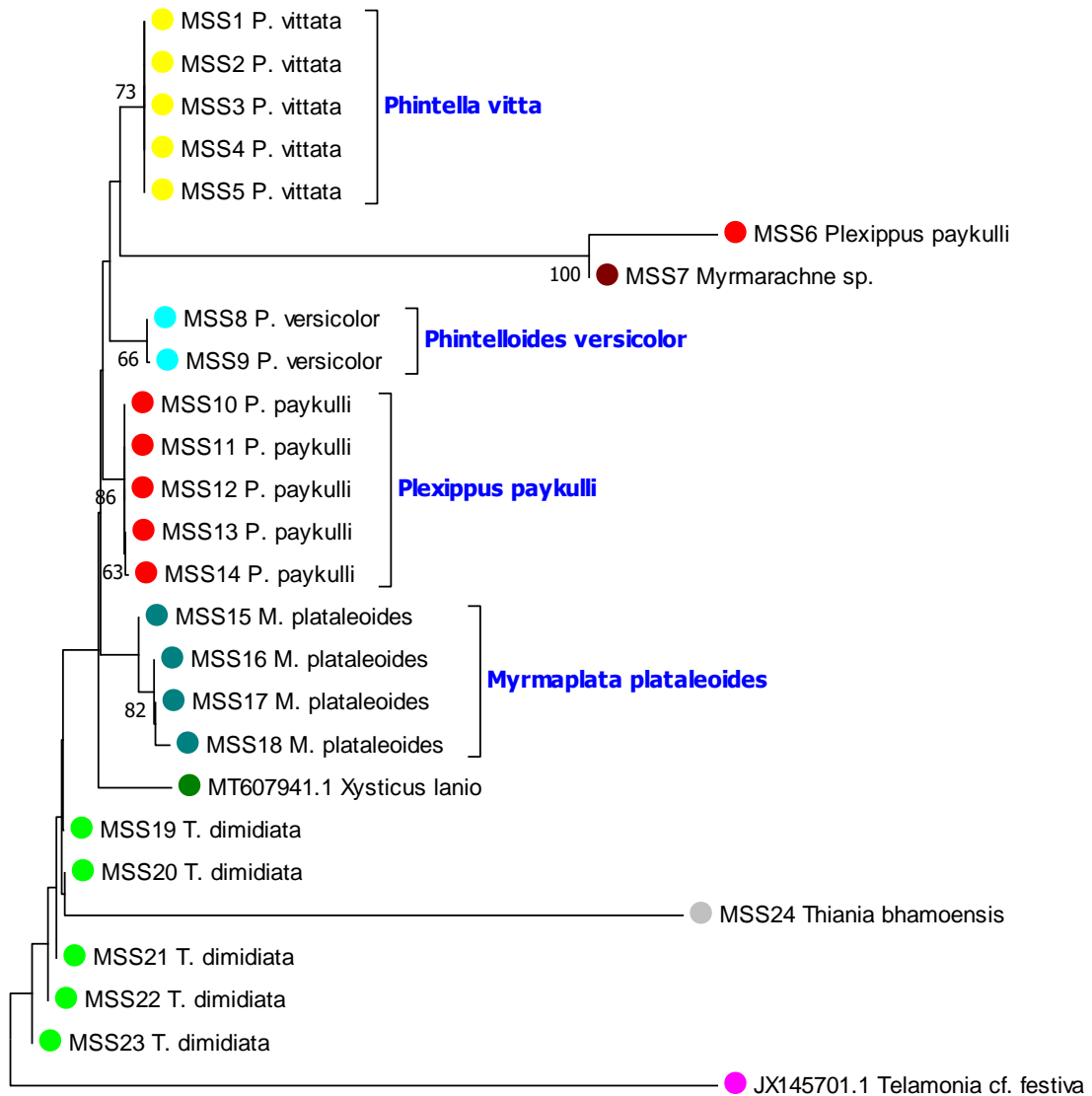


Figure 10 Neighbor joining analysis phylogenetic tree based on *COX1* gene sequences. *Xysticus lanio* was used as outgroup. The scale bar = 0.02 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.

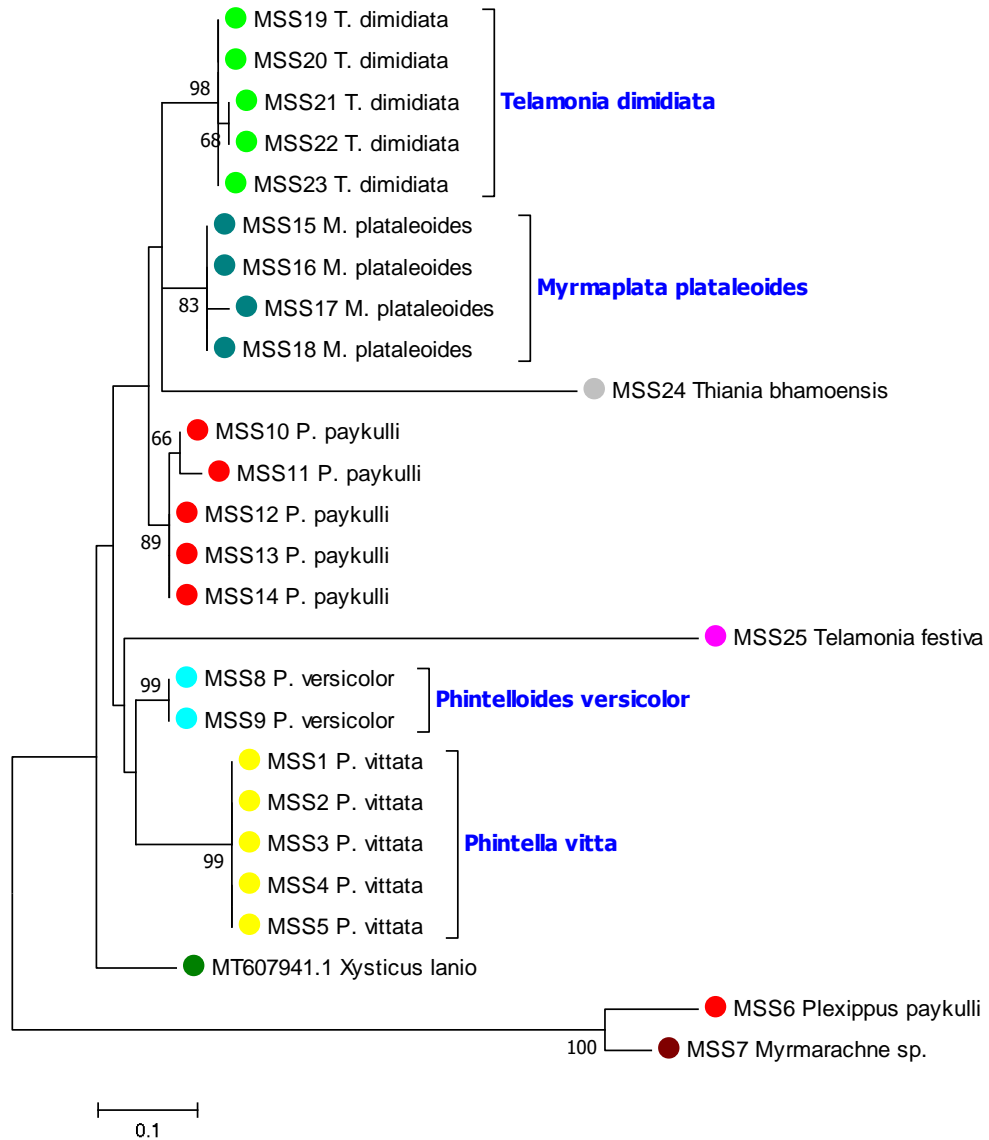


Figure 11 Maximum likelihood phylogenetic tree based on *COX1* gene sequences, showing the phylogenetic relationship among Salticidae Specimens and *Xysticus lanio* was used as outgroup. The number of sites are 650, and scale bar = 0.01 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.

