



กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ผลงานวิจัย ประจำปี ๒๕๖๒ เล่ม ๕

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Plant Protection Research and
Development Office

เอกสารวิชาการเลขที่ ๒/๒๕๖๓





รายงาน
ผลงานวิจัยประจำปี 2562
เล่ม 4

เอกสารวิชาการเลขที่ 2/2563

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์



วิสัยทัศน์

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

ค่านิยม

ซื่อสัตย์ โปร่งใส งานวิจัยมีคุณภาพ

วัฒนธรรมองค์กร

รักองค์กร ทำงานอย่างมีเป้าหมาย และมุ่งผลสัมฤทธิ์

พันธกิจ

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

คำนำ

“รายงานผลงานวิจัย ประจำปี 2562” เป็นเอกสารวิชาการที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จัดทำต่อเนื่องติดต่อกัน 16 ปี จากผลงานวิจัยของนักวิจัย กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช กลุ่มวิจัยการกักกันพืช และกลุ่มบริหารศัตรูพืช ที่ดำเนินงานด้วยงบประมาณ ภายใต้แผนงานวิจัยและพัฒนา กรมวิชาการเกษตร ปี 2559 - 2564 ประกอบด้วยแผนงานวิจัย 2 แผนงาน ได้แก่ 1.แผนงานวิจัยมาตรการ สุขอนามัยพืช ประกอบด้วย 1 ชุดโครงการวิจัย (4 โครงการวิจัย) ได้แก่ 1) โครงการวิจัยมาตรการสุขอนามัยพืช ในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร 2) โครงการวิจัยการศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า 3) โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดศัตรูพืชกักกันของพืชส่งออก 4) โครงการวิจัยการศึกษาสถานภาพศัตรูพืช กักกันในประเทศไทย 2. แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิง พาณิชยกรรม ประกอบด้วย 1 ชุดโครงการวิจัย (4 โครงการวิจัย) ได้แก่ 1) โครงการวิจัยต้นแบบการผลิตชีวภัณฑ์ที่มี ประสิทธิภาพเพื่อการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ 2) โครงการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ ในการควบคุมศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ 3) โครงการวิจัยการผสมผสานเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์เพื่อควบคุม ศัตรูพืช 4) โครงการวิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร แผนงานวิจัยเดี่ยว จำนวน 8 แผน (โครงการวิจัยเดี่ยว) 1) แผนงานวิจัยการพัฒนาระบบการจัดการศัตรูพืชที่ต้านทานต่อสารป้องกัน กำจัดศัตรูพืช 2) แผนงานวิจัยเทคนิคเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช 3) แผนงานวิจัยการ บริหารศัตรูพืชแบบบูรณาการ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ 4) แผนงานวิจัยและ พัฒนาการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นคำแนะนำในการผลิตพืชบริโภคภายในประเทศและส่งออก 5) แผนงานวิจัยอนุกรมวิธานชีววิทยาและการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อ การวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย 6) แผนงานวิจัยการศึกษาและการจัดการพืชต่างถิ่นที่รุกรานนิเวศเกษตร 7) แผนงานวิจัยชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vectors) ที่ก่อให้เกิดโรคสำคัญกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย 8) แผนงานวิจัยและพัฒนาการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรัมวิทยาและชีวโมเลกุล เพื่อนำเข้าและ ส่งออกสินค้าเกษตร

สำหรับแผนงานวิจัยอื่น ๆ ได้แก่ ชิง เกษตรอินทรีย์ ไม้ผลเศรษฐกิจ ระบบการผลิตพืชในเขต พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตพืชเศรษฐกิจเฉพาะพื้นที่ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง เทคโนโลยีการผลิตพืชท้องถิ่นในเขตภาคกลางและภาคตะวันตก ความคุ้มค่าทาง เศรษฐกิจและการยอมรับเทคโนโลยีใหม่ทดแทน ชาโยเต้ ปาล์มน้ำมัน เมล็ดพันธุ์พืช สัมเป็ลือกถ่อน กล้วย กาแฟ มะคาเดเมีย มันฝรั่ง พริก มะเขือเทศ กล้วยไม้ ข้าวโพดฝักสด ถั่วเขียว เครื่องพ่นสารเพื่อป้องกันศัตรูข้าว สมุนไพรและเครื่องเทศ องุ่น มันเทศ ไม้ดอกไม้ประดับ ข้าวฟ่าง เป็นการรวมการดำเนินงานจาก 32 แผนงานวิจัย 17 โครงการวิจัยเดี่ยว 26 โครงการวิจัย รวมทั้งสิ้น 43 โครงการวิจัย 50 กิจกรรม ที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา พืชต้องรับผิดชอบในฐานะหัวหน้าการทดลอง รวมจำนวนการทดลองทั้งสิ้น 271 การทดลอง เป็นการทดลองร่วม 27 การทดลอง

การจัดทำรายงานผลงานวิจัยเล่มนี้ เสร็จสมบูรณ์ เพราะนักวิจัยจากกลุ่มวิจัย ของสำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช มุ่งหวังจะเผยแพร่ผลงานด้านอารักขาพืชที่ตนได้วิจัยด้วยความพากเพียร และมุ่งมั่น ให้ ผู้สนใจได้นำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ ทั้งการอ้างอิง การประยุกต์ เพื่อขยายผล ตลอดจนการต่อยอดผลงานวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จึงขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านไว้ในโอกาสนี้



(นายศรุต สุทธิอารมภ์)

ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

มิถุนายน 2563

สารบัญ

รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2562 เล่มที่ 1.....	1-587
รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2562 เล่มที่ 2.....	588-1062
รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2562 เล่มที่ 3.....	1063-1757
รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2562 เล่มที่ 4.....	1758-2425

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตข้าวโพดฝักสด (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตข้าวโพดฝักสด (01-13-59-02)

กิจกรรมที่ 3. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการอารักขาข้าวโพดฝักสด

กิจกรรมย่อยที่ -

- 3.3 การป้องกันกำจัดเชื้อรา *Peronosclerospora sorghi*.....
สาเหตุโรคราน้ำค้างในข้าวโพดหวานในพื้นที่ปลูกข้าวโพดที่สำคัญ
01-13-59-02-03-00-05-60

❖ พิระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยการพัฒนาระบบการจัดการศัตรูพืชที่ด้านทานต่อสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยการพัฒนาระบบการจัดการศัตรูพืชที่ด้านทานต่อสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (03-29-60-01)

กิจกรรมที่ 1. การศึกษาความต้านทานและการจัดการความต้านทานศัตรูพืชในพืช บริโภคและพืชอาหารสัตว์

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.4 การจัดการสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 1
หนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* (Hübner) ในพื้นที่
ปลูกมะเขือเทศที่สำคัญ
03-29-60-01-01-00-10-62

❖ อีราทัย บุญญะประภา และคณะ

- 1.5 รูปแบบการใช้สารฆ่าแมลงโดยการหมุนเวียน..... 10
กลุ่มสารตามกลไกออกฤทธิ์เพื่อป้องกันกำจัดหนอนใยผักในกะหล่ำปลี
03-29-60-01-01-00-03-60

❖ สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ

- 1.7 ความต้านทานและการจัดการสารกำจัดไรในไร..... 25
สองจุด *Tetranychus urticae* Koch ในสตรอเบอร์รี่
03-29-60-01-01-00-11-62

❖ ณพชกร ธีไภย์ชัย และคณะ

- 1.8 สถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืช.....
ของวัชพืชในแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญและการจัดการ
03-29-60-01-01-00-07-61
❖ สิริชัย สาธุวิจารณ์ และคณะ
- 1.9 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐาน..... 41
ของหญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.) กับ
ความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช quinclorac
03-29-60-01-01-00-04-60
❖ จริญญา ปิ่นสุภา และคณะ
- 1.10 พื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดของหญ้าข้าวนก..... 58
ที่มีกลไกความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชแบบ multiple
resistance ในนาข้าว^๑
03-29-60-01-01-00-06-60
❖ ปรัชญา เอกฐิน และคณะ
- 1.11 สถานการณ์ความต้านทานสารกำจัดวัชพืช.....
ของวัชพืชในแหล่งปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่สำคัญและการจัดการ
03-29-60-01-01-00-05-60
❖ สิริชัย สาธุวิจารณ์ และคณะ
- 1.12 ความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ 81
ต่อเพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* Hood ในมะนาว
03-29-60-01-01-00-08-61
❖ สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ
- 1.13 การจัดการสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 97
เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* Hood ในมะนาว
03-29-60-01-01-00-09-61
❖ สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ
- 1.14 ความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงในเพลี้ยไฟพริก..... 110
Scirtothrips dorsalis Hood ที่ทำลายมะม่วง
03-29-60-01-01-00-11-62
❖ สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ

- 1.15 การจัดการสารฆ่าแมลงแบบหมุนเวียนตามกลุ่ม..... 124
กลไกการออกฤทธิ์เพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟในมะม่วง
03-29-60-01-01-00-12-62
❖ ศรีจันทร์ ศรีจันทร์ และคณะ
- 1.16 ความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงในเพลี้ยไฟฝ้าย 135
Thrips palmi Karny ที่ทำลายเมล็ด
03-29-60-01-01-00-13-62
❖ สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ
- 1.17 สถานการณ์หญ้าตีนกา (*Eleusine indica*) 146
ต้านทานสารกำจัดวัชพืชกลุ่ม Aryloxyphenoxy-propionate
ในแหล่งปลูกฝักและการจัดการ
03-29-60-01-01-00-14-62
❖ จริญญา ปิ่นสุภา และคณะ

กิจกรรมที่ 2. การศึกษาความต้านทานและการจัดการความต้านทานศัตรูพืชในไม้ดอกไม้
ประดับ

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.2 การจัดการสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 157
เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrips dorsalis* Hood ในกุหลาบพวง
03-29-60-01-02-00-04-61
❖ ศรีจันทร์ ศรีจันทร์ และคณะ
- 2.3 ความต้านทานและการจัดการสารกำจัด..... 174
ไรในไรเมงมุมคันชวา *Tetranychus kanzawai* Kishida ในกุหลาบ
03-29-60-01-02-00-02-60
❖ อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล และคณะ
- 2.4 การเปลี่ยนแปลงความเป็นพิษของสารฆ่าแมลง..... 186
spinetoram และ emamectin benzoate ในเพลี้ยไฟฝ้าย
Thrips palmi ที่ทำลายกล้วยไม้
03-29-60-01-02-00-05-62
❖ สุภรดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยเทคนิคเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (โครงการวิจัยเดี่ยว)
โครงการวิจัย วิจัยเทคนิคเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (03-33-60-01)
กิจกรรมที่ 1. วิจัยและพัฒนาเทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช
กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.1 พัฒนาเทคนิคการพ่นสารชีวภัณฑ์ในการ..... 191
ป้องกันกำจัดด้วงเจาะเห็ด (*Cyrtolodes biplagiatus*) ในเห็ด
นางฟ้าช่วงเก็บเกี่ยว
03-33-60-01-01-00-01-60
❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ
- 1.2 พัฒนาเทคนิคการพ่นสารในการป้องกันกำจัด..... 208
เพลี้ยจักจั่นฝ้ายศัตรูกระเจี๊ยบเขียว
03-33-60-01-01-00-02-60
❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ
- 1.3 พัฒนาเทคนิคการพ่นสารด้วยเครื่องพ่นสาร.....
แบบแรงลมขนาดใหญ่เพื่อป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชที่
สำคัญในแปลงอุ่นแบบสภาพไร่
03-33-60-01-01-00-03-61
❖ วรวิษ สุจริตธรรมจริยางกูร และคณะ
- 1.4 พัฒนาเทคนิคการพ่นสารด้วยคานหัวฉีด.....
เพื่อป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชที่สำคัญในแปลงอุ่นแบบ
สภาพร่องสวน
03-33-60-01-01-00-04-61
❖ วรวิษ สุจริตธรรมจริยางกูร และคณะ
- 1.5 พัฒนาเทคนิคการพ่นสารด้วยคานหัวฉีด..... 225
แบบต่าง ๆ ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูที่สำคัญในกล้วยไม้
03-33-60-01-01-00-05-61
❖ พฤทธิชาติ ปุญวัฒน์โท และคณะ
- 1.6 เทคนิคการใช้ไส้เดือนฝอย.....
Steinernema carpocapsae Weiser ควบคุมด้วงหมัดผักใน
คะน้าด้วยระบบการให้น้ำแบบสปริงเกอร์
03-33-60-01-01-00-06-62
❖ สุภางคณา ถิรจุฑ และคณะ

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

❖ สุภางคณา ธีรวุธ และคณะ

- 1.8 การฉีดสารเข้าต้นเพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ
เพลี้ยไก่อ๊ว และหนอนชอนใบส้มเขียวหวาน
03-33-60-01-01-00-08-62

❖ สุภางคณา ธีรวุธ และคณะ

กิจกรรมที่ 2. การศึกษาผลของการใช้สารแบบผสม สารเสริมประสิทธิภาพและ คุณภาพน้ำที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.4 ประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอก..... 237
(pre - emergence herbicide) ผสมร่วมกับประเภทพ่นหลังวัชพืชงอก
post- emergence herbicide) เพื่อกำจัดวัชพืชในมันสำปะหลัง
03-33-60-01-02-00-04-61

❖ ยุรวรรณ อนันตมณี และคณะ

- 2.5 ประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นก่อนวัชพืช..... 259
งอก (pre - emergence herbicide) ผสมร่วมกับประเภทพ่น
หลังจากวัชพืชงอก (post- emergence herbicide) ในอ้อย
03-33-60-01-02-00-05-61

❖ ปรัชญา เอกฐิน และคณะ

- 2.6 ผลของสารเสริมประสิทธิภาพที่มีต่อประสิทธิภาพ.....
ในการป้องกันกำจัดและความคงทนของสารฆ่าแมลงที่ใช้ในการ
ป้องกันกำจัดหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* L.)
03-33-60-01-02-00-06-62

❖ นลินา ไชยสิงห์ และคณะ

- 2.10 ประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชคู่ผสมระหว่าง..... 279
สารกำจัดวัชพืชประเภทใช้ก่อนวัชพืชงอกในอ้อยต่อ
03-33-60-01-02-00-07-62

❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย และคณะ

- 2.11 การสังเคราะห์และทดสอบประสิทธิภาพ.....
อนุภาคนาโนคอปเปอร์ในการควบคุม โรคใบจุดพริกที่เกิดจาก
แบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*
03-33-60-01-02-00-08-62

❖ ดารุณี บุญญพิทักษ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยการบริหารศัตรูพืชแบบบูรณาการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของพืช
เศรษฐกิจที่สำคัญ (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยการบริหารศัตรูพืชแบบบูรณาการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของพืช
เศรษฐกิจที่สำคัญ (03-34-60-01)

กิจกรรมที่ 1. ป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสาน (IPC) เพื่อควบคุมศัตรูพืชที่สำคัญ
กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.5 การป้องกันกำจัดแมลงวันแตงแบบผสมผสานใน..... 291
พืชตระกูลแตง
03-34-60-01-01-00-05-62

❖ สัญญาณี ศรีคชา และคณะ

กิจกรรมที่ 2. การบริหารศัตรูพืชแบบผสมผสาน (IPM) ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ
กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.4 การบริหารแมลงศัตรูกะหล่ำปลีโดยวิธีผสมผสาน..... 299
03-34-60-01-02-00-04-62

❖ สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ

- 2.5 เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสาน..... 314
ในถั่วฝักยาว
03-34-60-01-02-00-05-62

❖ นพพล สัตยาสัย และคณะ

- 2.6 เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสาน..... 324
ในมะเขือเปราะ
03-34-60-01-02-00-06-62

❖ สัญญาณี ศรีคชา และคณะ

- 2.7 การจัดการศัตรูพริกแบบผสมผสาน.....
03-34-60-01-02-00-07-62

❖ วิภาดา ปลอดภัยบุรี และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มการผลิตกาแฟคุณภาพ

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

กิจกรรมที่ 3. วิจัยและพัฒนาการบริหารจัดการศัตรูพืชของกาแฟและวิทยาการหลัง
การเก็บเกี่ยว

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3.5 การจัดการวัชพืชในสวนกาแฟอาราบิก้า 332
3.5.2 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทพ่นหลังวัชพืช
งอกในสวนกาแฟ
01-58-59-03-03-00-06-60

❖ จริญญา ปิ่นสุภา และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีในการเพิ่มผลผลิตมะพร้าวให้เพียงพอับความ
ต้องการ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์มะพร้าว (01-56-59-03)

กิจกรรมที่ 2. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มจากผลพลอยได้จากการแปรรูปมะพร้าว

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.2 ศึกษาการใช้ประโยชน์จากสารสกัดแทนนิน.....
จากเปลือกมะพร้าว ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลงศัตรู
มะพร้าว
01-56-59-03-02-00-02-62

❖ พัชรีวรรณ จงจิตเมตต์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยการปรับปรุงพันธุ์และศึกษาเทคโนโลยีการผลิตมะคาเดเมีย (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยการปรับปรุงพันธุ์และศึกษาเทคโนโลยีการผลิตมะคาเดเมีย (01-55-59-01)

กิจกรรมที่ 2. การศึกษาเทคโนโลยีการผลิตมะคาเดเมีย

- การทดลอง ➤ 2.5 การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดแมลงศัตรู..... 348
มะคาเดเมีย
01-55-59-01-02-00-06-62

❖ บุษบง มั่นมั่นคง และคณะ

- 2.6 ทดสอบเทคโนโลยีการจัดการการป้องกันกำจัด..... 352
สัตว์ฟันแทะศัตรูมะคาเดเมียโดยวิธีผสมผสาน
01-55-59-01-02-05-01-61

❖ วิชาญ วรธนะไกว้ล และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตมันฝรั่ง (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตมันฝรั่ง (01-27-59-01)

กิจกรรมที่ 1. การวิจัยพัฒนาพันธุ์และการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 การทดสอบปฏิกิริยาต้านทานโรคของมันฝรั่ง

- การทดลอง ➤ 1.2.1 การทดสอบความต้านทานของพันธุ์มันฝรั่ง..... 372
ต่อรา *Phytophthora infestans*
01-27-59-01-01-02-01-61
❖ ธารทิพย์ ภาสบุตร และคณะ
- 1.2.2 การทดสอบปฏิกิริยาของพันธุ์มันฝรั่งต่อเชื้อ..... 390
แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง
01-27-59-01-01-02-02-61
❖ รุ่งนภา ทองเคิ่ง และคณะ
- 1.2.3 การทดสอบปฏิกิริยาของเชื้อพันธุกรรม..... 402
มันฝรั่งต่อไส้เดือนฝอยรากปม
01-27-59-01-01-02-03-61
❖ ไตรเดช ช่ายทอง และคณะ
- 1.2.4 การทดสอบความต้านทานของพันธุ์มันฝรั่ง..... 409
ต่อเชื้อไวรัส *Potato virus Yn* (PVY strain n)
01-27-59-01-01-02-04-61
❖ สิทธิศักดิ์ แสนไพศาล และคณะ

กิจกรรมที่ 3. การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชสำคัญของมันฝรั่ง

กิจกรรมย่อยที่ 3.1 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการแมลงศัตรูสำคัญของมันฝรั่ง

- การทดลอง ➤ 3.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการ.....
ป้องกันกำจัดด้วงเจาะหัวมันฝรั่ง
03-05-59-02-01-00-29-61
❖ อูราพร หนูนารถ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาระบบการผลิตพืชในระบบอินทรีย์

โครงการวิจัย วิจัยพัฒนาการป้องกันกำจัดศัตรูพืชในการผลิตพืชระบบเกษตรอินทรีย์ (03-03-59-02)

กิจกรรมที่ 2. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพืชต่อแมลงศัตรูพืชและแมลงศัตรู

ธรรมชาติจากแปลงปลูกพืชอินทรีย์ (2559-2563)

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.7 การศึกษาประชากรของแมลงและไรศัตรูเมล็ดอ่อน..... 420
อินทรีย์ที่ปลูกในโรงเรือนตาข่ายและการศึกษาประสิทธิภาพ
ของสารสกัดจากพืชต่อแมลงและไรศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติใน
ห้องปฏิบัติการ
03-03-59-02-02-00-07-62
❖ อทิตยา แก้วประดิษฐ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์
โครงการวิจัย วิจัยต้นแบบการผลิตชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อการขยายผลสู่เชิงพาณิชย์
(03-05-62-04)

กิจกรรมที่ -

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1. ต้นแบบผลิตมวลเพาะขนาดอย่างเป็นระบบเพื่อ.....
การควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน
03-05-62-04-00-00-01-62
❖ สาทิพย์ มาลี และคณะ
- 2. ต้นแบบผลิตแมลงช้างปีกใสอย่างเป็นระบบเพื่อ.....
การควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน
03-05-62-04-00-00-02-62
❖ ประภัสสร เขยคำแหง และคณะ
- 3. ต้นแบบการผลิตแมลงหางหนีบขาววงแหวนและ..... 429
แมลงหางหนีบน้ำตาลเพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน
03-05-62-04-00-00-03-62
❖ นันทนัช พินศรี และคณะ

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

กิจกรรมที่ 1. การผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.6 วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงมวลเชื้อวูดไซ..... 443
Cyrtorhinus lividipennis Reuter) เป็นปริมาณมาก และการ
นำไปใช้ควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* (Stål)
03-05-59-02-01-00-06-59
❖ ณัฐฉิณี ศิริมาจันทร์ และคณะ

- 1.8 การผลิตและการใช้ไรตัวห้ำ *Amblyseius* spp..... 450
ควบคุมเพลี้ยไฟ
03-05-59-02-01-00-08-59
❖ อทิตยา แก้วประดิษฐ์ และคณะ
- 1.9 การผลิตขยายและใช้หอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae 455
ควบคุมหอยทากศัตรูพืชโดยชีววิธี
03-05-59-02-01-00-09-59
❖ ดาราพร รินทะรักษ์ และคณะ
- 1.13 การใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave*
ควบคุมด้วงหมัดผักในคะน้า
03-05-59-02-01-00-13-59
❖ วิไลวรรณ เวชยันต์ และคณะ
- 1.14 ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง.....
Steinernema riobrave ในการควบคุมด้วงงวงมันเทศ
Cylas formicarius
03-05-59-02-01-00-14-59
❖ วิไลวรรณ เวชยันต์ และคณะ
- 1.15 ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง.....
Steinernema ในการควบคุมด้วงเจาะเห็ด *Cylloides biplagiatus*
03-05-59-02-01-00-15-59
❖ วิไลวรรณ เวชยันต์ และคณะ
- 1.23 การศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงแตนเบียนดักด้ว..... 470
หนอนหัวดำมะพร้าว *Opisina arenosella* Walker
(Lepidoptera: Oecophoridae) ชนิดท้องถิ่นและนำเข้า
03-05-59-02-01-00-23-61
❖ ณัฐฉิณี ศิริมาจันทร์ และคณะ
- 1.24 ศึกษาารูปแบบบรรจุภัณฑ์มวนพิฆาต.....
Eocanthecona furcellata (Wolff) ที่เหมาะสมเพื่อการ
นำไปใช้ประโยชน์
03-05-59-02-01-00-24-61
❖ สาทิพย์ มาลี และคณะ

- 1.25 การศึกษาวิธีการใช้ตัวง่า *Cryptolaemus* 479
montrouzieri Mulsant ควบคุมเพลี้ยแป้งในมันสำปะหลัง*
03-05-59-02-01-00-25-61
❖ ญัฐฉิณี ศิริมาจันทร์ และคณะ
- 1.26 ศึกษาวิธีการผลิตขยายตัวง่าสตีธอรัส 486
Stethorus pauperculus (Weise) (Coleoptera:
Coccinellidae) และประสิทธิภาพในการควบคุมไรศัตรูพืช
03-05-59-02-01-00-26-61
❖ อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล และคณะ
- 1.27 การใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมหนอนหัวดำ..... 499
มะพร้าวในมะพร้าว
03-05-59-02-01-00-27-61
❖ นันทนัช พินศรี และคณะ
- 1.28 การศึกษาระดับความเป็นพิษของไวรัส NPV 513
ต่อหนอนผีเสื้อศัตรูพืช
03-05-59-02-01-00-28-61
❖ อนุสรณ์ พงษ์มี และคณะ
- 1.29 ศึกษาอัตราการใช้ไวรัส NPV ในการควบคุม.....
หนอนกระทู้หอมในหอมแบ่งด้วยวิธีการพ่นสารแบบน้ำน้อย
03-05-59-02-01-00-29-61
❖ อิศเรศ เทียนทัด และคณะ
- 1.30 การใช้ไวรัส NPV ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก..... 522
(*Spodoptera litura* (Fabricius)) ในเผือก
03-05-59-02-01-00-30-61
❖ อนุสรณ์ พงษ์มี และคณะ
- 1.32 วิธีการที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้..... 532
เชื้อราเขียวเมตาโรเซียมในการควบคุมด้วงแรดในสภาพไร*
03-05-59-02-01-00-32-61
❖ เมธาสิทธิ์ คนการ และคณะ

- 1.33 ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง..... 544
ในการควบคุมแมลงหนอนหลวง *Lepidiota stigma* Fabricius
03-05-59-02-01-00-33-61

❖ สุวิมล วงศ์ปลั่ง และคณะ

- 1.35 ทดสอบผลของสารป้องกันกำจัดแมลงศัตรู..... 556
มะพร้าวต่อแมลงศัตรูธรรมชาติของหนอนหัวดำมะพร้าว
(*Opisina arenosella* Walker)
03-05-59-02-01-00-35-62

❖ พัชรีวรรณ จงจิตเมตต์ และคณะ

- 1.36 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus thuringiensis*..... 566
(*Xentari*) โดยใช้เครื่องพ่นสารชนิดต่าง ๆ ในการป้องกันกำจัดหนอน
กระทู้หอม *Spodoptera exigua* (Hübner) ในหอมแบ่ง^๕
03-05-59-02-01-00-36-62

❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ

- 1.37 การผลิตและการใช้แมลงข้างปีกใส
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

กิจกรรมที่ 2. การผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมโรคพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.8 การพัฒนาชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* 573
และวิธีการใช้ เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจาก
แบคทีเรีย
03-05-59-02-02-00-08-61

❖ รุ่งนภา ทองเคิ่ง และคณะ

- 2.9 การพัฒนากระบวนการผลิตสารชีวภัณฑ์..... 588
Bacillus subtilis ไอโซเลท 20W16 และ/หรือ 20W33 เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Colletorichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก
03-05-59-02-02-00-09-62
❖ บุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ
- 2.10 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* แบบผง..... 595
เพื่อควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*
03-05-59-02-02-00-10-62
❖ กาญจนา ศรีไม้ และคณะ
- 2.11 การพัฒนารูปแบบการผลิตและการใช้สาร..... 604
ออกฤทธิ์จากเห็ดเรืองแสงสีรีนริคมี *Neonothopanus nambi* (Speg.) R.H. Petersen & Krisai ต่อการควบคุมโรคเน่าดำในกล้วยไม้
03-05-59-02-02-00-11-62
❖ สุรีย์พร บัวอาจ และคณะ
- 2.12 ศักยภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก..... 614
เห็ดเรืองแสง *Neonothopanus nambi* (Speg.) R.H. Petersen & Krisai ในการควบคุมโรครากเน่า และผลเน่าของทุเรียนที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler
03-05-59-02-02-00-12-62
❖ สุรีย์พร บัวอาจ และคณะ
- โครงการวิจัย วิจัยการผสมผสานเทคโนโลยีการใช้ชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมศัตรูพืช (03-05-59-03)
กิจกรรมที่ -
กิจกรรมย่อยที่ -
การทดลอง ➤ 2. การสังเคราะห์เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดศัตรูพืช..... 622
โดยชีววิธีในปาล์มน้ำมัน
03-05-59-03-00-00-02-61
❖ ปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ

- 3. เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.....
ในกระเจียบเขียวแบบผสมผสาน
03-05-59-03-00-00-03-62

❖ ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ และคณะ

- 4. ทดสอบเทคโนโลยีการใช้ก้อนเชื้อเห็ดเรืองแสงสตรีนรัศมี..... 631
Neonothopanus nambi (Speg.) R.H. Petersen & Krisai
ควบคุมโรครากปมในแปลงพริก
03-05-59-03-00-00-04-62

❖ สุรียพร บัวอาจ และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยสำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร (03-05-59-01)

กิจกรรมที่ 1. สำรวจและศึกษาศักยภาพของชีวภัณฑ์ในการควบคุมแมลงไรและสัตว์
ศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง

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

❖ สุขลวัจน์ ว่องไวลิขิต และคณะ

- 1.14 การตัดแยกชนิดและทดสอบประสิทธิภาพ..... 643
การก่อโรคในหนูของโปรโตซัวสกุล *Eimeria* (Apicomplexa:
Coccidia) จากหนูนาใหญ่ (ricefield rat: *Rattus*
argentiventer (Robinson and Kloss, 1916)) เพื่อนำมาผลิต
เป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดหนู
03-05-59-01-01-00-14-61

❖ วิชาญ วรธนะไกววัล และคณะ

- 1.15 ชนิดและศักยภาพของบั่วตัวห้ำในการควบคุม.....
เพลี้ยแป้ง
03-05-59-01-01-00-15-62

❖ ประภัสสร เขยคำแหง และคณะ

- 1.16 การคัดเลือกสารสกัดจากพืชบางชนิด เพื่อป้องกันกำจัด
เพลี้ยแป้ง (*Phenacoccus* sp.) และเพลี้ยอ่อนฝ้าย
(*Aphis gossypii* Glover) ในพืชผัก
03-05-59-01-01-00-16-62

❖ ยุทธนา แสงโชติ และคณะ

- 1.17 ศีรษะศึกษากายภาพเชื้อรา *Metarhizium* spp..... 657
และ *Beauveria* spp. ในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟพันธุ์
อะราบิก้า (*Hypothenemus hampei*)
03-05-59-01-01-00-17-62
❖ เมธาสิทธิ์ คนการ และคณะ
- 1.18 ศีรษะขนิดและประเมินศีกัยภาพแมลงศัตรูธรรมชาติ.....
ของหนอนใยผัก *Plutella xylostella* L. ในแหล่งปลูกภาคกลาง
03-05-59-01-01-00-18-62
❖ สาทิพย์ มาลี และคณะ
- 1.19 การศีกษาขนิดของแบคทีเรีย *Streptomyces*..... 668
ที่มีศีกัยภาพในการกำจัดหอยศัตรูพืช
03-05-59-01-01-00-19-62
❖ อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข และคณะ

**กิจกรรมที่ 2. สํารวจและศีกษาศีกัยภาพของชีวภณขัในการควบคุมโรคพืช
กิจกรรมย่อยที่ -**

- การทดลอง ➤ 2.4 การทดสอบอัตร่าที่เหมะสมของสารปฏิชีวณะ..... 2401
บางขนิดในการควบคุมโรคกรีนนิงในต้นกล้าและกิ่งตอนส้ม
03-05-59-01-02-00-03-60
❖ แสนชัย คำหล้า และคณะ
- 2.6 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษัที่มีประสิทธิภพ..... 681
ในการควบคุมโรคเน่าดำของคะน้า
03-05-59-01-02-00-05-61
❖ กาญจนา ศรีไม้ และคณะ
- 2.7 การคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. และ 691
Streptomyces spp. ที่มีศีกัยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย
รากปมในพริก
03-05-59-01-02-00-06-61
❖ วีรกรรม์ แสงไสย์ และคณะ
- 2.8 การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษัที่มีศีกัยภาพในการ..... 710
ควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพริก
03-05-59-01-02-00-07-62
❖ มะโนรัตน์ สุดสงวน และคณะ

- 2.9 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย..... 718
ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดพริกที่เกิดจากแบคทีเรีย
Xanthomonas axonopodis pv. *vesicatoria*
03-05-59-01-02-00-08-62
❖ ดารุณี บุญญพิทักษ์ และคณะ
- 2.10 การคัดเลือกและทดสอบแบคทีเรีย..... 723
Bacillus spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคเน่าคอดิน
(damping-off) สาเหตุจากเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* ใน
มะเขือเทศ^๕
03-05-59-01-02-00-09-62
❖ บุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ
- 2.11 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ..... 730
จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคราแป้ง (powdery mildew)
พืชตระกูลแตง
03-05-59-01-02-00-10-62
❖ ทศนาพร ทศคร และคณะ
- 2.12 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพ..... 745
ในการควบคุมโรคแคงเกอร์ของมะนาว
03-05-59-01-02-00-11-62
❖ กาญจนา ศรีไม้ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนากล้วยไม้

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนากล้วยไม้สกุลหวายเพื่อการค้า ระยะที่ 2 (01-24-59-01)

กิจกรรมที่ 3. เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูสำคัญในกล้วยไม้สกุลหวาย

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3.5 ประสิทธิภาพของการใช้สารฆ่าแมลง..... 752
แบบเดี่ยวและแบบผสม (Tank mixtures) ในการป้องกันกำจัด
เพลี้ยไฟฝ้าย (*Thrips palmi* Karny) และผลกระทบต่ออายุการ
ใช้งานของหัวฉีด^๕
01-24-59-01-03-00-05-60
❖ สุซาดา สุพรศิลป์ และคณะ

- 3.7 พัฒนารูปแบบการใช้สารฆ่าแมลงโดยการ..... 781
หมุนเวียนกลุ่มกลไกการออกฤทธิ์เพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ
ในกล้วยไม้สกุลหวาย
01-24-59-01-03-00-07-61
❖ ศรีจันทร์ ศรีจันทร์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับที่มีศักยภาพในเชิงการตลาด

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาปทุมมาและกระเจียวเพื่อการค้า (01-22-59-01)

กิจกรรมที่ 1. การจัดการโรคเหี่ยวของปทุมมาและกระเจียวโดยวิธีผสมผสาน

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.2 การจัดการโรคเหี่ยวของปทุมมา..... 801
โดยวิธีผสมผสาน
01-22-59-01-01-00-02-61
❖ บุรณี พัวพงษ์แพทย์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตพืชเศรษฐกิจเฉพาะพื้นที่ภาค

ตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง (02-08-59-02)

โครงการวิจัย วิจัยการเพิ่มศักยภาพการผลิตน้อยหน้าคุณภาพ

กิจกรรมที่ 1. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตน้อยหน้า

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2. ศึกษาประสิทธิภาพและวิธีการใช้สารป้องกันกำจัด.....
โรคพืชที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคกิ่งแห้งของน้อยหน้า
02-08-59-02-01-00-04-62
❖ พจนา ตระกูลสุจริตน์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกล้วย

โครงการวิจัย วิจัยการปรับปรุงพันธุ์กล้วย (01-44-59-01)

กิจกรรมที่ 3. การปรับปรุงพันธุ์กล้วยน้ำว้าต้านทานโรคตายพราย

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3.1 การคัดเลือกกล้วยน้ำว้าสายพันธุ์ต้านทาน.....
ต่อโรคตายพรายที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp.
cubense (FOC)
01-44-59-01-03-00-01-59
❖ 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 สมฤทธิ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตองุ่น (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตองุ่น (01-151-60-01)

กิจกรรมที่ 3. ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลง เชื้อไวรัสและสารสะเดาแมลงศัตรูที่
สำคัญในองุ่น

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 3.3 ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงและสารสะเดา..... 808
กับเพลี้ยไฟพริก
01-151-60-01-03-00-03-62

❖ สราวุฒิจิต ไกรฤกษ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เพื่อใช้เป็นคำแนะนำในการผลิตพืช
บริโภคภายในประเทศและส่งออก (โครงการวิจัยเดี่ยว)

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

กิจกรรมที่ 1. ศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อเป็นคำแนะนำสำหรับ
พืชผักที่มีปัญหาการส่งออกปศุสหาพยุโรป

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 1.11 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดแมลง..... 818
หิวชาวยาสูป, *Bemisia tabaci* (Gennadius) ในมะเขือเปราะ
03-32-60-01-01-00-11-62

❖ สุชาติ สุปริศิลป์ และคณะ

➤ 1.12 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟพริก..... 827
Scirtothrips dorsalis Hood ในพริก
03-32-60-01-01-00-12-62

❖ สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ

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

❖ อูราพร หนูนารถ และคณะ

➤ 1.14 ศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดวัชพืช..... 835
ประเภทพ่นก่อนวัชพืชงอกในผักซีฝรั่ง
03-32-60-01-01-00-11-62

❖ จริญญา ปิ่นสุภา และคณะ

กิจกรรมที่ 2. ศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อเป็นคำแนะนำสำหรับพืชผัก
ไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับ และพืชไร่ สำหรับบริโภครภายในประเทศและการส่งออก

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง ➤ 2.21 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคราแป้ง..... 844
(powdery mildew) ในแตงเทศสาเหตุจากเชื้อ *Oidium* sp.
03-32-60-01-02-00-21-61

❖ ทศนาพร ทศศร และคณะ

➤ 2.22 ประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดเชื้อราในการควบคุม..... 857
โรคราสนิมสาเหตุจากเชื้อ *Puccinia allii* Rud. ในกุยช่าย
03-32-60-01-02-00-22-61

❖ นพพล สัทยาสิทธิ์ และคณะ

➤ 2.23 ทดลองประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัด..... 871
โรคสแคปขององุ่นสาเหตุจากเชื้อรา *Sphaceloma*
ampelinum de Bary
03-32-60-01-02-00-03-60

❖ พจนา ตระกูลสุวรรณ์ และคณะ

➤ 2.24 ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลง..... 883
ในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟในมะลิ
03-32-60-01-02-00-24-61

❖ สมรวย รวมชัยอภิกุล และคณะ

➤ 2.25 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 893
โรคราสนิมของลิลาวดี
03-32-60-01-02-00-25-61

❖ วรางคณา โชติเศรษฐี และคณะ

- 2.26 การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 902
วัชพืชประเภทก่อนงอกในถั่วฝักยาว
03-32-60-01-02-00-26-61
❖ อมฤต ศิริอุดม และคณะ
- 2.27 ทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืช.....
ไกลโฟเซตสูตรต่าง ๆ ต่อการควบคุมวัชพืช
03-32-60-01-02-00-27-61
❖ สิริชัย สาธุวิจารณ์ และคณะ
- 2.28 การทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 918
เพลี้ยไฟพริกในเงาะ
03-32-60-01-02-00-28-61
❖ ยุทธนา แสงโชติ และคณะ
- 2.29 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด..... 928
ด้วงเต่าแตงแดงและหนอนแมลงวันชอนใบในแตงกวา
03-32-60-01-02-00-29-62
❖ สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ
- 2.30 ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในกา..... 934
ป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่นฝ้าย *Amrasca biguttula biguttula*
(Ishida) ในกระเจี๊ยบเขียวโดยวิธีรองกันหลุม ❖
03-32-60-01-02-00-30-62
❖ สมรวย รวมชัยอภิกุล และคณะ
- 2.31 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก..... 940
ในกวางตุ้ง
03-32-60-01-02-00-31-62
❖ พวงผกา อ่างมณี และคณะ
- 2.32 ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภท..... 947
ก่อนวัชพืชงอกในผักขึ้นฉ่าย
03-32-60-01-02-00-32-62
❖ อุษณีย์ จินตากุล และคณะ

- 2.33 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืช..... 958
ในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดสีม่วง (purple blotch) ของ
หอมหัวใหญ่ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria porri* (Ellis)
Ciferri[⊕]
03-32-60-01-02-00-33-62
❖ ธารทิพย์ ภาสบุตร และคณะ
- 2.34 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัด.....
โรคราสนิมของข้าวโพดหวานสาเหตุจากเชื้อรา
Puccinia polysora
03-32-60-01-02-00-34-62
❖ พีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ
- 2.35 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้ง..... 965
Pseudococcus cryptus Hempel ในมังคุด
03-32-60-01-02-00-35-62
❖ ศรุต สุทธิอารมณ และคณะ
- 2.37 ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืช..... 970
ในการป้องกันกำจัดโรคใบไหม้มันฝรั่งที่มีสาเหตุจากเชื้อรา
Phytophthora infestans [⊕]
03-32-60-01-02-00-36-62
❖ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ
- 2.38 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดหนอนกระทู้..... 974
Spodoptera spp. ในกุหลาบ
03-32-60-01-02-00-37-62
❖ ศรีจันทร์ ศรีจันทร์ และคณะ
- 2.39 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรค.....
ต้นเน่าแห้งของกล้วยไม้สาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc.
03-32-60-01-02-00-38-62
❖ สุณิรัตน์ สิมะเตือ และคณะ
- 2.40 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคพืช..... 978
ในการป้องกันกำจัดโรคใบไหม้ของหน่อกล้วยที่มีสาเหตุจากเชื้อ
Xanthomonas axonopodis pv. *dieffenbachiae* [⊕]
03-32-60-01-02-00-39-62
❖ บุรณี พัวพงษ์แพทย์ และคณะ

- 2.41 ทดลองประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดโรคเน่าดำ..... 987
ถั่วเขียวสาเหตุจากเชื้อรา *Macrophomina phaseolina*
03-32-60-01-02-00-40-62
❖ อมรรักษ์ คัดใจเดี่ยว และคณะ
- 2.52 การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดวัชพืช..... 995
ประเภทก่อนงอกในฝือก
03-32-60-01-02-00-41-62
❖ ภัทร์พิชชา รุจิระพงษ์ชัย และคณะ
- 2.53 ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด..... 1002
แมลงหีขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) ในถั่วเหลือง
03-32-60-01-02-00-42-62
❖ สิริกัญญา ขุนวิเศษ และคณะ
- 2.54 ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดหนอนแดง..... 1011
ในชมพู
03-32-60-01-02-00-43-62
❖ กรกต ดำรักษ์ และคณะ
- 2.55 ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดไรศัตรูพืช..... 1018
ในการป้องกันกำจัดไรแดงแอฟริกัน
(*Eutetranychus africanus* (Tucker)) ในมะละกอ
03-32-60-01-02-00-44-62
❖ ณพชกร ธัญชัย และคณะ
- 2.56 ประสิทธิภาพของสารเคมีชนิดเม็ดในการป้องกัน..... 1026
กำจัดโรครากปมของปทุมมา
03-32-60-01-02-00-45-62
❖ ไตรเดช ช่างทอง และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยมาตรการสุขอนามัยพืช

โครงการวิจัย วิจัยมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร (03-04-59-01)

กิจกรรมที่ 1. ศึกษาศัตรูพืชในประเทศเพื่อการค้าระหว่างประเทศ

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.1 การศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชของพืชนำเข้าและส่งออก..... 1033
03-04-59-01-01-00-01-59
❖ เกศสุตา สนศิริ และคณะ

- 1.2 การศึกษาชนิดของโรคศัตรูพืชของพืชส่งออก..... 1052
และพืชนำเข้า

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

❖ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง และคณะ

- 1.3 การศึกษาชนิดของโรคพืชของพืชส่งออก.....