ภาคผนวกที่ 1

DNA Barcode ของแมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae เพิ่มปริมาณ DNA ด้วย COX1

รายละเอียดของ DNA Barcode ของ แมงมุมกระโดดวงศ์ Salticidae จำนวน 25 ตัวอย่าง

>ตัวอย่างที่ 1 MSS1

AACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCTGCTATAGTAGGAACTGCTATGAGAGTTTTAATTCGAATA
GAATTGGGTCAAACAGGAAGTTTTTAGGAAATGATCATATATATAATGTAATTGTAACGGCTCATGCTT
TTGAATAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTTAATTGGAGTTTTGGAAATTGATTAGTTCCTTTAAT
ATTAGGAGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTGTTACCTCCTTCTTTA
TTTTTATTATTTATTTCTTCTATAGCTGAAATGGGTGTAGGAGCTGGGTGAACGGTATATCCTCCTCTTG
CTTCAATTGTTGGACATAATGGTAGATCTGTTGATTTTGCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTC
TTCTATTATGGGGGCTATTAATTTTATTTCAACTGTTATTAATATACGGTCTGTTGGGATAAGATTGGAT
AAGGTTCCCTTATTTGATGATCTGTTGTAATTACTGCTGTTTTATTATTATTACATTACCTGTATTAG
CAGGTGCTATTACAATATTGTTAACTGATCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGTGG
TGATCCAATTTTATTTCAACATTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 2 MSS2

AACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCTGCTATAGTAGGAACTGCTATGAGAGTTTTAATTCGAATA
GAATTGGGTCAAACAGGAAGTTTTTAGGAAATGATCATATATATAATGTAATTGTAACGGCTCATGCTT
TTGAATAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTTAATTGGAGTTTTGGAAATTGATTAGTTCCTTTAAT
ATTAGGAGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTGTTACCTCCTTCTTTA
TTTTTATTATTTATTTCTTCTATAGCTGAAATGGGTGTAGGAGCTGGGTGAACGGTATATCCTCCTCTTG
CTTCAATTGTTGGACATAATGGTAGATCTGTTGATTTTGCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTC
TTCTATTATGGGGGCTATTAATTTTATTTCAACTGTTATTAATATACGGTCTGTTGGGATAAGATTGGAT
AAGGTTCCCTTATTTGATGATCTGTTGTAATTACTGCTGTTTTATTATTATTACATTACCTGTATTAG
CAGGTGCTATTACAATATTGTTAACTGATCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGTGG
TGATCCAATTTTATTTCAACATTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 3 MSS3

AACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTGATCTGCTATAGTAGGAACTGCTATGAGAGTTTTAATTCGAATA
GAATTGGGTCAAACAGGAAGTTTTTAGGAAATGATCATATATATAATGTAATTGTAACGGCTCATGCTT
TTGAATAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTTAATTGGAGTTTTGGAAATTGATTAGTTCCTTTAAT
ATTAGGAGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTGTTACCTCCTTCTTTA
TTTTTATTATTTATTTCTTCTATAGCTGAAATGGGTGTAGGAGCTGGGTGAACGGTATATCCTCCTCTTG
CTTCAATTGTTGGACATAATGGTAGATCTGTTGATTTTGCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGTGCTTC
TTCTATTATGGGGGCTATTAATTTTATTTCAACTGTTATTAATATACGGTCTGTTGGGATAAGATTGGAT
AAGGTTCCCTTATTTGATGATCTGTTGTAATTACTGCTGTTTTATTATTATTACATTACCTGTATTAG
CAGGTGCTATTACAATATTGTTAACTGATCGTAATTTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGTGG
TGATCCAATTTTATTTCAACATTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 4 MSS4

AAC TTT AT AT T T A A T T T T T T G G T G C T T G A T C T G C T A T A G T A G G A A C T G C T A T G A G A G T T T T A A T T C G A A T A
 G A A T T G G G T C A A A C A G G A A G T T T T T T A G G A A A T G A T C A T A T A T A T A A T G T A A T T G T A A C G G C T C A T G C T T
 T T G T A A T A A T T T T T T T A T A G T A A T G C C A A T T T T A A T T G G A G G T T T T G G A A A T T G A T T A G T T C C T T T A A T
 A T T A G G A G C T C C A G A T A T A G C T T T T C C T C G A A T A A A T A A T T T A A G A T T T T G A T T G T T A C C T C C T T C T T T A
 T T T T T A T A T T T T T T C T T C T A T A G C T G A A A T G G G T G T A G G A G C T G G G T G A A C G G T A T A T C C T C C T C T T G
 C T T C A A T T G T T G G A C A T A A T G G T A G A T C T G T T G A T T T T G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G T G C T T C
 T T C T A T T A T G G G G G C T A T T A A T T T T A T T T C A A C T G T T A T T A A T A T A C G G T C T G T T G G G A T A A G A T T G G A T
 A A G G T T C C T T T A T T T G T A T G A T C T G T T G T A A T T A C T G C T G T T T T A T T A T T A T C A T T A C C T G T A T T A G
 C A G G T G C T A T T A C A A T A T T G T T A A C T G A T C G T A A T T T T A A T A C T T C T T T T T T G A T C C T G C A G G A G G T G G
 T G A T C C A A T T T T A T T T C A A C A T T T G T T T

>ตัวอย่างที่ 5 MSS5

AAC TTT AT AT T T A A T T T T T T G G T G C T T G A T C T G C T A T A G T A G G A A C T G C T A T G A G A G T T T T A A T T C G A A T A
 G A A T T G G G T C A A A C A G G A A G T T T T T T A G G A A A T G A T C A T A T A T A T A A T G T A A T T G T A A C G G C T C A T G C T T
 T T G T A A T A A T T T T T T T A T A G T A A T G C C A A T T T T A A T T G G A G G T T T T G G A A A T T G A T T A G T T C C T T T A A T
 A T T A G G A G C T C C A G A T A T A G C T T T T C C T C G A A T A A A T A A T T T A A G A T T T T G A T T G T T A C C T C C T T C T T T A
 T T T T T A T A T T T T T T C T T C T A T A G C T G A A A T G G G T G T A G G A G C T G G G T G A A C G G T A T A T C C T C C T C T T G
 C T T C A A T T G T T G G A C A T A A T G G T A G A T C T G T T G A T T T T G C A A T T T T T C T T T A C A T T T A G C A G G T G C T T C
 T T C T A T T A T G G G G G C T A T T A A T T T T A T T T C A A C T G T T A T T A A T A T A C G G T C T G T T G G G A T A A G A T T G G A T
 A A G G T T C C T T T A T T T G T A T G A T C T G T T G T A A T T A C T G C T G T T T T A T T A T T A T C A T T A C C T G T A T T A G
 C A G G T G C T A T T A C A A T A T T G T T A A C T G A T C G T A A T T T T A A T A C T T C T T T T T T G A T C C T G C A G G A G G T G G
 T G A T C C A A T T T T A T T T C A A C A T T T G T T T

>ตัวอย่างที่ 6 MSS6

A G T T A R W T W A A A A A T C A A A C A A A T G M T G A A T A A A A T T G G A T C C C C T C C C T C C A T S A G G A T C A A A A A A A G A T G T
 A T T A A A A T T T C G A T C T G T T A C A A T A T A T G T A A T A G C T C C A G C T A A A A C T G G T A A T G A T A A T A A T A A A A C A G
 C T G T A A T G A A A C T G A T C A T A C A A A T A A T G G T A C C T T A T C T A A A G A T A T T C C A A T T C T T C G T A T A T T A A T T A C G G
 T A G A A A T A A A A T T A A T A G C C C C T A T A A T T G A A G A A G C A C C A G C C A A A T G T A A A G A A A A A T A G C A A A A T C C A T A
 G A T C T T C C A T T A T G T C C T A C A A T A G A A G C T A A A G G A G G A T A A A C A G T T C A C C C C G C A C C C A C T C C T A T T T C A G C
 T A T A G A A G A A A T A A A T A A T A A T T A A T G A T G G G G G T A A A A G T C A A A A A C T C A A A T T A T T T A T A C G W G G A A A A G
 C C A T A T C A G G A G C A C C T A A T A T T A A G G A A C T A A T C A A T T T C A A A T C C T C C C A

>ตัวอย่างที่ 7 MSS7

N G T G N G N N A C A T C A A A T A A A T G T T G A A A T A A A A T T G G A T C T C C T C C T C C T G C A G G A T C A A A A A A A G A G T A T T A
 A A A T T T C G A T C A G T C A A T A A C A T T G T A A T A G C A C C C G C T A A T A C A G G T A A A G A T A A T A A T A A A A A T A G C A G T
 A A T T A T T A C A G A T C A T A C A A A T A A C G A A A T T T T A T C T A T T G A T A T T C C T A C C G A A C G T A T A T T A A T A A T T G T A G A
 A A T A A A A T T A A T A G C T C C T A T A A T A G A A G A A G C A C C A G C T A A A T G T A A A G A A A A A A T A G C A A A A T C T A C T G A T C
 T T C A T T A T G C C C A C A A T A G A T G C T A A A G G A G G A T A T A C T G T T C A T C C T G C C C T A C T C C C A T T T C A A C T A T A

GAAGAAATAATAATAATATTAAGAAGGAGGTAACAATCAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGAAAAGCCAT
ATCAGGTGCTCCTAATATTAATGGAATAATCAATTTCAAATCCTCCN

>ตัวอย่างที่ 8 MSS8

TTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCACCT
TCTTTATTTTATTATTTATTTCTTCTATAGCAGAAATAGGCGTAGGTGCTGGTTGAACAGTTTACCCTC
CTTTAGCTTCCATTGTGGGACATAATGGAAGTGTGTTGATTTTGCTATTTTTCTCTTCATTAGCTGG
TGCCTCATCCATTATAGGAGCAATTAATTTTATTTCAACTGTAATTAATATACGTTCTATTGGTATAAGT
TTAGATAAGGTTCTTTGTTGTATGATCTGTAGTAATTACAGCTGTATTATTATTATTACATTACCTG
TATTAGCAGGTGCTATTACAATATTATTAAGTATCGAAATTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGG
TGGAGGAGATCCAATTTTATTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGACATCCT

>ตัวอย่างที่ 9 MSS9

GGAGCTCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCACCTTCTTTATTTTATTAT
TTATTTCTTTTATAGCAGAAATAGGCGTAGGTGCTGGTTGAACAGTTTACCCTCCTTTAGCTTCCATTGTGGGA
CATAATGGAAGTGTGTTGATTTTGCTATTTTTCTCTTCATTTAGCTGGTGCCTCATCCATTATAGGAGCAATT
AATTTTATTTCAACTGTAATTAATATACGTTCTATTGGTATAAGTTTAGATAAGGTTCTTTGTTGTATGATCT
GTAGTAATTACAGCTGTATTATTATTATTACATTACCTGTATTAGCAGGTGCTATTACAATATTATTAAGTAT
CGAAATTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGTGGAGGAGATCCAATTTTATTTCAACATTTATTTTGATTT
TTTGGACATCCTGAAGTTTATTTTTATTTTTACCGGA

>ตัวอย่างที่ 10 MSS10

AACTTTATATTTAATTTTTGGAGCTTGAGCAGCTATAGTTGGAACAGCAATAAGAGTATTGATTGCAATA
GAGTTAGGTCAAACGGGAAGTTTTTTAGGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTT
TTGTTATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATTTTAAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCTTTAAT
ATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGTTTTTACTATTACCCCTTCTTTA
ATATTATTATTTATTTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTAGGTGCAGGTTGGACTGTTTATCCTCCTTTAG
CATCAATTGTAGGTCATAATGGAAGATCTGTTGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTAGCGGGTGCTTC
ATCGATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACGGTAATTAATATACGATCAGTAGGAATATCTATAGAT
AAGATTCCATTGTTGTATGATCAGTAGTATTACTGCTGTTTTATTATTATTATCTCTACCTGTTTTAG
CAGGTGCTATTACTATATTGTTAACTGATCGAAATTTAATACTTCTTTTTTTGACCCTGCAGGTGGTGG
GGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTT

>ตัวอย่างที่ 11 MSS11

AACTTTATATTTAATTTTTGGAGCTTGAGCAGCTATAGTTGGAACAGCAATAAGAGTATTGATTGCAATA
GAGTTAGGTCAAACGGGAAGTTTTTTAGGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTT
TTGTTATAATTTTTTTTATAGTAATACCTATTTTAAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCTTTAAT
ATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGTTTTTACTATTACCCCTTCTTTA
ATGTTATTATTTATTTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTAGGTGCAGGTTGGACTGTTTATCCTCCTTTAG
CATCAATTGTAGGTCATAATGGAAGATCTGTTGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTAGCGGGTGCTTC
ATCGATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACGGTAATTAATATACGATCAGTAGGAATATCTATAGAT

AAGATTCCATTGTTTGTATGATCAGTAGTTACTGCTGTTTTATTATTATTATCTCTACCTGTTTTAG
 CAGGTGCTATTACTATATTGTTAACTGATCGAAATTTAATACTTCTTTTTTGACCCTGCAGGTGGTGG
 GGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTT

>ตัวอย่างที่ 12 MSS12

AACTTTATATTTAATTTTTGGAGCTTGAGCAGCTATAGTTGGAACAGCAATAAGAGTATTGATTCGAATA
 GAGTTAGGTCAAACGGGAAGTTTTTAGGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTT
 TTGTTATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTTAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTTAAT
 ATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGTTTTGACTATTACCCCTTCTTTA
 ATATTATTATTTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTAGGTGCAGGTTGGACTGTTTATCCTCCTTTAG
 CATCAATTGTAGGTCATAATGGAAGATCTGTTGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTAGCGGGTGCTTC
 ATCGATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACGGTAATTAATATACGATCAGTAGGAATATCTATAGAT
 AAGATTCCATTGTTTGTATGATCAGTAGTTACTGCTGTTTTATTATTATTATCTCTACCTGTTTTAG
 CAGGTGCTATTACTATATTGTTAACTGATCGAAATTTAATACTTCTTTTTTGACCCTGCAGGTGGTGG
 GGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTT

>ตัวอย่างที่ 13 MSS13

AACTTTATATTTAATTTTTGGAGCTTGAGCAGCTATAGTTGGAACAGCAATAAGAGTATTGATTCGAATA
 GAGTTAGGTCAAACGGGAAGTTTTTAGGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTT
 TTGTTATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTTAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTTAAT
 ATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGTTTTGACTATTACCCCTTCTTTA
 ATGTTGTTATTTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTGGGTGCAGGTTGGACTGTTTATCCTCCTTTAG
 CATCAATTGTAGGTCATAATGGAAGATCTGTTGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTAGCGGGTGCTTC
 ATCGATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACGGTAATTAATATACGATCAGTAGGAATATCTATAGAT
 AAGATTCCATTGTTTGTATGATCAGTAGTTACTGCTGTTTTATTATTATTATCTCTACCTGTTTTAG
 CAGGTGCTATTACTATGTTGTTAACTGATCGAAATTTAATACTTCTTTTTTGACCCTGCAGGTGGTGG
 GGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTT

>ตัวอย่างที่ 14 MSS14

AACTTTATATTTAATTTTTGGAGCTTGAGCAGCTATAGTTGGAACAGCAATAAGAGTATTGATTCGAATA
 GAGTTAGGTCAAACGGGAAGTTTTTAGGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTT
 TTGTTATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTTAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTTTAAT
 ATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGTTTTGACTATTACCCCTTCTTTA
 ATATTATTATTTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTAGGTGCAGGTTGGACTGTTTATCCTCCTTTAG
 CATCAATTGTAGGTCATAATGGAAGATCTGTTGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTAGCGGGTGCTTC
 ATCGATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACGGTAATTAATATACGATCAGTAGGAATATCTATAGAT
 AAGATTCCATTGTTTGTATGATCAGTAGTTACTGCTGTTTTATTATTATTATCTCTACCTGTTTTAG
 CAGGTGCTATTACTATATTGTTAACTGATCGAAATTTAATACTTCTTTTTTGACCCTGCAGGTGGTGG
 GGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTT

>ตัวอย่างที่ 15 MSS15

ATTATTATTTATTTCTTCTATAAATTGAAATAGGAGTTGGGGCTGGATGGACTGTTTATCCTCCTTTAGCT
 TCTGTTGTAGGGCATGGAGGAAATCTGTTGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTGGCTGGTGCTTCTT
 CTATTATAGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATTAATATACGTTTCAGTTGGGATATCTATAGATAA
 AATTTCTTTATTTGTTTGGTCTGTAATTATTACTGCTGTATTATTATTATTATCATTACCAGTTTTAGCT
 GGTGCTATTACTATATTGTTAACTGATCGAAATTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGAGGGG
 ATCCTATTTTATTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGTGTATTTTTGATTTTGCCTGG
 ATTTGGAATTGTTTCTCATGTGATTAGATCTTCTGTTGGAAAGCGAGAACCTTTTGGATTTTTAGGAATA
 GTTTATGCTATAGTTGGAATTGGTGGTATAGGATTTGTTGTTTGGAGCTCATCATATGTTTTCTGTTGGAA
 TGGATGTAGATACTCGAGCTTATTTACTGCTGCTACTATAATTATTGCTGTTTCTACAGGAATTAAGT

>ตัวอย่างที่ 16 MSS16

ATTATTATTTATTTCTTCTATAAATTGAAATAGGAGTTGGGGCTGGATGGACTGTTTATCCTCCTTTAGCT
 TCTGTTGTAGGGCATGGAGGAAATCTGTTGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTGGCTGGTGCTTCTT
 CTATTATAGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATTAATATACGTTTCAGTTGGGATATCTATAGATAA
 AATTTCTTTATTTGTTTGGTCTGTAATTATTACTGCTGTATTATTATTATTATCATTACCAGTTTTAGCT
 GGTGCTATTACTATATTGTTAACTGATCGAAATTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTGCAGGAGGAGGGG
 ATCCTATTTTATTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGTGTATTTTTGATTTTGCCTGG
 ATTTGGAATTGTTTCTCATGTGATTAGATCTTCTGTTGGAAAGCGAGAACCTTTTGGATTTTTAGGAATA
 GTTTATGCTATAGTTGGAATTGGTGGTATAGGATTTGTTGTTTGGAGCTCATCATATGTTTTCTGTTGGAA
 TGGATGTAGATACTCGAGCTTATTTACTGCTGCTACTATAATTATTGCTGTTTCTACAGGAATTAAGT
 ATTTAGATGAATAGCTACTTTATATGGATCATTTTTAAAGTAGATACTCCATTAATATGGTGTATTGGA
 TTTGTATTTTTATTTACTTTGGGAGGGATTACGGGTGTAATTTTATCTAATCTTCTTTGGATATTGTAT
 TACATGATACTTATTATGTGGTTGCACATTTTCATTATGTTTTAAGAATAGGAGCTGTGTTTGCTATTTT
 AGCTGGAATTACTTATTGATTTCTTTATTTTTTGGAGTTGTATTA

>ตัวอย่างที่ 17 MSS17

AACGTTATTTAATTTTTGGGGCTTGATCAGCTATAGTTGGTACTGCTATAAGAGTTTTGA
 TTCGAATAGAATTAGGTCAGACAGGTGATTTTTTGGGTAATGATCATTTATATAATGTGATT
 GTTACTGCTCATGCTTTTGTATAATTTTTTTATAGTAATACCAATTTAATTGGTGGTTTT
 GGTAATTGATTAGTTCCTTTAATATTGGGGCTCCTGATATAGCTTTTCTCGTATAAATAA
 TTTAAGATTTTATTACCTCCTCTTTAATATTATTATTTCTTCTATAATTGAAAT
 AGGAGTTGGGGCTGGATGAACTGTTTATCCTCCTTTAGCTTCTGTTGTAGGACATGGAGGA
 AATTCTGTTGATTTTCTATTTTTCTTTACATTTGGCTGGTGCTTCTTCTATTATAGGGGC
 TATTAATTTTATTTCTACTATTATTAATATACGTTTCAGTTGGAATATCTATAGATAAAGTTTC
 TTTATTTGTTTATGCTGTTATTATTACTGCTGTATTATTATTATTATC

>ตัวอย่างที่ 18 MSS18

TTCNNCNNTANATTNTTTTTNATTNGGGTATTACCTCCTTCTTTAATATTATTATTATTCTTCTATAATTGA
 AATAGGAGTTGGGGCTGGATGGACTGTTTATCCTCCTTTAGCTTCTGTTGTAGGGCATGGAGGAAATCTGTTG

AATTTGCTATTTTTCTTTACATTTGGCTGGTCTTCTTCTATTATAGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTAT
 TAATATGCGTTCAGTTGGATTATCTATAGATAAAAATTTCTTTATTTGTTTGGTCTGTAATTACTGCTGTATT
 ATTATTATTATCATTACCAGTTTTAGCTGGTGCTATTACTATATTGTTAACTGATCGAAAATTTAATACTTCTTT
 TTTTGATCCTGCAGGAGGGGAGATCCTATTTTTATTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGTTTA
 TATTTAATTTTACCGGA

>ตัวอย่างที่ 19 MSS19

AACATTATATTTAATTTTTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAAGTCTATAAGAGTATTAATTCGAATA
 GAGTTAGGACAAACAGGAAGATTTTTAGGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTT
 TTGTTATAATTTTTTTATAGTTATACCTATTTAATTGGAGGTTTTGGAAAATTGATTGGTTCCTTTAAT
 GTTAGGGGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATGAATAATTTAAGTTTTTGATTACTTCTCCGTCATTA
 ATATTATTATTTATTTTCAATAGTAGAAATAGGAGTAGGGGCTGGATGAACTGTATATCCTCCTTTAG
 CTTCTATTGTTGGTCATAATGGTAGATCAGTAGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTC
 TTCTATTATAGGTGCTATTAATTTATTTCTACAGTAGTAAATATACGATCTATTGGAATATCTATAGAT
 AAGATTCCTTTGTTTGTATGATCGGTTATTACTGCTGTTTTATTATTGTTATCATTACCAGTATTAG
 CAGGTGCTATTACTATATTATTGACTGATCGTAATTTAATACTTCTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGG
 AGATCCTATTTTTATTTCAACATTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 20 MSS20

AACATTATATTTAATTTTTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAAGTCTATAAGAGTATTAATTCGAATA
 GAGTTAGGACAAACAGGAAGATTTTTAGGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTT
 TTGTTATAATTTTTTTATAGTTATACCTATTTAATTGGAGGTTTTGGAAAATTGATTGGTTCCTTTAAT
 GTTAGGGGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATGAATAATTTAAGTTTTTGATTACTTCTCCGTCATTA
 ATATTATTATTTATTTTCAATAGTAGAAATAGGAGTAGGGGCTGGATGAACTGTATATCCTCCTTTAG
 CTTCTATTGTTGGTCATAATGGTAGATCAGTAGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTC
 TTCTATTATAGGTGCTATTAATTTATTTCTACAGTAGTAAATATACGATCTATTGGAATATCTATAGAT
 AAGATTCCTTTGTTTGTATGATCGGTTATTACTGCTGTTTTATTATTGTTATCATTACCAGTATTAG
 CAGGTGCTATTACTATATTATTGACTGATCGTAATTTAATACTTCTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGG
 AGATCCTATTTTTATTTCAACATTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 21 MSS21

AACATTATATTTAATTTTTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAAGTCTATAAGAGTATTAATTCGAATA
 GAGTTAGGACAAACAGGAAGATTTTTAGGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTT
 TTGTTATAATTTTTTTATAGTTATACCTATTTAATTGGAGGTTTTGGAAAATTGATTGGTTCCTTTAAT
 GTTAGGGGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATGAATAATTTAAGTTTTTGATTACTTCTCCATCATT
 ATATTATTATTTATTTTCAATAGTAGAAATAGGAGTAGGGGCTGGATGAACTGTATATCCTCCTTTAG
 CTTCTATTGTTGGTCATAATGGTAGATCAGTAGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTC
 TTCTATTATAGGTGCTATTAATTTATTTCTACAGTAGTAAATATACGATCTATTGGAATATCTATAGAT
 AAGATTCCTTTGTTTGTATGATCAGTTATTACTGCTGTTTTATTATTGTTGTCATTACCAGTATTAG
 CAGGTGCTATTACTATGTTATTAAGTATCGTAATTTAATACTTCTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGG

AGATCCTATTTTATTTCAACACTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 22 MSS22

AACATTATATTTAATTTTTGGAGCTGGGCTGCTATAGTAGGAAGCTATAAGAGTATTAATTCGAATA
GAGTTAGGACAAACAGGAAGATTTTTAGGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTT
TTGTTATAATTTTTTTATAGTTATACCTATTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTGGTTCCTTTAAT
GTTAGGGGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATGAATAATTTAAGTTTTTGATTACTTCCTCCGTCATTA
ATATTATTATTTATTTTCATCAATAGTAGAAATAGGAGTAGGGGCTGGATGAACTGTATATCCTCCTTTAG
CTTCTATTGTTGGTCATAATGGTAGATCAGTAGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTC
TTCTATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACAGTAGTAAATATACGATCTATTGGAATATCTATAGAT
AAGATTCCTTTGTTGTATGATCGGTTATTACTGCTGTTTTATTATTGTTGCATTACCAGTATTAG
CAGGTGCTATTACTATATTATTGACTGATCGTAATTTAATACTTCTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGG
AGATCCTATTTTATTTCAACATTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 23 MSS23

AACATTATATTTAATTTTTGGAGCTGGGCTGCTATAGTAGGAAGCTATAAGAGTATTAATTCGAATA
GAGTTAGGACAAACAGGAAGATTTTTAGGTAATGAACATTTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTT
TTGTTATAATTTTTTTATAGTTATACCTATTTAATTGGAGGTTTTGGAAATTGATTGGTTCCTTTAAT
GTTAGGGGCTCCAGATATAGCTTTTCCTCGAATGAATAATTTAAGTTTTTGATTACTTCCTCCGTCATTA
ATATTATTATTTATTTTCATCAATAGTAGAAATAGGAGTAGGGGCTGGATGAACTGTATATCCTCCTTTAG
CTTCTATTGTTGGTCATAATGGTAGATCAGTAGATTTTGCTATTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTC
TTCTATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACAGTAGTAAATATACGATCTATTGGAATATCTATAGAT
AAGATTCCTTTGTTGTATGATCGGTTATTACTGCTGTTTTATTATTGTTATCATTACCAGTATTAG
CAGGTGCTATTACTATATTATTGACTGATCGTAATTTAATACTTCTTTTTTTGATCCAGCTGGAGGGGG
AGATCCTATTTTATTTCAACATTTGTTT

>ตัวอย่างที่ 24 MSS24

TTTGTGTGGGCTCATCATATGTTTTCTGTAGGGATGGATGTTGATACTCGAGCATATTTTACAGCAG
CTACTATAATTATGCAGTACCTACCGGTATTAAGGTTTTAGTTGAATAGCTACATTGTATGGGCTTA
TTTTAAAATTGATACACCTTTAATGTGATGTATTGGGTTGTATTTTTGTTACTTTAGGTGGAATTACT
GGTGTAGTTTTATCTAATTTCTTTGGATATTTTTACATGATACTTATTATGTGGTTGCACATTTTC
ATTATGTATTAAGAATAGGAGCTGTTTTGCTATTTTAGGTGGTATTACTTATTGATTCCTTTGTTTT
TGGTGTGGTTTTGAATGAGAGGAAAATAAATTACAATTTTTAGTAATATTTTTGGGTGTTAATAACT
TTTTTCTCAGCATTTTTAGGGTTAAATGGTATACCGCGTCGATATGCTGACTATCCTGATGCTTTTA
TATTTGAAATATAATTTCTTTAGGGTCTTTATTGTCTTTAATTGGAGTTTTACTTTTTATTTATAT
TGTTTTGGGAGAGTTTGGTTATGAAATATTCTTTTTATGATAGATATTATACTAGTTCCTTTTAGAATGA
AT

>ตัวอย่างที่ 25 MSS25

ACTATATTGTTAACTGATCGTAATTTAATACTTCTTTCTTTGACCCAGCAGGAGGAGGAGATCCTATTT
TATTTCAACATTTGTTTTGATTTTTGGTCATCCAGAGGTATATTTTTAATTTTACCTGGATTTGGTAT

TGTTTCTCATGTAATTAGAGCTTCTGTGGGAAAGCGAGAACCGTTTGGTTCCTTAGGTATGATTTATGCC
ATAGTGGGAATTGGTGGGAATAGGATTTGTAGTTTGGGCTCATCATATATTTTCTGTAGGTATAGATGTAG
ATACTCGAGCTTATTTTACAGCAGCTACTATAATTATTGCTGTACCTACTGGAATTAAGTATTTAGATG
AATAGCTACATTATACGGATCATATTTTAAAATTGATACTCCTTTAATATGATGTATTGGTTTTGTATTC
TTATTTACTTTTAGGAGGAATTACTGGAGTAGTTTTATCAAATTCCTTTAGATATTGTATTACATGATA
CTTATTATGTTGTTGCTCATTTTCATTATGTACTAAGAATAGGAGCTGTATTTGCTATTTTAGCTGGAAT
TACTTATTGATTCCTTTATTTTTTGGAGTAGTTTTAAGAGAAAAGAAACTAAATTACAATTTTTAGTT
ATATTTATTGGGGTAAAT