ได้แก่ กล้าย มะยงชิด ขนุน กล้วยาสนาม แก้วมังกร และสับปะรด
พืชนำเข้า ได้แก่ เมลอน มะนาว พริก มะเขือ ถั่วเหลือง และแตงกวา

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

❖ มะโนรัตน์ สุดสงวน และคณะ

- 1.4 การศึกษาชนิดของวัชพืชของพืชส่งออก ได้แก่..... 1063

ขนุน และกล้วยาสนาม พืชนำเข้า ได้แก่ พริก และมะเขือ

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

❖ ธัญชนก จงรักไทย และคณะ

กิจกรรมที่ 2. ศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.11 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของ..... 1092
ผลเชอร์รี่สดนำเข้าจากสาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน

03-04-59-01-02-00-11-61

❖ ชวลิต จิตนันท์ และคณะ

- 2.12 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของ..... 1136
ผลพลัมสดนำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล

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

❖ วรัญญา มาลี และคณะ

- 2.13 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของผลท้อสด..... 1145
นำเข้าจากสาธารณรัฐแอฟริกาใต้และรัฐอิสราเอล

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

❖ ชวลิต จิตนันท์ และคณะ

- 2.14 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์..... 1157
ฝักนำเข้าจากสาธารณรัฐอิตาลี

03-04-59-01-02-00-14-62

❖ ณัฐสุดา บรรเลงสุวรรณ และคณะ

- 2.15 การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์..... 1167
มะเขือเทศนำเข้าจากรัฐอิสราเอล
03-04-59-01-02-00-15-62
❖ สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และคณะ

กิจกรรมที่ 3. การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าสินค้าเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3.4 การประเมินมาตรการสุขอนามัยพืชในการนำเข้าผล..... 1200
มะเขือเทศสดจากประเทศมาเลเซีย
03-04-59-01-03-00-03-61
❖ คมศร แสงจินดา และคณะ

กิจกรรมที่ 4. ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อการเปิดตลาดสินค้าเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 4.2 ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออก..... 1210
ผลมะละกอ
03-04-59-01-04-00-02-61
❖ อลงกต โพธิ์ดี และคณะ
- 4.3 ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออก..... 1219
ต้นและดอกกล้วยไม้
03-04-59-01-04-00-03-61
❖ วาริรัตน์ สมประทุม และคณะ
- 4.4 ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออก..... 1250
เมล็ดพันธุ์แตงโม
03-04-59-01-04-00-04-62
❖ คมศร แสงจินดา และคณะ
- 4.5 ศึกษามาตรการสุขอนามัยพืชในการส่งออก..... 1257
เมล็ดพันธุ์มะระ
03-04-59-01-04-00-05-62
❖ วาสนา ฤทธิ์ไธสง และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยการศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า (03-04-59-02)

กิจกรรมที่ 1. ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชและส่วนของพืชที่นำเข้าเพื่อขยายพันธุ์
กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง

➤ 1.1 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์.....
มะเขือเทศนำเข้าจากอินเดีย จีน สหรัฐอเมริกา และเนเธอร์แลนด์
03-04-59-02-01-00-01-59

❖ ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ และคณะ

➤ 1.2 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์แดงโม..... 1267
นำเข้าจาก ญี่ปุ่น และอิสราเอล *
03-04-59-02-01-00-02-59

❖ วันเพ็ญ ศรีชาติ และคณะ

➤ 1.3 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์เมลอน..... 1283
นำเข้าจากญี่ปุ่น และอิสราเอล *
03-04-59-02-01-00-03-59

❖ วันเพ็ญ ศรีชาติ และคณะ

➤ 1.4 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์พริก..... 1296
นำเข้าจากอินเดีย จีน เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา
03-04-59-02-01-00-04-59

❖ วานิช คำพานิช และคณะ

➤ 1.8 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์..... 1310
ผักกาดหัวนำเข้าจากนิวซีแลนด์ และญี่ปุ่น
03-04-59-02-01-00-08-61

❖ โสภามีอำนาจ และคณะ

➤ 1.9 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด..... 1326
นำเข้าจาก อินเดีย และ สหรัฐอเมริกา
03-04-59-02-01-00-09-61

❖ ชลธิชา รักไคร้ และคณะ

➤ 1.13 ชนิดศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์..... 1340
ผักกาดกวางตุ้งนำเข้าจากประเทศนิวซีแลนด์และสาธารณรัฐ
ประชาชนจีน
03-04-59-02-01-00-10-62

❖ จันทร์พิศ เดชหามาตย์ และคณะ

- 1.14 การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในเมล็ดพันธุ์..... 1348
มะเขือเทศนำเข้า
03-04-59-02-01-00-11-62
❖ วาสนา รุ่งสว่าง และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดศัตรูพืชกักกันของพืชส่งออก (03-04-59-03)

กิจกรรมที่ 1. วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยวิธีการอบไอน้ำเพื่อการส่งออก

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.5 วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับ..... 1356
กำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera latifrons* (Hendel) ในส้มโอ
พันธุ์ขาวแตงกวาเพื่อการส่งออก*
03-04-59-03-01-00-05-62
❖ พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์ และคณะ
- 1.6 วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับ..... 1377
กำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลมะนาวแป้นพิจิตร 1 เพื่อการส่งออก
03-04-59-03-01-00-06-62
❖ สลักจิต พานคำ และคณะ
- 1.7 วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับ..... 1404
กำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลส้มโอทับทิมสยามเพื่อการส่งออก
03-04-59-03-01-00-07-62
❖ ชัยณรัตน์ สนศิริ และคณะ
- 1.8 วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับ..... 1430
กำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลมะละกอฮอลแลนด์เพื่อการส่งออก
03-04-59-03-01-00-08-62
❖ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ และคณะ
- 1.9 วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับ..... 1441
กำจัดแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel)
ในผลแก้วมังกรเนื้อแดงเพื่อการส่งออก
03-04-59-03-01-00-09-62
❖ ปวีณา บุษาทิยาน และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยการศึกษาศาสนาภาพศัตรูพืชที่ชุกกักกันในประเทศไทย (03-04-59-04)

กิจกรรมที่ 1. การศึกษาศัตรูพืชในประเทศเพื่อการค้าระหว่างประเทศ

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 9. การศึกษาศาสนาภาพของไร *Aceria guerreronis* Keifer 1456
ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-09-60
❖ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง และคณะ
- 10. การติดตามการระบาดและเผ่าละวังแมลงวันทอง..... 1494
ชนิด *Bactrocera carambolae* (Drew & Hancock) ในเขต
ภาคใต้^๕
03-04-59-04-01-00-10-60
❖ สัญญาณี ศรีรักษา และคณะ
- 11. การศึกษาศาสนาภาพเชื้อไวรัส..... 1518
Sri Lankan Cassava Mosaic Virus ในประเทศไทย^๕
03-04-59-04-01-00-11-61
❖ ภูวนารถ มณีโชติ และคณะ
- 12. การศึกษาศาสนาภาพของรา 1530
Bipolaris zeicola (G.L.Stout) Shoemaker สาเหตุโรค
Northern Corn Leaf Spot ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-12-62
❖ ชนินทร ดวงสอาด และคณะ
- 13. การศึกษาศาสนาภาพของเชื้อแบคทีเรีย..... 1542
Burkholderia glumae สาเหตุโรค Bacterial Panicle Blight
ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-13-62
❖ ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ
- 14. การศึกษาศาสนาภาพแบคทีเรีย..... 1547
Pseudomonas syringae pv. *tomato* สาเหตุโรค Bacterial
speck ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-14-62
❖ ชลธิชา รักใคร่ และคณะ

- 15. การศึกษาสถานภาพเชื้อไวรัส..... 1555
Maize Dwarf Mosaic Virus ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-15-62
❖ สิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ
- 16. การศึกษาสถานภาพของเชื้อไวรัส.....
Pepper Mild Mottle Virus ของพริก
03-04-59-04-01-00-16-62
❖ เยาวภา ตันติวานิช และคณะ
- 17. การศึกษาสถานภาพของเชื้อไวรัส..... 1562
African Cassava Mosaic Virus (ACMV) ในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-17-62
❖ กาญจนา วาระวิชนี และคณะ
- 18. การศึกษาสถานภาพของแบคทีเรีย *Xylella fastidiosa*..... 1571
ของอ้อยในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-18-62
❖ ธิดาวรรณ ชมเดช และคณะ
- 19. การศึกษาสถานภาพด้วงฟูเรอโรส..... 1578
Pantomorus cervinus (Boheman) ในพืชตระกูลส้ม
03-04-59-04-01-00-19-62
❖ ภัทรา อุปดิษฐ์ และคณะ
- 20. การศึกษาสถานภาพเพลี้ยหอย..... 1586
Aspidiotus nerii Bouché ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-20-62
❖ ดนัย ชัยเรือนแก้ว และคณะ
- 21. การศึกษาสถานภาพวัชพืช *Chenopodium album* L..... 1595
ของพืชผักในประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-21-62
❖ ชุติมา อ้อมกิ่ง และคณะ
- 22. การศึกษาสถานภาพของไส้เดือนฝอยรากปม..... 1602
Meloidogyne thailandica ในชิงของประเทศไทย
03-04-59-04-01-00-22-62
❖ ธิติยา สารพัฒน์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ 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

➤ 1.1.1 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงค์ย่อย.....

Aspidiotinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae)

ในประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-01-60

❖ ชมัยพร บัวมาศ และคณะ

➤ 1.1.3 อนุกรมวิธานเพลี้ยจักจั่นศัตรูมะม่วง 1610

(Hemiptera: Cicadellidae) ในประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-03-60

❖ เกศสุดา สนศิริ และคณะ

➤ 1.1.4 อนุกรมวิธานผีเสื้อหนอนกอสกุล *Chilo*.....

(Lepidoptera: Crambidae: Crambinae) ในประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-04-60

❖ สุนัดตา เขาวลิต และคณะ

➤ 1.1.5 สำรวจความหลากหลายชนิดหอยทากบกศัตรูพืช..... 1626

ในระบบนิเวศเกษตรและสิ่งแวดล้อม

03-30-60-01-01-01-05-60

❖ ดาราพร รินทะรักษ์ และคณะ

➤ 1.1.8 ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทาง..... 1637

พันธุกรรมของหนูหริ่งสกุล *Mus* (Rodentia: Murinae) ที่พบใน ประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-08-60

❖ วิชาญ วรธนะไกววัล และคณะ

➤ 1.1.9 อนุกรมวิธานของแตนเบียนสกุล *Encarsia*..... 1666

(Hymenoptera: Aphelinidae) ศัตรูธรรมชาติของแมลงหีขาว (Hemiptera: Aleyrodidae) ในประเทศไทย

03-30-60-01-01-01-09-60

❖ จารุวัตต์ แต่กุล และคณะ

- 1.1.10 อนุกรมวิธานของแมลงข้างปีกใส วงศ์..... 2380
Chrysopidae ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-10-60
❖ อาทิตย์ รักกสิกร และคณะ
- 1.1.11 อนุกรมวิธานมวนตัวห้าสกุล *Orius* 1683
(Hemiptera: Anthocoridae) ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-11-60
❖ จอมสุรางค์ ดวงธิดาร และคณะ
- 1.1.12 ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae)..... 1700
ในพืชผัก(วงศ์แตง กะหล่ำ พริก มะเขือ และถั่ว) ของประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-12-61
❖ เกศสุตา สนศิริ และคณะ
- 1.1.13 อนุกรมวิธานมวนสกุล *Nysius* 1710
(Hemiptera: Lygaeidae) ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-13-61
❖ จอมสุรางค์ ดวงธิดาร และคณะ
- 1.1.14 อนุกรมวิธานและการศึกษาชนิดของด้กแตน..... 1716
(Orthoptera) ในพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-14-61
❖ จารุวัฒน์ แต้กุล และคณะ
- 1.1.15 อนุกรมวิธานของผีเสื้อหอนร่านวงศ์ 1727
Limacodidae ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-15-61
❖ อาทิตย์ รักกสิกร และคณะ
- 1.1.16 ชนิดของแมลงหิวขาว (Hemiptera: Aleyrodidae)
ในพืชผักสวนครัวเพื่อการส่งออกของประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-16-62
❖ สุนัดดา เขาวลิต และคณะ
- 1.1.17 อนุกรมวิธานเพลี้ยหอยเกล็ดวงค์ย่อย
Diaspidinae (Hemiptera: Coccoidea: Diaspididae)
ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-17-62
❖ ชมัยพร บัวมาศ และคณะ

- 1.1.18 อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้งในราก
วงศ์ Rhizoecidae (Hemiptera: Coccoidea) ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-18-62
❖ ชมัยพร บัวมาศ และคณะ
- 1.1.19 อนุกรมวิธานและความหลากหลายชนิดของ 1736
แตนเบียนไข่ของแมลงกลุ่มมวนวงศ์ Pentatomidae ศัตรูพืช
สำคัญทางการเกษตรในประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-19-62
❖ จารุวัตร ด้กกุล และคณะ
- 1.1.20 อนุกรมวิธานของแมลงช้างสีน้ำตาล..... 1746
วงศ์ Hemerobiidae และแมลงช้างปีกแบ่ง วงศ์
Coniopterygidae ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-20-62
❖ อาทิตย์ รักกลีกร และคณะ
- 1.1.21 อนุกรมวิธานไรขาว วงศ์ Tarsonemidae 1758
ในประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-21-62
❖ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง และคณะ
- 1.1.22 การจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง.....
ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย
03-30-60-01-01-01-22-62
❖ พัชรวิพรรณ จงจิตเมตต์ และคณะ
- 1.1.23 อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัยของ..... 1768
แมลงวันหนอนซอนไบในวงศ์ Agromyzidae (Order : Diptera)
ในพืชผัก
03-30-60-01-01-01-23-62
❖ ยุวรินทร์ บุญทบ และคณะ
- กิจกรรมย่อยที่ 1.2 สํารวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช
และจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช
- การทดลอง ➤ 1.2.1 ศีรษะราสกุล *Phytophthora* ในเผือก..... 1780
03-30-60-01-01-02-01-60
❖ อมรรักษ์ คัดใจเดียว และคณะ

- 1.2.2 การจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* 1807
และ *Bipolaris*
03-30-60-01-01-02-02-60
❖ มะโนรัตน์ สุดสงวน และคณะ
- 1.2.6 การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล 1826
Radopholus ทางสัณฐานวิทยาในไม้ประดับส่งออก
03-30-60-01-01-02-06-60
❖ อติยา สารพัฒน์ และคณะ
- 1.2.11 ศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา..... 1849
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

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

กิจกรรมย่อยที่ 2.1 ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืช

- การทดลอง ➤ 2.1.8 ศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด..... 1856
Bactrocera umbrosa (Fabricius)
03-30-60-01-02-01-08-62
❖ กรกต ดำรักษ์ และคณะ
- 2.1.9 ศึกษาชนิด ชีววิทยา และการแพร่กระจาย..... 1872
เชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella*
03-30-60-01-02-01-09-62
❖ อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข และคณะ

กิจกรรมย่อยที่ 2.2 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของโรคพืช

- การทดลอง ➤ 2.2.1 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา
Phyllosticta citriasiana
03-30-60-01-02-02-01-60
❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ

- 2.2.2 การศึกษาพืชอาศัย และเขตการแพร่..... 2358
กระจายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรครากเน่าของ
พืชในประเทศไทย
03-30-60-01-02-02-02-60
❖ อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ
- 2.2.3 ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครากเน่า..... 1879
ของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า
03-30-60-01-02-02-03-60
❖ ทิพวรรณ กันหาญาติ และคณะ
- 2.2.4 การศึกษาสาเหตุและการถ่ายทอดโรคใบหงิกของส้มโอ..... 2409
03-30-60-01-02-02-04-60
❖ แสนชัย คำหล้า และคณะ
- 2.2.5 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา 1894
Curvularia eragrostidis และรา *Curvularia oryzae*
03-30-60-01-02-02-05-60
❖ มะโนรัตน์ สุตสงวน และคณะ
- 2.2.6 ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา 1924
Neoscytalidium dimidiatum
03-30-60-01-02-02-06-61
❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
- 2.2.7 การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและชีวโมเลกุล..... 1941
ของเชื้อ *Pepper vein yellows virus (PeVYV)* ที่เข้าทำลาย
พริกในประเทศไทย
03-30-60-01-02-02-07-62
❖ ภูวนารถ มณีโชติ และคณะ
- 2.2.8 การจำแนกชนิดเชื้อ *Crinivirus* ของพืชตระกูลแตง..... 1954
ในประเทศไทย
03-30-60-01-02-02-08-62
❖ ภูวนารถ มณีโชติ และคณะ
- กิจกรรมย่อยที่ 2.3 ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของวัชพืช
- การทดลอง ➤ 2.3.4 ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของกระดุมใบใหญ่..... 1962
(*Borreria latifolia* (Aubl), Schum.
03-30-60-01-02-03-04-61
❖ ธัญชนก จงรักไทย และคณะ

กิจกรรมที่ 3. การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 3.3 การสำรวจโรคและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา..... 1972
Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช
03-30-60-01-03-00-03-60
❖ ชนินทร ดวงสอาด และคณะ
- 3.4 การสำรวจโรคและจัดทำรหัสดีเอ็นเอบาร์โค้ด..... 1995
ของราสนิมสาเหตุโรคพืช
03-30-60-01-03-00-04-60
❖ ชนินทร ดวงสอาด และคณะ
- 3.5 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria*.....
สาเหตุโรคพืช
03-30-60-01-03-00-05-60
❖ สุณิรัตน์ สีมะเดื่อ และคณะ
- 3.7 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกชนิดแมงมุม..... 2016
แม่ห้ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย
03-30-60-01-03-00-07-60
❖ วิมลวรรณ โชติวงศ์ และคณะ
- 3.9 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา..... 2045
Trichoderma asperellum *Trichoderma harzianum* และ
Trichoderma viride
03-30-60-01-03-00-09-60
❖ ชนินทร ดวงสอาด และคณะ
- 3.11 การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนก..... 2060
ชนิดเพี้ยไฟอันดับย่อย *Tubulifera* (*Thysanoptera*:
Tubulifera) ในประเทศไทย
03-30-60-01-03-00-11-61
❖ อธิพิล บรรณาการ และคณะ
- 3.12 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา..... 2069
Chaetomium cupreum และ *Chaetomium globosum*
03-30-60-01-03-00-12-61
❖ ชนินทร ดวงสอาด และคณะ

- 3.13 การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกแมงมุม..... 2082
วงศ์ Salticidae
03-30-60-01-03-00-13-61
❖ วิมลวรรณ โชติวงศ์ และคณะ
- 3.14 การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Curvularia* 2090
สาเหตุโรคพืช
03-30-60-01-03-00-14-62
❖ มะโนรัตน์ สุดสงวน และคณะ
- 3.15 การศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini..... 2098
(Diptera: Tephritidae) ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
03-30-60-01-03-00-15-62
❖ ยิวรินทร์ บุญทบ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยการศึกษาและการจัดการพืชต่างถิ่นที่รุกรานในนิเวศเกษตร (โครงการวิจัยเดี่ยว)
โครงการวิจัย วิจัยการศึกษาและการจัดการพืชต่างถิ่นที่รุกรานในนิเวศเกษตร (03-27-60-01)
กิจกรรมที่ -

กิจกรรมย่อยที่ -

การทดลอง

- 4. ชีววิทยาและการแพร่กระจายของหญ้ายอดหนอน..... 2108
(*Spigelia anthelmia* L.)
03-27-60-01-00-00-04-61
❖ ธัญชนก จงรักไทย และคณะ
- 5. ชีววิทยาและการแพร่กระจายของพืชต่างถิ่น 2122
3 ชนิด : เอื้องชมพู *Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross; Dandelion (*Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg.) และ False Dandelion (*Hypochaeris radicata* L.) ในพื้นที่เกษตรที่สูง
03-27-60-01-00-00-05-61
❖ เอกรัตน์ ธนทอง และคณะ
- 6. การจัดการวัชพืชประเภทใบกว้าง : หญ้ายางนงนุช..... 2147
(*Euphorbia* sp.) หญ้ายอดหนอน (*Spigelia anthelmia* L.) และเอื้องชมพู (*Persicaria capitata* (Buch.- Ham. ex D.Don)
03-27-60-01-00-00-06-62
❖ ธัญชนก จงรักไทย และคณะ

- 7. การจัดการกระจุก (*Cyperus entrerianus* Boeckl.)..... 2160
03-27-60-01-00-00-07-62

❖ เอกรัตน์ ธนูทอง และคณะ

- 8. ชีววิทยาและการจัดการมะเขือต่างถิ่น : มะเขือหนาม 2167
(*Solanum sisymbriifolium* Lam.)
03-27-60-01-00-00-08-62

❖ อัญศยา พรพมา และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vector) ที่ก่อให้เกิดโรคร่วมกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยชนิดของแมลงพาหะนำโรค (Insect vector) ที่ก่อให้เกิดโรคร่วมกับพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย (03-47-61-01)

กิจกรรมที่ -

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1. ชีวชนิด (biotype) ของแมลงหิวข้าวยาสูบ.....
Bemisia tabaci (Gennadius) (Hemiptera:Aleyrobiae)
ที่เป็นพาหะของโรคใบหงิกเหลืองในพริก (*Pepper Yellow Leafcurl Virus*) ในภาคตะวันตกของประเทศไทย
03-47-61-01-00-00-01-61

❖ สุนัดดา เชาวลิต และคณะ

- 2. ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) 2173
ที่เป็นพาหะของเชื้อ *Potyvirus* สาเหตุโรคเส้นใบเหลืองในพริก
และ ใบเหลืองแตงกวา^๑
03-47-61-01-00-00-02-61

❖ เกศสุดา สนศิริ และคณะ

- 3. ชนิดของเพลี้ยแป้ง (Hemiptera: Pseudococcidae).....
ที่เป็นพาหะของโรคเหี่ยวสับประรด (*Pineapple Mealybug Wilt*) ใน
เขตภาคตะวันออกและภาคตะวันตกของประเทศไทย
03-47-61-01-00-00-03-61

❖ ชมัยพร บัวมาศ และคณะ

- 4. ชนิดของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *Diaphorina citri*..... 2188
(Hemiptera: Psyllidae) ที่เป็นพาหะนำโรครีนนิ่ง Huanglongbin
(Citrus greening disease) ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย^๑
03-47-61-01-00-00-04-61

❖ จอมสุรางค์ ดวงอิสาร และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อ
การนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร (โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและ
ชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร (03-31-60-01)

กิจกรรมที่ 1. การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร
กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 1.1. การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis*..... 2202
subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าโดยเทคนิค Real
time PCR
03-31-60-01-01-00-01-60
❖ อนุรักษ์มา โฆษิตเจริญกุล และคณะ
- 1.2. การตรวจแบคทีเรีย 2211
Clavibacter michiganensis.subsp. *Nebraskensis* จาก
เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเทคนิค
Real time PCR
03-31-60-01-01-00-02-60
❖ อนุรักษ์มา โฆษิตเจริญกุล และคณะ
- 1.4 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* 2221
ในข้าวด้วยเทคนิค Real time PCR
03-31-60-01-01-00-04-62
❖ ทิพวรรณ กันหาญาติ และคณะ
- 1.5 พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย..... 2229
Ralstonia solanacearum species complex สาเหตุโรค
เหี่ยวของกล้วย
03-31-60-01-01-00-05-62
❖ ทิพวรรณ กันหาญาติ และคณะ

กิจกรรมที่ 2. การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อ
การป้องกันกำจัด และการส่งออก

กิจกรรมย่อยที่ -

- การทดลอง ➤ 2.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบ Immuno Strip 2234
เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv.
campestris สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า
03-31-60-01-02-00-01-60
❖ รุ่งนภา ทองเครื่อง และคณะ

- 2.2 การผลิตแอนติบอดีของเชื้อไวรัส..... 2245
Watermelon Silver Mottle Virus (WSMoV) ในระบบเซลล์
แบคทีเรีย
03-31-60-01-02-00-02-60
❖ กาญจนา วาระวิชนี และคณะ
- 2.3 การตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* 2260
Wulandari, Crous and Gruyter ด้วยเทคนิค Polymerase
Chain Reaction
03-31-60-01-02-00-03-60
❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
- 2.5 การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส 2283
Leek Yellow Stripe Virus (LYSV)
03-31-60-01-02-00-05-61
❖ สิทธิศักดิ์ แสนไพศาล และคณะ
- 2.6 การตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum*..... 2290
ด้วยเทคนิค *Polymerase Chain Reaction*
03-31-60-01-02-00-06-61
❖ พรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
- 2.7 การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ
Pepper Chat fruit Viroid (PCFVd) ในเมล็ดพริกขี้หนูเทศ
03-31-60-01-02-00-07-61
❖ วาสนา รุ่งสว่าง และคณะ
- 2.8 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีเพื่อตรวจ.....
สอบโรคใบด่างลายของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Sugarcane*
Mosaic Virus (SCMV)
03-31-60-01-02-00-08-61
❖ ภูวนารถ มณีโชติ และคณะ
- 2.9 ผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT Kit 2300
(Gold Labeling IgG Flow Test) จากแอนติบอดีของโปรตีน
ลูกผสม SecA ต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย
03-31-60-01-02-00-09-61
❖ กาญจนา วาระวิชนี และคณะ

- 2.10 การพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซ่า..... 2421
ของพืชตระกูลส้ม
03-31-60-01-02-00-10-61
❖ แสนชัย คำหล้า และคณะ
- 2.11 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบแมลงวันแดง 2305
Zeugodacus cucurbitae (Coquillet) (Diptera:
Tephritidae) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง^๑
03-31-60-01-02-00-11-61
❖ ยุวรินทร์ บุญทบ และคณะ
- 2.12 การผลิตโปรตีนและแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ..... 2319
immunodominant Membrane protein (Imp)
ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยอาศัยระบบ
เซลล์แบคทีเรียในประเทศไทย
03-31-60-01-02-00-12-62
❖ กาญจนา วาระวิชะนี และคณะ
- 2.13 การตรวจสอบแบคทีเรีย 2327
Xanthomonas campestris pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ด
ด้วยเทคนิค Real-time PCR
03-31-60-01-02-00-13-62
❖ รุ่งนภา ทองเคิ่ง และคณะ
- 2.14 การตรวจไส้เดือนฝอยรากปม 2336
Meloidogyne enterolobii ด้วยเทคนิคแลมป์
03-31-60-01-02-00-14-62
❖ ไตรเดช ช่างทอง และคณะ
- 2.15 การพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง 2348
Bactrocera correcta (Diptera: Tephritidae) เพื่อการนำเข้า
และส่งออกด้วยไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง
03-31-60-01-02-00-15-62
❖ ยุวรินทร์ บุญทบ และคณะ

หมายเหตุ

^๑ ชื่อการทดลองที่นักวิจัยแจ้งไม่ตรงกับชื่อการทดลองจากกองแผนงาน

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

พลอยชมพู กรวิภาสเรือง^{1/} พิเชฐ เขาวนัฒนวงศ์^{2/}
 วิมลวรรณ โชติวงศ์^{1/} อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล^{1/} อติติยา แก้วประดิษฐ์^{1/}
^{1/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/}รักษาการผู้เชี่ยวชาญด้านศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการสำรวจไรขาวเพิ่มขึ้นอีก 80 ตัวอย่างในพื้นที่ 15 จังหวัด ได้แก่ อุดรธานี อุบลราชธานี หนองคาย สกลนคร ชุมพร นครศรีธรรมราช สตูล พัทลุง สงขลา นครปฐม ราชบุรี ชลบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร และน่าน พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 5 ชนิด เป็นไรศัตรูพืช 4 ชนิด ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ได้แก่ไรขาวพริก *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) ไรขาวภายในข้าวผลมะพร้าวจำนวน 2 ชนิดคือ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon และ *Steneotarsonemus* sp. ไม่พบเพศผู้ในการจำแนก จึงจำแนกได้ในระดับสกุล และไรขาวข้าว *Steneotarsonemus spinki* Smiley สำหรับไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) พบภายในข้าวผลมะพร้าว พบรวมด้วยกับไร *S. furcatus*

คำนำ

ไรขาว (tarsonemid mite) อยู่ในวงศ์ Tarsonemidae มีถิ่นอาศัยอยู่กว้างขวาง เช่น กินเชื้อรา กินสาหร่าย กินพืช เป็นตัวห้ำของไรชนิดอื่น เป็นตัวเบียนในแมลง แบบพึ่งพาอาศัยกันกับแมลง และเป็นศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ไรขาวเป็นไรที่มีขนาดเล็กกรองลงมาจากรีสีขา มีสีขาใส แผ่นหลังนูน รูปรี กลม หรือลำตัวยาว ขึ้นอยู่กับชนิดของไร โดยมากแล้วตัวผู้จะมีขนาดเล็กกว่าตัวเมีย อย่างไม่เห็นได้ชัด ไรขาวมีรายงานทั่วโลก 529 ชนิด 40 สกุล (Lin and Zhang, 2002) ไรขาวในวงศ์ Tarsonemidae เป็นไร พบเข้าทำลายพืชทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพไร่ เช่น ไรขาว *Polyphagotarsonemus latus* Banks มีรายงานแพร่กระจายทั่วโลกถึง 124 ประเทศ บนพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากถึง 34 ชนิด เช่น ส้ม มะนาว มะม่วง องุ่น กาแฟ เป็นต้น (CABI, 2018) นอกจากนี้มีรายงานพบไรขาว *Steneotarsonemus spinki* Smiley เป็นศัตรูที่สำคัญในข้าว *Tarsonemus myceliophagus* เป็นไรขาวที่พบเข้าทำลายเห็ดหลายชนิด (Cho, 2013) *Phytonemus pallidus* เป็นศัตรูที่สำคัญในสตอเบอรี่ และไม้ดอกหลายชนิดในโรงเรือน (Zhang, 2003) ชนิดที่มีความสำคัญเข้าทำลายพืชไปทั่วโลกเช่น *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) เข้าทำลายพริก ถั่ว ถั่วเหลือง ถั่วลันเตา มะเขือเทศ แตงกวา และพืชอื่น ๆ อีกมากมาย ในหลาย ๆ

คำหลัก : ไรศัตรูพืช ไรขาว ไรขาวพริก

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-21-62

ประเทศ เช่น ประเทศบราซิล ออสเตรเลีย อินเดีย ญี่ปุ่น เกาหลี (Lin and Zhang, 2002; Venzon et al., 2008) *Tarsonemus setifer* Ewing เป็นไรขาที่มีเขตการแพร่กระจายไปในหลาย ๆ ทวีป เช่นในทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ บนพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเช่น ทับทิม สตรอเบอร์รี่ ท้อ องุ่น กุหลาบ ไม้ blackberry dewberry raspberry และพืชอื่นอีกหลายชนิด *Tarsonemus smithi* Ewing มีรายงานพบในแอปเปิล ส้ม ท้อ พลัม มะเขือเทศ และไม้ดอกพวกเบญจมาศ โดยมีรายงานพบในประเทศ โปรตุเกส เวอจีเนีย และ สหรัฐอเมริกา (Jepson et al., 1975) *Phytonemus pallidus* (Zimmerman) เป็นไรศัตรูที่สำคัญในสตรอเบอร์รี่ในยุโรปและอเมริกาเหนือ (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 ใบเรียวยาว ทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต และมีรายงานเข้าทำลายพืชปลูกได้หลายชนิดเช่น ส้มโอ ชา พริก ฝ้าย ปอกระเจา บวบ ถั่วเขียว โหระพา มันฝรั่ง มะม่วง และไม้ดอกหลายชนิด เช่น เยอ ปีร่า 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. พบในลิ้นจี่ และองุ่น ตามลำดับ (วัฒนาและมานิตา, 2533; วัฒนาและคณะ, 2535; พิเชษฐและคณะ, 2548)

เนื่องจากไรขาเป็นไรที่มีขนาดเล็กมากการใช้กล้องจุลทรรศน์ในการจำแนกชนิด ในอดีตเทคโนโลยีของกล้องยังไม่ทันสมัย ไม่สามารถที่จะส่องดูลักษณะที่สำคัญของไรขาได้ และข้อจำกัดของกล้องและคู่มือการจำแนกชนิดของไรขาไม่สมบูรณ์และละเอียดมากพอ ปัจจุบันด้วยเทคโนโลยีอันทันสมัยของกล้องจุลทรรศน์ ทำให้มีคู่มือการจำแนกชนิดไรขานี้ได้อย่างละเอียด และซับซ้อนมากกว่าคู่มือเดิม ใช้ตรวจสอบและจำแนกชนิดของไรขาจากต่างประเทศที่ติดมากับส้มแมนดาริน ประเทศอเมริกา ทางด้านตรวจศัตรูพืชแหลมฉบับที่มีชื่อว่า *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. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง: ได้แก่ ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ ถุงกระดาษ ปากกาเขียนแก้ว กล้องพลาสติกรักษาความเย็นขนาด 68 ควอทซ์ แวนชยาย (กำลังขยาย 20x)
2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่าง: เพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน: ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ (stereo microscope), โคมไฟ พู่กันเบอร์ 0 เข็มเขี่ยปลายแหลม และปลายงอ สำลีสู้บ/เครื่องอุ่นสไลด์ ตั้งอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส แป้นหมุนสำหรับฝักขอบสไลด์ น้ำยาฝักขอบสไลด์
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. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเก็บตัวอย่าง: ได้แก่ ถุงกระดาษ ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ
2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่าง: เพื่อการศึกษาลักษณะชนิดของไรศัตรูพืช ได้แก่ แผ่น slide, coverglass, กล้องสไลด์, สารเคมี สำหรับใช้เตรียมน้ำยาเมาท์สไลด์ สำลีสู้บ น้ำยาสำหรับฝักขอบสไลด์แผ่นพลาสติกเจาะรู จานแก้ว

วิธีการ

1. การเก็บและรักษาตัวอย่างไรขาว

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

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

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

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

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

เวลาและสถานที่

พื้นที่ปลูกผัก และไม้ผลทั่วประเทศ ได้แก่ จังหวัดนครปฐม ราชบุรี สมุทรสาคร มหาสารคาม ชลบุรี น่าน ชัยภูมิ อุตรธานี นครราชสีมา สกลนคร หนองคาย ชุมพร พัทลุง สตูล และสงขลา

กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจไรขาในพื้นที่ 15 จังหวัด 18 อำเภอ จำนวน 80 ตัวอย่าง ได้แก่จังหวัด อุตรธานี อุบลราชธานี หนองคาย สกลนคร ชุมพร นครศรีธรรมราช สตูล พัทลุง สงขลา นครปฐม ราชบุรี ชลบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร และน่าน พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 5 ชนิด เป็นไรศัตรูพืช 4 ชนิด ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ได้แก่ พริกพบไรขาพริก *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) ทำให้ยอดใบพริกหงิกม้วนงอ มะพร้าวพบไรขาภายในซุ้มผลมะพร้าวจำนวน 2 ชนิด ไรขาที่พบบนใบซุ้มผลมะพร้าว มีสีขาว ตัวแก่มีสีขาวอมน้ำตาล ตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าตัวผู้ ตัวผู้มีขนาดเล็ก เคลื่อนไหวว่องไว ไรขาที่พบบนมะพร้าวนี้นี้ได้แก่ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon ทำให้เกิดแผลนูนแข็งสีน้ำตาล ปลายแผลเรียบเป็นเส้นตรง บางลูกอาจแสดงอาการผลบิดเบี้ยว ซึ่งแตกต่างกว่าอาการที่พบบนผลมะพร้าวที่เกิดจากอาการเข้าทำลายของไรสีขามะพร้าว ที่ปลายแผลจะมีลักษณะปลายแผลแหลม ผลเล็กลีบ อีกชนิดคือ *Steneotarsonemus* sp. ไม่พบเพศผู้ในการจำแนก จึงจำแนกได้เพียงระดับสกุล ชนิดสุดท้ายที่พบได้แก่ไรขาข้าว *Steneotarsonemus spinki* Smiley ซึ่งไรชนิดนี้เป็นไรที่มีความสำคัญในข้าว ทำให้กาบใบข้าวเป็นสีน้ำตาลไหม้ คล้ายอาการของโรค สำหรับไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) โดยพบภายในซุ้มผลมะพร้าวพบร่วมด้วยกับไร *S. furcatus*

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจไรขาเพิ่มขึ้นอีก 80 ตัวอย่างในพื้นที่ 15 จังหวัด ได้แก่ อุตรธานี อุบลราชธานี หนองคาย สกลนคร ชุมพร นครศรีธรรมราช สตูล พัทลุง สงขลา นครปฐม ราชบุรี ชลบุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร และน่าน พบไรทั้งหมด 2 วงศ์ 5 ชนิด เป็นไรศัตรูพืช 4 ชนิด ไรตัวห้ำ 1 ชนิด ได้แก่พริกพบไรขาพริก *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) ทำให้ยอดใบพริกหงิกม้วนงอ มะพร้าวพบไรขาภายในซุ้มผลมะพร้าวจำนวน 2 ชนิด คือ *Steneotarsonemus furcatus* De Leon ทำให้เกิดแผลนูนแข็งสีน้ำตาล ปลายแผลเรียบเป็นเส้นตรง อีกชนิดคือ *Steneotarsonemus* sp. ไม่พบเพศผู้ในการจำแนก จึงจำแนกได้ในระดับสกุล และไรขาข้าว *Steneotarsonemus spinki*

Smiley ซึ่งไรชนิดนี้เป็นไรที่มีความสำคัญในข้าว ทำให้กาบใบข้าวเป็นสีน้ำตาลไหม้ คล้ายอาการของโรค สำหรับไรตัวห้ำพบ 1 ชนิดคือ *Amblyseius largoensis* (Muma) โดยพบภายในข้าวผลมะพร้าว พบร่วมด้วยกับไร *S. Furcatus*

เอกสารอ้างอิง

- พิเชฐ เขาวนัวัฒน์วงศ์ 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 และพิเชฐ เขาวนัวัฒน์วงศ์. 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.
- Kongchuensin, 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'
<i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon	Broad mite	eggplant.	Lam Hoei Sub-district, Don Tum District, Nakhon Phathom Province	Leaf curl	13°57.467'	100°02.754'
			Lumpum Sub-district, Mueang District, Phatthalung Province		07°41.739'	100°08.634'
			Laem Son Sub-district, La-ngu District, Satun Province	Scanty squarely brown patches of damaged tissue on the fruit surface	06°54.707'	099°41.706'

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

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
					Lat (N)	Long (E)
<i>Steneotarsonemus furcatus</i> De Leon	-	coconut	Pak nam Sub-district, La-ngu District, Satun Province	Scanty squarely brown patches	06°52.744'	099°41.527'
			Khon Klan Sub-district, Thung Wa District, Satun Province	of damaged tissue on the	06°58.892'	099°40.770'
			Tung bu Lang Sub-district, Thung Wa District, Satun Province	fruit surface	06°59.548'	099°40.584'
			Chumpon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province		07°01.831'	099°40.477'
			Thungkha Sub-district, Mueang District, Chumphon Province		07°36.007'	100°24.096'
			Ban Phaeo Sub-district, Ban Phaeo District, Samut Sakhon Province		10°25.651'	099°09.258'
			pangpuay Sub-district, Damnoen Saduak District, Ratcha Buri Province		13°28.20'	100°04.50'
			Takian Tia Sub-district, Bang Lamung District, Chon Buri Province		-	-
					13°00.681'	100°58.512'

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

Scientific name of mite	Common name	Host plant	Location	Symptom of injury	GPS	
					Lat (N)	Long (E)
<i>Steneotarsonemus</i> sp.		coconut	*Jompluak Sub-district, Bang Khonthi District, Samut Songkhram Province	Scanty squarely brown patches	13°28.50'	99°58.28'
			Wa Ta Baek Sub-district, Thep Sathit District, Chaiyaphum Province	of damaged tissue on the	15°23.106'	101°25.886'
			Klong Noi Sub-district, Pak Phanang District, Nakhon Si Thammarat Province	fruit surface	08°22.384'	100°06.146'
			Chumpon Sub-district, Sathing Phra District, Songkhla Province		07°36.159'	100°23.789'
					07°36.071'	100°22.881'
<i>Steneotarsonemus spinki</i> Smiley	rice	eggplant	Wiang Sa District, Nan Province	Discoloration on	18°36.223'	100°31.469'
			Nong Khon Sub-district, Mueang District, Ubon Ratchathani Province	the inside of the leaf sheath	13°49.29.713'	100°36.0.495'

Table 2 Predatory mite associated with mite on Tarsonemid mites in Thailand

Scientific name of predatory mite	Associated mite pest	Location	GPS	
			Lat (N)	Long (E)
Family Phytoseiidae	<i>Steneotarsonemus</i>	Pangpuay Sub-district, Damnoen Saduak District, Ratcha Buri Province	-	-
<i>Amblyseius largoensis</i> (Muma)	<i>furcatus</i> De Leon			

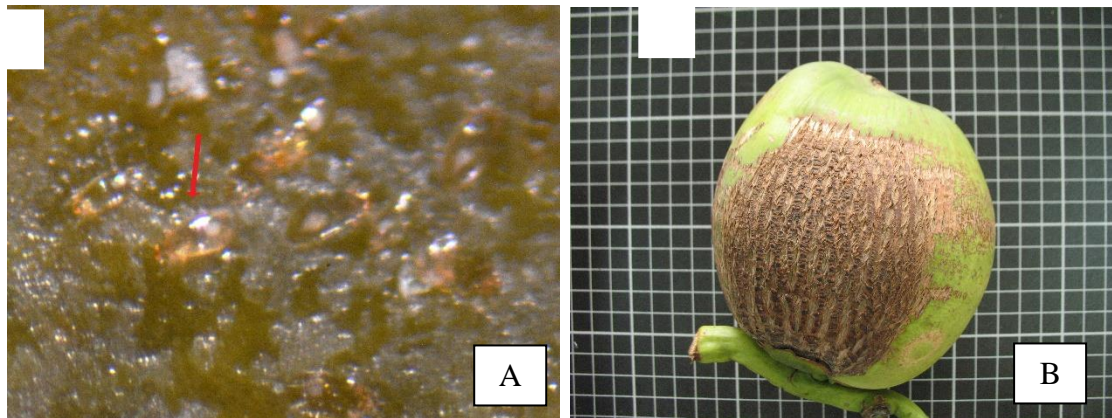


Figure 1 A. ไรขามะพร้าว *Steneotarsonemus furcatus* De Leon เพศเมีย
B. อาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไร



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

อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัยของแมลงวันหนอนขนใบในวงศ์

Agromyzidae (Order : Diptera) ในพืชผัก

Taxonomy, Distribution and Host Plants of Leafminer Flies in Family

Agromyzidae (Order: Diptera) in vegetable crops

ยุวรินทร์ บุญทบ สุนัดตา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ

เกศสุดา สนสิริ สิทธิสิโรตม แก้วสวัสดิ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ทำการสำรวจ เก็บตัวอย่าง แมลงวันหนอนขนใบจากแปลงพืชผักชนิดต่าง ๆ ในเขตพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม กรุงเทพมหานคร สุพรรณบุรี ราชบุรี และ เพชรบุรี และในเขตพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ตรัง นราธิวาส และนครศรีธรรมราช พบแมลงวันหนอนขนใบเข้าทำลายพืชผักหลากหลายชนิด เช่น สร้อยทอง โหระพา แตงกวา ฟักทอง หอมแดง ถั่วฝักยาว มะเขือเทศ กวางตุ้ง ผักกาดเขียว จีนจุกฉาย แตงโม บวบ คะน้า และ เมล่อน นำใบพืชที่พบลักษณะการเข้าทำลายของแมลงวันหนอนขนใบมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ได้ตัวเต็มวัยจำนวน 1,344 ตัวอย่าง ทำการแยกแมลงวันหนอนขนใบเพศผู้และเพศเมีย ถ่ายรูปลักษณะสำคัญต่าง ๆ เช่น ส่วนหัว (head) อก (thorax) ส่วนท้อง (abdomen) เก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% และทำสไลด์ถาวรของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) ของแมลงวันหนอนขนใบที่เข้าทำลายถั่วฝักยาว จำนวน 40 ตัวอย่าง และทำการจำแนกแมลงวันหนอนขนใบที่สำรวจทั้งหมดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้พบแมลงวันหนอนขนใบ 2 ชนิดได้แก่ *Liriomyza sativae* Blanchard และ *Liriomyza chinensis* (Kato, 1949)

คำหลัก: อนุกรมวิธาน การแพร่กระจาย พืชอาศัย แมลงวันหนอนขนใบ Agromyzidae



คำนำ

แมลงวันหนอนซอนใบในอดีตจัดเป็นแมลงศัตรูพืชชนิดรอง (minor pests) แต่ปัจจุบันพบว่าแมลงวันหนอนซอนใบได้เพิ่มจำนวนประชากรอย่างรวดเร็ว เกิดความต้านทานยาฆ่าแมลงในการเพาะปลูกพืชผัก และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด (Parrella *et al.*, 1984) และพบว่าแมลงวันหนอนซอนใบเริ่มเป็นแมลงศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดปัญหาใหญ่ขึ้นทั่วโลก และจากการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่ามนุษย์เป็นตัวกลางสำคัญที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของแมลงวันหนอนซอนใบจากพื้นที่หนึ่งไปยังอีกพื้นที่หนึ่ง (Minkenber, 1988) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันนี้มีการค้าขายกันอย่างเสรีทั่วโลก และในประเทศไทยนั้นมีการส่งออกผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรของไทยไปสู่ประเทศต่างๆ ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในพืชผักนั้น จากการตรวจสอบพบว่าแมลงวันหนอนซอนใบเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อส่งออกผลิตผลทางการเกษตร เนื่องจากแมลงวันหนอนซอนใบสามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากให้กับพืชหลากหลายชนิด แต่จะพบมากในพืชในวงศ์ (Family) Cucurbitaceae ซึ่งได้แก่ พืช ตระกูลแตงชนิดต่างๆ (Spencer, 1973) พืชตระกูลถั่ว ในวงศ์ (Family) Leguminosae เช่น ถั่วชนิดต่างๆ ในวงศ์ Solanaceae เช่น พืชตระกูลมะเขือ และในวงศ์ Cruciferaeae 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 และ เพชรบุรี

ซึ่งคาดว่าภายใน 3 ปีจะสามารถเก็บตัวอย่างแมลงวันหนอนซอนใบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยจะมีการเก็บรวบรวมตัวอย่างจากแปลงพืชผักสวนครัว เช่น แตงกวา ฟักทอง ถั่วฝักยาว บวบ ฟัก และอื่นๆ จากนั้นใส่ถุงพลาสติกหรือกล่องพลาสติก เพื่อให้ระบายอากาศได้ดี บันทึกวันที่ เดือน พ.ศ. และสถานที่เก็บ และนำกลับมาเลี้ยงย้งห้องปฏิบัติการจนเป็นตัวเต็มวัย

2. เตรียมตัวอย่างตัวเต็มวัย เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดแมลงวันหนอนซอนใบ โดยใช้ตัวอย่างตัวเต็มวัยที่อบแห้ง หรืออาจฆ่าด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ หรือเก็บแมลงใส่หลอดแก้ว แช่ในช่องน้ำแข็ง 4 - 5 ชั่วโมง วิธีนี้จะทำให้สีไม่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อได้ตัวอย่างแล้วใช้เข็มขนาดเล็ก (micropin) แทงด้านบนส่วนนอกแล้วจึงเสียบ micropin กับโฟม หรือค็อกขนาดเล็กที่มีเข็มปักแมลงเสียบอยู่ โดยมีป้ายเล็ก ๆ กับกบโดยบอก สถานที่ วันเดือนปี ผู้เก็บอีกชิ้นเป็นชื่อพืชที่เก็บมา รวมทั้งมีป้ายบันทึกแยกชื่อพืชอาหารที่เก็บมา และชื่อแมลงที่จำแนกได้อีก 1 ป้าย

3. นำตัวอย่างแมลงวันหนอนซอนใบมาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope โดยใช้ตัวอย่างแมลงวันหนอนซอนใบแต่ละชนิดที่นำมาศึกษาจำนวน 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 รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของแมลงวันหนอนซอนใบแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่พบตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

5. แมลงวันหนอนซอนใบบางชนิดที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงกันมาก และยากในการตรวจวินิจฉัยชนิดนั้น จะต้องมีการทำสไลด์อวัยวะของอวัยวะเพศ (genitalia) ซึ่งได้แก่ aedeagus ในเพศผู้ และอวัยวะวางไข่ในเพศเมีย เพื่อวัดขนาดและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

- ตัดส่วนท้องของแมลงวันหนอนซอนใบแช่ในน้ำยาโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (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

- เชื้ออวัยวะเพศมาวางบนสไลด์ที่หยดน้ำยาที่ทำสไลด์ 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

ทำการสำรวจ เก็บตัวอย่าง แมลงวันหนอนชอนใบจากแปลงพืชผักชนิดต่าง ๆ ในเขตพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม กรุงเทพมหานคร สุพรรณบุรี ราชบุรี และ เพชรบุรี และในเขตพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ตรัง นราธิวาส และนครศรีธรรมราช พบแมลงวันหนอนชอนใบเข้าทำลายพืชผักหลากหลายชนิด เช่น สร้อยทอง โหระพา แตงกวา ฟักทอง หอมแดง ถั่วฝักยาว มะเขือเทศ กวางตุ้ง ผักกาดเขียว จินจูฉาย แตงโม บวบ คะน้า และ เมล่อน (Figure 1 และ Table 1) นำใบพืชที่มีลักษณะการเข้าทำลายของแมลงวันหนอนชอนใบมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (Figure 2) ได้ตัวเต็มวัยจำนวน 1,344 ตัวอย่าง ทำการแยกแมลงวันหนอนชอนใบเพศผู้และเพศเมีย โดยแมลงวันหนอนชอนใบเพศเมีย จะมีลักษณะเป็นท่อแข็งยาวยื่นออกมาจากส่วนปลายท้อง (heavily sclerotized tube) แต่ในแมลงวันหนอนชอนใบเพศผู้จะมีลักษณะคล้ายก้อนสีดำติดอยู่บริเวณปลายของส่วนท้อง (Figure 3) ถ่ายรูปลักษณะสำคัญต่าง ๆ เช่น ส่วนหัว (head) ออก (thorax) ส่วนท้อง (abdomen) (Figure 4) เก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% และทำสไลด์ถาวรของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male genitalia) เพื่อใช้ในการจำแนกชนิด เนื่องจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้โดยเฉพาะ distiphallus นั้น เป็นส่วนที่มีความแตกต่างกันในแมลงวันหนอนชอนใบแต่ละชนิดจากการจำแนกแมลงวันหนอนชอนใบที่สำรวจได้โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ พบแมลงวันหนอนชอนใบ 2 ชนิดได้แก่ *Liriomyza sativae* (Figure 5-6 และ 9) และ *Liriomyza chinensis* (Figure 7-8 และ 10)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจ เก็บตัวอย่าง แมลงวันหนอนชอนใบจากแปลงพืชผักชนิดต่าง ๆ ในเขตพื้นที่ภาคกลาง และในเขตพื้นที่ภาคใต้ พบแมลงวันหนอนชอนใบเข้าทำลายพืชผักหลากหลายชนิด นำใบพืชที่แมลงวันหนอนชอนใบเข้าทำลายมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนั้น ได้ตัวเต็มวัยจำนวน 1,344 ตัวอย่าง และจากจำแนกแมลงวันหนอนชอนใบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ พบแมลงวันหนอนชอนใบ 2 ชนิดได้แก่ *Liriomyza sativae* Blanchard และ

Liriomyza chinensis (Kato, 1949) และดำเนินการจำแนกแมลงวันหนอนซอนใบที่รวบรวมได้ในปีการศึกษาต่อไป

คำขอบคุณ

ข้าราชการ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมาบริการ ของกลุ่มงาน อนุกรมวิธานแมลงในการช่วยเหลือเก็บตัวอย่างแมลงวันหนอนซอนใบ จึงทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จ และลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Malipatil, M. B., Ridland, P. M., Rauf, A., Watung, J., & Kandowangko, 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

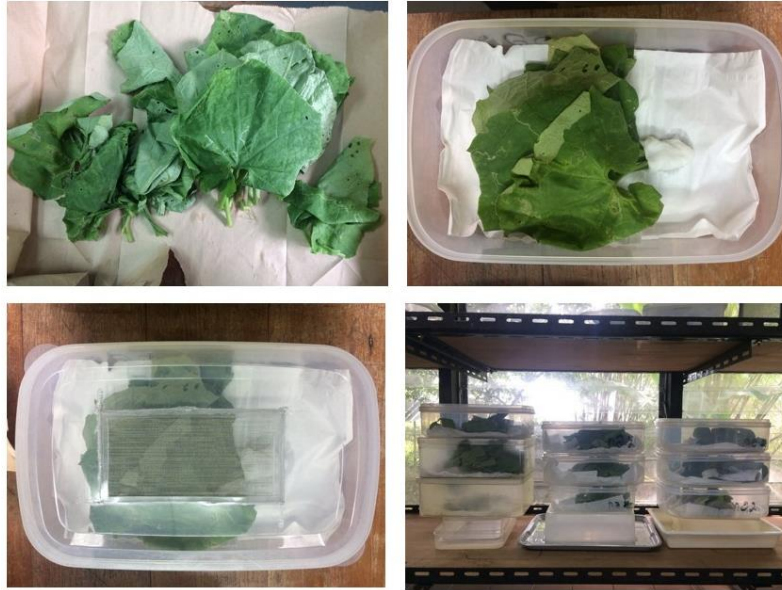


Figure 2 Mass-rearing of leaf miner from host plants in the insect laboratory

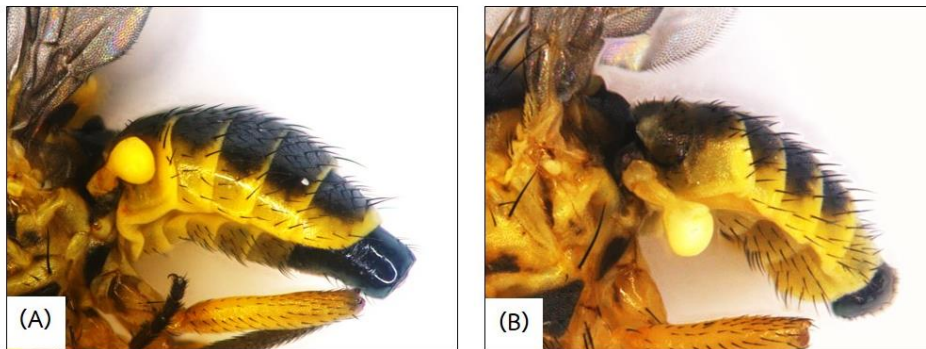


Figure 3 Abdomen of leaf miner

(A) Female abdomen

(B) Male abdomen

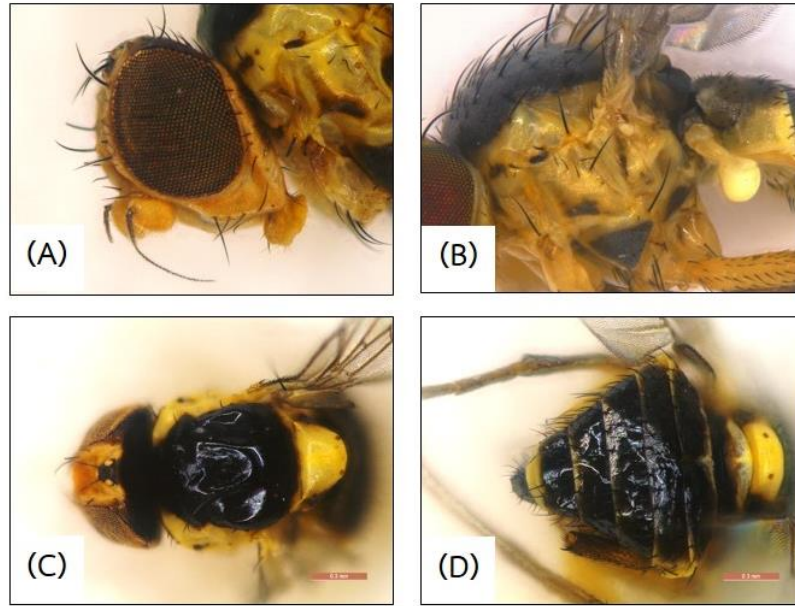


Figure 4 The important characteristics of leaf miner for identification

- (A) Head
- (B) Thorax
- (C) Pronotum
- (D) Abdomen

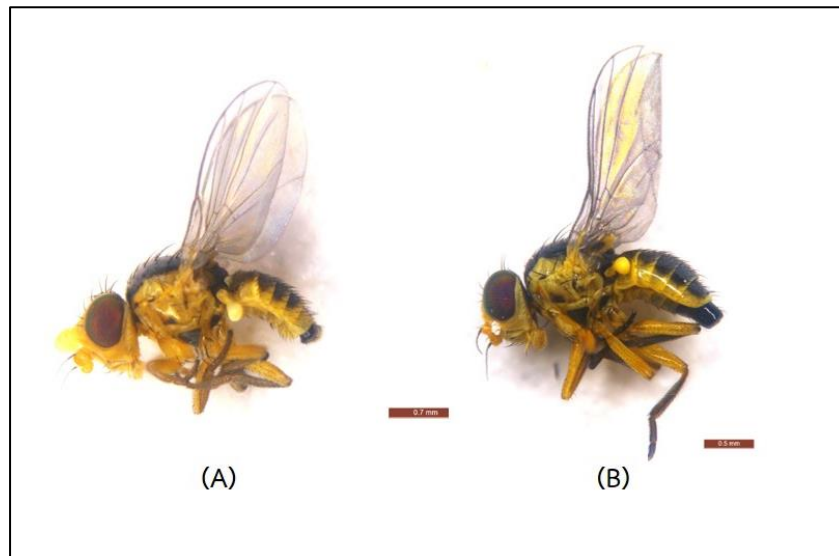


Figure 5 Adult of *Liriomyza sativae*

- (A) Male
- (B) Female

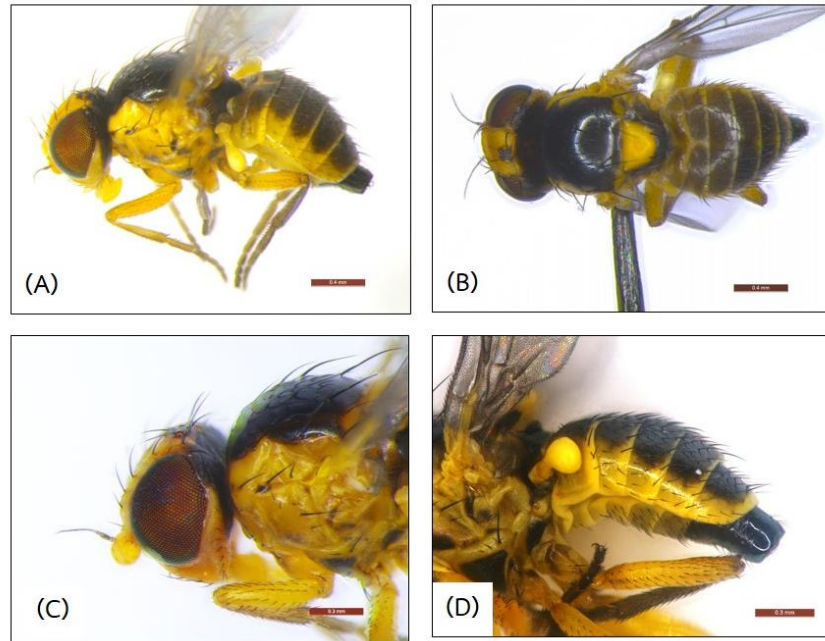


Figure 6 The important characteristics of leaf miner for identification *Liriomyza sativae*

- (A) Head (B) Thorax
(C) Pronotum (D) Abdomen

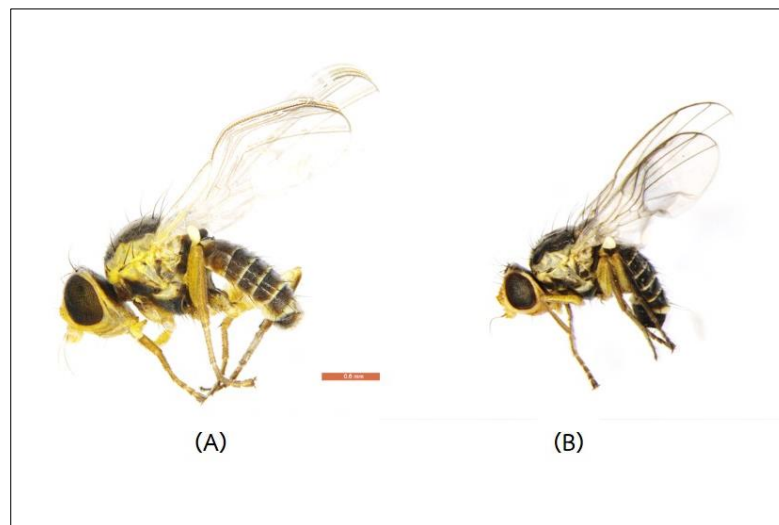


Figure 7 Adult of *Liriomyza chinensis*

- (A) Male (B) Female

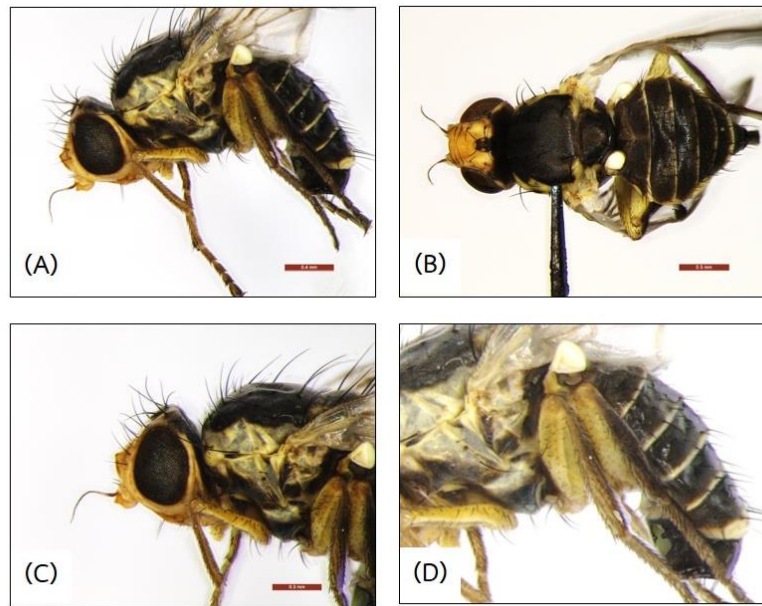


Figure 8 The important characteristics of leaf miner for identification *Liriomyza chinensis*

(A) Head

(B) Thorax

(C) Pronotum

(D) Abdomen



Figure 9 Male genitalia of *Liriomyza sativae* (lateral view)

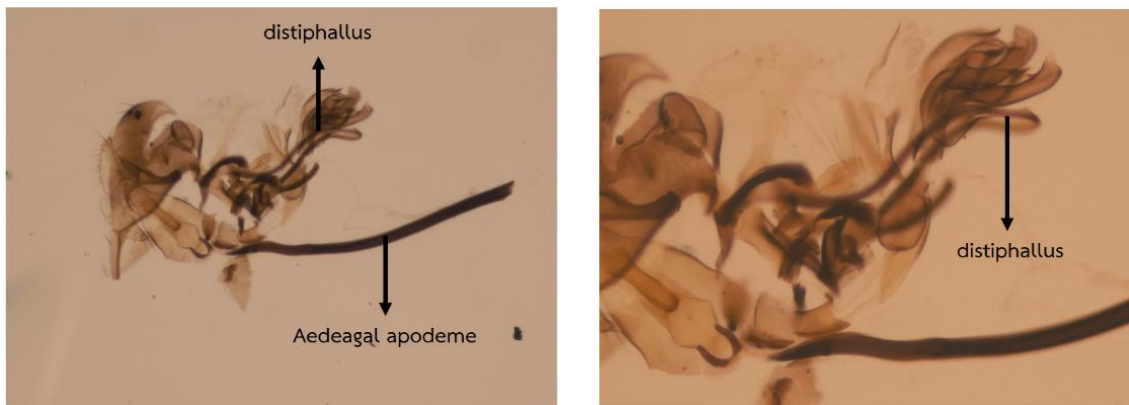


Figure 10 Male genitalia of *Liriomyza chinensis* (lateral view)

Table 1 Fruit collection data showing common name, scientific name, family, date, location, latitude, longitude and number of samples

No.	Common Name	Scientific Name	Family	Date	Location	Latitude	Longitude	Male	Female	Total
1	Cucumber	<i>Sucumis sativus</i> Linn	Cucurbitaceae	31.01.2018	Surin, Mueang Surin, Sawai	14° 48' 18.2"	103° 20' 39.5"	53	60	113
2	Angled Loofah	<i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb.	Cucurbitaceae	31.01.2018	Surin, Mueang Surin, Sawai	14° 48' 18.2"	103° 20' 39.5"	209	200	409
3	Shallot	<i>Allium ascalonicum</i> L.	Amaryllidaceae	21.03.2018	Kanchanaburi, Tha Muang, Tha Muang			10	33	43
4	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	21.03.2018	Kanchanaburi, Tha Muang, Tha Muang					
5	Golden Rod	<i>Solidage caradensis</i>	Compositae	08.05.2018	Nakhon Pathom, Nakhon Chai Si, Si Maha Pho	13° 52' 3"	100° 10' 53"	1	2	3
6	Sweet Basil	<i>Ocimum basilicum</i> Linn.	Labiatae	08.05.2018	Nakhon Pathom, Nakhon Chai Si, Si Maha Pho	13° 52' 3"	100° 10' 53"	16	16	32
7	Cucumber	<i>Sucumis sativus</i> Linn	Cucurbitaceae	23.05.2018	Kanchanaburi, Tha Muang, Thung Thong			15	6	21
8	Pumpkin	<i>Cucurbita maxima</i> Duchesne.	Cucurbitaceae	19.06.2018	Suphan Buri, U Thong, Chorakhe Sam Phan	14° 18' 27"	99° 51' 37"			
9	Cucumber	<i>Sucumis sativus</i> Linn	Cucurbitaceae	25.07.2018	Kanchanaburi, Tha Muang, Thung Thong			25	90	115
10	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	05.09.2018	Kanchanaburi, Tha Maka, Takhram En			72	89	161
11	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	13.09.2018	Kanchanaburi, Tha Maka, Don Cha-em			9	0	9
12	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	13.09.2018	Kanchanaburi, Tha Maka, Takhram En			12	17	29
13	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	13.09.2018	Kanchanaburi, Tha Muang, Thung Thong			38	98	136
14	Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	03.10.2018	Chiang Mai, Hot, Bo Luang (1)	18° 08' 47.9"	98° 20' 47.1"	1	5	6
15	Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	03.10.2018	Chiang Mai, Hot, Bo Luang (2)	18° 09' 08.9"	98° 20' 38.6"	14	16	30
16	Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	03.10.2018	Chiang Mai, Hot, Bo Luang (3)	18° 09' 22.3"	98° 20' 35.8"	2	3	5
17	Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	03.10.2018	Chiang Mai, Hot, Bo Sali (4)	18° 09' 00.1"	98° 14' 49.7"	1	1	2
18	Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	03.10.2018	Chiang Mai, Hot, Bo Sali (5)	18° 08' 58.1"	98° 15' 04.3"	4	1	5
19	Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	03.10.2018	Chiang Mai, Hot, Bo Sali (6)	18° 08' 34.1"	98° 15' 16.9"	13	6	19
20	Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	03.10.2018	Chiang Mai, Hot, Bo Sali (7)	18° 08' 44.4"	98° 15' 12.3"	14	0	14
21	Chanese Cabbage	<i>Brassica Chinensis</i> Linn.	Cruciferae	24.10.2018	Chon Buri, Bang Lamung, Nong Prue	12° 56' 21.9"	100° 54' 18.0"	5	0	5
22	Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	06.12.2018	Suphan Buri, U Thong, Chorakhe Sam Phan	14° 18' 27"	99° 51' 37"	2	3	5
23	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	06.12.2018	Suphan Buri, U Thong, Chorakhe Sam Phan	14° 18' 27"	99° 51' 37"	1	1	2
24	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	11.12.2018	Nakhon Pathom, Nakhon Chai Si, Huai Phlu	13° 52' 31"	100° 15' 17"	2	0	2
25	Cucumber	<i>Sucumis sativus</i> Linn	Cucurbitaceae	06.01.2019	Chanthaburi, Pong Nam Ron, Thap Sai	12° 56' 23.0"	102° 16' 20.9"	20	32	52

Table 1 Fruit collection data showing common name, scientific name, family, date, location, latitude, longitude and number of samples (continued)

No.	Common Name	Scientific Name	Family	Date	Location	Latitude	Longitude	Male	Female	Total
26	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	07.01.2019	Bangkok, Lad ayo, Chatuchak, DOA			4	2	6
27	Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	22.01.2019	Nakhon Pathom, Mueang, Sam Khwai Phueak	13° 51' 18.9"	100° 07' 08.9"	3	2	5
28	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	22.01.2019	Nakhon Pathom, Mueang, Sam Khwai Phueak	13° 51' 18.9"	100° 07' 08.9"	20	12	32
29	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	22.01.2019	Kanchanaburi, Tha Muang, Nong Tak Ya	13° 46' 10.9"	99° 34' 07.2"	14	19	33
30	Chanese Cabbage	<i>Brassica Chinensis</i> Linn.	Cruciferae	28.01.2019	Bangkok, Lad ayo, Chatuchak, DOA			1	0	1
31	Tomato	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Solanaceae	28.01.2019	Bangkok, Lad ayo, Chatuchak, DOA			14	13	27
32	Chanese Cabbage	<i>Brassica Chinensis</i> Linn.	Cruciferae	12.02.2019	Bangkok, Lad ayo, Chatuchak, DOA	14° 25' 59"	100° 57' 47"	1	1	2
33	Choy Sum	<i>B. juncea</i> Czern. et Coss.	Brassicaceae	14.02.2019	Bangkok, Lad ayo, Chatuchak, DOA	14° 25' 59"	100° 57' 47"	2	0	2
34	Smooth Loofah	<i>Luffa cylindrica</i> (L.) M.Roem.	Cucurbitaceae	14.03.2019	Bangkok, Lad ayo, Chatuchak, Rice Department	13° 50' 58"	100° 34' 23"	N/A	N/A	N/A
35	Pumpkin	<i>Cucurbita maxima</i> Duchesne.	Cucurbitaceae	13.03.2019	Sa Kaeo, Wang Sombun, Wang Thong	13° 23' 40.15"	102° 7' 26.57"	N/A	N/A	N/A
36	Cucumber	<i>Sucumis sativus</i> Linn	Cucurbitaceae	20.03.2019	Chumphon, Tha Sae, Tha Sae	10° 40' 29"	99° 10' 14"	N/A	N/A	N/A
37	White mugwort	<i>Artemisia lactiflora</i>	Asteraceae.	10.04.2019	Nakhon Pathom, Kamphaeng Saen	14° 1' 53"	99° 58' 16"	7	5	12
38	Melon	<i>Cucumis melo</i> L.	Cucurbitaceae	10.04.2019	Bangkok, Thawi Watthana			3	3	6
39	Chanese Cabbage	<i>Brassica Chinensis</i> Linn.	Cruciferae	18.04.2019	Ang Thong, Mueang Ang Thong	14° 34' 09.7"	100° 28' 53.2"	N/A	N/A	N/A
40	Chinese cabbage	<i>Brassica Chinensis</i> Linn.	Cruciferae	18.04.2019	Phra Nakhon Si Ayutthaya, Maha Rat, Tha To	14° 34' 09.7"	100° 28' 53.2"	N/A	N/A	N/A
41	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	19.04.2019	Nakhon Pathom, Mueang, Sam Khwai Phueak	13° 55' 3"	99° 56' 47"	N/A	N/A	N/A
42	Smooth Loofah	<i>Luffa cylindrica</i> (L.) M.Roem.	Cucurbitaceae	22.05.2019	Nakhon Si Thammarat, Lan Saka, Lan Saka	8° 18' 47.9"	99° 45' 42.4"	N/A	N/A	N/A
43	Marigold	<i>Tagetes erecta</i> L.	Compositae	22.05.2019	Nakhon Si Thammarat, Lan Saka, Lan Saka	8° 18' 47.9"	99° 45' 42.4"	N/A	N/A	N/A
44	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	25.05.2019	Phetchaburi, Tha Yang, Khao Krapuk	12° 44' 51.1"	99° 42' 27.1"	N/A	N/A	N/A
45	Chinese cabbage	<i>Brassica Chinensis</i> Linn.	Cruciferae	25.05.2019	Phetchaburi, Tha Yang, Khao Krapuk	12° 44' 51.1"	99° 42' 27.1"	N/A	N/A	N/A
46	Smooth Loofah	<i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb.	Cucurbitaceae	25.05.2019	Phetchaburi, Tha Yang, Khao Krapuk	12° 44' 51.1"	99° 42' 27.1"	N/A	N/A	N/A
47	Smooth Loofah	<i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb.	Cucurbitaceae	25.05.2019	Phetchaburi, Cha-am, Sam Phraya	12° 43' 26.1"	99° 53' 35.2"	N/A	N/A	N/A
48	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculata</i>	Fabaceae	25.05.2019	Phetchaburi, Cha-am, Sam Phraya	12° 43' 26.1"	99° 53' 35.2"	N/A	N/A	N/A
49	Cucumber	<i>Sucumis sativus</i> Linn	Cucurbitaceae	31.05.2019	Ratchaburi, Damnoen Saduak, Tha Nat	13° 32' 38.8"	99° 56' 30.8"	N/A	N/A	N/A
50	Smooth Loofah	<i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb.	Cucurbitaceae	31.05.2019	Nakhon Pathom, Mueang, Sam Khwai Phueak	13° 50' 14.0"	100° 07' 37.6"	N/A	N/A	N/A
51	Celery	<i>Aqium graveolens</i> L.	Apiaceae	05.06.2019	Nakhon Pathom, 'Kamphaeng Saen	14° 07' 04.66"	100° 01' 06.49"	N/A	N/A	N/A
Total								608	736	1344

ศึกษาราสกุล *Phytophthora* ในเผือก
 Studt on *Phytophthora* species of Taro

อมรรักษ์ คัดใจเดี่ยว^{1/} ชนินทร ดวงสอาด^{1/} มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/}
 สุนีรัตน์ สีมะเต็อ^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} พชร รัตนนที^{1/} ดารณี เจริญผล^{1/}
^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Taro leaf blight samples were collected from plantation located in Phetchaburi, Prachuap Khiri Khan, Kanchanaburi, Suphan Buri, Nakhon Pathom, Phetchabun, Saraburi, Nakhon Ratchasima, Sukhothai and Chiang Mai provinces, 110 specimens 117 isolates. Ten specimens had been observed and identified using morphological and molecular data of β -tubulin and translation elongation factor 1-alpha gene regions. It was found that *P. colocasiae*. This fungi grow well on V8, CA OMA and PDA and sporulation on CA and PDA. It can be stored in slant PDA tube at least 10 months both in incubator (17°C) and at room temperature (27°C) but at room temperature (27°C), survival decreases and is more contaminated than storing in an incubator (temperature 17°C). *In vitro* growth and sporulation of *P. colocasiae*, pH 5, 6, 7 and temperature of 25°C and 30°C were the optimum conditions for growth while those of sporulation were pH 5, 6, and 25°C.