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/} ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล^{2/} นพรัตน์ จันทร์หอม^{3/}
นางสาวชุตติกาญจน์ ใจแล^{3/}

^{1/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ สำนักควบคุมวัสดุทางการเกษตร

รายงานความก้าวหน้า

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ที่ทำการสำรวจได้และแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นแมลงกักกัน (quarantine pest) ของไทย รวมทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequences) แมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจากฐานข้อมูล Genbank มาจัดลำดับและทำการตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม chromas และ BioEdit เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* โดยเลือกตำแหน่ง single - nucleotide polymorphism (SNPs) ซึ่งจะใช้ระบุชนิดของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เท่านั้น ซึ่งไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแมลงวันชนิดอื่น ๆ ได้ และได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จำนวน 3 เส้น ซึ่งจะได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงจำนวน 2 คู่ ได้แก่ Bco-F1 กับ Bco-R1 ขนาด 141 คู่เบส และ Bco-F1 กับ Bco-R2 ขนาด 396 คู่เบส ทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับแมลงวันแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะต่าง ๆ ได้แก่ ไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย จากนั้นนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จาก PCR product ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความถูกต้องอยู่ระหว่าง 99 -100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบนั้นมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

คำหลัก แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ไพรเมอร์

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-15-62

คำนำ

ปัจจุบันการนำเข้าและส่งออกผัก ผลไม้มีมาตรฐานที่สูงขึ้น ดังนั้นหากมีการตรวจพบสิ่งปนเปื้อนโดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชที่ติดมากับผลผลิตทางการเกษตรนั้น จะต้องมีมาตรการและวิธีการที่เป็นมาตรฐานระดับสากล และวิธีการที่นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดศัตรูนั้นจะต้องมีความสะดวกรวดเร็ว และประหยัด สำหรับประเทศไทยนั้นการนำเข้าและส่งออกพืช ผัก ผลไม้ในปัจจุบันนี้ พบว่าแมลงวันผลไม้ (Tephritid fruit fly) เป็นศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนสูงมาก เนื่องจากแมลงวันผลไม้เพศเมียจะวางไข่ ตัวหนอนเจริญเติบโต และกักกินอยู่ภายในผล ยากต่อการสังเกตเห็น ทำให้มีโอกาสดูดไปภายใน ผัก และผลไม้ได้สูง ส่งผลเสียหายเป็นอย่างยิ่งในการส่งออก ก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้าตามมาอีกด้วย ทั่วโลกพบแมลงวันผลไม้มากกว่า 5,000 ชนิด แต่ในประเทศไทยนั้นพบว่าแมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* และสกุล *Zeugodacus* นั้นสามารถทำลายผลผลิตทางการเกษตรได้หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็น ผักหรือ ผลไม้ และพบว่าแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เป็นศัตรูที่ก่อให้เกิดความเสียหายและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างยิ่งสามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 30 วงศ์ (Family) ใน 60 ชนิด (species) เช่น ชมพู่ มะม่วง ฝรั่ง เชอรี่ พุทรา และพริก โดยเฉพาะผลไม้ที่เกษตรกรนิยมปลูกเพื่อการการบริโภคภายในประเทศ และส่งออก เช่น ฝรั่ง มะม่วง และชมพู่ แต่ในปัจจุบันนี้ มีงานวิจัยเกี่ยวกับ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* นั้นยังมีน้อยมาก

ดังนั้นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จัดเป็นหนึ่งในแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญต่อการนำเข้าและส่งออก แต่ปัจจุบันนี้ประเทศไทยใช้การตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของตัวเต็มวัย (Traditional taxonomy) เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยเพียงเท่านั้น ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยแต่หากมีการสำรวจพบแมลงวันผลไม้ ในระยะไข่ หนอน หรือดักแด้ นำมาตรวจวินิจฉัยนั้นยังไม่เป็นที่นิยม และขาดความน่าเชื่อถือ เนื่องจากลักษณะไข่ และตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ นั้น มีความคล้ายคลึงกันมาก และหากต้องการศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้จากตัวอ่อน จะต้องนำตัวอ่อนมาทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษารายละเอียดจากสัณฐานวิทยาภายนอกในส่วนต่างๆ เช่นส่วนปาก (mouth hook) และรูหายใจด้านหน้า (anterior spiracles) และปลายท้อง (posterior spiracles) นอกจากนี้หากมีการตรวจพบตัวอ่อนในการส่งออกหรือนำเข้าผลผลิตทางการเกษตรนั้น ผู้ที่ทำการตรวจวินิจฉัยจะต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้ตัวอ่อน หรือดักแด้ นั้นเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ชนิดซึ่งค่อนข้างใช้เวลานานและเป็นผลเสียต่อการค้าผักผลไม้ตามมา (Armstrong et al., 1997)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จะเป็นครั้งแรกในการทดสอบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงต่อ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ประเทศจีนได้นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ตรวจพบจากชมพู่ที่ส่งออกไปจากประเทศไทย (Jiang et al., 2013) ว่าไพรเมอร์ดังกล่าวนี้มีความเหมาะสม และมีประสิทธิภาพเพียงพอในการนำมาใช้หรือไม่ นอกจากนี้จะทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ให้มีความเหมาะสมและสามารถนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในประเทศไทย โดยการออกแบบออกแบบไพรเมอร์ที่มี

เฉพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในครั้งนี้จะเป็นการประยุกต์หลักการพื้นฐานของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR กับ species - specific primer จาก DNA Barcode และจะใช้เพียงขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA จากการทำ PCR และ electrophoresis ซึ่งจะสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดได้ภายในวันเดียว และสามารถตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่งได้ทุกระยะไม่ว่าจะเป็นระยะไข่ หนอน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัย ซึ่งประโยชน์จากการศึกษาครั้งนี้จะทำให้เกิดความรู้เร็ว ประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย และเป็นการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทย และสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์กับการตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆ อีกด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope
- กล้องถ่ายรูปจากกล้องจุลทรรศน์
- อุปกรณ์และสารเคมีในการเก็บตัวอย่างแมลง (ขวดดอง กล้องพลาสติก ถังพลาสติก กับดักแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) สารฟีโรโมนล่อแมลงวันผลไม้ ได้แก่ เมทิล ยูจีนอล (Methyl Eugenol) คิวลัวร์ (CUE lure) รวมทั้งโพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) สำหรับรักษาคุณภาพของแมลงวันผลไม้ระหว่างติดกับดักไว้ในแปลงสำรวจ
- สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอ เช่น ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Bioline, Australia), Agarose gel (Bioline, Australia) และ TBE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), MyTag (Bioline, Australia) HS Red DNA Polymerase และ MgCl₂
- สารเคมี และไพรเมอร์ (primer) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

วิธีการ

1. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* จากแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และสืบค้นข้อมูลแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นศัตรูพืชกักกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม chromas (version, 2.33, Technelysium Pty Ltd, Australia) และ BioEdit เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เริ่มจากการหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่มีความแตกต่างกัน (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ระหว่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงโดยอาศัยโปรแกรม GeneFisher (<http://www.bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher/>) โดยเลือกความยาวของไพรเมอร์ที่มีขนาด 18 - 25 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่

ออกแบบมาวิเคราะห์ dimer hairpin และ false priming sites ด้วยโปรแกรม Oligo (version 6.0) (DBA Oligo, Inc., USA) และนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มาวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงโดยการ BLAST กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล สังเคราะห์คู่ไพรเมอร์จำนวนสองคู่ไพรเมอร์เพื่อใช้จำแนกแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยเทคนิค PCR

2. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำไพรเมอร์ที่เหมาะสมมาทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานดังต่อไปนี้

2.1 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการสำรวจในประเทศไทย

2.2 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ โดยทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ (laboratory samples) ในระยะ ไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย

2.5 ยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยการทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ให้บริสุทธิ์และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

การบันทึกข้อมูล

1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบให้สอดคล้องกับชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบ ด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2562 - กันยายน 2563

สถานที่ : 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *B. apicalis*, *B. carambolae*, *B. correta*, *B. cilifera*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *D. longicornis*, *Z. caudatus*, *Z. cucurbitae*, *Z. tau* และลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้บางส่วนจากฐานข้อมูลของ

GenBank มาเปรียบเทียบกับความเหมือนและความคล้ายกันเพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และตรวจหาตำแหน่ง SNPs ด้วยโปรแกรม Vector NTI (Invitrogen) (<https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>) 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 ได้แก่ R1 บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 204 จำนวน 22 คู่เบส (Figure 1) และ R2 บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 456 จำนวน 25 คู่เบส (Figure 2)

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ของไพรเมอร์ (Table 1) 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 3) ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นไม่สามารถจับกันเป็น dimer ได้ ตั้งชื่อ Forward และ Reverse primers แต่ละเส้นว่า Bco-F1 และ Bco-R1 ไพรเมอร์คู่นี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ขนาดประมาณ 141 คู่เบส และ Bco-F1 และ Bco-R2 ไพรเมอร์คู่นี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ขนาดประมาณ 396 คู่เบส

จากการวิเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นด้วยโปรแกรม Primer map พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เท่านั้น และเมื่อนำไป BLAST ของฐานข้อมูล GenBank พบว่าไพรเมอร์ทุกเส้นมีความเหมือนกับบริเวณยีน *cox1* แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ระดับความเหมือน 99 -100% (Table 1)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำดีเอ็นเอต้นแบบของแมลงวันผลไม้ทั้งหมด 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* มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* (Zcu-F1, Zcu-R1) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* (Bco-F1, Bco-R1) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้อุณหภูมิและปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมของแต่ละคู่ไพรเมอร์ ส่วนผสมของปฏิกิริยา 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 μl

สภาวะปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมสำหรับจำแนกแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยวิธี PCR ปรับ annealing temperature ที่ 53 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ 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	55/53	30 sec	
4. extension	72	30 sec	
5. final-extension	72	4 min	1

เพื่อยืนยันว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีประสิทธิภาพและสามารถใช้จำแนกชนิดแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้จริง พร้อมทั้งทดสอบความใช้งานจริง (validation) ทั้งในเรื่องความจำเพาะเจาะจงกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (specificity test) โดยทำการประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ออกแบบ โดยสกัด DNA ในตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะต่าง ๆ ได้แก่ ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ และตรวจสอบ PCR product ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ทั้ง 2 คู่ ได้แก่ Bco-F1 กับ Bco-R1 ขนาด 141 คู่เบส และ Bco-F1 กับ Bco-R2 ขนาด 396 คู่เบส และทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงด้วยวิธีการเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วย 1.5% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer โดยอาศัยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าและประจุไฟฟ้า (Figure 4 - 5)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยโปรแกรม chromas และ BioEdit เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* โดยเลือกตำแหน่ง single - nucleotide polymorphism (SNPs) และได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จำนวน 3 เส้น ซึ่งจะได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงจำนวน 2 คู่ ได้แก่ Bco-F1 กับ Bco-R1 ขนาด 141 คู่เบส และ Bco-F1 กับ Bco-R2 ขนาด 396 คู่เบส ทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะต่าง ๆ ได้แก่ ไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย จากนั้นนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จาก PCR product ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความถูกต้องอยู่ระหว่าง 99 -100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบนั้นมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

เอกสารอ้างอิง

- Armstrong, K. F., & Ball, S. L. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 360(1462): 1813-1823.
- Jiang, F., Li, Z. H., Deng, Y. L., Wu, J. J., Liu, R. S., & Buahom, N. (2013). Rapid diagnosis of the economically important fruit fly, *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) based on a species-specific barcoding cytochrome oxidase I marker. *Bulletin of entomological research*, 103(03), 363-371. *Journal of Applied Entomology* 128, 670–676.

Table 1 Nucleotide of sequences and properties of broad-spectrum primer set used in *B. correcta* screening in this study primer (primer name, sequences, position, no. of base pair, temperature (Tm), % GC and size of PCR product).

Primer name	Sequences	Position	No. of base pair	Tm	% GC	Size of PCR product
1 Forward (F1)	CT-----AC	(85-103)	19	54.2	68.4	141
2 Reverse (R1)	CA-----AA	(204-225)	22	50.3	45.5	
3 Reverse (R2)	TC-----TA	(456-480)	25	55.4	36	396

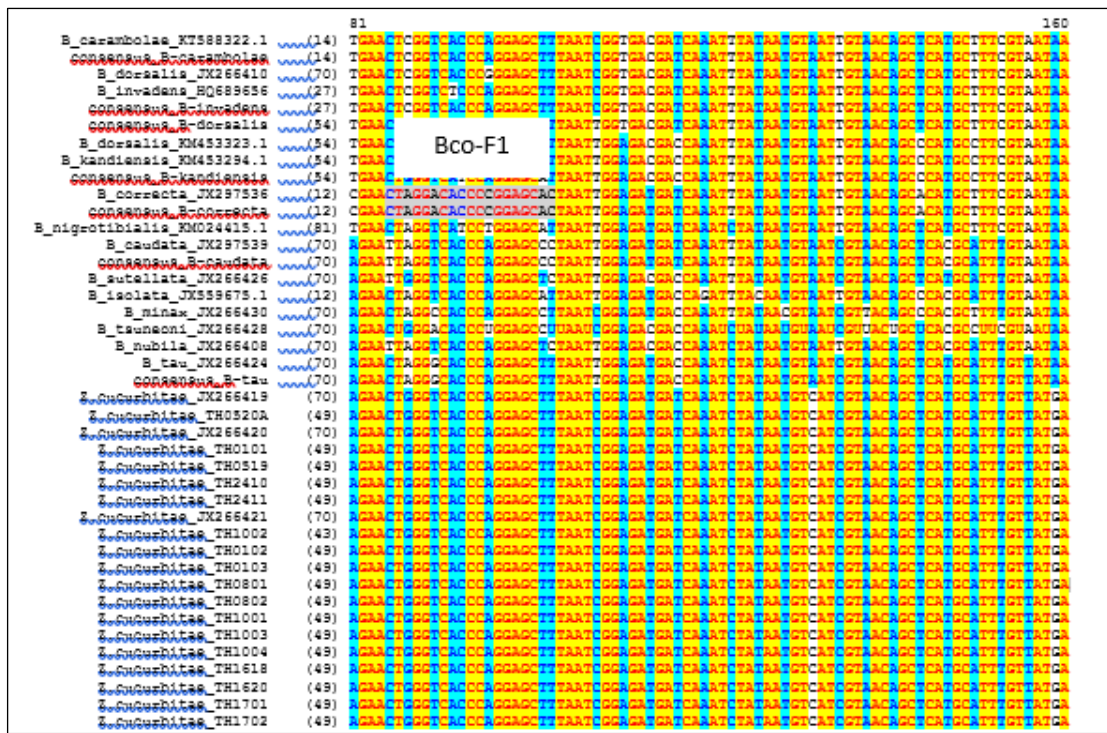


Figure 1 Alignment of the nucleotide sequence regions of cox1 gene on fruit flies. Consensus sequences were used to design broad-spectrum primers for *Bactrocera correcta* (Bco-F1).