Keywords: *Phytophthora*, taro, Taro leaf blight

บทคัดย่อ

การศึกษาราสกุล *Phytophthora* ในเผือก ได้รวบรวมและเก็บตัวอย่างเผือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ 110 ตัวอย่าง 117 ไอโซเลท ในจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เพชรบูรณ์ สระบุรี นครราชสีมา สุโขทัย และจังหวัดเชียงใหม่ ศึกษาและจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง β -tubulin และ translation elongation factor พบว่าเป็น *P. colocasiae* ราเจริญได้ดีบนอาหาร V8, CA OMA และ PDA สร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร CA และ PDA สามารถเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหารเลี้ยง PDA ได้อย่างน้อย 10 เดือน ทั้งในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) และ ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) แต่ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) การมีชีวิตรอดลดลงและมีการปนเปื้อนมากกว่าการเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) รานี้เจริญได้ดีที่ pH 5, 6 และ pH 7 อุณหภูมิ 25°C และอุณหภูมิ 30°C ราสร้างสปอร์ได้ดีที่ pH 5, 6 และ pH 7 อุณหภูมิ 25°C

คำหลัก: รา *Phytophthora* เผือก ใบจุดตาเสือ

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-01-60

คำนำ

เผือก (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.) ประชากรของประเทศในเขตร้อนเกือบทั่วโลก รู้จักเผือกเป็นอย่างดี บางประเทศรับประทานเผือกเป็นอาหารหลัก บางประเทศรับประทานเผือกเป็นอาหารรอง ประเทศเหล่านั้นจึงปลูกเผือกเป็นพืชเศรษฐกิจพืชหนึ่งของประเทศ (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน, ม.ป.ท.) สำหรับประเทศไทย เผือกถือเป็นพืชเศรษฐกิจระดับท้องถิ่นที่สำคัญอีกพืชหนึ่ง คนไทยนิยมบริโภคเผือกเพราะมีกลิ่นหอมและรสชาติดี เป็นพืชหัวที่เป็นพืชอาหารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง (มาลินี และคณะ, ม.ป.ท.) การปลูกเผือกมีทุกภาคของประเทศ ปี 2559/60 มีพื้นที่ปลูกประมาณ 16,148 ไร่ ผลผลิตประมาณ 26,830 ตัน ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 2,836 กิโลกรัมต่อไร่ จังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดสระบุรี นครปฐม เพชรบุรี และจังหวัดสุพรรณบุรี (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2560)

โรคใบจุดตาเสือ (โรคใบไหม้; Taro leaf blight) อาการเริ่มแรกบนใบ เป็นจุดขีดแมลงวันเล็กๆ สีน้ำตาลเข้ม หรือจุดสีน้ำตาลอ่อน ปรากฏเห็นชัดบนผิวใบ (Brooks, 2005) จากแผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นวงๆ ต่อกัน ลักษณะพิเศษ คือ บริเวณขอบแผลมีหยดสีเหลืองข้น ซึ่งต่อมาแห้งเป็นเม็ดๆ เกาะอยู่เป็นวงๆ เมื่อปีบจะแตกเป็นผงละเอียด สีสนิม ในระยะที่รุนแรงแผลขยายติดต่อกัน และทำให้ใบม้วนพับเข้าและแห้งเหี่ยว หรืออาจเน่าและถ้าอากาศชื้นมีฝนพรำ อาการบนก้านใบ จะเกิดแผลฉ่ำน้ำยาวรี สีน้ำตาลอ่อน แผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นวงๆ เช่นกัน ต่อมาจะเน่าแห้ง เป็นสีน้ำตาล มีหยดสีเหลืองข้นด้วย ทำให้ก้านตันทานน้ำหนักใบไม่ได้จึงหักพับ มีผลทำให้ใบแห้ง พบมากในระยะโรครุนแรง และมีลมพัดอาการเป็นระยะนี้ทำให้ผลผลิตลดลง และเชื้อนี้อาจเข้าทำลายหัวเผือกด้วยทำให้หัวเผือกเน่าเสียหายได้ โรคนี้เป็นโรคที่รุนแรงที่สุดของเผือกที่พบในประเทศไทยและในต่างประเทศ โรคนี้เริ่มระบาดเมื่อมีฝนตกและอากาศชุ่มชื้น ถ้ามีฝนตกหนักและติดต่อกันหลายๆ วัน โรคจะระบาดอย่างรวดเร็ว ในแปลงที่เป็นรุนแรง เผือกจะมีใบเหลืองประมาณต้นละ 3-4 ใบ เท่านั้น เผือกที่เป็นโรคนี้ถ้ายังไม่เริ่มลงหัว หรือลงหัวไม่โตนักจะเสียหายหมด หัวที่ลงจะไม่ขยายเพิ่มขนาดขึ้น ในช่วงที่หมอกลงจัด เผือกจะเป็นโรคนี้ได้ง่ายเช่นเดียวกัน (อมรรัตน์, 2552; กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2555) โรคสามารถแพร่กระจายอย่างรวดเร็วในสภาพที่มีเมฆมากและฝนตกไม่สม่ำเสมอ อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส และจะเกิดการระบาดเมื่อเวลากลางคืนมีอุณหภูมิต่ำต่อเนื่องกัน ประมาณ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90-100 เปอร์เซ็นต์ (Nath, et al., 2013)

P. colocasiae จัดอยู่ใน class Oomycetes family Pythiaceae ลักษณะของรานี้เป็นราน้ำ เส้นใยสีขาว ไม่มีผนังกัน แดกกิ่งก้าน สร้างสปอร์ 4 ชนิด ได้แก่ sporangia เกิดบนก้าน sporangiophores มีการขยายพันธุ์ทั้งแบบไม่ใช้เพศให้กำเนิด zoospores ภายใน sporangium ส่วนการขยายพันธุ์แบบใช้เพศให้กำเนิด oospores ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างเพศผู้ (antheridium) และเพศเมีย (oogonium) และ chlamydospores เชื้ออยู่ข้ามฤดูในรูปของ oospore และเส้นใยในพืชที่เป็นโรค เมื่อความชื้นเหมาะสมจะเกิด sporangia ให้กำเนิด zoospore ที่มีหางว่ายน้ำได้ เข้าทำลายพืชต่อไป (Erwin and Ribeiro, 1996)

P. colocasiae มีพืชอาศัยส่วนมากเป็นพืชพวก aroids (Araceae) รวมทั้ง พืชตระกูลเผือก [*Colocasia esculenta* (taro, kalo, dasheen) และ *Alocasia macrorrhiza* (giant taro)] (Brooks, F.E. 2005) มีรายงานในประเทศอินเดียว่า *P. colocasiae* ทำให้เกิดโรคใบไหม้และหัวเน่าที่ร้ายแรงที่สุดของเผือก (Raj et al., 2011) พบได้ทุกพื้นที่ที่มีการปลูกเผือกในฮาวายและยังพบได้ในพื้นที่อื่นอีก ได้แก่ ปาปัวนิวกินี, เกาะโซโลมอน, ฟิลิปปินส์, เกาะกวม, ซามัวตะวันตก, อินเดีย,

ไต้หวัน และทรินิแดด เป็นต้น (Anonymous, n.p.) ทำให้ผลผลิตลดลง 25-50% (Gollifer and Brown, 1974; Jackson *et al.*, 1980) ในประเทศไทย อมรรรัตน์ (2552; 2556) รายงานว่ารา *P. colocasiae* ทำให้เกิดโรคใบแห้ง ใบไหม้ ใบจุดตาเสือกกับ เห็บอก บอนน้ำ บอนเขียว และคุณ

ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์เห็บอกให้ต้านทานโรคใบจุดตาเสือกของบางประเทศ มีการนำวิธีการ Isozyme analysis and DNA markers (RAPD) มาระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *P. colocasiae* ไอโซเลทต่างๆ ทั้งภายในและนอกประเทศ ซึ่งเห็บอกจากการปรับปรุงพันธุ์ควรมีการทดสอบการต่อต้านเชื้อนี้ ก่อนที่จะออกเป็นพันธุ์ใหม่ต่อไป (Brooks, 2005)

Mei-ju Lin and Wen-Hsiung Ko (2008) ทำการสำรวจและเก็บใบเห็บอกที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อได้ 7 ไอโซเลท จากนั้นนำมาวินิจฉัยว่าเป็น *P. colocasiae* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลำดับของ ITS (Internal Transcribed Spacer) และความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนเห็บอก

ในประเทศไทย มีรายงานเกี่ยวกับรา *Phytophthora* หลายสปีชีส์ ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชต่างๆ หลายชนิด แต่การศึกษาเกี่ยวกับรา *Phytophthora* ที่ทำให้เกิดโรคใบจุดตาเสือกของเห็บอก ยังมีน้อย จึงควรมีการศึกษาข้อมูลต่างๆ ของรานี้ เพื่อให้ได้ทราบชนิด และลักษณะประจำพันธุ์ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาวิธีการป้องกันกำจัดโรค เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับนำมาใช้กำหนดแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันเหตุการณ์ และยังเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า และเพื่อเก็บในศูนย์รวบรวมราสาเหตุโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช และตัวอย่างแห้งโรคพืชเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างและอุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ ปากกาเคมี, ดินสอ, กระดาษหนังสือพิมพ์, ถุงพลาสติก, กรรไกรตัดแต่งกิ่ง, ไม้ทาบตัวอย่าง, ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง และ GPS ฯลฯ
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์, ปากคีบ, เข็มเขี่ยปลายแหลม, ใบมีดโกน, ใบมีดผ่าตัด, ตะเกียงแอลกอฮอล์, ยาทาเล็บ (แบบใส), cork borer, เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge), เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR machine), เครื่องเขย่า (vortex), เครื่อง tissue lyser, gel tank, เครื่องกำเนิดกระแสไฟ, gel plate, comb, PCR tube, เครื่องอ่านผล PCR (gel doc), microwave, micropipette ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร, tips ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร, กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo, water bath หรือ incubation chamber ฯลฯ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์, ขวดดูแรน, กระจกตวง, จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ฯลฯ
4. สารเคมี ได้แก่ lactophenol, lactic acid, oil immersion, sodium hypochlorite, ethyl alcohol ฯลฯ
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA), Potato Carrot Agar (PCA), V-8 juice agar, และ Carrot Agar (CA) ฯลฯ
6. ตำราสำหรับใช้ในการจัดจำแนกรา *Phytophthora* (*Phytophthora Diseases Worldwide, Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints*)

วิธีการ

1. การเก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Phytophthora*

เก็บและรวบรวม และเก็บตัวอย่างโรคใบจุดตาเสือของเผือก จากแหล่งปลูก ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ นครสวรรค์ พิชณุโลก สิงห์บุรี นครราชสีมา สุรินทร์ สระบุรี ปราจีนบุรี อุทัย นครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลอยู่ในสภาพที่ สมบูรณ์และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุม เนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาจำแนกชนิดและ ทำการสกัดดีเอ็นเอ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑวัตถุโรคพืช ตึกอภิศรีการศึกษาร กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การจำแนกชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- การแยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธี Tissue transplanting โดยตัดบริเวณรอยต่อ เนื้อเยื่อที่เป็นโรครกับเนื้อเยื่อปกติเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร แช่ในสารละลายไฮเดียม ไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar ผสม BRNAP (PDA+BRNAP) (Masago *et al.*, 1972) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบ โคลนินของเส้นใยราที่เจริญจากชิ้นตัวอย่างพืช มาเลี้ยงบนอาหาร PDA+BRNAP อีกครั้ง บ่ม ที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคลนินของเส้นใยราที่เจริญจาก ชิ้นวุ้น มาเลี้ยงบนอาหาร Carrot Agar (CA) (อมรรัตน์ และคณะ, 2556) แล้วทำให้เป็นรา บริสุทธิ์จากสปอร์เดี่ยว โดยนำราที่เจริญบนอาหารวุ้นแครอท ไปเก็บไว้ในที่มืด 72 ชั่วโมง แล้ว นำออกไปไว้ใต้แสงน้อน ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง ใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มในน้ำกลั่น บริสุทธิ์ มาแกะกลุ่มสปอร์ แล้วนำไปเขี่ยให้สปอร์กระจายบนอาหารวุ้น (water agar: WA) แล้ว ตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อแยกสปอร์เดี่ยว นำไปวางบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ 72 ชั่วโมง ให้ สปอร์เจริญสร้างกลุ่มสปอร์ แล้วตัดขอบโคลนิน ไปเลี้ยงในหลอดอาหาร PDA (อมรรัตน์, 2556) ใน หลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

- การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (คู่มือการจำแนกชนิด *Phytophthora* ของ Stamps *et al.* (1990) และ เอกสารของ Erwin and Ribeiro (1996))

- ศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคลนิน) ของเชื้อ

เลี้ยงรา *Phytophthora* บนอาหาร PDA หรืออาหาร CA เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของ เส้นใย ใช้เครื่องเจาะรู (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยบริเวณขอบ โคลนินของเชื้อซึ่งเลี้ยงบนอาหาร นาน 5 วัน วางให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อคว่ำลงบนอาหารบริเวณกลาง จานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มมืดอุณหภูมิห้อง จนเชื้อเจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อ บันทึกลักษณะการ เจริญที่ผิวหน้าอาหารและความหนาแน่นของเส้นใย

- ศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของรา

นำรา *Phytophthora* ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหาร CA จำนวน 15 มิลลิเมตร ที่บ่มในตู้บ่ม นาน 72 ชั่วโมง นำไปไว้ใต้แสงน้อน (White cool) 40 วัตต์ 2 หลอด ระยะ 30 เซนติเมตร ที่ให้แสง 200 แสงเทียน (Foot candle; ftc) ที่อุณหภูมิห้อง ปลอ่ยไว้ใต้แสงนาน 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้าง สปอร์แรงเจีย (Sporangia) ศึกษาและบันทึกลักษณะการแตกแขนงของก้านสปอร์

(Sporangiophores) วัดความยาว (Length) และความกว้าง (Breadth) ของ สปอร์แรงเจีย เพื่อหาอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง

- จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช ตัวอย่างโรคพืชที่เก็บมาได้ ส่วนหนึ่งนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยตัดส่วนของพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผ่นไม้อัดตัวอย่างโรคพืช นำไปวางผึ่งลม ไม่ให้ถูกแดด เปลี่ยนกระดาษทุกวัน จนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง จึงนำมาเก็บในถุงกระดาษสำหรับเก็บตัวอย่างแห้ง พร้อมลงรายละเอียดข้อมูลตัวอย่างตามระบบสากล ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

3. การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

โดยเลี้ยงรา *Phytophthora* ที่ต้องการศึกษาในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) ให้มีอายุประมาณ 7 วัน จากนั้นเขี่ยเส้นใยของรา ย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ปฏิบัติตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต โดยก่อนสกัด จะเติมเอ็นไซม์ Proteinase K เพื่อช่วยในการย่อยผนังเซลล์ ใช้ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากสกัดได้ดีดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) หากยังไม่ทำ PCR ทันที จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ translation elongation factor 1-alpha (Tef1) ด้วยคู่ไพรเมอร์ ELONGF1/ELONGR1 (Kroon *et al.*, 2004) β -tubulin ด้วยคู่ไพรเมอร์ TUBuF2/TUBuR1 (Kroon *et al.*, 2004) และ Internal Transcribed Spacer (ITS) DC6 (Cooke *et al.*, 2000)/ITS4 (White *et al.*, 1990) เอนไซม์ที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาสำหรับการวิจัยนี้ คือ Taq DNA Polymerase และกำหนดค่า annealing temperature คือ 56 องศาเซลเซียส สำหรับไพรเมอร์ของยีนทั้ง 3 ตำแหน่ง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 μ l 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

การวิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอของรา *Phytophthora* มาทำการวิเคราะห์ โดยนำเส้นดีเอ็นเอ 2 เส้นที่ได้จาก forward และ reverse primer มาเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Genious version 8.1.9 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอ และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดของ *Phytophthora* โดยวิเคราะห์เบี่ยงต้นจากตำแหน่ง ITS (883 bases/taxa) และทำการวิเคราะห์ concatenated dataset ของยีนตำแหน่ง β -tubulin และ translation elongation factor 1-alpha (1,863 bases/taxa; Tub2 = 944, TEF1 = 919) ด้วย phylogenetic criteria คือ Maximum Likelihood (ML) มีรายละเอียดการวิเคราะห์ ดังนี้ เตรียมไฟล์ phy วิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command -f a) เริ่มจาก random starting tree และ กำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง

4. ศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae*

วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 10 ซ้ำ โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี คือ

- กรรมวิธีที่ 1 Potato dextrose agar (PDA)
- กรรมวิธีที่ 2 V8 juice agar (V8 A)
- กรรมวิธีที่ 3 Oat meal agar (OMA)
- กรรมวิธีที่ 4 Carrot agar (CA)
- กรรมวิธีที่ 5 Corn meal agar (CMA)

วิธีการทดลอง

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหารทดสอบชนิดต่างๆ ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิต่ำ 27 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะสีของเส้นใย และการสร้างสปอร์ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของราบนอาหารสูตรต่างๆ

5. ศึกษาการเก็บรักษารรา *P. colocasiae*

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ในหลอดทดลอง จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มนำไปเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิต่ำ 17 °C) และ ที่อุณหภูมิต่ำห้อง (อุณหภูมิต่ำ 27 °C) เมื่อได้ระยะเวลาตามแผนนำหลอดเชื้อมาแยกเชื้อเพื่อดูการมีชีวิตของเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

การเจริญและการสร้างสปอร์ หลังการเก็บรักษา 2 4 6 8 และ 10 เดือน

6. ศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และอุณหภูมิต่ำ (T) ของอาหารต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae*

วางแผนการทดลองแบบ 3 x 4 Factorial in RCB จำนวน 20 ซ้ำ โดยปัจจัยแรก เป็น ระดับอุณหภูมิต่ำ 3 ระดับ ได้แก่ 25°C 30 °C และ 35 °C และปัจจัยที่สอง เป็น ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ระดับ ได้แก่ pH 6 7 8 9 และ 10

วิธีการทดลอง

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร CA ที่ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ ไฮโดรคลอริกแอซิด) ในจานเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยรา ลักษณะสีของเส้นใย และการสร้างสปอร์

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเผือกของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. การเก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Phytophthora*

เก็บตัวอย่างเผือกที่เป็นโรคใบจุดตาเสือจากแหล่งปลูกเผือก (Table 1) รวม 110 ตัวอย่าง แยกราสาเหตุโรคจากส่วนก้านใบและใบเผือกที่แสดงอาการ (Figure 1 and 2) เก็บเป็นราบริสุทธิ์ เพื่อใช้ศึกษา 117 ไอโซเลท

2. การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- ศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ

การเจริญเติบโตของรา *Phytophthora* ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ บนอาหารแข็ง 2 ชนิด คืออาหารวุ้นมันฝรั่ง (PDA) และอาหารวุ้นแครอท (CA) บ่มไว้ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Figure 3) พบว่าการสร้างเส้นใยบนอาหารแข็ง มีลักษณะการเจริญเป็นเส้นตรง แตกกิ่งก้านออกไปสม่ำเสมอ เส้นใยใสไม่มีสี ไม่มีผนังกันเส้นใย ผิวผนังเส้นใยเรียบ (Smoot) ไม่มีการโป่งพอง การเจริญบนอาหารวุ้นมันฝรั่ง เต็มจานเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 9 วัน แต่บนอาหารวุ้นแครอท เชื้อเจริญเติบโตช้ากว่า เต็มจานเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 11 วัน นอกจากนี้ บนอาหารวุ้นมันฝรั่ง ราสร้างเส้นใยหนาแน่นกว่า แต่บนอาหารวุ้นแครอทสร้างสปอร์แรนเจีย (Sporangia) มากกว่าบนอาหารวุ้นมันฝรั่ง

- ศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของรา (Figure 4 and 5)

รา *Phytophthora* สร้างสปอร์แรนเจียจำนวนมาก มีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่ รูปไข่ หรือรูปค่อนข้างยาว หรือรูปไข่ ขนาดสปอร์แรนเจีย $98.71-179.40 \times 87.78-144.40 \mu\text{m}$ อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง เท่ากับ 1.40:1 ด้านบนของสปอร์แรนเจียมีส่วนเปิดเป็นทางออกของสปอร์ที่มีหางและว่ายน้ำได้ เด่นชัด

3. การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม

การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* ที่แยกได้จากตัวอย่างเผือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ จากแหล่งปลูกเผือก 110 ตัวอย่าง 117 ไอโซเลท จากข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น *P. colocasiae* ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละแหล่งปลูก เมื่อพิจารณาจากพิภักตุมิตาสตรและวิธีการปลูก สามารถแบ่งได้ 5 กลุ่ม เลือกมากลุ่มละ 2 ไอโซเลท รวม 10 ไอโซเลท (Figure 6) เพื่อเปรียบเทียบและจำแนกเบื้องต้นด้วยข้อมูลพันธุกรรมของยีนตำแหน่ง ITS พบว่ารา *P. colocasiae* และรา *Phytophthora* ทั้ง 10 ไอโซเลท มีความใกล้เคียงกับ *P. meadii* มาก จึงวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วย concatenated dataset ของยีนตำแหน่ง β -tubulin และ translation

elongation factor 1-alpha โดยเปรียบเทียบกับราใน genus *Phytophthora* จำนวน 69 taxa โดยมี *Pythium aphanidermatum* เป็น outgroup (Table 2) เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction พบว่ารา *Phytophthora* ทั้ง 10 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็น *P. colocasiae* (Figure 7) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาใน clade ของ *P. colocasiae* จะพบว่าราที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 10 ไอโซเลท มีความหลากหลาย โดยความหลากหลายนี้อาจมีความสอดคล้องตามชนิดของพืชอาศัยที่แตกต่าง เช่น ไอโซเลท M0193 ที่แยกได้จากใบบอนพบว่ามีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับไอโซเลทอื่น ๆ ใน clade เดียวกัน (Figure 7) รวมถึงความหลากหลายที่อาจเกิดจากความแตกต่างของพื้นที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งเมื่อพิจารณาภายใน clade ของรา *P. colocasiae* จะพบว่ามีความหลากหลายอย่างน้อย 5 กลุ่ม

4. ศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae*

ชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *P. colocasiae* ที่ 7 วัน พบว่า รา *P. colocasiae* เจริญบนอาหาร CMA ได้เร็วที่สุดโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 78.0 มิลลิเมตร รองมา ได้แก่ V8, CA, OMA และ PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 69.30, 64.30, 58.70 และ 52.20 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Table 3, Figure 8)

ที่ 14 วัน พบว่า บนอาหาร PDA รา *P. colocasiae* มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 85.10 มิลลิเมตร ส่วนบนอาหารชนิดอื่น รา *P. colocasiae* เจริญเต็มจานอาหารแล้ว โดยบนอาหาร CMA เจริญเต็มจานอาหารที่ 8 วัน แต่ให้เส้นใยที่น้อยและบางติดอาหาร ส่วนบนอาหาร V8, CA และ OMA เจริญเต็มจานอาหารที่ 10 วัน แต่ถึงแม้การเจริญของ รา *P. colocasiae* บนอาหาร PDA จะเจริญได้ช้ากว่า แต่เส้นใยหนาแน่นกว่าอาหารชนิดอื่น ส่วนบนอาหาร OMA ถึงจะมีการเจริญของเส้นใยดีและเราสามารถสร้างสปอร์แรงเจียมได้ แต่ยากต่อการสังเกต เนื่องจากสีของอาหารมีสีขาวขุ่น

ลักษณะเส้นใยบนอาหารต่างๆ ดังนี้

- PDA เส้นใยสีขาว แน่น ค่อนข้างหยาบ เจริญเป็นวงถี่ๆ เห็นชัดเจน เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหารเล็กน้อย
- CA เส้นใยสีขาว หยาบ เจริญเป็นวง เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหาร
- V8 เส้นใยสีขาว หยาบ เจริญเป็นวงเห็นชัดเจน เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหารมาก
- OMA เส้นใยสีขาว หยาบ หยาบเล็กน้อย เจริญแบนราบติดผิวอาหาร แต่เห็นการเจริญยาก เนื่องจากอาหารมีสีขาวขุ่น สีเดียวกับเส้นใย
- CMA เส้นใยสีขาว บางมาก ค่อนข้างตรง เจริญแบนราบติดผิวอาหาร

ชนิดอาหารที่เหมาะสมการสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae* พบว่า รา *P. colocasiae* ไม่สร้างสปอร์แรงเจียมบนอาหาร CMA ส่วนบนอาหารอื่นๆ สามารถสร้างสปอร์ได้เรียงลำดับ ดังนี้ CA, PDA, OMA และ V8A (Table 4, Figure 9) ซึ่งสอดคล้องกับ Jeffers (2006) ที่ใช้อาหาร CA และ V8A ในการศึกษาการระบุชนิดของรา *Phytophthora*

5. ศึกษาการเก็บรักษารรา *P. colocasiae*

หลังการเก็บรักษา 2 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) และ ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) การเจริญของราปกติ ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย

หลังการเก็บรักษา 4 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) และ ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) การเจริญของราเริ่มลดลง ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย

หลังการเก็บรักษา 6 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) การเจริญของรา ไม่แตกต่างจากการเก็บที่ 4 เดือน การเก็บที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) การเจริญของราลดลง ส่วน การสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย และเริ่มพบการปนเปื้อน

หลังการเก็บรักษา 8 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) และที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27 °C) มีการเจริญของลดลง ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย และมีการปนเปื้อน

หลังการเก็บรักษา 10 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) และที่ อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27 °C) มีการเจริญของลดลง ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย และมีการ ปนเปื้อนเพิ่มขึ้น

6. ศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และอุณหภูมิ (T) ของอาหารต่อการเจริญ และสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae*

ผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และอุณหภูมิ (T) ต่อการเจริญของรา *P. colocasiae* ที่ pH 10 ไม่มีการเจริญของรา ที่อุณหภูมิ 35°C ส่วนที่อุณหภูมิ 30°C และอุณหภูมิ 25 °C มีการเจริญเป็นปกติ pH 5, 6, 7, 8 และ 9 มีการเจริญช้า ที่อุณหภูมิ 35°C ส่วนที่อุณหภูมิ 30°C และอุณหภูมิ 25 °C มีการเจริญเป็นปกติ ซึ่งสอดคล้องกับ Tsopmbeng *et al.* (2014) ที่รายงานว่า ที่ pH 10 การเจริญของรา *P. colocasiae* ต่ำกว่าที่ pH อื่นๆ ในทุกอุณหภูมิ และ เจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 27 °C, 30 °C, 24 °C, 21 °C และ 18 °C ตามลำดับ และ ที่ pH 6.5 เหมาะสม ที่สุดสำหรับการเจริญของรา *P. colocasiae* (Sahu *et al.*, 2000)

ผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และอุณหภูมิ (T) ต่อการสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae* ที่ pH 9 ไม่มีการสร้างสปอร์ ที่อุณหภูมิ 35°C และอุณหภูมิ 30°C ที่อุณหภูมิ 25 °C สร้างสปอร์ได้ปกติ สำหรับ pH 5, 6, 7 และ 8 มีการสร้างสปอร์ที่อุณหภูมิ 30°C ได้ แต่น้อยกว่า ที่ อุณหภูมิ 25°C ซึ่งสามารถสร้างสปอร์ได้ดีเป็นปกติ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการรวบรวมและเก็บตัวอย่างเหือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ 110 ตัวอย่าง ในจังหวัด เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เพชรบูรณ์ สระบุรี นครราชสีมา สุโขทัย และ จังหวัดเชียงใหม่ แยกได้ 117 ไอโซเลท เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม พบว่าเป็น *P. colocasiae* ราเจริญได้ดีบนอาหาร V8, CA OMA และ PDA สร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร CA และ PDA สามารถเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหารเอียง PDA ได้อย่างน้อย 10 เดือน ทั้งในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) และ ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) แต่ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) การมีชีวิต รอดลดลงและมีการปนเปื้อนมากกว่าการเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) รานี้เจริญได้ดีที่ pH 5, 6 และ pH 7 อุณหภูมิ 25°C และอุณหภูมิ 30°C ราสร้างสปอร์ได้ดีที่ pH 5, 6 และ pH 7 อุณหภูมิ 25°C สำหรับที่ pH 10 การเจริญและการสร้างสปอร์ ลดลงเมื่อมีอุณหภูมิสูงขึ้น ทำการจัดเก็บตัวอย่างเหือก โรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างเหือกพืช ตึกอสังคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา พืช กรมวิชาการเกษตร และเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อไว้ใน culture collection

จากการทดลองนี้ ถึงแม้จะสามารถจำแนกสาเหตุโรคใบจุดตาเสือของเหือกได้ ว่าเป็น *P. colocasiae* แต่เมื่อพิจารณาใน clade ของ *P. colocasiae* ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 10 ไอโซ เลท ยังมีความหลากหลาย โดยความหลากหลายนี้อาจมีความสอดคล้องตามชนิดของพืชอาศัยที่ แตกต่าง เช่น ไอโซเลท M0193 ที่แยกได้จากใบบอนพบที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับไอโซเลทอื่น

ๆ ใน clade เดียวกัน รวมถึงความหลากหลายที่อาจเกิดจากความแตกต่างของพื้นที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งเมื่อพิจารณาภายใน clade ของรา *P. colocasiae* จะพบว่ามีความหลากหลายอย่างน้อย 5 กลุ่ม จึงน่าจะมีการนำไปศึกษาต่อไป และสามารถให้คำแนะนำเบื้องต้นในการปลูกเหือกเพื่อลดปัญหาการเกิดโรคใบจุดตาเสือ หากปลูกในสภาพที่มีอุณหภูมิประมาณ 25°C - 30°C ควรปรับค่า pH ของดินประมาณ 8-10 เพื่อลดการเจริญและสร้างสปอร์ของราสาเหตุโรค

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณพี่ ๆ และน้อง ๆ กลุ่มงานวิทยาโมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความช่วยเหลือ และความร่วมมือในการดำเนินการทดลองทุกขั้นตอน รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยโรคพืช. 2555. *คู่มือโรคผัก*. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 153 หน้า.
- มาลินี พิทักษ์ สมศรี บุญเรือง และรังสิมันต์ สัมฤทธิ์. ม.ป.ท. *การปลูกเหือก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/herb_gar/pukperk.pdf (7 มีนาคม 2562).
- ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. 2560. *ข้อมูลภาวะการผลิตพืช ปี 2559/60*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : <http://www.agriinfo.doae.go.th/year60/plant/rortor/page1.pdf> (7 มีนาคม 2562).
- สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน. ม.ป.ท. *พืชหัว/เหือก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : <http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=5&chap=5&page=t5-5-infodetail04.html> (7 มีนาคม 2562).
- อมรรัตน์ ภูไพบูลย์. 2552. *รา Phytophthora สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย*. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 74 หน้า.
- อมรรัตน์ ภูไพบูลย์. 2556. *พืชที่เป็นโรคไฟทอปทอรา*. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 189 หน้า.
- อมรรัตน์ ภูไพบูลย์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และพีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2556. การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phytophthora capsici*. หน้า 2281-2292. ใน : *ผลงานวิจัยประจำปี 2555*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- Anonymous. n.p. *Phytophthora colocasiae*. (Online). Available : http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/p_coloc.htm. (June 22, 2014)
- Brooks, F.E. 2005. *Taro leaf blight*. (Online). Available : <https://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lesson/fungi/Oomycetes/Pages/TaroLeafBlight.aspx>. (June 22, 2014)
- Cooke, D. E. L., A. Drenth, J. M. Duncan, G. Wagels, and C. M. Brasier. 2000. A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. 30: 17-32.

- Erwin, D.C and O.K.Ribeiro. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St.Paul., MN., USA. 562 p.
- Gollifer, D.E. and J.F. Brown. 1974. Phytophthora leaf blight of *Colocasia esculenta* in the British Solomon Islands. *Papua New Guinea Agricultural Journal*. 25: 6-11.
- Jackson, G.V.H., D.E. Gollifer and F.J. Newhook. 1980. Studies on the taro leaf blight fungus *Phytophthora colocasiae* in Solomon Islands: Control by fungicides and spacing. *Annals of Applied Biology*. 96 (1): 1-10.
- Jeffers, S.N. 2006. *Identifying species of Phytophthora*. (Online). Available: https://fhm.fs.fed.us/sp/sod/misc/culturing_species_phytophthora.pdf. (November 20, 2017)
- 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.
- Kroon L., Bakker FT, Bosch GBM van den, Bonants PJM and Flier WG. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 766 – 782.
- Masago, H., M. Yoshikawa, M. Fukada and N. Nakanishi. 1972. Selection inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytophthology* 67 : 425 – 428.
- Mei-ju Lin and Wen-Hsiung Ko. 2008. Occurrence of isolates of *Phytophthora colocasiae* in Taiwan with homothallic behavior and its significance. *Mycologia*. 100(5) : 727-734.
- Nath, V.S., M. Senthil, V.M. Hegde, M.L. Jeeva, R.S. Misra, S.S. Veena and M. Raj. 2013. Genetic diversity of *Phytophthora colocasiae* isolates in India based on AFLP analysis. *Biotech*. 3: 297–305.
- Raj, S.M., A.K. Mishra, K.S., M.L. Jeeva and V. Hegde. 2011. Characterisation of *Phytophthora colocasiae* isolates associated with leaf blight of taro in India. *Phytopathology and Plant Protection*. 44(6) : 581-591.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *BIOINFORMATICS*. 30(9) : 1312–1313.
- Stamps, D.J., G. M. Waterhouse, F. J. Newhook and G. S. Hall. 1990. *Revised Tabular Key to the Species of Phytophthora*. Mycological Papers No. 162. CB. International Mycological Institute. 28 p.
- Sahu, A.K., S.K. Maheshwari, S. Sriram and R.S. Misra. 2000. Effects of temperature and pH on the growth of *Phytophthora colocasiae*. *Annals of Plant Protection Sciences*. 8(1) : 112-114.

- Tsopmbeng N.G.R., J.A. Lienou, C.P. Megatche and D. A. Fontem. 2014. Effect of different pH and temperature levels on in vitro growth and sporulation of *Phytophthora colocasiae*, taro leaf blight pathogen. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 4(4) : 202-206.
- 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.