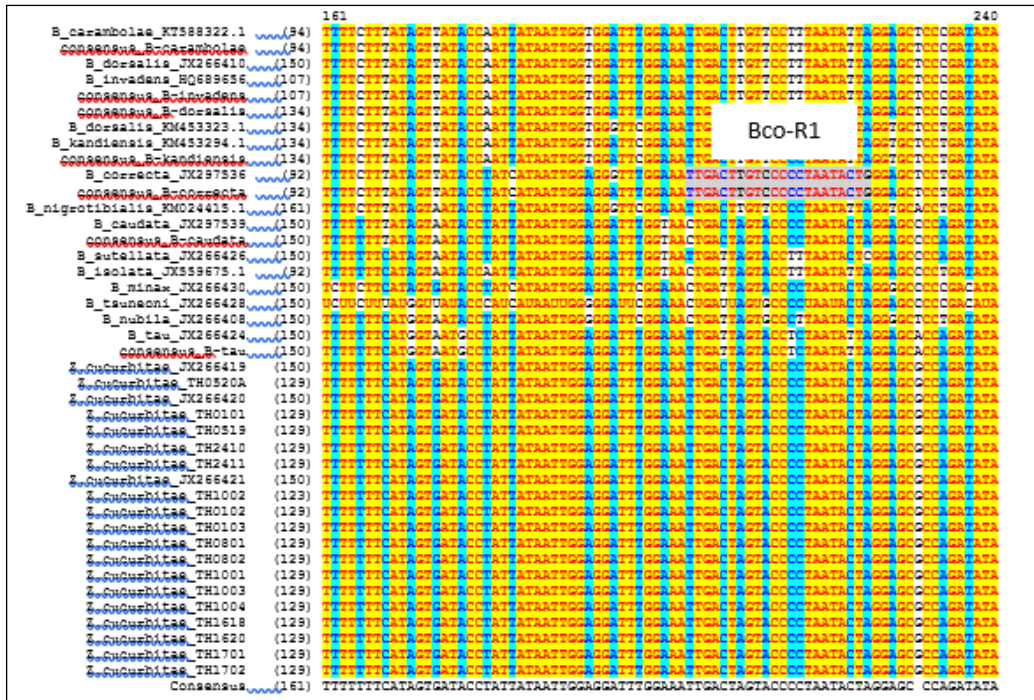
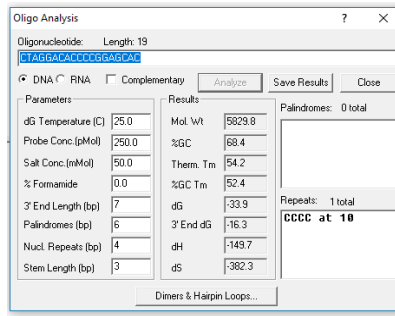
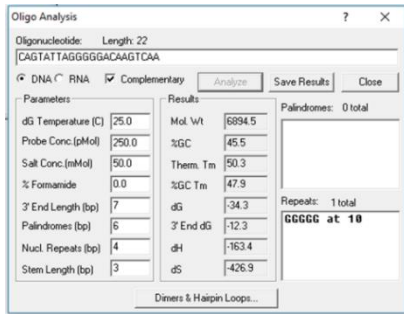


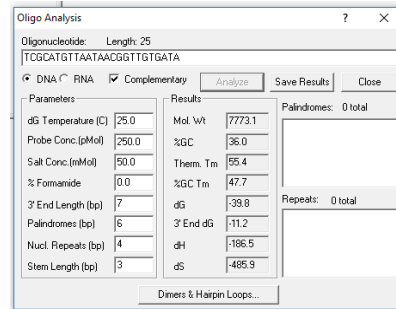
Figure 2 Alignment of the nucleotide sequence regions of cox1 gene on fruit flies. Consensus sequences were used to design broad-spectrum primers for *Bactrocera correcta* (Bco-R1 and Bco-R2)



(A)



(B)



(C)

Figure 3 Primers from Oligo cal program.

- (A) Forward (F1): CT-----AC (85-103)
- (B) Reverse (R1): CA-----CAA (204-225)
- (C) Reverse (R2): TC-----ATA (456-480)

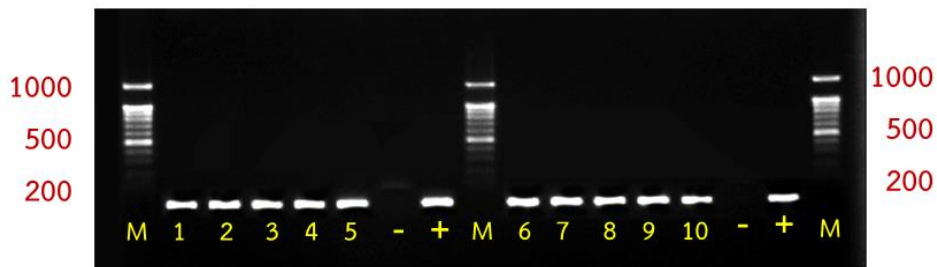


Figure 4 DNA from all stage of *Bactrocera correcta* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *B. correcta* -specific primer pair (Bco-F1). Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker.

- Lane 1 - 2 = eggs Lane 3 - 5 = larvae
- Lane 6 - 7 = pupae Lane 8 - 10 = adults
- Lane - = Negative Lane + = Positive (*B. correcta*)

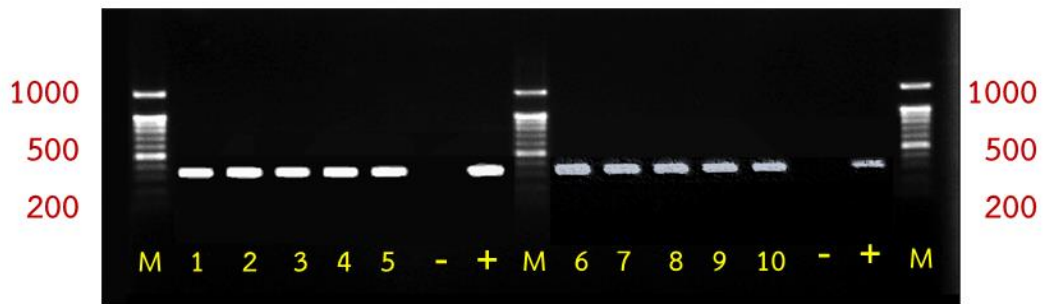


Figure 5 DNA from all stage of *Bactrocera correcta* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *B. correcta* -specific primer pair (Bco-F1 and Bco-R2). Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker.

Lane 1 - 2 = eggs

Lane 3 - 5 = larvae

Lane 6 - 7 = pupae

Lane 8 - 10 = adults

Lane - = Negative

Lane + = Positive (*B. correcta*)

ผู้รวบรวมและแก้ไข

นางสาวภัทรพร	สรรพคุณเคราะห์
นางสาวดารารพร	รินทะรักษ์
นางสาวอมรรักษ์	คิดใจเดียว
นางสาวกาญจนา	วาระวิชนะ
นางสาวอุษณีย์	จินตากล
นายเอกรัตน์	ธนูทอง
นางสาววันเพ็ญ	ศรีชาติ
นางวรัญญา	มาลี
นางศรีจันทร์	ศรีจันทร์
นางสาววิภาดา	ปลอดครบุรี

ผู้สอบทาน

นางสาวจิราภรณ์	สินทร
----------------	-------



ANNUAL REPORT 2020



กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์