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight

No.	Sampling location			
1	สายหนึ่ง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
2			ท่ายาง	เพชรบุรี
3	ม.7 บ้านประชาสุขसार	ทุ่งสมอ	เขาค้อ	เพชรบูรณ์
4	ม.7 บ้านประชาสุขसार	ทุ่งสมอ	เขาค้อ	เพชรบูรณ์
5		วังโบลี	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
6		วังโบลี	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
7	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
8	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
9	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
10	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
11	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
12	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
13	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
14	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
15	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
16	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
17	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
18	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
19	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
20	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
21	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
22	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
23	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
24	ม.5 (บ้านวังกะโหล)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
25	ม.5 (บ้านวังกะโหล)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
26	ม.5 (บ้านวังกะโหล)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
27	ม.5 (บ้านวังกะโหล)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
28	ม.1 บ้านท่ายาง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
29	ม.7 บ้านหนองบัว	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
30	ม.7 บ้านหนองบัว	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
31	ม.9 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
32	ม.9 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
33	ม.9 สาย 2 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
34	ม.9 สาย 2 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
35	ม.4 บ้านไสค์น	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
36	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight (continue)

No.	Sampling location			
37	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
38	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
39	ม.8 บ้านหนองแวม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
40	ม.8 บ้านหนองแวม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
41	ม.8 บ้านหนองแวม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
42	ม.8 บ้านหนองแวม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
43	ม.8 บ้านหนองแวม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
44	บ้านหัวฟุ้ง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
45	บ้านหัวฟุ้ง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
46	ม.2 บ้านฟุ้งแฝก	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
47		หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
48	ม.4 บ้านโป่งกะสัง	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
49	ม.11 บ้านเขาดกน้ำ	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
50	ม.11 บ้านเขาดกน้ำ	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
51	ช. พืชรี ม.4 บ้านโป่งกะสัง	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
52	ม.3 บ้านหาดขาม	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
53	ม.7	ท่าเรือ	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
54	ม.7	ท่าเรือ	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
55	วัดเทวธรรม ม.3 บ้านศาลตึก	ท่าล้อ	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
56	ม.6 บ้านหนองสองตอน	ท่าล้อ	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
57	ม.2 บ้านห้วยนาคราช	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
58	ม.2 บ้านห้วยนาคราช	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
59	ม.2 บ้านห้วยนาคราช	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
60	ม.1 ช.12 บ้านกร่างทอง	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
61	ม.1 ช.13 บ้านกร่างทอง	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
62	วัดสันติคีรีศรีบรมธาตุ ม.5	ท่าล้อ	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
63	ม.2 บ้านสำนักคร้อ	ตะคร้อเอน	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
64	ม.1 บ้านท่ากระบือ	เกาะสำโรง	เมือง	กาญจนบุรี
65	ม.7 หนองยายทรัพย์	สระยายโสม	อู่ทอง	สุพรรณบุรี
66	ม.4 บ้านโชนัง	สระยายโสม	อู่ทอง	สุพรรณบุรี
67	บ้านทองลุ่ม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
68	บ้านทองลุ่ม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
69	บ้านทองลุ่ม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
70	ม.3 บ้านดอนบุปผา	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
71	ม.3 บ้านดอนบุปผา	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
72	ม.5 บ้านกล้วย	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight (continue)

No.	Sampling location				
73	วัดโพธิ์ศรีเจริญ ม.6 บ้านดงตาป้อม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	
74	วัดโพธิ์ศรีเจริญ ม.6 บ้านดงตาป้อม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	
75	ม. 4 บ้านปู่เจ้า	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	
76	ม. 4 บ้านปู่เจ้า	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	
77	วัดดงขี้เหล็ก ม.4 บ้านดงขี้เหล็ก	วังห้ว	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	
78	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังห้ว	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	
79	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังห้ว	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	
80	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังห้ว	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี	
81	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่	
82	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่	
83	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่	
84	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่	
85	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่	
86	ม.6	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่	
87	117/1 ม.11	หนองงูเหลือม	เมือง	นครปฐม	
88	ม.8	ห้วยหมอนทอง	กำแพงแสน	นครปฐม	
89	ม.9 บ้านหนองขี้แรด	ตะคร้ำเอน	ท่ามะกา	กาญจนบุรี	
90		วังขนาย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	
91	ม.6	วังขนาย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	
92	ม.6	วังขนาย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี	
93	ม.1 บ้านป่ากระพุ่ม	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย	
94	ม.1 บ้านป่ากระพุ่ม	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย	
95	ม.5 บ้านหนองโรง	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย	
96	ม.2 บ้านหนองเหมือง	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย	
97	ม.2 บ้านหนองเหมือง	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย	
98	ม.1 บ้านตาลพร้าว	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย	
99	ม.6 บ้านบึงงาม	นครเดิฐ	ศรีนคร	สุโขทัย	
100	ม.6 บ้านบึงงาม	นครเดิฐ	ศรีนคร	สุโขทัย	
101	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย	
102	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย	
103	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย	
104	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย	
105	ม.5 บ้านหนองสนวน	กุดโบสถ์	เสิงสาง	นครราชสีมา	
106	ม.7 บ้านหนองแดง	กุดโบสถ์	เสิงสาง	นครราชสีมา	
107	ม.7 บ้านหนองแดง	กุดโบสถ์	เสิงสาง	นครราชสีมา	
108	ม.7 บ้านหนองตุม	สุขไพบูลย์	เสิงสาง	นครราชสีมา	

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight (continue)

No.	Sampling location			
109	ม.6 บ้านหนองเข้	สุขไพบุลย์	เสิงสาง	นครราชสีมา
110	ม.6 บ้านหนองเข้	สุขไพบุลย์	เสิงสาง	นครราชสีมา



Figure 1 Symptoms of taro leaf blight on leaf and petiole



Figure 2 Symptoms of taro leaf blight on the upper leaf surface (dark brown flecks or light brown spots, circular, zonate, some with yellow halos) (left) and on the lower leaf surface, spots have a water-soaked, or dry gray appearance (right)

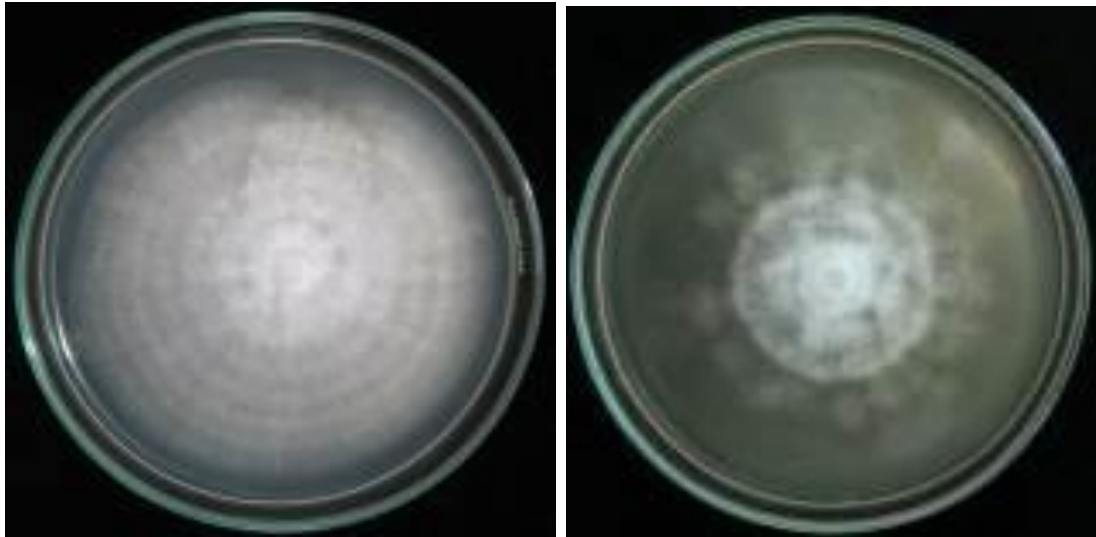


Figure 3 Colony types of *Phytophthora* isolated from taro on Potato dextrose agar (PDA) after 9 days incubation (left) and on Carrot agar (CA) after 11 days incubation (right)

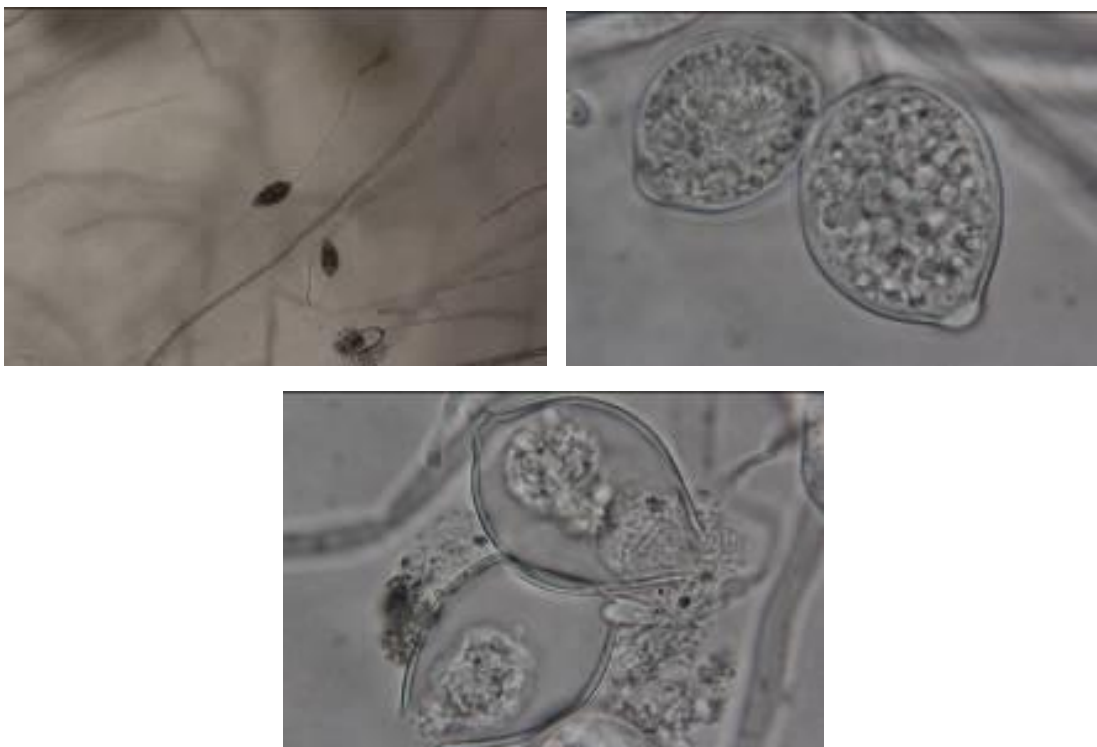


Figure 4 Microscopic view of mycelium and sporangium of *Phytophthora* on Potato dextrose agar (PDA)

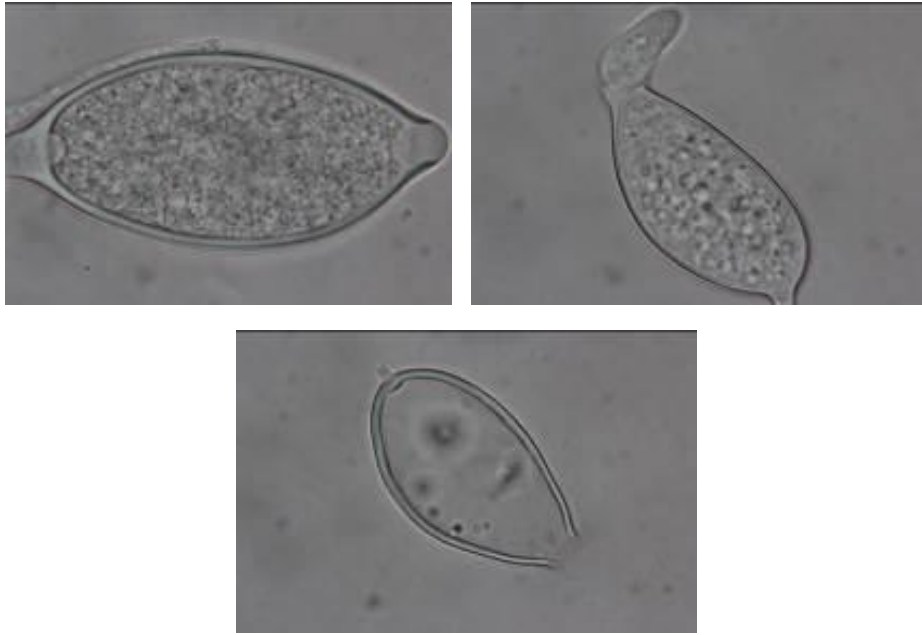


Figure 5 Microscopic view of sporangium of *Phytophthora* on Carrot agar (CA)

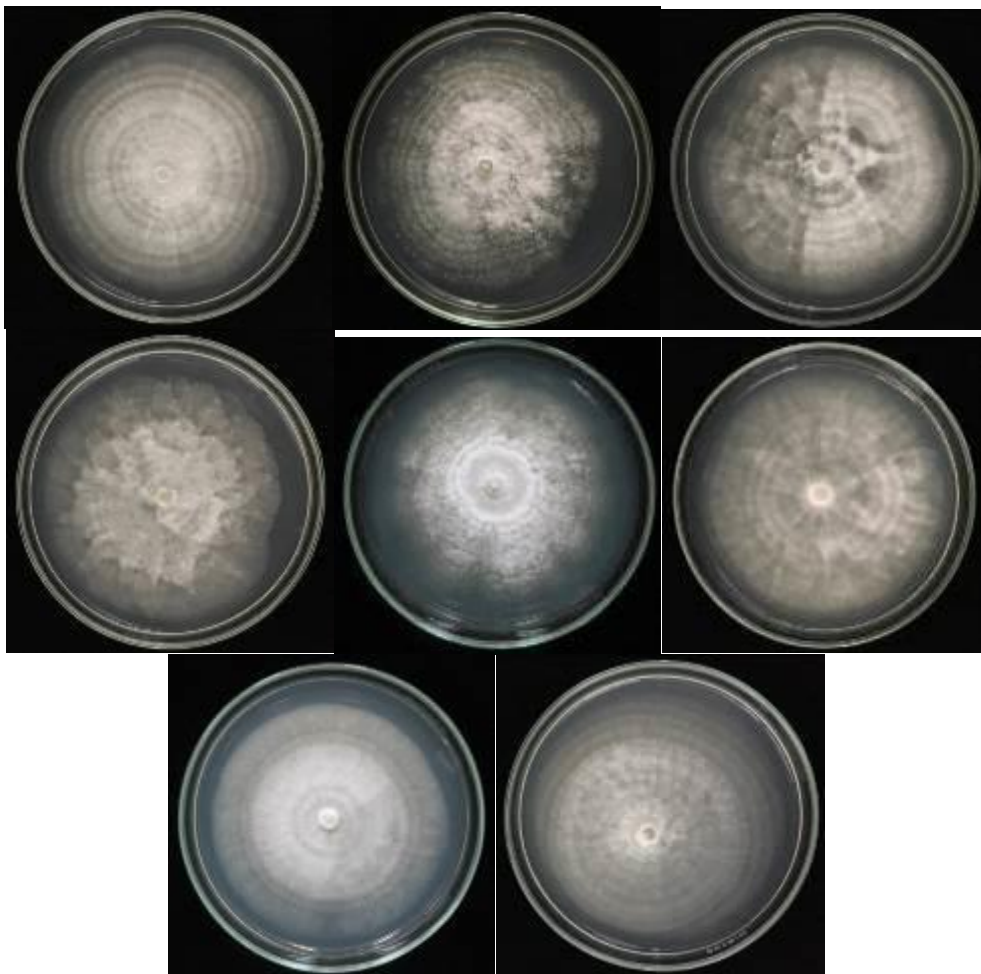


Figure 6 *Phytophthora colocasiae* isolates used for genetic characteristics

Table 2 The list of taxa used in the phylogenetic identification

Taxa	Accession No.	Host	Locations	GenBank No. ^a	
				β -tubulin	EF-1 α
<i>Phytophthora andina</i>	EC3421	<i>Solanum muricatum</i>	Ecuador	AY564045	AY564102
<i>P. arecae</i>	CBS148.88	<i>Chamaedorea seifrizzi</i> x <i>erumpens</i>	USA	AY564049	AY564105
<i>P. boehmeriae</i>	CBS291.29	<i>Boehmeria nivea</i>	Japan	AY564050	AY564106
<i>P. botryosa</i>	CBS533.92	<i>Hevea brasiliensis</i>	Thailand	AY564051	AY564107
<i>P. brassicae</i>	CBS179.87	<i>Brassica oleracea</i>	The Netherlands	AY564083	AY564139
<i>P. cactorum</i>	P6183	<i>Rubus idaeus</i>	USA	AY564052	AY564108
<i>P. cinnamomi</i>	10A6	<i>Persea americana</i>	-	AY564054	AY564110
<i>P. citricola</i>	P1817	<i>Medicago sativa</i>	South Africa	AY564055	AY564111
<i>P. citrophthora</i>	PD94/353	<i>Citrus limonium</i>	Cyprus	AY564056	AY564112
<i>P. clandestina</i>	R193	<i>Trifolium subterranea</i>	Australia	AY564057	AY564113
<i>P. colocasiae</i>	IMI368918	<i>Colocasia esculenta</i>	Malaysia	AY564058	AY564114
<i>P. colocasiae</i>	M0186	<i>C. esculenta</i>	Moo 5, Ban Nong Sa-nguan, Kut Bot Sub-district, Soeng Sang District, Nakhon Ratchasima Province, Thailand	this study	this study
<i>P. colocasiae</i>	M0187	<i>C. esculenta</i>	Huai Mon Thong Subdistrict, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province, Thailand	this study	this study

Table 2 The list of taxa used in the phylogenetic identification (continue)

Taxa	Accession No.	Host	Locations	GenBank No.	
				β -tubulin	EF-1 α
<i>Phytophthora colocasiae</i>	M0188	<i>C. esculenta</i>	Moo 6, Ban Nong Khe, Suk Phaibun Sub-district, Soeng Sang District, Nakhon Ratchasima Province, Thailand	this study	this study
<i>P. colocasiae</i>	M0189	<i>C. esculenta</i>	Moo 5, Khok Mai Sub-district, Ban Mo District, Saraburi Province, Thailand	this study	this study
<i>P. colocasiae</i>	M0190	<i>C. esculenta</i>	Moo 9, Nong Han Sub-district, San Sai District, Chiang Mai Province, Thailand	this study	this study
<i>P. colocasiae</i>	M0192	<i>C. esculenta</i>	Baan Sai Nueng, Tha Khoi Subdistrict, Tha Yang District, Phetchaburi Province, Thailand	this study	this study
<i>P. colocasiae</i>	M0193	<i>C. esculenta</i> var. <i>aquatilis</i>	Moo 7, Prachasuksan Village, Thung Samo Sub-district, Khao Kho District, Phetchabun Province, Thailand	this study	this study
<i>P. colocasiae</i>	M0194	<i>C. esculenta</i>	Moo 7, Prachasuksan Village, Thung Samo Sub-district, Khao Kho District, Phetchabun Province, Thailand	this study	this study
<i>P. colocasiae</i>	M0195	<i>C. esculenta</i>	Ban Nong Yai Sub Sra Yai Som Sub-district, U Thong District, Suphan Buri Province, Thailand	this study	this study
<i>P. colocasiae</i>	M0196	<i>C. esculenta</i>	Ban Nong Suk, Ban Krang Si Prachan District Suphan Buri Province, Thailand	this study	this study
<i>P. cryptogea</i>	HR1/ss/pp/99	<i>S. lycopersicum</i>	UK	AY564059	AY564115
<i>P. drechsleri</i>	CBS292.35	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>altissima</i>	USA	AY564060	AY564116

Table 2 The list of taxa used in the phylogenetic identification (continue)

Taxa	Accession No.	Host	Locations	GenBank No.	
				β -tubulin	EF-1 α
<i>Phytophthora erythroseptica</i>	CBS951.87	<i>S. tuberosum</i>	Australia	AY564061	AY564117
<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i> I	A2	<i>Fragaria x ananassa</i>	-	AY564062	AY564118
<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i> II	NS4	<i>Fragaria x ananassa</i>	-	AY564063	AY564119
<i>P. fragariae</i> var. <i>rubi</i> I	FVR67	<i>Rubus idaeus</i>	-	AY564064	AY564120
<i>P. fragariae</i> var. <i>rubi</i> II	FVR30	<i>R. idaeus</i>	Scotland	AY564065	AY564121
<i>P. gonapodyides</i>	P245	<i>Salix matsudana</i>	UK	AY564066	AY564122
<i>P. heveae</i>	CBS296.29	<i>Hevea brasiliensis</i>	Malaysia	AY564067	AY564123
<i>P. hibernalis</i>	CBS522.77	<i>Aquilegia vulgaris</i>	New Zealand	AY564068	AY564124
<i>P. humicola</i>	IMI302303	citrus orchard soil via citrus bait	Taiwan	AY564069	AY564125
<i>P. hybrid-Dutch</i> variant	PD92/1471	<i>Alnus cordata</i>	The Netherlands	AY564053	AY564109
<i>P. idaei</i>	R66	-	UK	AY564070	AY564126
<i>P. ilicis</i>	PD91/595	<i>Ilex aquifolium</i>	The Netherlands	AY564071	AY564127
<i>P. infestans</i> haplotype Ia	Pic99186	<i>S. stoliniferum</i>	Mexico	AY564035	AY564093
<i>P. infestans</i> haplotype IIa	Dr98004	<i>S. tuberosum</i>	-	AY564036	AY564094
<i>P. infestans</i> haplotype IIb	Can4	-	The Netherlands	AY564037	-
<i>P. inflata</i>	IMI342898	<i>Syringa</i>	UK	AY564072	AY564128
<i>P. insolita</i>	IMI288805	soil	Taiwan	AY564073	AY564129
<i>P. ipomoeae</i>	Pic99165	<i>Ipomoea longipedunculata</i>	Mexico	AY564043	AY564100
<i>P. iranica</i>	CBS374.72	<i>S. melongena</i>	Iran	AY564074	AY564130

Table 2 The list of taxa used in the phylogenetic identification (continue)

Taxa	Accession No.	Host	Locations	GenBank No.	
				β -tubulin	EF-1 α
<i>Phytophthora katsurae</i>	CBS587.05	soil	Taiwan	AY564075	AY564131
<i>P. lateralis</i>	CBS168.42	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	USA	AY564076	AY564132
<i>P. meadii</i>	CBS219.88	<i>H. brasiliensis</i>	India	AY564077	AY564133
<i>P. megakarya</i>	IMI337098	<i>Theobroma cacao</i>	Equatorial Guinea	AY564078	AY564134
<i>P. megasperma</i>	MEG23	<i>Malus sylvestris</i>	Australia	AY564079	AY564135
<i>P. mirabilis</i> type I	Pic99129	<i>Mirabilis jalapa</i>	Mexico	AY564038	AY564095
<i>P. mirabilis</i> type II	P3001	<i>M. jalapa</i>	Mexico	AY564039	AY564096
<i>P. mirabilis</i> type III	Pic99145	<i>M. jalapa</i>	Mexico	AY564040	AY564097
<i>P. mirabilis</i> type IV	G4-4	<i>M. jalapa</i>	Mexico	AY564041	AY564098
<i>P. mirabilis</i> type V	G15-4	<i>M. jalapa</i>	Mexico	AY564042	AY564099
<i>P. multivesiculata</i>	PD95/8679	<i>Cymbidium</i>	The Netherlands	AY564080	AY564136
<i>P. nicotianae</i>	P582	<i>Nicotiana tabacum</i>	USA	AY564081	AY564137
<i>P. palmivora</i>	CBS236.30	<i>Cocos nucifera</i>	India	AY564082	AY564138
<i>P. phaseoli</i>	CBS556.88	<i>Phaseolus lunatus</i>	-	AY564044	AY564101
<i>P. pseudotsugae</i>	PSE1	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	USA	AY564084	AY564140
<i>P. quininea</i>	CBS407.48	<i>Cinchona officinalis</i>	Peru	AY564085	AY564141
<i>P. ramorum</i> European-type	USA 0.13	<i>Quercus agrifolia</i>	USA	AY564092	AY564149
<i>P. ramorum</i> US-type	-	-	-	-	AY564148
<i>P. richardiae</i>	CBS240.30	<i>Zantedeschia aethiopica</i>	USA	AY564086	AY564142

Table 2 The list of taxa used in the phylogenetic identification (continue)

Taxa	Accession No.	Host	Locations	GenBank No.	
				β -tubulin	EF-1 α
<i>Phytophthora sinensis</i>	P1475	-	-	AY564087	AY564143
<i>P. sojae</i>	P6497	<i>Glycine max</i>	-	AY564047	AY564104
<i>P. sp. Spathiphyllum</i>	-	<i>Spathiphyllum</i> spp.	-	AY564091	AY564147
<i>P. syringae</i>	CBS364.52	<i>Prunus armeniaca</i>	New Zealand	AY564088	AY564144
<i>P. tentaculata</i>	CBS552.96	<i>Chrysanthemum leucanthemum</i>	Germany	AY564089	AY564145
<i>P. tropicalis</i>	PD97/11132	<i>Rosa</i> spp.	The Netherlands	AY564046	AY564103
<i>P. vignae</i>	CBS241.73	<i>Vigna sinensis</i>	Australia	AY564090	AY564146
<i>Pythium aphanidermatum</i>	PD93/51	<i>Rhododendron catawbiense</i>	The Netherlands	AY564048	-

^a Dataset referred to Kroon (2010), except the taxa obtained from this study.

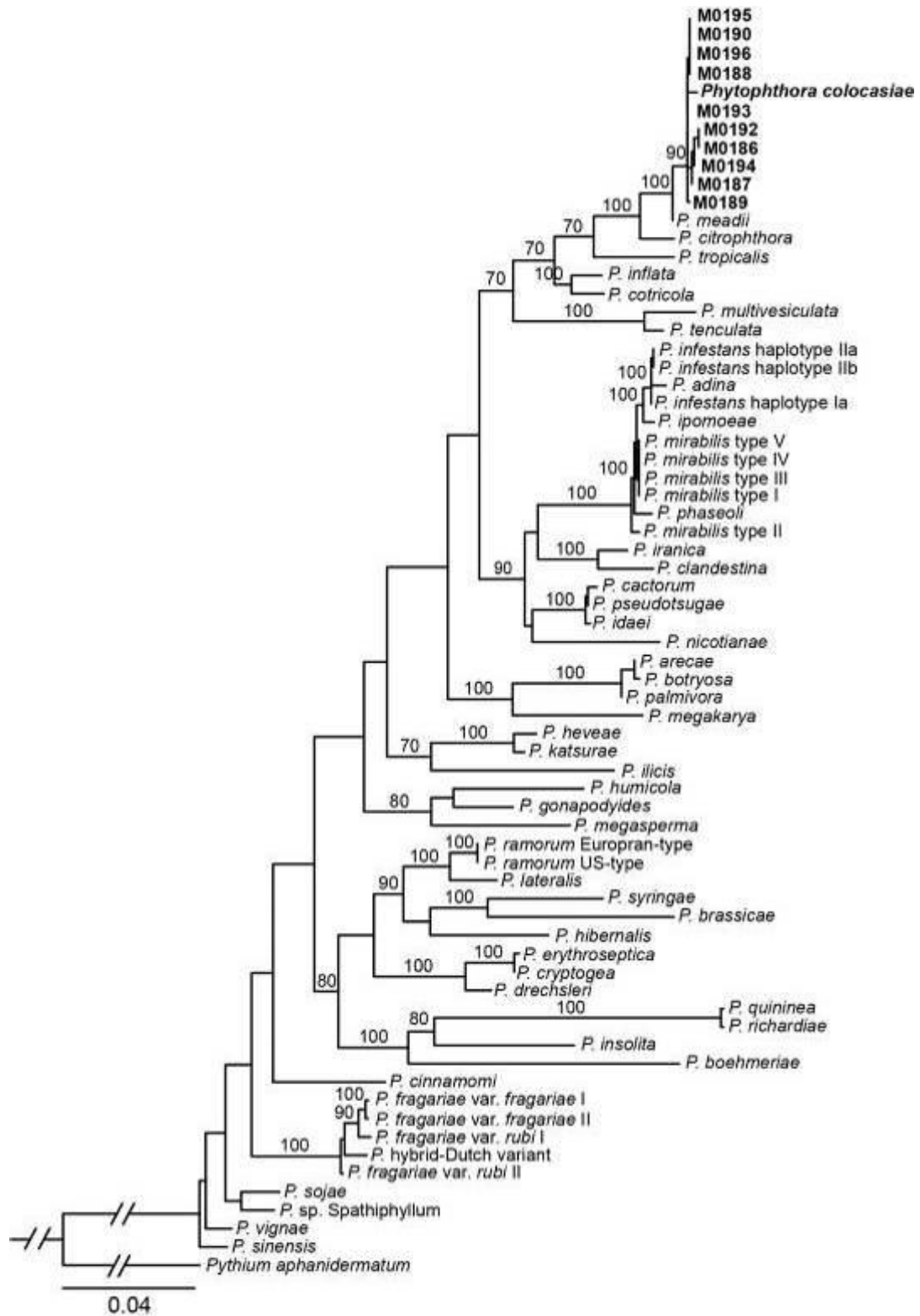


Figure 7 Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of concatenated β -tubulin2 and TEF1 gene regions. Bootstrap support values ($\geq 70\%$) from 1,000 replicates above nodes

Table 3 Effect of different media on radial growths of *Phytophthora colocasiae* at 7 and 14 day

Media	Day 7 (mm.)	Day 14 (mm.)
PDA	52.2 e ^{1/}	85.1 b
CA	64.3 c	90.0 a
OMA	58.7 d	90.0 a
CMA	78.0 a	90.0 a
V8	69.3 b	90.0 a
CV	15	4

^{1/} Mean followed by different letter in the same column are significantly different at the 5% level.

Table 4 Effect of different media on sporangium production of *Phytophthora colocasiae* at 7 day

Media	Day 7
PDA	5.01 b
CA	7.48 a
OMA	2.54 c
CMA	0.00 d
V8	1.69 c
CV	84

^{1/} Mean followed by different letter in the same column are significantly different at the 5% level.

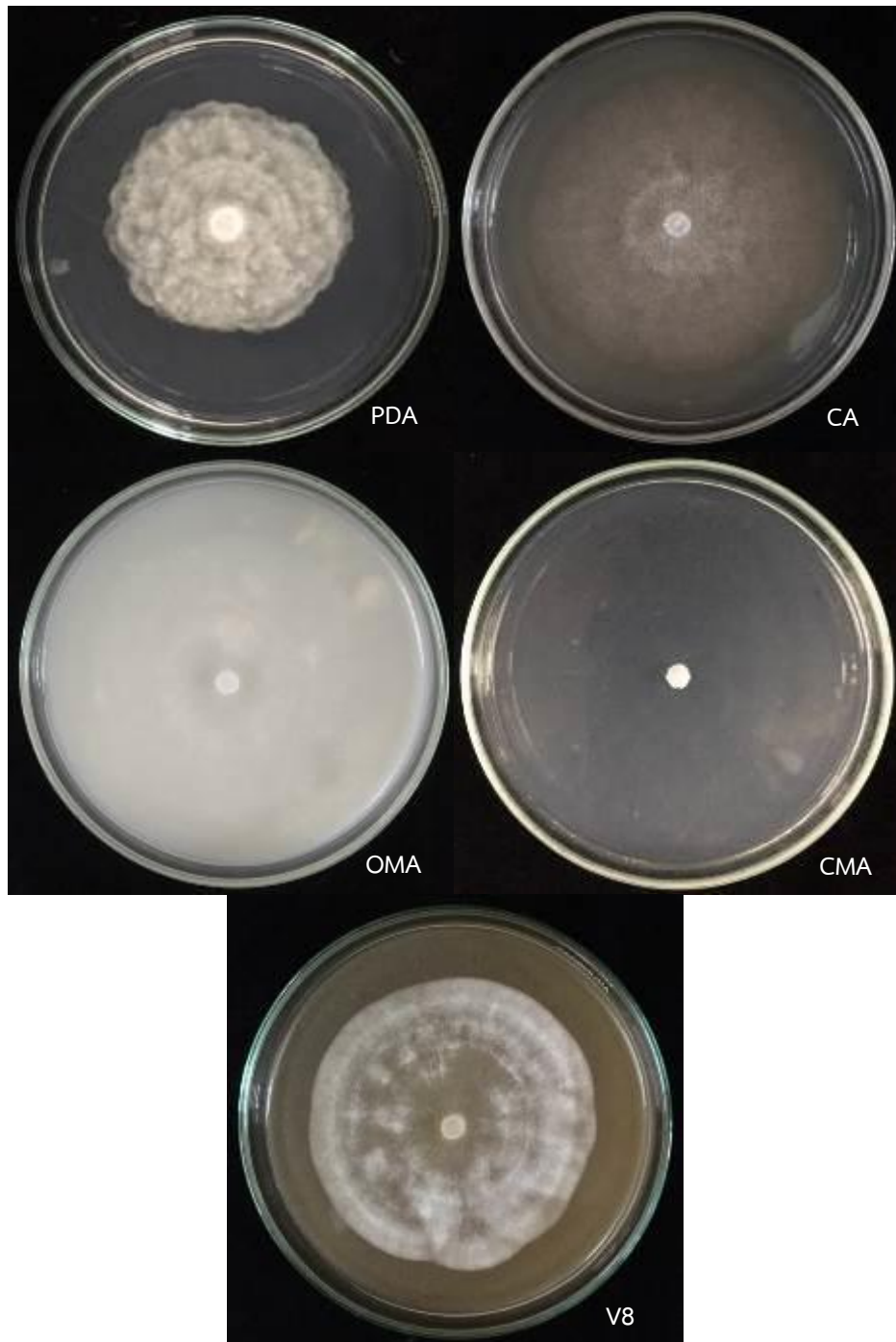


Figure 8 Colony growths of *Phytophthora colocasiae* on 5 selective media at 7 day

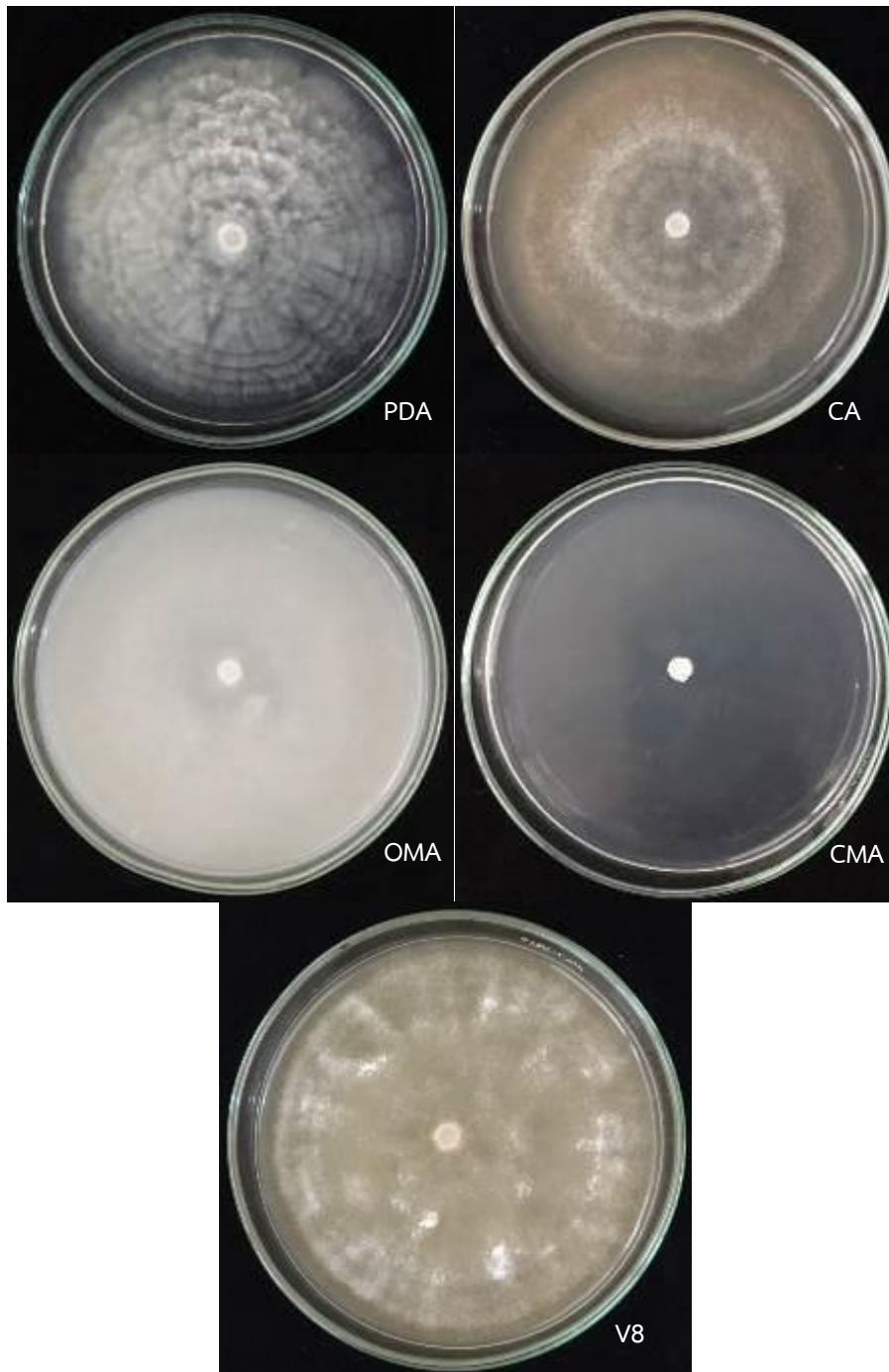


Figure 9 Colony growths of *Phytophthora colocasiae* on 5 selective media at 14 day

การจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris*
 Identification of *Curvularia* and *Bipolaris*

มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/}
 ชนินทร ดวงสอาด^{1/} สุณีรัตน์ สีมะเตี๋^{1/} อมรรักษ์ คัดใจเดียว^{1/}
^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Plant disease samples caused by *Curvularia* and *Bipolaris* had been collected from various plantations located in Chiang Rai, Chiang Mai, Phayao, Lamphun, Uttaradit, Bangkok, Nakhon Nayok, Nakhon Pathom, Phitsanulok, Phetchabun, Lop Buri, Sukhotai, Nakhon Ratchasima, Surin, Kanchanaburi, Tak, Prachuap Khiri Khan, Ratchaburi, Chanthaburi, Chachoengsao, Sakaeo, Krabi, Chumphon and Surat Thani provinces during October 2017 to September 2019. The spot symptoms which found on maize, rice, oil palm, orchid, dragon fruit and weeds were observed and 107 samples were collected for further investigation. The sixty-five isolates, which were obtained from 107 specimens, were identified based on morphological data such as colonization, conidia and conidiophores. The result showed that 65 isolates were identified as *Curvularia* and 37 isolates were identified as *Bipolaris*. The taxa in the group of *Curvularia* comprised of *C. akii*, *C. clavata*, *C. lunata*, *C. oryzae*, *C. eragrostidis* and *C. pallescens*. Whereas the taxa in the group of *Bipolaris* comprised of *B. bicolor*, *B. cactivora*, *B. maydis* and *B. oryzae*. 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*, *Bipolaris*

บทคัดย่อ

ศึกษาชนิดของราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* โดยเก็บตัวอย่างโรคพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 - กันยายน 2562 จำนวน 107 ตัวอย่างจากแปลงปลูกพืชข้าวโพด ข้าว ปาล์มน้ำมัน ถั่วเขียว ถั่วเขียว และหญ้าสนามกอล์ฟจากจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำพูน อุตรดิตถ์ กรุงเทพมหานคร นครนายก นครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ลพบุรี สุโขทัย นครราชสีมา สุรินทร์ กาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว กระบี่ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี แยกจากตัวอย่างโรคพืชด้วยวิธี tissue transplanting ได้รา *Curvularia* spp. จำนวน 65 ไอโซเลท และ *Bipolaris* spp. จำนวน 37 ไอโซเลท จำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยดูลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะ conidia และ conidiophore พบว่ารา *Curvularia* ที่ได้จากการศึกษา ได้แก่ *C. akii*, *C. clavata*, *C. lunata*, *C. oryzae*, *C. eragrostidis* และ *C. pallescens* และรา *Bipolaris* ได้แก่ *B. bicolor* *B. cactivora* *B. maydis* และ *B. oryzae* ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาจัดทำเป็นตัวอย่างแห้งเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

คำหลัก : โรคใบจุด โรคใบไหม้ *Curvularia* *Bipolaris*

คำนำ

ราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* (Teleomorph: *Cochiobolus* Drechsler) จัดอยู่ใน Division Ascomycota Class Dothideomycetes Order Pleosporales Family Pleosporales มีรายงานพบ 183 records (*Curvularia*) และ 132 records (*Bipolaris*) (Indexfungorum, 2019) เชื้อราทั้ง 2 สกุลนี้สามารถพบได้ทั่วไปและเป็นสาเหตุของโรคพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น ใบจุดปาล์มน้ำมัน ใบจุดสีน้ำตาลของข้าว โรคเมล็ดต่างข้าว โรคใบจุดข้าวสาลี โรคใบไหม้ข้าวโพด และโรคที่สำคัญในข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลี ได้แก่ โรค root rot leaf spot และ seedling blight (จิตรา, 2547; Manamgoda *et al.*, 2011; 2012 Kumar *et al.*, 2002; Knight *et al.*, 2010; Gurung *et al.*, 2013) มีรายงานพบโรคใบจุดใน switch grass เป็นครั้งแรกในทางตอนเหนือของรัฐดาโกต้า ประเทศสหรัฐอเมริกาโดยสาเหตุจากเชื้อรา *B. oryzae* พบโรคใบจุดในอ้อยเป็นครั้งแรกในประเทศจีน ซึ่งมีเชื้อรา *B. spicifera* เป็นเชื้อสาเหตุของโรค (Krupinsky *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2012) และพบมีรายงานโรคใบจุดที่สำคัญของ gladiolus โดยมีเชื้อรา *Curvularia gladioli* เป็นเชื้อสาเหตุของโรค นอกจากนี้พบเป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบไหม้ของข้าวโพดในประเทศสหรัฐอเมริกาและอังกฤษก่อให้เกิดการสูญเสียผลผลิตเป็นจำนวนมาก (Manamgoda *et al.*, 2014; Torros *et al.*, 2015; Ullstrup A.J., 1972) มีการสำรวจและศึกษาชนิดของรา *Curvularia* และ *Bipolaris* โดยนิยม (2542) ทำการศึกษาความหลากหลายของราดินและราโรคพืชในดินปลูกพืชไร่ในจังหวัดสกลนครพบว่าสามารถแยกรา *C. eragrostidis* ได้จากดินปลูกมันสำปะหลัง และดินปอแก้ว ในปี 2553 พิระวรรณ และคณะ ทำการสำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อราสกุล *Curvularia* โดยเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการไหม้และใบจุด มาทำการแยกเชื้อสาเหตุโรค พบว่าสามารถแยกได้เชื้อ *Curvularia* ทั้งหมด 45 ไอโซเลท โดยแยกเชื้อสาเหตุได้จากพืชที่เป็นโรคต่างๆ ดังนี้ โรคใบจุดข้าวโพด โรคเมล็ดต่างข้าว โรคใบจุด โรคใบไหม้เยอบีรา้ โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สับดูต้า โรคใบไหม้

วัชพืชหญ้าทาง โรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน โรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนดอกไม้สกุลหวาย โรคจุดบนกล้วยไม้สกุลออเยเดียม โรคใบแกลดดีโอลัส โรคใบไหม้ลิ้นมังกรใบจุดบานชื่น และ ฝักจุดกระเจี๊ยบแดง

ในปี 2002 Manoch *et al.* ทำการศึกษาเชื้อราสาเหตุของโรคข้าวและแยกรา *C. pallescens* ได้จากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และรายงานแยกรา *Curvularia* และ *Bipolaris* จากข้าวโพด ข้าว และหญ้าด้วยวิธี tissue transplanting พบเชื้อราจำนวน 19 ชนิด ซึ่ง 1 ใน 19 ชนิด (เลขา และคณะ, 2544) นอกจากนี้ สมศิริ และ ศศิวิมล (2011) รายงานการสำรวจโรคที่สำคัญของดอกกล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวายเอียสกุลที่ผลิตเป็นการค้า (*Dendrobium 'Earsakul'*) พบโรคสำคัญที่ดอก คือ โรคเกสรดำและแยกเชื้อราที่แยกได้ดังนี้ *A. alternata* *C. lunata* *Drechslera* sp. *Nigrospora* sp. *Fusarium* sp. และ *Cladosporium* sp. และโรคดอกสนิมแยกเชื้อราได้ดังนี้ *A. alternata* *C. eragostidis* *C. lunata* *Nigrospora* sp. และ *Drechslera* sp. จากรายงานดังกล่าวในข้างต้นพบว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถพบก่อโรคได้ในพืชทุกชนิดและก่อให้เกิดปัญหาผลผลิตลดลงและไม่ได้มาตรฐาน ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่ต้องทำการสำรวจ เก็บรวบรวม และจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* เพื่อทราบถึงการระบาดและเพื่อศึกษาหาแนวทางในการป้องกันกำจัดและลดปัญหาการเกิดโรคจากเชื้อสาเหตุทั้ง 2 ชนิดนี้ และสามารถลดการสูญเสียของผลผลิตทำให้เกษตรกรมีผลผลิตที่สามารถเก็บเกี่ยวได้มากขึ้นและเพื่อเพิ่มผลผลิตที่มีคุณภาพและสามารถส่งออกได้มากยิ่งขึ้นส่งผลดีต่อเศรษฐกิจทั้งในประเทศและต่างประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ มีด กรรไกร กรรไกรตัดกิ่ง ถุงพลาสติก กระดาษบันทึก ปากกาเคมี เครื่องระบุพืช
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เชื้อเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูเรน ปีกเกอร์ สไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์ กระจกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด ด้ามมีด
5. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อม กล้องถ่ายภาพ
6. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), ½Potato Dextrose Agar (½PDA) และ Potato Dextrose Agar (PDA)
7. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และเอธิลแอลกอฮอล์ 75%
8. อุปกรณ์ทำตัวอย่างแห้ง ได้แก่ กระดาษหนังสือพิมพ์ ไม้อัดตัวอย่าง กระดาษฟาง และซองกระดาษสำหรับใส่ตัวอย่าง

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกพืชชนิดต่าง ๆ เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และราก จากแปลงปลูกพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าวโพด ข้าว ข้าวฟ่าง อ้อย ปาล์มน้ำมัน แก้วมังกร และกล้วยไม้ เป็นต้น จากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย เช่น จังหวัดนครราชสีมา สุรินทร์ เพชรบูรณ์ ลพบุรี สระบุรี พิษณุโลก สุโขทัย เชียงใหม่ เชียงราย กระบี่ และสุราษฎร์ธานี เป็นต้น ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ ข้อมูลพืช

ภูมิศาสตร์ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดหีบตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอภิศรีศรีการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- แยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือโคนิเดีย (conidia) โดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยส่วนของรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมามาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แขนในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซึบบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำชิ้นพืชไปวางบนอาหาร 1/2PDA PDA หรือ WA บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน เมื่อพบเส้นใยของราที่เจริญออกจากชิ้นพืชให้ทำการแยกราบริสุทธิ์เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และเก็บรักษาสายพันธุ์ราเพื่อศึกษาต่อไป

3. การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษารูปร่างลักษณะของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย ก้านชูสปอร์ (conidiophores) โคนิเดีย (conidia) และโครงสร้างอื่น ๆ เช่น fruiting body, ตำแหน่งการเกิดของสปอร์ เป็นต้น โดยการใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยโครงสร้างของรามาวางบนแผ่นสไลด์และหยดด้วยน้ำ หรือ shear's solution ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์และนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี ขนาด และสี ลักษณะของเส้นใย ลักษณะของก้านชูสปอร์ และลักษณะของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ

- จำแนกชนิดของรา ตามเอกสารของ Ellis (1971, 1976)

4. เก็บรักษาสายพันธุ์ราและตัวอย่างแห้ง

เก็บรักษาราที่แยกได้ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection และเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอภิศรีศรีการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกพืชต่าง ๆ

เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะอาการจุดหรือไหม้ของพืชต่าง ๆ จำนวน 107 ตัวอย่าง จากจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำพูน อุตรดิตถ์ กรุงเทพมหานคร นครนายก นครปฐม

พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ลพบุรี สุโขทัย นครราชสีมา สุรินทร์ กาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว กระบี่ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี (Table 1 และ Figure 1) ตัวอย่างแห่งโรคพืชที่ได้จากการศึกษา จำนวน 107 ตัวอย่าง นำไปเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

การแยกและจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

แยกเชื้อราสาเหตุของโรคจากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคใบจุดและใบไหม้และศึกษา ลักษณะของทางสัณฐานของเชื้อราที่แยกได้ โดยศึกษาลักษณะของโคโลนี ขนาด และสี ลักษณะของเส้นใย ลักษณะของก้านชูสปอร์ และลักษณะของโคนิเดีย โดยเปรียบเทียบกับเอกสารการจำแนกเชื้อรา Dematiaceous hyphomycetes และ more Dematiaceous hyphomycetes ของ Ellis (1971, 1976) และ The Genera of Hyphomycetes ของ Seifert *et al.* (2011) สามารถจำแนกชนิดได้ดังนี้ *Curvularia* spp. จำนวน 65 ไอโซเลท 6 ชนิด ได้แก่ *Curvularia akii*, *C. clavata*, *C. lunata*, *C. oryzae*, *C. eragrostidis* และ *C. pallens* ราสกุล *Bipolaris* spp. จำนวน 37 ไอโซเลท 4 ชนิด ได้แก่ *B. bicolor* *B. cactivora* *B. maydis* และ *B. oryzae* (Figure 2 และ 3)

Scientific Classification

Kingdom:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Class:	Dothideomycetes
Subclass:	Pleosporomycetidae
Order:	Pleosporales
Family:	Pleosporaceae
Genus:	<i>Curvularia</i> , <i>Bipolaris</i>

Curvularia akii (Tsuda & Ueyama)

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเทา สร้างก้านชูสปอร์ (conidiophore) แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม มีสีน้ำตาล โคนิเดีย (conidia) มีลักษณะทรงกระบอกตรงหรือโค้งเล็กน้อย ผนังเรียบ มีผนังกั้น (septate) 3 เส้น มีสีน้ำตาล เซลล์บริเวณกลางมีสีเข้มกว่าบริเวณหัวท้าย เซลล์ที่ 3 จากฐานจะมีลักษณะโป่งพองและมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่น สามารถแยกได้จากโรคใบไหม้ข้าวโพดเช่นเดียวกับการศึกษาของกัญญา (2545) ที่ทำการแยกราชนิดนี้จากข้าวโพดที่มีอาการใบไหม้

Curvularia clavata Jain

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีน้ำตาลดำ สร้างก้านชูสปอร์ลักษณะตรงหรือโค้งงอ ผนังเรียบ สีน้ำตาล โคนิเดียมี ลักษณะเป็นรูปกลมรีคล้ายไข่ (elilipsoid) ผนังเรียบ มีสีน้ำตาลเข้ม มีผนังกั้น 3 เส้น มี 4 เซลล์ โดยเซลล์ส่วนกลางมีสีเข้มกว่าเซลล์บริเวณหัวท้าย แยกได้จากใบจุดและใบไหม้ข้าวโพดเช่นเดียวกับการศึกษาของกัญญา (2545) แยกราชนิดนี้โดยแยกจากข้าวโพดที่มีอาการใบไหม้และหญ้าพะดองเขียวที่มีอาการใบจุด

Curvularia eragrostidis (P. Henn.) J. A. Meyer (Figure 4)

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเทาเข้มจนถึงดำ สร้างก้านชูสปอร์ผนังเรียบ สีน้ำตาล โคนิเดียมีรูปร่างคล้ายถังเบียร์ (barrel shaped) เซลล์ที่อยู่ตรงกลางโป่งออก ผนังเรียบ มี 4 เซลล์

มีสีน้ำตาลเซลล์บริเวณปลายทั้ง 2 ข้างของ conidia มีสีอ่อนกว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณตรงกลาง และผนังกันที่อยู่กึ่งกลางของโคนิเดียมีสีเข้มจนถึงดำมองเห็นชัดเจนซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเชื้อราชนิดนี้โคนิเดียเกิดเป็นกลุ่มบริเวณปลายก้านชูสปอร์ แยกได้จากโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้เช่นเดียวกับงานวิจัยของพีระวรรณ และคณะ (2553) มีรายงานพบเชื้อราชนิดนี้ได้ทั้งในดินและพืชหลายชนิด เช่น อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เป็นต้น (นิยม, 2542; Domsch *et al.*, 1993) นอกจากนี้พบมีการเกิดโรคผลเน่าของสับปะรดสาเหตุจากเชื้อรา *C. eragrostidis* เป็นครั้งแรกในประเทศบราซิล (Ferreira *et al.*, 2014)

Curvularia lunata (Wakker) Boedijn (Figure 5)

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีตาลเข้มจนถึงดำ สร้างก้านชูสปอร์ เกิดแบบเดี่ยว ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล โคนิเดียมีลักษณะโค้งเล็กน้อย ผนังเรียบ มีผนังกัน 3 เส้น และมี 4 เซลล์ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาลเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย แยกจากใบจุดข้าวโพด เมล็ดต่างข้าว และหญ้าสนามกอล์ฟเช่นเดียวกับรายงานของ พีระวรรณ และคณะ (2553) แยกราชนิดนี้ได้จาก โรคใบจุดข้าวโพด โรคเมล็ดต่างข้าว โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สับปะรด โรคใบจุดหน้าวัว โรคใบไหม้เยอร์บีรา โรคใบไหม้หญ้าขน นอกจากนี้พบเชื้อราชนิดนี้ในดินปลูกอ้อย ปอ และมันสำปะหลัง สถานีทดลองพืชไร่สกลนคร จังหวัดสกลนคร และพบเป็นราเอนโดไฟท์ในใบ *Globba* sp. จากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา (นิยม, 2542; Kokaew, 2011)

Curvularia oryzae Bugnicourt (Figure 6)

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเทาเข้ม สร้างก้านชูสปอร์ เกิดแบบเดี่ยว ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล โคนิเดียมีลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย ผนังเรียบ มีผนังกัน 3 เส้น และมี 4 เซลล์ มีสีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลปนดำ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาลเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย แยกได้จากใบจุดและใบไหม้ของปาล์มน้ำมันเช่นเดียวกับการวิจัยของ Sunpapoa and Kittimorakul (2014) รายงานรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของปาล์มน้ำมัน

Curvularia pallescens Boedijn

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีดำปนเขียว สร้างก้านชูสปอร์ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล โคนิเดียมีลักษณะเป็นทรงรี ปลายเซลล์งอเล็กน้อย หัวท้ายมน ผนังเรียบ มีผนังกัน 3 เส้น และมี 4 เซลล์ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาลอ่อนแต่เข้มกว่าเซลล์หัวท้าย แยกได้จากข้าวโพด มีรายงานพบในกล้วยไม้ดินพันธุ์เหลืองพิสมร จังหวัดตรัง ข้าวโพด หญ้าขน จังหวัดนครราชสีมา หญ้าตีนกา หญ้าปากควาย จังหวัดนนทบุรี หญ้าพะดอเจียว และหญ้าม้าเลเซีย จังหวัดกรุงเทพฯ (กัญญา, 2545; คณิงนิจ, 2545)

Bipolaris bicolor (Mitra) Shoemaker (Figure 7)

Synonym:

≡ *Helminthosporium bicolor* Mitra, 1931. Transactions of the British Mycological Society 15 (3-4): 286.

≡ *Drechslera bicolor* (Mitra) Subram. & B.L. Jain, 1966, Current Science 35 (14): 354.

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีน้ำตาล สร้างก้านชูสปอร์ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล โคนิเดียมีลักษณะทรงกระบอกปลายมน มีสีน้ำตาลทอง ผนังกันแบบ pseudoseptate มี 7-8 เซลล์ บริเวณ

เซลล์หัวท้ายมีผนังกันสีเข้มและเซลล์สีอ่อนกว่าบริเวณอื่น มี hilum อยู่ที่ฐานของโคนเดี่ยว เมื่อให้ความชื้น 24 ชั่วโมง เส้นใยจะงอกออกมาบริเวณหัวและท้ายเซลล์

***Bipolaris cactivora* (Petr.) Alcorn (Figure 8)**

Synonymy:

≡ *Helminthosporium cactivora* Petr., 1931, Gartenbauwissenenschaft 5: 226.

≡ *Drechslera cactivora* (Petr.) M.B. Ellis, 1971, Dematiaceous Hyphomycetes: 432.

โคโลนีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเทาเข้ม สร้างก้านชูสปอร์มีสีน้ำตาล ผนังเรียบ โคนเดี่ยวมีลักษณะทรงกระบอกแหลมปลายมน มีสีน้ำตาล ผนังกันแบบ pseudoseptate 2-4 เส้น มี 3-5 เซลล์ แยกได้จากผลแก้วมังกร และมีรายงานเป็นโรคที่สำคัญทำให้เกิดผลเน่าของแก้วมังกรในประเทศเวียดนาม (He *et al.*, 2012)

***Bipolaris maydis* Y. Nisik & (Miyake) Shoemaker**

Synonymy:

≡ *Helminthosporium maydis* Y. Nisik. & Miyake, 1926, Ber. Ohara Inst. landw. Biol.: 243.

≡ *Drechslera maydis* (Y. Nisik. & C. Miyake) Subram. & B.L. Jain, 1966, Current Science 35 (14): 354.

โคโลนีสบนอาหาร PDA มีสีเทาอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม สร้างก้านชูสปอร์มีผนังเรียบ สีน้ำตาล จนถึงน้ำตาลเข้ม โคนเดี่ยวมีลักษณะโค้งงอ ผนังเรียบ มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงน้ำตาลทองเข้ม มี 5-11 เซลล์ และมี hilum อยู่บริเวณส่วนฐาน แยกได้จากโรคใบไหม้ข้าวโพดเช่นเดียวกับรายงานของ กัญญา (2545) แยกเชื้อชนิดนี้จากใบข้าวโพดที่เป็นโรคใบไหม้

***Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker**

Synonym:

≡ *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan, 1900, Bulletin de l'Institut Botanique de Buitenzorg 6: 11.

≡ *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subram. & B.L. Jain, 1966, Current Science 35(14): 354.

≡ *Luttrellia oryzae* (Breda de Haan) Gornostai, Vodorosli, 1978, Griby I Mkh Dal'nego Vostoka: 81.

≡ *Helminthosporium macrocarpum* Grew., 1825, Scott. Cypt. Fl. (Edinburgh): pl. 148.

โคโลนีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเทาจนถึงเทาดำ สร้างก้านชูสปอร์มีลักษณะตรงหรือโค้งงอ ผนังเรียบ สีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลเข้ม โคนเดี่ยวมีลักษณะโค้งงอ แบบ fusoid หรือ obclavate ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล มี 6-14 เซลล์ แยกได้จากโรคเมล็ดต่างข้าวเช่นเดียวกับรายงานของ กัญญา (2545) แยกเชื้อชนิดนี้จากใบและเมล็ดข้าว

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคพืชในช่วงเดือนกันยายน 2559 - กันยายน 2562 จากจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำพูน อุตรดิตถ์ กรุงเทพมหานคร นครนายก นครปฐม พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ลพบุรี สุโขทัย นครราชสีมา สุรินทร์ กาญจนบุรี ตาก ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว กระบี่ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี จำนวน 107 ตัวอย่างและแยกได้จากตัวอย่างโรคพืชได้ จำนวน 102 ไอโซเลท ดังนี้ *Curvularia* spp. จำนวน 65 ไอโซเลท 6 ชนิด ได้แก่ *Curvularia akii*, *C. clavata*, *C. lunata*, *C. oryzae*, *C. eragrostidis* และ *C. pallescens* ราสกุล *Bipolaris* spp. จำนวน 37 ไอโซเลท 4 ชนิด ได้แก่ *Bipolaris bicolor* *B. cactivora* *B. maydis* และ *B. oryzae* และนำตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาจัดทำเป็นตัวอย่างแห้ง จำนวน 107 ตัวอย่าง เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ กลุ่มงานวิทยาโมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูลในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กัญญา เจริญไทย. 2545. เชื้อรา *Dematiaceous Hyphomycetes* บนข้าว ข้าวโพด วัชพืชใบแคบ และดินบริเวณราก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 163 หน้า.
- คะนิงนิจ บุศราคำ. 2545. โรคของกล้วยไม้ดิน ราเอนโดไฟท์บนใบและราก และราดินบริเวณรอบราก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 245 หน้า.
- จิตรา เกาะแก้ว. 2547. ความหลากหลายของเชื้อราบนวัชพืชที่เป็นโรคในแปลงผักและแนวทางการนำมาใช้ควบคุมวัชพืชทางชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 150 หน้า.
- นิยม สุตเพราะ. 2542. ความหลากหลายของราดินและราโรคพืชในดินปลูกพืชไร่ จังหวัดสกลนคร. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, 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.
- สมศิริ แสงโชติ และศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์. 2011. โรคที่สำคัญของดอกกล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวายเอื้องสกุลที่ผลิตเป็นการค้า. *วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร* 42:1(พิเศษ) :315-318.
- Domsh, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 1993. *Compendium of soil fungi*. Vol. 2. 2nd ed Academic Press, London. 405 p.
- 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.

- 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):1,277.
- Gurung, S., B. N. Mahto, S. Gyawali and T. B. Adhikari. 2013. Phenotypic and molecular diversity of *Cochlibolus sativus* populations from wheat. *Plant Disease*. 97:62-73.
- He, P.F., H. Ho, X.X. Wu, M.S. Hou and Y.Q. He. 2012. *Bipolaris cactivora* causing fruit rot of dragon fruit imported from Vietnam. *Plant Pathology & Quarantine* - Doi 10.5943/ppq/2/1/5. 31-35.
- Indexfungorum. 2019. *Names record*. (Online). Available. <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp> (February 19, 2019)
- Kokaew, J. 2011. *Diversity and bioactivities of endophytic fungi from Thai forests*. Ph.D.Thesis, Kasetsart University. 202 p.
- Manamgoda, D. S. , L. Cai, A. H. Bahkali, E. Chukeatirote and K. D. Hyde. 2011. *Cochlibolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity*. 51(1): 3-42.
- 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* - *Cochlibolus* - *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*. Nov. 5-8, 2002. Chiang Mai, Thailand.
- Knight, N. L., G. J. Platz, A. Lehmensiek and M. W. Sutherlan. 2010. An investigation of genetic variation among Australian isolates of *Bipolaris sorokiniana* from different cereal tissues and comparison of their abilities to cause spot blotch on barley. *Australasian Plant Pathology*. 39:207-216.
- Krupinsky, J. M., J. D. Berdahl, C. L. Schoch and A. Y. Rossman. 2004. Leaf spot on switch grass (*Panicum virgatum*), symptoms of a new disease caused by *Bipolaris oryzae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26(30): 371-378.
- Kumar, J. , P. Schäfer, R. Hückelhoven, 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.

- Lin, S.H., C.H. Huang, Z.Y. Deng, M.X. Yan, W.H. Huang, J.J. Wei and Z.Q. Qin. 2012. First report of leaf spot disease on sugarcane caused by *Bipolaris spicifera* in China. *Australasian Plant Disease*. 7: 51-53.
- 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.
- 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.

Table 1 Plant disease samples collected from different location during October 2017 to September 2019

Common name	Scientific name	location		
		Province	District	Sub-district
Dendrobium	<i>Dendrobium</i> spp.	Nakhon Pathom	Bang Len	Naraphirom
				Khlong Nok
				Krathung
		Nakhon Nayok	Ongkharak	Khlong Yai
		Kanchanaburi	Tha Maka	Nong lan
Dragon fruit		Bangkok	Don Mueang	Don Mueang
Rice	<i>Oryza sativa</i>	Phetchabun	Khao Kho	Khao Kho
		Surin	Mueang Surin	Bu Ruesi
		Sukhothai	Thung Saliam	Khao Kaeo Si Sombun
Maize	<i>Zea mays</i>	Lop Buri	Chai Badan	Chai Narai
		Phetchabun	Mueang Phetchabun	Na Ngua
			Khao Kho	Khao Kho
				Thung Samo
		Phayao	Chiang Muan	Sa
			Taki	Phop Phra
		Chiang Mai	Mae Ai	Tha Ton
			Chai Prakan	
			San Pa Tong	Thung Satok
			Amphoe San Sai	Nong Han
			Chiang Rai	Mueang Chiang Rai
			Mae Suai	
			Mae Lao	
			Mae Chan	Pa Tueng
Lamphun	Li			
Uttaradit	Phichai	Tha Sak		
Sukhothai	Sukhothai Sukhothai	Pak Khwae		
	Sawankhalok	Wang Mai Khon		

Table 1 Plant disease samples collected from different location during October 2017 to September 2019 (Continute)

Common name	Scientific name	location			
		Province	District	Sub-district	
Maize	<i>Zea mays</i>	Phitsanulok	Phrom Phiram	Matong Tha Chang	
			Bang Rakam	Plak Raet	
			Mueang Phitsanulok	Ban Pa	
		Nakhon Ratchasima	Sikhio	-	
			Pak Chong	-	
		Nakhon Pathom	Kamphaeng Sae	Kamphaeng Sae	Thung Bua
					Kanchanaburi
		Sa Kaeo Chantaburi	Prachuap Khiri Khan	Tha Muang	Wang Khanai
				Aranyaprathet	Thap Phrik
				Kui Buri	Kui Buri
Palm oil	<i>Elaeis guineensis</i>	Surat Thani	Kanchanadit	Tha U-thae	
			Tha Chana	Khan Thuli	
		Krabi	Mueang Surat-Thani	Khlong Noi	
			Nuea Khlong	Pakasai	
		Chumphon	Mueang Krabi	Khao Khram	
			Khlong Thom	Khlong Thom	
Coconut	<i>Cocos nucifera</i>	Surat Thani	Kanchanadit	Tha U-thae	
			Tha Chana	Khan Thuli	
		Ratchaburi	Bang Phae	Wang Yen	
		Chumphon	Sawi		
Manila grass	<i>Zoysia sp.</i>	Chachoengsao	-	-	
Hybrid bermuda grass (Tifdwarf grass)	-	Chonburi	-	-	



Figure 1 Plant disease samples : disease symptom on various plant from different location

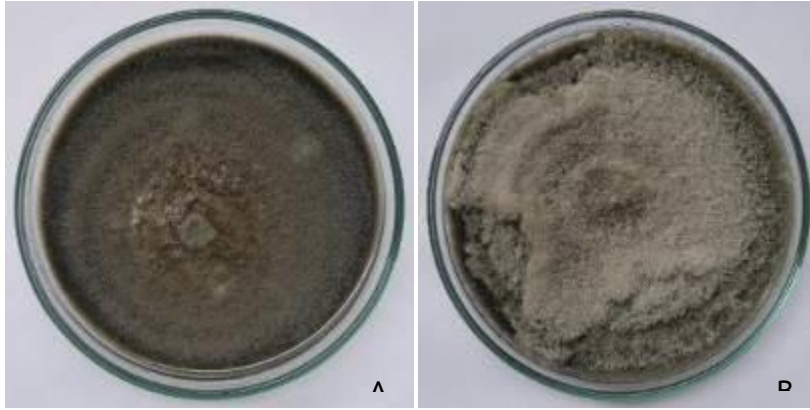


Figure 2 Colonies of A) *Curvularia* and B) *Bipolaris* on PDA at 14 days

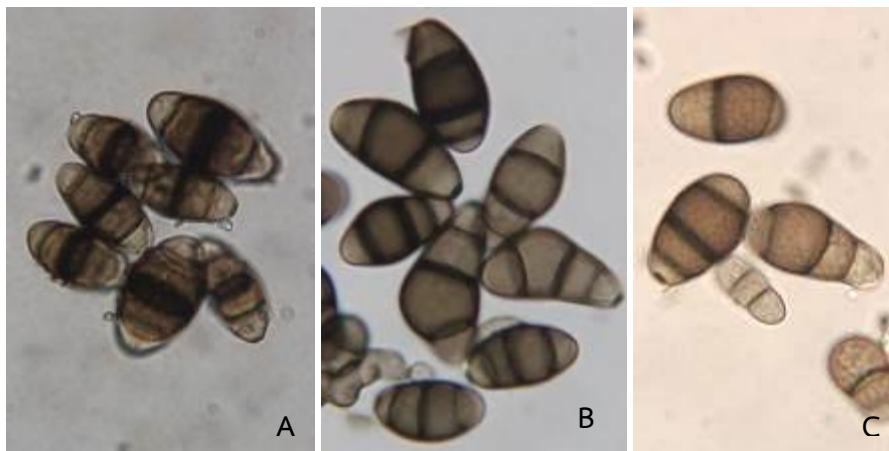


Figure 3 Conidia of the genus *Curvularia* isolated from: A) Flower rusty spot of dendrobium, B) Leaf spot of maize and C) Leaf spot of manila grass

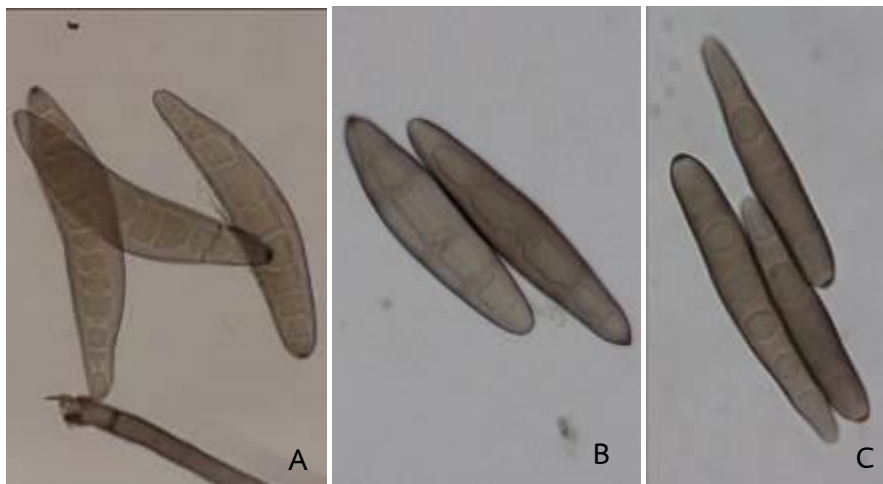


Figure 4 Conidia of the genus *Bipolaris* isolated from: A) Leaf spot of coconut, B) Northern Corn Leaf Blight of maize and C) Fruit rot of dragon fruit



Figure 4 *Curvularia eragrostidis* :
 A) Symptom of flower rusty spot disease on orchid flower
 B - D) Conidiophores and conidia
 E - H) Conidia

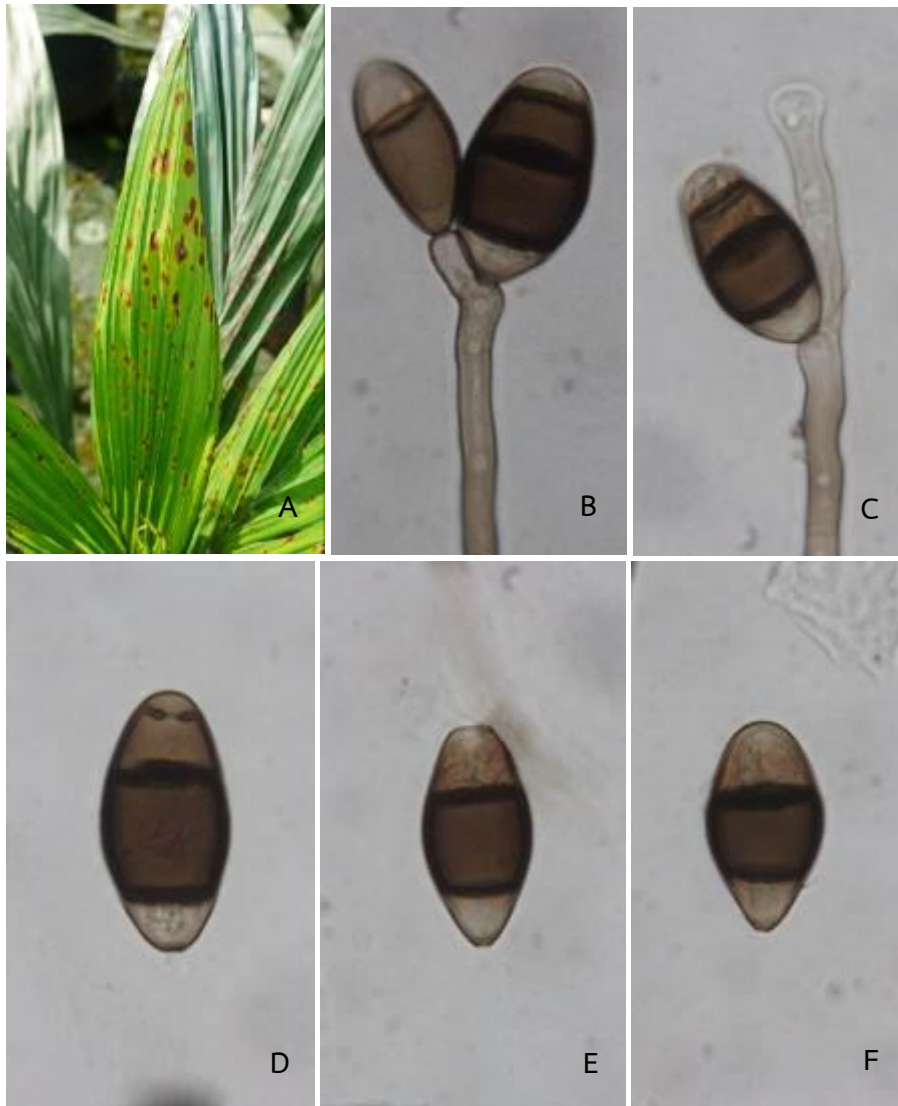


Figure 5 *Curvularia lunata* :
 A) Symptom of dirty panicle disease on rice
 B - C) Conidiophores and conidia
 D - I) Conidia



Figure 6 *Curvularia oryzae* :
 A) Symptom of leaf spot on oil palm leaf
 B - D) Conidiophores and conidia
 E - F) Conidia



Figure 7 *Bipolaris bicolor* :
 A - B) Symptom of blight on maize
 C - H) Conidia



Figure 8 *Bipolaris cactivora* : A) Symptom of fruit rot on dragon fruit
 B and C) Conidiophores and conidia on dragon fruit
 D and E) Conidiophores and conidia
 F and G) Conidia

การจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*
ทางสัณฐานวิทยาในไม้ประดับส่งออก
The Taxonomic Classification of the Genus *Radopholus* in
export ornamental plants.

จิตติยา สารพัฒน์ ไตรเดช ช่ายทอง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The genus *Radopholus* found in exported ornamental plants, especially aquatic plants and Zanzibar gem (*Zamioculcas zamiifolia*), the research team began to diagnose plant-parasitic nematodes from September 2017 to October 2019, a total of 2,583 population samples. The results showed the genus *Radopholus* had been detected in 26 populations which were 1.0 % of all samples. Morphological comparison of 28 female samples with diagnostics of the EPPO PM 7/88 (1): *Radopholus similis*. Species is *Radopholus similis*. And the experiment showed *R. similis* has little effect on the export of aquatic plants and Zanzibar gem by the monitory process for exportation ornamental and aquatic plant populations sent for nematode diagnostics before exporting every 2 months. This experiment was found only 9 aquatic plants which was had had *R. similis*. This research team used to diagnose plant-parasitic nematodes from year 2013 to present 2019 found that moreover 85 species of aquatic plants and Zanzibar gem never found *R. similis*. In this study, they have plants from eleven genera within the Araceae, Poaceae, Brassicaceae, Apiaceae families that are risk of encountering *R. similis*. because they had reported this nematode has been observed infecting in these families (e.g. The family Araceae consists of *Cryptocoryne* spp., *Pistia* spp., *Spathiphyllum* spp., *Syngonium* spp., and *Zamioculcas zamiifolia*. The family Poaceae included of only *Cyperus* spp. The family Brassicaceae consists of only *Rorippa* spp. The family Apiaceae contains *Hydrocotyle* spp., *Chlorophytum* spp. and *Hydrocotyle* spp.) but they have never been found burrowing nematode. This result showed that many factors that cause of *R. similis* is very few the impact on these plants exporting. Because it is possible that more than, 85 species of aquatic plants and Zanzibar gem are not the main plant hosts of *R. similis* and they are not particularly reported to be susceptible to *R. similis*. Combined with the good management

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-60-60

of enterprise, such as cleaning and disinfection of facilities, growing medium and tool used by aseptic technique, attention of the workers to prevent the spread of infection, disinfecting and destroying the accumulation of pathogens etc. Especially, the cooperation with the Plant Protection Research and Development Office, DOA to process monitor for exportation plants for nematode diagnostics before exporting every 2 months. This research can concluded that *R. similis* nematode has a low impact on exportation of aquatic plants and Zanzibar gem.

บทคัดย่อ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมียจำนวน 28 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับการวินิจฉัยของ EPPO PM 7/88 (1) : *Radopholus similis* พบว่าเป็นไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* เพียงชนิดเดียว และจากการเก็บตัวอย่างไม้ประดับส่งออก โดยเฉพาะพรรณไม้น้ำ และกวักรมรด ผลการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำ และ กวักรมรดเพื่อการส่งออกนี้ คณะวิจัยได้เริ่มดำเนินการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชตั้งแต่วันที่ 2560 ถึง ตุลาคม 2562 ซึ่ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 2,583 กลุ่มประชากรตัวอย่าง พบไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จำนวน 26 กลุ่มประชากร คิดเป็นร้อยละ 1.0 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด จากผลการทดลองพบว่า *R. similis* มีผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อการส่งออกของพรรณไม้น้ำ และกวักรมรด โดยการติดตามสุ่มกลุ่มประชากรตัวอย่างพืชเพื่อตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชก่อนการส่งออกทุก 2 เดือน พบว่ามีพืชเพียง 9 ชนิดที่พบ *R. similis* และจากการตรวจติดตามจากปี 2556 ถึงปัจจุบัน 2562 พบว่าพรรณไม้น้ำกว่า 85 ชนิด และกวักรมรด ไม่เคยพบไส้เดือนฝอยชนิดนี้ ในพืชวงศ์ที่มีความเสี่ยงที่จะพบ *R. similis* เนื่องจากมีรายงานการเป็นพืชอาศัยหลายวงศ์ เช่น พืชวงศ์บุก (Arecaceae) ได้แก่ *Cryptocoryne* spp., *Pistia* spp., *Spathiphyllum* spp., *Syngonium* spp., และกวักรมรด (*Zamioculcas zamiifolia*) วงศ์หญ้า (Poaceae) เช่น *Cyperus* spp. วงศ์ผักกาด (Brassicaceae) เช่น *Rorippa* spp. วงศ์ผักชี (Apiaceae) เช่น *Hydrocotyle* spp., *Chlorophytum* spp. และ *Hydrocotyle* spp. เป็นต้น พบว่าไม่เคยพบไส้เดือนฝอย Burrowing nematode นี้ ผลการทดลองนี้พบว่ามีหลายปัจจัยที่ทำให้ไส้เดือนฝอย *R. similis* มีผลกระทบน้อยกับการส่งออกพืชเหล่านี้ เพราะเป็นไปได้ว่าพรรณไม้น้ำกว่า 85 ชนิด และกวักรมรด ไม่ใช่พืชอาศัยหลัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม่เคยมีรายงานว่า เป็นพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อ *R. similis* ประกอบกับการจัดการของสถานประกอบการที่ดี เช่น การมีสภาพของโรงเรือนที่ดี วัสดุปลูก และอุปกรณ์สะอาดปราศจากเชื้อ ความใส่ใจของผู้ปฏิบัติงานเพื่อไม่ให้เชื้อแพร่กระจาย การฆ่าเชื้อ และการทำลายแหล่งสะสมของเชื้อ เป็นต้น รวมถึงความร่วมมือกับภาครัฐในการติดตามโดยสุ่มกลุ่มประชากรตัวอย่างพืช เพื่อตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชก่อนการส่งออกทุก 2 เดือน ซึ่งการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าไส้เดือนฝอย *R. similis* มีผลกระทบในระดับต่ำต่อการส่งออกพรรณไม้น้ำและ กวักรมรด

คำหลัก: ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ไม้ประดับส่งออก Burrowing nematode *Radopholus similis*

คำนำ

ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* (Burrowing nematode) เป็นศัตรูพืชกักกัน มากกว่า 55 ประเทศ เนื่องจากความรุนแรงของการระบาด และความยากในการป้องกันกำจัด ในปี 1928 ไส้เดือนฝอย *R. similis* (เดิมเรียกว่า *R. citrophilus* หรือ *R. similis* citrus race) ทำให้เกิดโรค “spreading decline” ในการปลูกส้มของรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐฯ โดยทำให้ผลผลิตส้มลดลง 40 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และใน grapefruits ซึ่งเป็นพืชในตระกูลส้มอีกชนิดหนึ่งผลผลิตลดลง 50 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เหตุการณ์ในครั้งนี้ ได้มีการใช้โปรแกรมการป้องกันกำจัดที่เรียกว่า ‘Push and Treat’ และ ‘Buffer’ ในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคซึ่งใช้เวลาต่อเนื่องยาวนานหลายปี มีผู้คำนวณค่าใช้จ่ายของโปรแกรมดังกล่าวนี้พบว่ามีค่าใช้จ่ายสูงประมาณ 20,000 เหรียญสหรัฐต่อเฮกตาร์ แม้ค่าใช้จ่ายสูง แต่ก็ทำให้ไส้เดือนฝอยชนิดนี้ลดลงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามในปี 1983 โปรแกรมนี้ต้องยุติลง เพราะมีการปนเปื้อนของสารป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยในแหล่งน้ำดื่ม จากนั้นได้มีการใช้ methyl bromide และการตัดรากของพืชออก แต่มียังค่าใช้จ่ายสูง ต่อมาได้มีการหลีกเลี่ยงการแพร่ระบาดของโรคต้นโทรมของส้มซึ่งเกิดจากไส้เดือนฝอย *R. similis* ของบริเวณแหล่งปลูกส้มบนสันเขาของรัฐฟลอริดาซึ่งได้คำนึงถึงการจัดการในระดับสูงเป็นสิ่งสำคัญ เช่น การผลิตต้นกล้าต้องได้รับใบรับรองว่าปลอดศัตรูพืช โรงเรือนเพาะกล้าต้องได้รับการเก็บตัวอย่าง และการตรวจสอบอย่างสม่ำเสมอ เพื่อที่จะได้มีสิทธิ์ได้รับใบรับรอง การเคลื่อนย้ายดินเข้าไปในขอบเขตที่กำหนด และเกี่ยวข้องกับปลูกส้มต้องมีใบรับรองว่าดินนั้นมาจากแหล่งปลอดศัตรูพืชชนิดนี้ ซึ่งการวิเคราะห์ต้นทุนต่อผลตอบแทนของโปรแกรมการออกใบรับรองที่สามารถเป็นไปได้ในการลดความสูญเสียที่เกิดจากไส้เดือนฝอย burrowing nematode นี้ มีอัตราผลตอบแทนของการลงทุนเพื่อให้มูลค่าผลผลิตเพิ่มขึ้น 40 ล้านเหรียญสหรัฐต่อปี อยู่ประมาณ 14 ต่อ 1 เท่า (Suit and Brooks,1957; Poucher et al.,1967; O’ Bannon,1977; Duncan et al.,1990 and Lehman,1995) เหตุการณ์ในครั้งนี้เปรียบเสมือนจุดเริ่มต้นของมาตรการต่างๆในการควบคุมการระบาดของโรค โดยได้ออกมาตรการกักกันพืช ห้ามนำเข้าพืชที่มีไส้เดือนฝอย *R. similis* (*R. similis* citrus race หรือ *R. citrophilus*) มีการจำกัดพื้นที่ในการแพร่ระบาด และมีความพยายามในการกำจัดไส้เดือนฝอยชนิดนี้ให้หมดไปในแทบทุกประเทศของโลก

ความสูญเสียของผลผลิตที่เกิดจากไส้เดือนฝอย *R. similis sensu lato* นี้ยังเป็นศัตรูสำคัญในการปลูกกล้วยในทวีป แอฟริกา ออสเตรเลีย อเมริกากลางและอเมริกาใต้ หมู่เกาะในทะเลแคริบเบียน ซึ่งทำให้เกิดโรคที่เรียกว่า “blackhead banana disease” หรือ “banana toppling disease” ทำให้เกิดการโค่นล้มของกล้วยในขณะที่ออกเครือเพราะหัวกล้วยและระบบรากได้ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย ทำให้ไม่สามารถรับน้ำหนักของเครือกล้วยได้จึงโค่นล้มก่อนที่จะเก็บผลผลิตและด้วยเหตุของการแพร่กระจายเชื้อไปกับหัวกล้วยและหน่อกล้วยทำให้แทบทุกภูมิภาคมีไส้เดือนฝอยชนิดนี้ อีกทั้งไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* มีพืชอาศัยมากกว่า 250 ชนิด ยกตัวอย่างเช่น กล้วย ส้ม ขิง ปาล์ม กาแฟ พริกไทย อ้อย ชา ไม้ดอกไม้ประดับ เช่น หน้าวัว พิไลเดนดรอน เป็นต้นในปี 1953 มีการระบาดครั้งใหญ่ของโรคเหลืองพริกไทย (yellow disease of *Piper nigrum*) ซึ่งเกิดจาก *R. similis* ในการปลูกพริกไทยของประเทศอินโดนีเซีย โดยเกิดความเสียหายเกือบ 90 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตทั้งประเทศซึ่งความเสียหายครั้งนี้ได้สูญเสียต้นพริกไทยกว่า 22 ล้านต้น และมีการรายงานว่าการแพร่กระจายไปในแหล่งปลูกพริกไทยอื่นได้แก่ อินเดีย พบว่า *R. similis* เป็นสาเหตุของโรค slow wilt ที่ทำให้ผล

ผลิตของพริกไทยลดลง (Ramana *et.al*, 1987; Roland,N.P and Maurice, M., 2006; Haegman *et. al.*, 2010)

แม้ประเทศไทยไม่มีรายงานความเสียหายของพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* แต่พบว่าได้เกิดปัญหาการส่งออกพืชไปยังสหภาพยุโรป ถูกปฏิเสธการนำเข้าเนื่องจากมีการตรวจพบ *R. similis* ในพรรณไม้ *Anubias* spp. ในระหว่างปี พ.ศ 2550 ถึง 2551 ไม้จากประเทศไทยถูกเผาทำลายไป 11 ครั้ง ทำให้มีผลกระทบต่อผู้ส่งออกพรรณไม้ของไทยเป็นอย่างมาก (นุชนารถ, 2551) ในการขอใบรับรองสุขอนามัยพืชเพื่อส่งออก ของผู้ประสงค์ส่งออกพืชหลายชนิด อาทิ พืชตระกูล Citrus, Araceae, Marantaceae, Musaceae เป็นต้น ต้องได้รับการรับรองว่าปราศจากไส้เดือนฝอย *R. similis* และ *R. citrophilus* และการส่งออกพืชที่เป็น ต้นพันธุ์ กิ่งพันธุ์ และพืชเพื่อปลูก (plant intend for planting) เช่น พรรณไม้ส่งออก ไม้ประดับ ไปยังหลายประเทศ ต้องได้รับการรับรองว่าปราศจากไส้เดือนฝอยดังกล่าวด้วยเช่นกัน ในการขอใบรับรองสุขอนามัยพืชนั้นต้องมีใบรายงานผลการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชดังกล่าว ซึ่งออกให้โดยกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ดังนั้นวัตถุประสงค์และเป้าหมายของการวิจัยนี้ เพื่อจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ทางสัณฐานวิทยาในไม้ประดับส่งออกให้ได้ชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบัน พร้อมแนวทางการวินิจฉัย (Key) ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้จะทำให้เกิดข้อมูลที่สำคัญสำหรับผู้เกี่ยวข้องกับการส่งออกพืช และผู้ตรวจรับรองการปราศจากศัตรูพืชกักกันโดยเฉพาะไส้เดือนฝอยศัตรูพืช และสำคัญที่สุดคือเป็นฐานข้อมูลอ้างอิงของศัตรูพืชของประเทศไทยและเป็นมาตรฐานที่สามารถสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ประเทศผู้นำเข้าได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ไม้ประดับส่งออก (พรรณไม้ส่งออก และ กวักมรกต)
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย

วิธีการ

การเก็บตัวอย่างไม้ประดับส่งออกจะได้รับการสุ่มและเก็บตัวอย่างจากฟาร์มโดยกลุ่มงานศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช แล้วจึงส่งตัวอย่างพืชมาตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ที่กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยเฉพาะพรรณไม้ ซึ่ง เป็นไม้ประดับส่งออกเพื่อเลี้ยงในตู้ปลา และไม้ประดับอื่น เช่น กวักมรกต มีขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยดังนี้

1. การแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจากรากพืช โดยการใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงอัลตราโซนิค (Ultrasonic Sonicator) ซึ่งประยุกต์จากการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชด้วยการใช้คลื่นเสียง โดยนำตัวอย่างพืชที่ได้รับล้างให้สะอาดบรรจุในภาชนะแก้วแล้วเติมน้ำให้ท่วมระบบราก จากนั้นนำไปวางในอ่างของเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงอัลตราโซนิค ปรับระดับของน้ำในอ่าง และภาชนะแก้วที่บรรจุพรรณไม้ น้ำให้อยู่ในระดับเดียวกัน โดยคำนึงถึงเหมาะสมกับของการเกิดคลื่นเสียงฯ เปิดคลื่นเสียงฯ เป็นเวลา 20 นาที (นุชนารถ, 2555) เมื่อครบกำหนดเวลาดังกล่าว นำน้ำในภาชนะแก้วที่บรรจุพรรณไม้แต่ละตัวอย่าง กรองผ่านตะแกรงโลหะ Cobb sieving ขนาด 20 mesh 150 mesh และ ขนาด 400 mesh ตามลำดับ จากนั้นเก็บน้ำที่อยู่บนตะแกรงโลหะ ขนาด 400 mesh ใส่ในภาชนะแก้ว นำน้ำในภาชนะแก้ว ที่ได้ ของแต่ละตัวอย่าง ตั้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อย เพื่อให้ไส้เดือนฝอยตกลง

ด้านล่างของภาชนะ จากนั้นดูดน้ำส่วนบนทิ้งอย่างแผ่วเบา เพื่อไม่ให้เกิดการฟุ้งกระจายของตะกอน คงเหลือน้ำในภาชนะแก้วประมาณ 10 -15 มิลลิลิตร หรือปริมาณที่เหมาะสมกับถ้วยนับตัวอย่าง ในกรณี น้ำ ที่ได้จาก มีความขุ่น ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถมองเห็นไส้เดือนฝอยได้อย่างชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฯ ต้องนำน้ำของตัวอย่างดังกล่าวกรองผ่านกรวยโดยวิธี Baermann funnel method หรือ เพื่อความสะดวกใช้ Oostenbrink dish แทนกรวยก็ได้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำที่ผ่านการกรองใสในภาชนะแก้ว

2. การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเบื้องต้น นำน้ำที่เหลือในภาชนะแก้ว จากข้อใสในถ้วยนับตัวอย่าง (Syracuse Dish) แล้วนำไปตรวจวินิจฉัย และนับจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) การจัดจำแนกสกุลไส้เดือนฝอยโดยเปรียบเทียบกับ คู่มือการจำแนกสกุลของไส้เดือนฝอย Plant-parasitic nematodes ; A pictorial key to genera (Mai et.al., 1996)

3. การทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอยศัตรู เมื่อพบว่าเป็นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จึงนำไปทำสไลด์ถาวร ตามวิธีการของ De Grisse, 1969 โดยย่อ ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 เชียตัวไส้เดือนฝอยลงใน straining block เติมน้ำ 400 μ l นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 55 °C นาน 5 นาที ตรวจดูไส้เดือนฝอยแล้วเติม Solution I ประมาณ 0.5 ml นำไปใส่ไว้ในขวดโหลที่บรรจุ Ethanol 96% นำเข้าตู้อบ ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 12 ชั่วโมง ขั้นตอนที่ 2 นำ straining block ออกจากตู้อบ และขวดโหลที่บรรจุ Ethanol 96% แล้วเติม Solution II เล็กน้อย ปิดฝานำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 °C นาน แล้วนำมาเติมอีก 4 ครั้ง ทุก 1 ชั่วโมง 30 นาที ก่อนกลับบ้านเติม Solution III เล็กน้อยนำเข้าตู้อบ ที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 24 ชั่วโมง ขั้นตอนที่ 3 นำ straining block ออกจากตู้อบ ตรวจดูไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อไม่พบการหดตัวของผนังลำตัวไส้เดือนฝอย ก็สามารถนำไส้เดือนฝอยไปใช้ในการทำสไลด์ถาวรได้ โดยนำไส้เดือนฝอยมาวางลงในสไลด์โดยหยด anhydrous glycerin ลงบนสไลด์แก้วเชียไส้เดือนฝอยที่เตรียมไว้จัดเรียงเป็นแถวโดยใช้ไม้เขี่ยกดให้ทุกตัวติดกับผิวสไลด์อย่างให้ตัวลอยจัดเรียงให้สวยงามง่ายแก่การดูรายละเอียดต่างๆ ภายใต้กล้อง ก่อนปิด cover slip แนวนวขอบด้วยยาทาเล็บให้สนิท แล้วเก็บในกล่องสไลด์

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยเปรียบเทียบกับ เอกสารการจำแนกชนิดของ 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

เวลาและสถานที่ดำเนินการ

- ระยะเวลา (เริ่มต้น ต.ค.2559-สิ้นสุด ก.ย.2562)

- สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนของกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กลุ่มงานศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และสถานประกอบการผู้ส่งออกไม้ประดับ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างไม้ประดับส่งออกโดยเฉพาะพรรณไม้น้ำซึ่งเป็นไม้ประดับส่งออกเพื่อเลี้ยงในตู้ปลา และไม้ประดับอื่น เช่น กวักมรกต ผลการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำและกวักมรกต คณะวิจัยได้เริ่มดำเนินการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชตั้งแต่ กันยายน 2560 ถึง ตุลาคม 2562 ซึ่งได้นำเฉพาะข้อมูลผลการตรวจของสถานประกอบการ 4 แห่ง ซึ่งส่งตัวอย่างเข้ามาตรวจอย่างสม่ำเสมอในช่วงเวลาดังกล่าว รวมทั้งสิ้นจำนวน 2,583 กลุ่มประชากรตัวอย่าง โดยจำนวนต้นของตัวอย่างแต่ละครั้งขึ้นกับจำนวนต้นพืชที่ต้องการส่งออก ซึ่งพบไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จำนวน 26 กลุ่มประชากร (ดังแสดงในตารางที่ 1) คิดเป็นร้อยละ 1.0 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด ส่วนจำนวนตัวของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่พบส่วนใหญ่พบเพียง 1 ตัวต่อครั้ง แต่โดยเฉลี่ยพบ จำนวน 6 ตัวต่อกลุ่มประชากร ในช่วงปี 2550 ถึง 2552 ไม้ประดับจากประเทศไทยได้ถูกปฏิเสธการนำเข้าจากสหภาพยุโรป เนื่องจากมีการตรวจพบไส้เดือนฝอย *R. similis* จำนวน 11 ครั้ง เป็นการพบในพืช *Anubias* spp. 10 ครั้ง และพบในพืช *Calathea* sp. 1 ครั้ง หลังจากนั้นการสกัดกั้นการนำเข้าลดลงมาตามลำดับเช่น ในช่วงปี 2553 ถึง 2559 มีการสกัดกั้นการนำเข้า 5 ครั้ง พบในพืช *Anubias* spp. 2 ครั้ง และพืช *Calathea* sp., *Philodendron* sp., และกล้วยพัด (*Ravenala madagascariensis*) อย่างละ 1 ครั้ง ในช่วงปี 2560 ถึง 2562 มีการสกัดกั้นการนำเข้าเพียง 1 ครั้งพบในพืช *Acorus* spp. ซึ่งจะเห็นได้ว่าส่วนใหญ่เป็นการพบในพืช *Anubias* spp. อย่างไรก็ตาม จากการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก จำนวน 2,168 ตัวอย่างระหว่าง ตุลาคม 2556 ถึง มิถุนายน 2559 พบไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จำนวน 7 กลุ่มประชากร พบในพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Acorus* spp. *Aglaonema* spp. และ *Lindernia* spp. ไม่พบในพืช *Anubias* spp. และในการการวิจัยครั้งนี้ พบ *R. similis* ในพืช *Anubias* spp. สามครั้ง ในปี 2560 เท่านั้น ในส่วนของพืช *Vallisneria* spp. จากประเทศมาเลเซียที่เคยถูกสกัดกั้นการนำเข้าจากสหภาพยุโรปเนื่องจากพบไส้เดือนฝอย *R. similis* นั้น สำหรับประเทศไทยพืช *Vallisneria* spp. ซึ่งเป็นไม้ประดับที่มีการส่งออกอย่างต่อเนื่อง จากการติดตามโดยการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชก่อนการส่งออกทุก 2 เดือน จาก ปี 2556 ถึงปัจจุบัน 2562 นี้ ไม่พบว่ามีไส้เดือนฝอย *R. similis* ในพืช *Vallisneria* spp. และมีไม้ประดับหลายชนิดที่ไม่พบ *R. similis* เช่น กวักมรกต เป็นไม้ประดับอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่พบ การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจาก 2556 ถึง ปัจจุบัน 2562 ไม่พบ *R. similis* (EFSA Panel on Plant Health, 2017 และ ธิติยา และคณะ, 2559) การศึกษานี้เป็นการศึกษาสำหรับพืชที่ปลูกเพื่อส่งออกที่ปลูกในโรงเรือนเป็นหลัก และ ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าเป็นเพราะการจัดการที่ดีของสถานที่ปลูก และในส่วนของพืช *Anubias* spp. ที่มีการพบไส้เดือนฝอยดังกล่าวลดลง และบางแห่งของสถานที่ผลิตในช่วงปี 2560 ถึง 2562 นี้ไม่พบ *R. similis* เพราะการจัดการของสถานที่ปลูกที่ดีขึ้น และเนื่องจากสถานที่ดังกล่าวปลูกพืชจำนวนน้อยชนิดจึงมีความสามารถในการดูแลที่ดีกว่าการปลูกพืชหลายชนิดเพราะพืชแต่ละชนิดต้องการดูแลและการจัดการที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาการพบ *R. similis* (ในตารางที่ 1) พบว่ามีพืชเพียงไม่กี่ชนิดที่พบ ได้แก่ *Acorus* spp. *Anubias minima*, *Anubias nana*, *Anubias* spp., *Hygrophila* spp., *Lilaeopsis* spp. และ *Micranthemum* spp. และเป็นการพบเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างจำนวนมากถึง 2,583 กลุ่มประชากรตัวอย่าง ซึ่งส่วนหนึ่งมาจากการจัดการสถานที่ปลูกที่ดีขึ้น และความร่วมมือในการติดตามโดยสุ่มกลุ่มประชากรตัวอย่างพืชเพื่อตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชก่อนการส่งออกทุก 2 เดือน และอีกส่วนน่าจะมาจากไม้ประดับที่ส่งออกเหล่านี้ ไม่ใช่พืชที่อ่อนแอต่อ *R. similis* ซึ่งมี

ยกตัวอย่างดังนี้ กระจับปี่ (Abelmoschus esculen), ไม้ (Bambusa spp.), ผักกาดแดง (Beta vulgaris), กระหล่ำปลี (Brassica oleracea), พริกหยวก (Capsicum annuum), แตงโม (Citrullus lanatus), แคนตาลูป (Cucumis melo), สตรอว์เบอร์รี (Fragaria ananassa), ผักกาดหอม (Lactuca sativa) ข้าว (Oryza sativa) และ ปักษาสวรรค์ (Strelitzia reginae) เป็นต้น และนอกจากนี้ยังพบว่า *R. similis* มีพืชอาศัยกว่า 250 ชนิด ซึ่งโดยส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์บุก (Arecaceae) และพืชวงศ์อื่น เช่น วงศ์หญ้า (Poaceae) วงศ์ผักกาด (Brassicaceae) วงศ์ผักชี (Apiaceae) เป็นต้น (EFSA Panel on Plant Health, 2014) การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืช จาก 2556 ถึง ปัจจุบัน 2562 ซึ่งมีพืชกว่า 106 ชนิดที่ส่งเข้ามาตรวจพบว่า *R. similis* มีในพืชเพียง 9 ชนิด เท่านั้น แต่ไม่ได้พบในพืชที่อยู่ในวงศ์ที่มีรายงานการเป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยชนิดนี้ ยกตัวอย่างเช่นพืชวงศ์บุก (Arecaceae) ได้แก่ *Cryptocoryne* spp., *Pistia* spp., *Spathiphyllum* spp., *Syngonium* spp., และ *Zamioculcas zamiifolia* วงศ์หญ้า (Poaceae) ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับข้าว เช่น *Cyperus* spp. วงศ์ผักกาด (Brassicaceae) เช่น *Rorippa* spp. วงศ์ผักชี (Apiaceae) เช่น *Hydrocotyle* spp., *Chlorophytum* spp. และ *Hydrocotyle* spp. เป็นต้น พบว่าไม่เคยพบ *R. similis* ในพืชเหล่านี้ รวมทั้งพืชกว่า 85 ชนิดที่ไม่เคยพบ Burrowing nematode นี้ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าพืชเหล่านี้ไม่ใช่พืชอาศัย หรือเป็นเพราะการจัดการของสถานประกอบการที่ดีก็เป็นได้

ในส่วนการศึกษาในแปลงของประเทศไทยพบว่าในปี พ.ศ.2508 (1965) พบไส้เดือนฝอย *R. similis* ครั้งแรกในกล้วย และฝรั่งที่เกษตรกลางบางเขน และในปี 2529 จากการศึกษาอนุกรมวิธานไส้เดือนฝอยในวงศ์ Pratylenchidae ในประเทศไทย พบ *R. similis* ในดินรอบรากกล้วย และพริกไทย ในจังหวัด จันทบุรี นครราชสีมา และยะลา (สืบศักดิ์, 2538 และ Pliansinchai and Boonduang, 1986) ในปี 2556 มีการศึกษาเกี่ยวกับ migratory endoparasitic nematodes ในกาแฟ และกล้วย จากการสำรวจไม่พบ Burrowing nematode ซึ่งเป็นหนึ่งในไส้เดือนฝอยนี้ (ไตรเดชและคณะ 2556) และในการสำรวจสวนพริกไทยเพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยในการควบคุมไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคเหลืองของพริกไทย ไม่พบ *R. similis* แม้ว่าพริกไทยจะเป็นพืชที่อ่อนแอต่อไส้เดือนฝอยชนิดนี้ โดยตรวจพบเพียงไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*) (ธิตยา และคณะ 2558) ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ความเสี่ยงของ *R. similis* ของสหภาพยุโรป โดยได้มีการทดลองและตรวจสอบ ในหลายด้านไม่ว่าจะเป็นการนำเข้า การตั้งรกราก การแพร่กระจาย ผลกระทบจากการติดเชื้อจากไม้ประดับที่นำเข้า เส้นทางหลักของการนำเข้าพืชที่มีการติดเชื้อไส้เดือนฝอย *R. similis* สู่สหภาพยุโรป ซึ่งเดิมมีการแยก *R. citrophilus* กับ *R. similis* โดย *R. citrophilus* อยู่ใน Annex II, Part A, Section I of Council Directive 2000/29/EC เป็นศัตรูพืชควบคุมเพราะเป็นสิ่งมีชีวิตที่อันตรายไม่มีอยู่ในสหภาพยุโรปอยู่ในระดับ A1 และ *R. similis* อยู่ใน Annex II, Part A, Section II of Council Directive 2000/29/EC เป็นศัตรูพืชควบคุมเพราะเป็นสิ่งมีชีวิตที่อันตรายซึ่งมีอยู่ในสหภาพยุโรปซึ่งอยู่ในระดับ A2 แต่จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า *R. citrophilus* เป็นชื่อพ้องรอง (junior synonym) ของ *R. similis* และมีการศึกษาและการทดลองหลากหลายเพื่อดูผลกระทบของ *R. similis* ต่อพืชในสหภาพยุโรป คณะวิจัยนี้ขอยกตัวอย่างเพียงหนึ่งการทดลอง ได้มีทดลองการติดเชื้อของส้ม ซึ่งพบว่า *R. similis* ที่มาจากไม้ประดับสามารถติดเชื้อในส้มได้ในการทดลองในโรงเรือนทดลอง แต่ในพื้นที่แปลงกลางแจ้งมีการติดเชื้ออยู่ในระดับต่ำ คาดว่ากลุ่มประชากรของ *R. similis* ไม่อยู่ในระดับที่ทำให้เกิดความเสียหายของส้มที่ปลูกกลางแจ้งได้ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะการเพิ่มขึ้นอุณหภูมิ เนื่องจากโลกร้อนทำให้จำนวนของ

R. similis ลดลง ถึงอย่างไรก็ตาม *R. similis* ยังเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่สำคัญของโลก แม้ว่าจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงในครั้งนี้ *R. similis* จะมีผลกระทบต่อสุขภาพยุโรปในระดับต่ำก็ตาม (EFSA Panel on Plant Health, 2017)

การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเบื้องต้น ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ (Inverted Microscope) ก่อนที่จะนำไปทำสไลด์ถาวรของไส้เดือนฝอย *Radopholus* ต้องจัดจำแนกเป็นไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ตาม คู่มือการจำแนกสกุลของไส้เดือนฝอย Plant-parasitic nematodes ; A pictorial key to genera (Mai et.al., 1996) ดังนี้ พบว่าเป็น ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยมีลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนี้ เป็นไส้เดือนฝอยที่มี stylet มองเห็นได้ชัดเจน แข็งแรง และมี stylet basal knobs บริเวณส่วนหัวค่อนข้างกลม และมีโครงสร้างแข็งแรง ทำให้มองเห็นอย่างชัดเจนภายใต้อ่างกล้อง ส่วนหัวไม่มี setae ตัวเต็มวัยเพศเมียมีรูปร่าง เรียวยาว (vermiform) ส่วนหลอดอาหาร (esophagus) แบ่งออกเป็น 3 ส่วน มีการซ้อนทับลำไส้ไปด้านหลัง ตำแหน่งของ vulva อยู่ใกล้กึ่งกลางลำตัว ประมาณ 50-69 เปอร์เซ็นต์ มี ovaries 2 ด้านของ vulva มีเพศเมีย และลำไส้ค่อนข้างสีเข้มมองเห็นได้ชัดเจน และมีเพศผู้ที่มีลักษณะแตกต่างกัน (sexual dimorphism)

การทำสไลด์ถาวร และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง differential interference contrast (DIC) พร้อมคอมพิวเตอร์ และอุปกรณ์ถ่ายภาพ และโปรแกรมการวัดขนาด โดยเปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกชนิดของ EPPO PM 7/88 (1): *Radopholus similis* เป็นสำคัญ และเอกสารอื่นที่เกี่ยวข้อง เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่พบในการศึกษานี้ จำนวน 28 ตัว กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *R. similis* ตาม คำนิยามชนิด และรูปภาพของ *R. similis* ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเพศผู้ของไส้เดือนฝอยชนิดนี้ จึงเปรียบเทียบเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเพศเมีย และหน่วยวัดทั้งหมดของการศึกษาในครั้งนี้เป็น ไมครอน (μm) ตามเอกสารอ้างอิงของ EPPO ผลการวิจัยนี้สามารถจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่พบได้เป็น *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 โดยมีการจัดหมวดหมู่ดังนี้

Domain Eukaryota

Kingdom Metazoa

Phylum Nematoda

Class Secernentea

Order Tylenchida

Suborder Tylenchina

Family Pratylenchidae

Subfamily Radopholinae

Genus *Radopholus*

Species: *Radopholus similis*

ซึ่งมีชื่อพ้องดังนี้:

Tylenchus similis Cobb, 1893

Tylenchus granulosus Cobb, 1893

Tylenchus acutocaudatus Zimmerman, 1898

Tylenchus bififormis Cobb, 1909

Anguillulina similis (Cobb, 1893) Goodey, 1932

Rotylenchus similis (Cobb, 1893) Filipjev, 1936

Radopholus citrophilus Huettel, Dickson & Kaplan, 1984

และยังมีชื่อพ้องอื่น (Siddiqi, 2000)

ลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอย *R. similis* เมื่อเปรียบเทียบกับคู่มือของ A.Y. Ryss (Ryss, 2003) และ คู่มือของ Nickle (Nickle, 1991) เป็นไส้เดือนฝอยที่มีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร เพศเมียส่วนหัวค่อนข้างกลม และมีโครงสร้างแข็งแรง และยกสูงแยกจากลำตัวเพียงเล็กน้อย ลักษณะคล้ายโดม ส่วนบริเวณ lib region มี 6 annules ส่วนของ Stylet ชัดเจน และพัฒนาดี และมี Stylet knobs ค่อนข้างกลม และค่อนข้างเท่ากัน ส่วนของ oesophagus ค่อนข้างยาว และลำไส้ซ่อนทับลำตัวด้านหลัง มีเส้นข้างลำตัว 4 เส้นมีความกว้างค่อนข้างเท่ากัน ตำแหน่ง Vulva อยู่ค่อนข้างกึ่งกลางความยาวของลำตัว มีแขนงของระบบสืบพันธุ์สองแขนงตรงข้ามกันด้านหน้าและด้านหลัง (Didelphic) ซึ่งแขนงของระบบสืบพันธุ์ทั้งสองด้านมีลักษณะและความยาวใกล้เคียงกัน แต่โดยส่วนใหญ่แขนงของระบบสืบพันธุ์ด้านหน้ามีความยาวกว่าเล็กน้อย ภายในระบบสืบพันธุ์ มี spermatheca ลักษณะกลม และพบ sperm cells ใน spermatheca เป็นแท่งเล็ก (rod-like) ไม่พบ sperm cells ที่ค่อนข้างกลม ผิวของลำตัวค่อนข้างเรียบ ส่วนของหางมีลักษณะ รูปทรงโคนค่อนข้างยาว (elongate-conoid) บริเวณส่วนใสของปลายหางค่อนข้างยาว ลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอย *R. similis* แสดงในภาพที่ 1

การวัดลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอย *R. similis* เปรียบเทียบกับเอกสารการจดจำแนกชนิดของ EPPO PM 7/88 (1) พบว่าความยาวของลำตัวของตัวอย่างที่ศึกษา (Body length) อยู่ในช่วงเดียวกันกับของ EPPO ซึ่งอยู่ที่ 510 ถึง 820 โดยเฉลี่ย 655 และการศึกษานี้ 534 ถึง 663 (592 ± 33.3) ส่วนความยาว Stylet อยู่ในช่วงใกล้เคียงกันมากของ EPPO 16–23 (18.5) และการศึกษานี้ 16–18 (17 ± 0.42) แขนงของระบบสืบพันธุ์ส่วนหน้า (Female gonad anterior branch) และแขนงของระบบสืบพันธุ์ส่วนหลัง (Female gonad posterior branch) ความยาวค่อนข้างใกล้เคียงกัน แม้ว่าส่วนหน้าจะยาวกว่าเล็กน้อย ความยาวของแขนงของระบบสืบพันธุ์ ส่วนหน้าของ EPPO 112–297 (174) และแขนงของระบบสืบพันธุ์ ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยในการศึกษานี้ความยาวอยู่ที่ 108–138 (126 ± 7.18) ความยาวของแขนงของระบบสืบพันธุ์ ส่วนหลังของ EPPO 103–269 (165) และการศึกษานี้ 103–132 (117 ± 7.44) เส้นผ่านของร่างกายบริเวณทวาร (Body diameter at the anus) ของ EPPO 13–24 (17.7) และการศึกษานี้ 13–16 (14 ± 0.85) ความยาวของส่วนปลายหัวถึงตำแหน่ง Excretory pore ของ EPPO 59–115 (88) และ ของการศึกษานี้ 75–96 (85 ± 5.21) สัดส่วนของตำแหน่งของ Vulva ต่อความยาวลำตัว (Vulva %) อยู่ที่ ของ EPPO 50–67 (57) และการศึกษานี้ 50–61 (57 ± 1.91) เปรอร์เซ็นต์ ค่า De Man's ratios โดยเปรียบเทียบค่า a (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัว) ของ EPPO 20–34 (27) และของการศึกษานี้ 30–38 (33 ± 1.94) ค่า b (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อความยาวของ oesophagus) ของ EPPO 6–10 (7.9) และ ของการศึกษานี้ 8–10 (9 ± 0.46) ค่า c (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อความยาวหาง) 7–13 (9.4) และของการศึกษานี้ 7–11 (10 ± 0.73) ของการศึกษานี้ยังได้ศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของ hyaline region length 9–15 (11 ± 1.24) จึงจัดจำแนก

ชนิดได้เป็น *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 ซึ่งค่าการวัดลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอย *R. similis* เปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกชนิดของ EPPO PM 7/88 (1) (แสดงในตารางที่ 2)

ไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* มีความหลากหลายของชนิดมากปัจจุบันพบว่ามี 30 ชนิด ซึ่งประเทศออสเตรเลียมีความหลากหลายมากถึง 25 ชนิด (Luc, 1987) จากการศึกษาของ Quénéhervé (2009) และ Tan *et. al.*, (2010) คาดว่าความหลากหลายของไส้เดือนฝอย *Radopholus* ในออสเตรเลียมีสาเหตุ เนื่องจากมีการแลกเปลี่ยนและเคลื่อนย้ายพืชที่ติดเชื้อมาจากภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นที่น่าสังเกตว่าในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีรายงานในการพบชนิดใหม่ของไส้เดือนฝอยสกุลนี้หลายชนิด โดยพบว่า มีการพบชนิดใหม่ในเวียดนาม 3 ชนิด นิวซีแลนด์ 1 ชนิด ออสเตรเลีย 2 ชนิด และอินโดนีเซีย 1 ชนิด (Volcy, 2010)

ในส่วนของประเทศไทยปี พ.ศ.2508 (1965) พบไส้เดือนฝอย *R. similis* ครั้งแรกในกล้วยและฝรั่งที่ เกษตรกลางบางเขน โดยนาย Timm และ การอนุกรมวิธานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ประเทศไทย พบเพียงชนิดเดียว *R. similis* (Pliansinchai and Boonduang, 1986 สืบศักดิ์, 2538 และ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และช่อทิพย์ ศัลยพงษ์, 2556) จากข้อมูลของ EPPO quarantine Pest ประเทศที่พบ *R. similis* ในเอเชีย ได้แก่ ประเทศบรูไน อินเดีย (บางรัฐ) อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น (ไม่มีการยืนยัน) มาเลเซีย (รัฐ Peninsular) โอมาน ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา เยเมน และรวมทั้งประเทศไทย จากการศึกษาของ Nguyen และคณะในปี 2003 ได้รายงานว่าการพบไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ชนิดใหม่ในทุเรียน คือ *R. duriophilus* ซึ่งมีผู้วิจัยได้เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *R. similis* ของการศึกษานี้ พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งจะศึกษาต่อในทางชีวโมเลกุลซึ่งอาจจะพบความแตกต่างกันก็เป็นได้ เพราะเป็นที่น่าสนใจว่าเวียดนามเป็นประเทศเพื่อนบ้านของไทย แต่ไม่เคยมีรายงานว่าพบ *R. similis* นอกจากนี้ ยังมีไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่ใกล้เคียงกับ *R. similis* อีก เช่น *R. musicola* ซึ่งพบในออสเตรเลียโดยพบว่าสามารถเข้าทำลายกล้วยที่ต้านทานต่อ *R. similis* ได้ โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันแต่ก็มีความแตกต่างกันในส่วนของ *R. musicola* มีเส้นข้างลำตัว 4 เส้นมีเท่ากับ *R. similis* แต่ความกว้างของเส้นคู่ในแคบเข้าหากัน มีระยะความกว้างไม่เท่ากัน และส่วนของปลายหางค่อนข้างแคบและมีเดือยแหลมที่ปลายหาง ส่วนใสของหาง (hyaline region length) สั้นกว่าของ *R. similis* และไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกับ *R. similis* ได้แก่ *R. bridgei* ซึ่งตรวจพบจากการสกัดกั้นการนำเข้าพรมขนไม้น้ำ จากประเทศสิงคโปร์และมาเลเซีย พบว่าแตกต่างกันในส่วนของ เส้นข้างลำตัว 4 เส้นมีเท่ากับ *R. similis* แต่ความกว้างของเส้นคู่ในแคบกว่าคู่ นอก ภายในระบบสืบพันธุ์ มี spermatheca ลักษณะกลม ขนาดใกล้เคียงกัน และพบ sperm cells ใน spermatheca เป็นแท่งเล็ก (rod-like) คล้าย *R. similis* แต่ *R. bridgei* มี sperm cells ที่ค่อนข้างกลมด้วย และค่า a ของ *R. bridgei* (อัตราส่วนของความยาวของลำตัวต่อส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัว) น้อยกว่า *R. similis* แสดงว่าตัวอย่าง *R. bridgei* ที่มีความยาวของลำตัวเท่ากับ *R. similis* ต้องมีส่วนที่กว้างที่สุดของลำตัวมีค่ามากกว่าจึงทำให้มีค่า a น้อยกว่า *R. similis* ซึ่งสามารถเรียงลำดับของค่า a จากมากไปน้อยได้ดังนี้ *R. similis*, *R. musicola*, และ *R. bridgei* ตามลำดับ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าในไม้ประดับส่งออกพรมขนไม้น้ำส่งออก มีเพียง *R. similis* ชนิดเดียว ไม่พบชนิดของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* ต่างถิ่น (alien species)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* เพศเมียจำนวน 28 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับการวินิจฉัยของ EPPO PM 7/88 (1) พบว่าเป็น ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* เพียงชนิดเดียว และจากการเก็บตัวอย่างไม้ประดับส่งออกโดยเฉพาะพรรณไม้น้ำซึ่งเป็นไม้ประดับส่งออกเพื่อเลี้ยงในตู้ปลา และไม้ประดับอื่น เช่น กวักมรกต ผลการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในพรรณไม้น้ำ และกวักมรกต เพื่อการส่งออกนี้ คณะวิจัยได้เริ่มดำเนินการตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชตั้งแต่ กันยายน 2560 ถึง ตุลาคม 2562 ซึ่ง รวมทั้งสิ้นจำนวน 2,583 กลุ่มประชากรตัวอย่าง พบไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus* จำนวน 26 กลุ่มประชากร คิดเป็นร้อยละ 1.0 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด จากผลการทดลองพบว่า *R. similis* มีผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อการส่งออกพรรณไม้น้ำ และ กวักมรกต จากการติดตามโดยสุ่มกลุ่มประชากรตัวอย่างพืชเพื่อตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชก่อนการส่งออกทุก 2 เดือน พบว่ามี พืชเพียง 9 ชนิดที่พบ *R. similis* และจากการตรวจติดตามจากปี 2556 ถึงปัจจุบัน 2562 พบว่าพรรณไม้น้ำกว่า 85 ชนิด รวมทั้ง กวักมรกต ไม่เคยพบไส้เดือนฝอยชนิดนี้ และในพืชวงศ์ที่มีความเสี่ยงที่จะพบ *R. similis* เนื่องจากมีรายงานการเป็นพืชอาศัยหลายวงศ์ เช่น พืชวงศ์บุก (Arecaceae) ได้แก่ *Cryptocoryne* spp., *Pistia* spp., *Spathiphyllum* spp., *Syngonium* spp., และกวักมรกต (*Zamioculcas zamiifolia*) วงศ์หญ้า (Poaceae) เช่น *Cyperus* spp. ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับข้าว และข้าวเป็นพืชที่อ่อนแอต่อไส้เดือนฝอยชนิดนี้ วงศ์ผักกาด (Brassicaceae) เช่น *Rorippa* spp. วงศ์ผักชี (Apiaceae) เช่น *Hydrocotyle* spp., *Chlorophytum* spp. และ *Hydrocotyle* spp. เป็นต้น พบว่าไม่เคยพบไส้เดือนฝอย Burrowing nematode นี้ รวมทั้งการสกัดกั้นการนำเข้าของสหภาพยุโรปก็ลดลงตามลำดับด้วย และคณะวิจัยพบว่า มีหลายปัจจัยที่ทำให้ไส้เดือนฝอย *R. similis* มีผลกระทบน้อยกับการส่งออกพืชเหล่านี้ เพราะเป็นไปได้ว่าพืชเหล่านี้ไม่ใช่พืชอาศัยหลัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งไม่เคยมีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อ *R. similis* ประกอบกับการจัดการของสถานประกอบการที่ดี เช่น การมีสภาพของโรงเรือนที่ดี วัสดุปลูกและอุปกรณ์สะอาดปราศจากเชื้อ ความใส่ใจของผู้ปฏิบัติงานเพื่อไม่ให้เชื้อแพร่กระจาย การฆ่าเชื้อ และการทำลายแหล่งสะสมของเชื้อ เป็นต้น รวมถึงความร่วมมือกับภาครัฐในการติดตามโดยสุ่มกลุ่มประชากรตัวอย่างพืช เพื่อตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชก่อนการส่งออกทุก 2 เดือน จึงสามารถสรุปได้ว่าไส้เดือนฝอย *R. similis* มีผลกระทบในระดับต่ำต่อการส่งออกพรรณไม้น้ำและ กวักมรกต แต่อย่างไรก็ตาม *R. similis* ยังเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่สำคัญของโลก ดังนั้นทั้งสถานประกอบการ และภาครัฐจะต้องรักษาระดับของการทำงานให้ต่อเนื่องเพื่อรักษาโอกาสทางการค้ากับสหภาพยุโรปต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นายวานิช คำพานิช กลุ่มงานศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช นางสาว อังคณา พวงเงินมาก นายอนุชิต อุทธิรัณ นายอภิชัย อยู่เอี่ยม กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และสถานประกอบการผู้ส่งออกไม้ประดับ และพรรณไม้น้ำทุกแห่งที่ให้ความร่วมมือกับภาครัฐอย่างดียิ่ง

เอกสารอ้างอิง

- ธิตยา สารพัฒน์ และ ไตรเดช ข่ายทอง .2558.การทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยในการควบคุมไส้เดือนฝอยสาเหตุโรคเหลืองของพริกไทย.การประชุมวิชาการประจำปี 2558. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.กรมวิชาการเกษตร.หน้า 300-314.
- ธิตยา สารพัฒน์ ไตรเดช ข่ายทอง วีรภรณ์ แสงไสย และวานิช คำพานิช . 2559. สถานการณ์การตรวจวินิจฉัยไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในพรรณไม้หน้าเพื่อการส่งออก. การประชุมวิชาการ ประจำปี 2559. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.กรมวิชาการเกษตร.หน้า 41-53.
- ไตรเดช ข่ายทอง ธิตยา สารพัฒน์ และมนตรี เอี่ยมวิม้งสา. 2556.อนุกรมวิธานและ ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย migratory endoparasitic nematodes. รายงานผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๕๖ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หน้า 2049-2053
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2551. *Burrowing Nematode ศัตรูพืชกักกันของไม้หน้าส่งออก*. ข่าวอารักขาพืช 3(3): 3.
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และช่อทิพย์ ศัลยพงษ์. 2556. อนุกรมวิธานและชีววิทยาของไส้เดือนฝอยสกุล *Radopholus*. รายงานผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๕๖ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หน้า 2485-2490
- นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2555. *ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชพรรณไม้หน้าและการป้องกันกำจัด*. นวัตกรรม ดาการพิมพ์,กรุงเทพฯ. 72 หน้า.
- สืบศักดิ์ สนธิรัตน์. 2538. *ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย*. สำนักพิมพ์รัฐเขียว. กรุงเทพฯ. 275 หน้า.
- Cobb, N.A. 1915. *Tylenchulus similis, the cause of a root disease of sugarcane and banana*. J. Agric. Res. 4: 561-568.
- Duncan,LW, Kaplan, D.T. and Joling, J.W. 1990 Maintaining barriers to spread of *Radopholus citrophilus* in Florida citrus orchard. Nematropica 20,71- 88 In: Nematode parasites of citrus. Larry W. Duncan (Eds), In: *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture 2nd edition*. 2005. Luc, M., Sikora, R. A. and Bridge, J. (Eds), Pp. 319 - 392. CAB International, Oxfordshire, UK.
- EFSA Panel on Plant Health .2014. *Scientific Opinion on the pest categorisation of Radopholus similis (Cobb)Thorne and Radopholus citrophilus Huettel, Dickson and Kaplan*.pp.36 Available from: Doi:10.2903/j.efsa.2014.3852 (20/01/2018)
- EFSA Panel on Plant Health. 2017. *Pest risk assessment of Radopholus similis for the EU territory*.pp.265 Available from Doi:10.2903/j.efsa.2017.4879 (20/01/2018)
- EPPO. 2009. PM 7/88(1): *Radopholus similis*. Bulletin OEPP / EPPO Bulletin 38, 374–378. (online). Available from <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2008.01248.x> (17/02/2017).

- Haegeman, A., A. Elsen, D. Dewaele and G. Gheysen. 2010. Emerging molecular knowledge on *Radopholus similis*. An important nematode pest of banana. Mol. PlantPathol. 11(3): 315-323. In: Nematode parasites of citrus. Larry W. Duncan (Eds), In: *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture 2nd edition*. 2005. Luc, M., Sikora, R. A. and Bridge, J. (Eds), Pp. 319 - 392. CAB International, Oxfordshire, UK.
- Hooper, D.J. and K. Evans. 1993. Extraction identification and control of plant parasitic nematodes. In K. Evans, D.L. Trudgill and J.M. Webster. eds. *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*. CAB International, Wallingford, UK, pp.1-59.
- Lehman, P.S. 1995. Role of plant protection organizations in nematode management. *XIX Congress of Brazilian Society of Nematology*. Brazilian Society of Nematology, Ryo Quente, Brazil, pp. 137- 14888 In: Nematode parasites of citrus. Larry W. Duncan (Eds), In: *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture 2nd edition*. 2005. Luc, M., Sikora, R. A. and Bridge, J. (Eds), Pp. 319 - 392. CAB International, Oxfordshire, UK.
- Luc, M. 1987. *Areappraisal of Tylenchina (Nemata)*. 7. *The family Pratylenchidae Thorne, 1949*. *Rev. Nématol.* 10(2): 203-218. J.B. Macgowan. 1982. The burrowing nematode infecting blackpepper. In *Nematology Circular No. 93*, Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Service, <http://www.freshfromflorida.com/pi/enpp/nema/nemacirc/nem093.pdf>; consulted: November, 2011.
- 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.
- Nickle WR (ed) . 1991. *Manual of agricultural nematology*. Marcel Dekker, INC. New York. pp.1035.
- Nguyen, N.C., S.A. Subbotin, M. Madani, P. Trinh, and M. Qandmoens. 2003. *Radopholus duriophilus* sp. n. (Nematoda: Pratylenchidae) from Western Highland of Vietnam. *International Journal of Nematology*. 5(4): 549-558.
- Quénéhervé, P. 2009. Integrated management of banana nematodes. pp.3-61. In A. Ciancio and K.G. Mukerji., eds. *Integrated management of fruit crop and forest nematodes*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Pliansinchai, U and A. Boonduang. 1986. A systematic study of *Pratylenchidae* In Thailand. *Nematology Section Technical Bulletin No. 4*. Plant pathology and Microbiology Division. Department of Agriculture.

- Ramana, K.V., C. Mohandas and R. Balakrishan. 1987. Role of plant parasitic nematodes in the slow wilt disease Complex of black pepper) *Piper nigrum* L. in Kerala. *Indian Journal of Nematology* 17: 225-230 In: Nematode parasites of citrus. Larry W. Duncan (Eds), In: *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture 2nd edition*. 2005. Luc, M., Sikora, R. A. and Bridge, J. (Eds), Pp. 319 - 392. CAB International, Oxfordshire, UK.
- Roland, N.P and M. Moens. 2006. *Plant Nematode*. CABI. 447p.
- O' Bannon, J.H. and Tomerin, A.T. 1977. Control of burrowing nematode, *Radopholus similis* with DBCP and Oxamyl. *Plant Disease Reporter* 61,450-455 In: Nematode parasites of citrus. Larry W. Duncan (Eds), In: *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture 2nd edition*. 2005. Luc, M., Sikora, R. A. and Bridge, J. (Eds), Pp. 319 - 392. CAB International, Oxfordshire, UK.
- Poucher, C., Ford, H. W., Suit, R. F., and DuCharme, E. P. 1967. Burrowing nematode in Citrus. Florida Department of Agriculture, Division of Plant Industry Bulletin No. 7 In: Nematode parasites of citrus. Larry W. Duncan (Eds), In: *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture 2nd edition*. 2005. Luc, M., Sikora, R. A. and Bridge, J. (Eds), Pp. 319 - 392. CAB International, Oxfordshire, UK.
- Ryss, A. Y. 2003. Taxonomy, evolution and phylogeny of the genus *Radopholus* (didelphic species) according to morphological data, with a key to species (Nematoda: Tylenchida). *Zoo systematica Rossica* 11: 243-256.
- Ryss, A.Y. and Karnkowski.W. 2010 Observations on *Radopholus bridgei* Siddiqi & Hahn, 1995 intercepted in exotic aquarium plants imported to Poland October *Nematology* 12:827-833. Available from DOI: 10.1163/138855410X491614
- Siddiqi, M.R. 2000. *Tylenchida: parasites of plant sand insects*. 2nded. CABI Publishing UK, Wallingford GB. pp.353-358.
- Suit, R. F and Brooks, T. L, 1957 Current information relating to barriers for the burrowing nematode proceeding of the Florida state Horticultural society 70,55- 57 In: Nematode parasites of citrus. Larry W. Duncan (Eds), In: *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture 2nd edition*. 2005. Luc, M., Sikora, R. A. and Bridge, J. (Eds), Pp. 319 - 392. CAB International, Oxfordshire, UK.
- Tan, M., J. Cobon, E. Aitken and L. G. Cook. 2010. Support for the “ out-of-South East Asia” hypothesis for the origin of Australian populations of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Nematoda: Pratylenchidae. *Syst. Parasitol* 77(3): 175-183.
- Thorne, G. 1961. *Principles of nematology*. McGraw-Hill Book Company, New York, NY.
- Volcy, C. 2011. Past and present of the nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne with emphasis on *Musa*. A review, *Agron. Colomb.* 29(3).

Table 1 The monitory process for exportation ornamental and aquatic plant populations sent for nematode diagnostics per year

Ornamental and aquatic plants for exportation	The number of plant-populations sent for nematode diagnostics per year			The number of <i>R.similis</i> populations are found in plant samples per year		
	2017	2018	2019	2017	2018	2019
	<i>Acorus</i> spp.	15	16	17	3	8
<i>Aglaonema</i> spp.	12	13	12	0	0	0
<i>Alternanthera</i> spp.	11	13	12	0	0	0
<i>Ammania</i> spp.	10	12	14	0	0	0
<i>Ammoricia aquatica</i>	0	6	7	0	0	0
<i>Anubias barteri</i> 'Broad Leaf'	15	12	11	2	0	0
<i>Anubias barteri</i> var. <i>barteri</i>	7	6	5	0	0	0
<i>Anubias coffeefolia</i>	7	6	5	0	0	0
<i>Anubias congensis</i>	13	15	12	0	0	0
<i>Anubias lanceolata</i>	7	7	6	0	0	0
<i>Anubias minima</i>	13	12	12	1	0	0
<i>Anubias nana</i>	14	13	11	1	0	0
<i>Anubias</i> spp.	19	18	19	1	0	0
<i>Aponogeton</i> spp.	4	6	6	0	0	0
<i>Bacopa</i> spp.	12	12	13	0	0	0
<i>Barclaya</i> spp.	11	12	8	0	0	0
<i>Bolbitis</i> spp.	11	12	12	0	0	0
<i>Bucephalandra</i> spp.	7	6	6	0	0	0
<i>Cabomba</i> spp.	12	14	15	0	0	0
<i>Cardamine</i> spp.	6	11	7	0	0	0
<i>Ceratophyllum</i> spp.	4	6	7	0	0	0
<i>Ceratopteris</i> spp.	7	6	6	0	0	0
<i>Chlorophytum</i> spp.	11	12	13	0	0	1
<i>Cordyline</i> spp.	5	8	6	0	0	0
<i>Crinum</i> spp.	2	8	5	0	0	0

Table 1 The monitory process for exportation ornamental and aquatic plant populations sent for nematode diagnostics per year (continue)

Ornamental and aquatic plants for exportation	The number of plant-populations sent for nematode diagnostics per year			The number of <i>R.similis</i> populations are found in plant samples per year		
	2017	2018	2019	2017	2018	2019
	<i>Cryptocoryne blassi</i>	3	5	3	0	0
<i>Cryptocoryne</i> spp.	11	12	14	0	0	0
<i>Cyperus</i> spp.	6	6	6	0	0	0
<i>Dracaena</i> spp.	11	13	13	0	0	0
<i>Echinodorus</i> spp.	12	14	14	0	0	0
<i>Eichhornia</i> spp.	10	12	12	0	0	0
<i>Eleocharis</i> spp.	12	15	13	0	0	0
<i>Elodea</i> spp.	10	12	14	0	0	0
<i>Eriocaulon</i> spp.	1	1	7	0	0	0
<i>Eustralis</i> spp.	6	7	7	0	0	0
<i>Fittonia</i> spp.	1	2	6	0	0	0
<i>Fissdens</i> .spp	0	3	0	0	0	0
<i>Gratiola</i> spp.	8	12	12	0	0	0
<i>Glossostigma</i> spp.	10	12	14	0	0	0
<i>Gymnocoronis</i> spp.	6	8	6	0	0	0
<i>Hedyotis</i> spp.	6	6	6	0	0	0
<i>Hemianthus</i> spp.	6	7	6	0	0	0
<i>Hemigraphis</i> spp.	11	13	12	0	0	0
<i>Heteranthera</i> spp.	9	12	10	0	0	1
<i>Homalomera</i> spp.	6	6	6	0	0	0
<i>Hottonia</i> spp.	4	6	6	0	0	0
<i>Hydrocotyle</i> spp.	10	13	13	0	0	0
<i>Hygrophila</i> spp.	11	12	16	0	0	1
<i>Hygrophyza</i> spp.	0	5	6	0	0	0
<i>Isoetes</i> spp.	6	6	7	0	0	0

Table 1 The monitory process for exportation ornamental and aquatic plant populations sent for nematode diagnostics per year (continue)

Ornamental and aquatic plants for exportation	The number of plant-populations sent for nematode diagnostics per year			The number of <i>R.similis</i> populations are found in plant samples per year		
	2017	2018	2019	2017	2018	2019
	<i>Juncus</i> spp.	6	6	6	0	0
<i>Lagenandra</i> spp.	6	6	6	0	0	0
<i>Lilaeopsis</i> spp.	10	14	14	0	0	1
<i>Limnobiium</i> spp	0	1	7	0	0	0
<i>Limnophila</i> spp.	12	14	15	0	0	0
<i>Lindernia</i> spp.	10	12	13	0	0	0
<i>Lobelia</i> spp.	11	12	14	0	0	0
<i>Ludwigia</i> spp.	10	12	12	0	0	0
<i>Lysimachia</i> spp.	6	7	6	0	0	0
<i>Marsilea</i> spp.	6	6	6	0	0	0
<i>Mayaca</i> spp.	6	5	7	0	0	0
<i>Micranthemum</i> spp.	12	13	12	1	0	0
<i>Microsorium</i> spp.	11	14	12	0	0	0
<i>Monosolenium</i> spp.	8	6	6	0	0	0
<i>Murdannia</i> spp.	0	6	6	0	0	0
<i>Myriophyllum</i> spp.	7	6	10	0	0	0
<i>Nesae</i> spp.	0	2	7	0	0	0
<i>Najas</i> spp.	4	8	6	0	0	0
<i>Nomaphila</i> spp.	10	12	13	0	0	0
<i>Nuphar</i> spp.	4	7	6	0	0	0
<i>Nymphaea</i> spp.	10	14	13	0	0	0
<i>Nymphooides</i> spp.	6	8	7	0	0	0
<i>Ophiopogon</i> spp.	11	13	12	0	0	0
<i>Pandanus</i> spp.	4	6	7	0	0	0
<i>Panthorum</i> spp.	0	4	7	0	0	0

Table 1 The monitory process for exportation ornamental and aquatic plant populations sent for nematode diagnostics per year (continue)

Ornamental and aquatic plants for exportation	The number of plant-populations sent for nematode diagnostics per year			The number of <i>R.similis</i> populations are found in plant samples per year		
	2017	2018	2019	2017	2018	2019
	<i>Phyllanthus</i> spp.	0	5	7	0	0
<i>Piptospatha</i> spp.	6	7	7	0	0	0
<i>Pista</i> spp.	10	12	13	0	0	0
<i>Pogostemon</i> spp.	6	6	6	0	0	0
<i>Polygonum</i> spp.	6	6	7	0	0	0
<i>Proserpinaca</i> spp.	5	6	6	0	0	0
<i>Ranalisma</i> spp.	0	1	4	0	0	0
<i>Ranunculus</i> spp.	6	7	6	0	0	0
<i>Riccia</i> spp.	0	1	7	0	0	0
<i>Rorippa</i> spp.	6	6	8	0	0	0
<i>Rotala</i> spp.	10	12	12	0	0	0
<i>Sagittaria</i> spp.	10	14	13	0	0	0
<i>Salvinia</i> spp.	9	13	13	0	0	0
<i>Samolus</i> spp.	0	1	0	0	0	0
<i>Saururus</i> spp.	11	13	13	0	0	0
<i>Spathiphyllum</i> spp.	6	7	6	0	0	0
<i>Staurogyne</i> spp.	6	6	7	0	0	0
<i>Syngonium</i> spp.	10	12	12	0	0	0
<i>Tonina</i> spp.	6	6	6	0	0	0
<i>Trapa</i> spp.	11	13	11	0	0	0
<i>Trichocoronis</i> spp.	6	7	5	0	0	0
<i>Utricularia</i> spp.	0	7	6	0	0	0
<i>Vallisneria</i> spp.	12	15	14	0	0	0
<i>Vesicularia</i> spp.	10	12	12	0	0	0
<i>Zamioculcas zamiifolia</i>	26	10	16	0	0	0

Table 1 The monitory process for exportation ornamental and aquatic plant populations sent for nematode diagnostics per year (continue)

	The total number of plant populations sent for nematode diagnostics per year.	The total number of <i>R.similis</i> populations are found in plant populations per year.
2017	759	9
2018	901	8
2019	923	9

Table 1 The monitory process for exportation ornamental and aquatic plant populations sent for nematode diagnostics per year (continue)

The total number of plant populations in three years.	The total number of <i>R. Similis</i> populations in three years.
2583	26

Table 2 Morphometric characteristics of *R. similis* comparison between this study and PM 7/88 (1): *Radopholus similis* of EPPO Bulletin from 28 different samples (measurement in μm and in the form: mean \pm standard deviation)

Character	EPPO	This study	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S17	S18	S19	S20
Female												
Body length	510–820 (655)	534-663 (592 \pm 33.3)	594	547	587	597	579	590	561	593	552	534
Stylet length	16–23 (18.5)	16-18 (17 \pm 0.42)	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
Female gonad anterior branch	112–297 (174)	108-138 (126 \pm 7.18)	130	120	130	108	134	132	120	133	138	129
Female gonad posterior branch	103–269 (165)	103-132 (117 \pm 7.44)	124	105	129	107	113	106	109	127	124	118
Body diameter at the anus	13–24 (17.7)	13-16 (14 \pm 0.85)	13	14	14	13	15	13	15	14	16	13
Distance from Excretory pore to head tip	59–115 (88)	75-96 (85 \pm 5.21)	90	80	83	86	86	84	80	89	81	83
Vulva %	50–67 (57)	50-61 (57 \pm 1.91)	57	57	58	57	57	53	56	56	50	57
a	20–34 (27)	30-38 (33 \pm 1.94)	33	31	32	35	34	36	32	31	30	32
b	6–10 (7.9)	8-10 (9 \pm 0.46)	8	9	9	10	8	9	9	9	9	9
c	7–13 (9.4)	7-11 (10 \pm 0.73)	10	9	10	10	10	10	7	11	11	8
hyaline region length		9-15 (11 \pm 1.24)	11	11	9	10	13	12	12	10	11	12

Table 2 Morphometric characteristics of *R. similis* comparison between this study and PM 7/88 (1): *Radopholus similis* of EPPO Bulletin from 28 different samples (measurement in μm and in the form: mean \pm standard deviation) (continue)

Character	EPPO	This study	S21	S22	S23	S24	S25	S27	S28	S29	S30	S31
Female												
Body length	510–820 (655)	534–663 (592 \pm 33.3)	580	596	542	655	581	613	561	605	605	621
Stylet length	16–23 (18.5)	16–18 (17 \pm 0.42)	17	17	17	17	17	16	17	17	16	17
Female gonad anterior branch	112–297 (174)	108–138 (126 \pm 7.18)	126	121	123	137	127	131	116	132	133	124
Female gonad posterior branch	103–269 (165)	103–132 (117 \pm 7.44)	121	120	113	132	125	125	115	120	123	121
Body diameter at the anus	13–24 (17.7)	13–16 (14 \pm 0.85)	14	13	13	15	15	13	13	14	16	15
Distance from Excretory pore to head tip	59–115 (88)	75–96 (85 \pm 5.21)	86	78	87	90	81	75	77	88	86	92
Vulva %	50–67 (57)	50–61 (57 \pm 1.91)	57	57	61	57	55	57	57	57	58	57
a	20–34 (27)	30–38 (33 \pm 1.94)	36	35	30	38	31	31	32	34	31	31
b	6–10 (7.9)	8–10 (9 \pm 0.46)	9	9	8	10	9	9	9	9	9	9
c	7–13 (9.4)	7–11 (10 \pm 0.73)	10	10	10	10	10	10	8	9	10	10
hyaline region length		9–15 (11 \pm 1.24)	10	12	13	12	11	13	11	12	10	10

Table 2. Morphometric characteristics of *R. similis* comparison between this study and PM 7/88 (1): *Radopholus similis* of EPPO Bulletin from 28 different samples (measurement in μm and in the form: mean \pm standard deviation) (continue)

Character Female	EPPO	This study	S32	S42	S43	S44	S45	S46	S47	S48
Body length	510-820 (655)	534-663 (592 \pm 33.3)	633	607	663	637	553	570	584	642
Stylet length	16-23 (18.5)	16-18 (17 \pm 0.42)	16	17	17	16	17	18	17	16
Female gonad anterior branch	112-297 (174)	108-138 (126 \pm 7.18)	121	115	136	120	122	124	131	121
Female gonad posterior branch	103-269 (165)	103-132 (117 \pm 7.44)	115	119	117	118	103	106	118	115
Body diameter at the anus	13-24 (17.7)	13-16 (14 \pm 0.85)	14	14	15	14	13	13	15	14
Distance from Excretory pore to head tip	59-115 (88)	75-96 (85 \pm 5.21)	77	90	91	93	85	87	84	96
Vulva %	50-67 (57)	50-61 (57 \pm 1.91)	57	54	58	59	58	58	58	58
a	20-34 (27)	30-38 (33 \pm 1.94)	35	34	34	31	31	34	30	34
b	6-10 (7.9)	8-10 (9 \pm 0.46)	9	9	10	9	9	10	9	10
c	7-13 (9.4)	7-11 (10 \pm 0.73)	9	9	10	10	10	9	9	10
hyaline region length		9-15 (11 \pm 1.24)	10	11	15	11	10	11	9	11

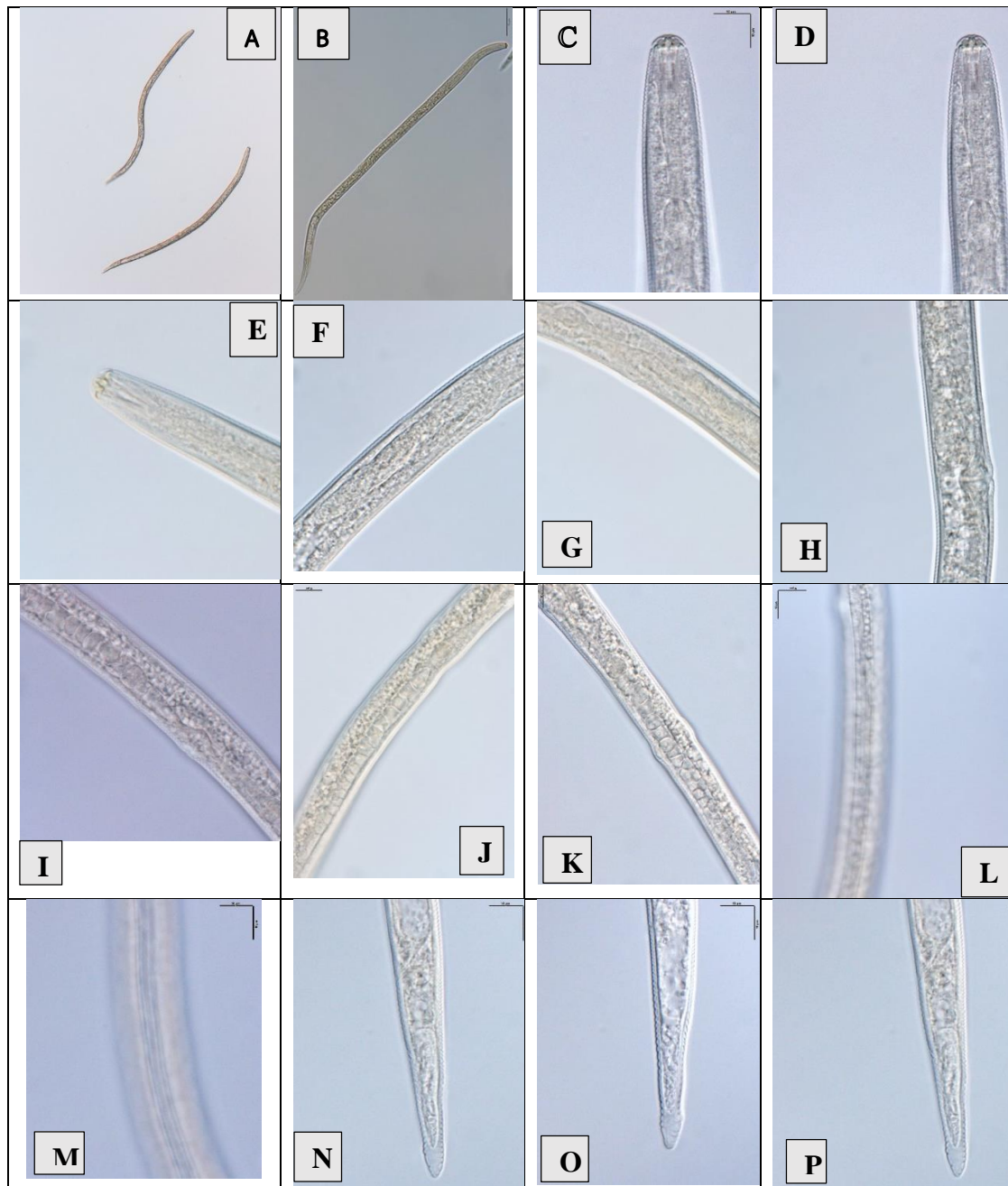


Figure 1 Differential interference contrast (DIC) microscope photographs of female *Radopholus similis* (A-B) : general view (C-E) : anterior part (F-G) : excretory pore (H) : a vulva (I) : the female genital system composed of two opposed branches (didelphic) with spermatheca filled with rod-like sperm (J) : female gonad anterior branch (K) : female gonad posterior branch (L-M) : lateral field near midbody (N-P) : tails

ศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp.
สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก
Study the Species and Epidemic Area, *Colletotrichum* spp.
Causal Agent of Chili Anthracnose Disease

รารทิพย์ ภาสบุตร อภิรัชต์ สมฤทธิ อมรรักษ์ คัดใจเดียว
มะโนรัตน์ สุดสงวน
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส ระหว่างเดือน ตุลาคม 2560 ถึง เดือน กันยายน 2562 จากแหล่งปลูกพริกในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาค ตะวันออก ได้ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส จำนวน 70 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ได้มา ศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเชื้อราสาเหตุโรคออกจากผลพริก แยกได้รา *Colletotrichum* spp. จำนวน 80 ไอโซเลต ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 69 ไอโซเลต จัดกลุ่มของราตามลักษณะรูปร่างของ โคนินเดีย เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโคนินเดียรูปร่าง ทรงกระบอกหรือรูปกระสวยตรง และ กลุ่มโคนินเดียรูปร่างโค้งคล้ายพระจันทร์เสี้ยว และได้จำแนก ชนิดของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกเป็น *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butl. and Bisby *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc และ *Colletotrichum acutatum* Simmonds ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ของรา *Colletotrichum* spp. โดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี รวมทั้งรา *Colletotrichum* spp. ที่ยังจำแนกชนิดไม่แล้ว เสร็จจะได้ดำเนินการในปี พ.ศ. 2563 ต่อไป

คำหลัก : *Colletotrichum* โรคแอนแทรคโนสของพริก

คำนำ

พริก (Chili ; *Capsicum* spp.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ที่นิยมปลูก ได้แก่ พริกชี้หนุผลใหญ่ พริกชี้ฟ้า พริกชี้หนุสวน พริกหยวก พริกเหลือง พริกหนุ่ม พริกกะเหรียง และ พริกหวาน เป็นต้น เมื่อนำพริกแต่ละชนิดมาจัดกลุ่ม จัดได้ 3 กลุ่ม คือ 1.กลุ่มพริกใหญ่ (*Capsicum annuum* L.) พริกกลุ่มนี้มีขนาดผลกว้างประมาณ 1-3 เซนติเมตร ยาว 8-20 เซนติเมตร มีความเผ็ดในระดับน้อยถึงเผ็ดปานกลาง พริกที่ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มพริกใหญ่ ได้แก่ พริกบางช้าง พริกมัน พริกหนุ่ม พริกเหลือง พริกขอส และพริกหวาน 2.กลุ่มพริกชี้หนุใหญ่ (*Capsicum annuum* L.) ขนาดของผลโดยประมาณกว้าง 0.3-1 เซนติเมตร ผลยาว 3-8 เซนติเมตร มีรสเผ็ด พริกที่จัดอยู่ในกลุ่มพริกชี้หนุใหญ่ ได้แก่ พริกจินดา พริกหัวเรือ พริกหัวสี่ทวน พริกยอดสน และพริกขอส 3. กลุ่มพริกชี้หนุเล็ก (*Capsicum frutescens* L.) ขนาดผลโดยประมาณยาวน้อยกว่า 3 เซนติเมตร พริกชี้หนุผลเล็กเป็นพริกที่มีรสเผ็ดจัด ตัวอย่างพริกชี้หนุเล็ก ได้แก่ พริกชี้หนุหอม พริกขี้นกและพริกกะเหรียง (วิลาวัลย์, 2557) ในระบบการปลูกพริกโรคที่สำคัญที่สุดโรคหนึ่งคือ โรคแอนแทรกโนส (Anthracnose) หรือ โรคกุ้งแห้งของพริก ซึ่งจะพบระบาดทำความเสียหายต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิตพริกในแปลงปลูกพริกของเกษตรกรในทุกแหล่งปลูก (นิรนาม, 2552) มีรายงานว่าเกิดจากราสกุล *Colletotrichum* หลายสปีชีส์ ซึ่งโดยส่วนใหญ่พบว่ามีสาเหตุจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. และรา *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby การแพร่ระบาดของโรคนี้เกิดจากโคนิเดียของเชื้อราบนผลพริกที่เป็นโรคแพร่ไปกับลม น้ำฝน และแมลง เชื้อราอยู่ข้ามฤดูปลูกโดยเส้นใย ราที่อาศัยอยู่ในเมล็ดจะเข้าทำลายต้นกล้าในระยะพีชอกเป็นต้นกล้าเกิดอาการกล้าเน่าตายและเข้าทำลายพืชต่อเนื่องในระยะติดผลกระทั่งผลเริ่มสุกแก่ (Chandra *et al.*, 2009; Than *et.al.*, 2008) ลักษณะอาการส่วนใหญ่มักพบบนผลพริกในระยะเริ่มสุกก่อนที่จะเปลี่ยนสี อาการในระยะแรกจะปรากฏเป็นจุดน้ำน้ำเล็กๆ แผลบุมลึกลงไปเล็กน้อย ต่อมาแผลขยายขนาดออกไปในลักษณะวงรี หรือวงกลม เกิดเป็นวงดำซ้อนกันเป็นชั้นๆ บางครั้งจะพบเมือกเยิ้มสีส้มอ่อนที่บริเวณแผล ผลพริกที่เป็นโรคจะเหี่ยวแฟบ สีเหลืองซีด ผลโค้งงอในสภาพแวดล้อมเหมาะสม และหรือพริกเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค แผลจะขยายลุกลามสู่ต้นอื่นๆ อย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายมาก บางแปลงอาจเก็บเกี่ยวผลผลิตไม่ได้เลย โรคแอนแทรกโนสในพริกจะระบาดรุนแรงมากในสภาพฟ้าอากาศที่มีความชื้นสูง และอุณหภูมิร้อนอบอ้าว (Robert *et. al.*, 2001; Chandra *et al.*, 2009; Than *et.al.*, 2008)

ปัจจุบันระบบนิเวศน์เกษตรมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ ทั้งสภาพอากาศและชนิดของพันธุ์พืชที่ปลูก จึงอาจมีแนวโน้มทำให้ราสาเหตุโรคมีความผันแปรในหลายๆด้านรวมทั้งความสามารถในการทำให้เกิดโรค ซึ่งพบว่าปัจจุบันพบการเข้าทำลายผลพริกได้ทุกระยะทั้งที่ผลยังเขียวและผลที่เปลี่ยนสีแล้ว ดังนั้นการศึกษาชนิดและเขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสพริก จึงมีความสำคัญที่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานและชนิดของราสาเหตุโรคบนพริกแต่ละสายพันธุ์ รวมทั้งแหล่งการแพร่ระบาดของโรค ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญสำหรับการศึกษาวิธีการป้องกันกำจัดโรค รวมทั้งได้สายพันธุ์รา *Colletotrichum* spp. เก็บรักษาไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เพื่อการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพริกเป็นโรคที่รวบรวมได้จากแปลงปลูก
2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างโรคพืช
3. อาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดต่างๆ วุ้น มันฝรั่ง
4. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง
5. วัสดุอุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ
6. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการบันทึกข้อมูลและบันทึกภาพ

วิธีการ

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างพริกที่แสดงอาการเป็นโรคแอนแทรคโนส

เก็บรวบรวมตัวอย่างพริกที่แสดงอาการเป็นโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกพริกที่สำคัญโดยกำหนดพื้นที่หรือแหล่งปลูกดังนี้

ภาคกลาง เช่น จังหวัดสุโขทัย สุพรรณบุรี เพชรบูรณ์ พิษณุโลก พิจิตร กำแพงเพชร นครสวรรค์ พระนครศรีอยุธยา นครปฐม ลพบุรี

ภาคเหนือ เช่น จังหวัดเชียงราย แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง แพร่ น่าน พะเยา อุตรดิตถ์

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดอุบลราชธานี นครราชสีมา ชัยภูมิ ขอนแก่น ร้อยเอ็ด นครพนมอำนาจเจริญศรีสะเกษ เลย

ภาคตะวันออกเช่น จังหวัดปราจีนบุรี สระแก้ว ระยอง ชลบุรี จันทบุรี ตราด ฉะเชิงเทรา

ภาคตะวันตก เช่น จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์

ภาคใต้ เช่น จังหวัดกระบี่ ชุมพร นครศรีธรรมราช พัทลุง สุราษฎร์ธานี

วางแผนการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูก โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างโรค 5 แถวต่อแปลง กำหนดการสุ่มแบบแถวเว้นแถว นำตัวอย่างโรคที่ได้ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก เจาะระบายความชื้น นำตัวอย่างพริกมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคและศึกษาชนิดที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช

2. การศึกษาราก *Colletotrichum* spp.

2.1 ศึกษาเชื้อสาเหตุจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง (Direct observation) ศึกษาลักษณะโครงสร้างที่สร้างโคนินเดี่ยวของราบนผลพริกที่เป็นโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ใช้เข็มปลายแหลมย้ายโคนินเดี่ยวหรือโครงสร้างที่สร้างส่วนขยายพันธุ์ของรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ ตรวจสอบลักษณะต่าง ๆ ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ้าไม่พบโคนินเดี่ยวของราบนชิ้นส่วนพืช นำชิ้นส่วนพืชมาวางในกล่องที่ทำให้ชื้น (moist chamber) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน ตรวจสอบชิ้นส่วนพืชเมื่อพบการสร้างกลุ่มโคนินเดี่ยว ใช้เข็มปลายแหลมย้ายส่วนของราที่เจริญอยู่บนชิ้นส่วนพืชมารวมดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound บันทึกลักษณะต่าง ๆ วัดขนาดส่วนต่าง ๆ ของราและถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ย้ายกลุ่มโคนินเดี่ยวไปเลี้ยงให้บริสุทธิ์

2.2 ศึกษาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค (Tissue transplanting) ตัดตัวอย่างพืชที่เป็นโรคบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติ ฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนพืชโดยแช่ในสารละลายคลอรีน 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3-5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร half strength Potato Dextrose Agar (1/2

PDA) ภายใต้ aseptic condition บ่มไว้ที่ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 2-3 วัน ตรวจสอบเส้นใยรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ตัดปลายเส้นใย (hyphal tip) ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช วางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ จนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษารายละเอียดของรา เพื่อจำแนกชนิดและเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

2.3 จำแนกชนิดของรา *Colletotrichum* spp.

- ศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารสังเคราะห์ เช่น ลักษณะการเจริญและสีของโคโลนี ลักษณะโครงสร้างที่ให้กำเนิดโคนิเดีย

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของรา เช่น ลักษณะและขนาดของเส้นใย ลักษณะรูปร่าง สีและขนาดของโคนิเดีย ลักษณะรูปร่าง สีและขนาดของแอฟเพรสซอเรีย (appressoria) โดยวิธีการเลี้ยงราบนสไลด์ (slide culture)

- นำลักษณะสัณฐานที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบกับคู่มือ เอกสารและวิธีการจัดจำแนกชนิดรา *Colletotrichum* spp. ของ Sutton (1980) Bailey and Jeger (1992) วิรัชและคณะ (2528) รัตยาและคณะ (2553) และ วรานันท์ (2554)

3. ศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. โดยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีตามวิธีการของ วรานันท์ (2554)

ศึกษาการสร้าง clear zone บนอาหาร Casein hydrolysis medium (CHM)

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

ศึกษาการสร้าง clear zone บนอาหาร Casein from bovine milk medium (CBM)

นำเชื้อรา *Colletotrichum* แต่ละชนิดที่ให้ค่า clear zone ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาการสร้าง clear zone บนอาหาร Casein hydrolysis medium โดยคัดเลือกไอโซเลตที่สร้าง clear zone ในระดับมากที่สุดและน้อยที่สุด มาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นย้ายเชื้อมาทดสอบบนอาหาร CBM ภายใต้แสง black light เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสลับกับความมืด 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน บันทึกผลโดยวัดขนาดของ clear zone ศึกษาความสัมพันธ์ของ clear zone และชนิดของรา *Colletotrichum* spp. แต่ละไอโซเลต

การบันทึกข้อมูล

บันทึกรายละเอียดของข้อมูลในการสำรวจเช่น ชื่อที่อยู่ที่ตั้งของแปลง วัน เดือน ปีที่เก็บตัวอย่าง พันธุ์พืช เป็นต้น

บันทึกลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราเช่น ลักษณะการเจริญและสีของโคโลนี ลักษณะและขนาดของเส้นใย ลักษณะรูปร่าง ขนาดและสีของโคนิเดีย รูปร่างและขนาดของแอฟเพรสซอเรีย

บันทึกขนาดของ clear zone บนอาหาร CHM และ CBM

เวลาและสถานที่

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

สถานที่ทำการทดลอง แปลงปลูกพริกของเกษตรกร และห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บรวบรวมตัวอย่างพริกที่แสดงอาการเป็นโรคแอนแทรคโนส

ระหว่างเดือน ตุลาคม 2560 ถึง เดือนกันยายน 2561 เก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากแหล่งปลูกพริกในเขตภาคเหนือและภาคกลางได้แก่ จังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ สุโขทัย แพร่ พิชณุโลก และสุพรรณบุรี ได้ตัวอย่างพริก ในกลุ่ม *Capsicum annuum* ได้แก่ พริกชี้หนูผลใหญ่พันธุ์จินดา พันธุ์ฮอตเตอร์ พันธุ์หัวเรือ พริกในกลุ่ม *Capsicum frutescens* หรือพริกชี้หนูผลเล็กได้แก่ พริกกะเหรียง และพริกในกลุ่ม *Capsicum chinense* Jacq. หรือพริกผลใหญ่ได้แก่ พริกหนุ่มเขียว พริกย่า พริกหยวก จำนวน 40 ตัวอย่าง

ระหว่างเดือน ตุลาคม 2561 ถึง เดือนกันยายน 2562 เก็บตัวอย่างผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส จากแหล่งปลูกพริกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออกได้แก่ จังหวัด บึงกาฬ หนองคาย ชัยภูมิ สกลนคร นครพนม อุบลราชธานี ศรีสะเกษ นครราชสีมา ระยอง และจันทบุรี ได้ตัวอย่างพริก ในกลุ่ม *Capsicum annuum* ได้แก่ พริกชี้หนูผลใหญ่พันธุ์จินดา พันธุ์เรดฮันเตอร์ พันธุ์ฮอตเตอร์ พันธุ์หัวเรือ พริกในกลุ่ม *Capsicum frutescens* หรือพริกชี้หนูผลเล็กได้แก่ พริกช่อ พริกส้มหรือพริกเล็บมือนาง พริกกะเหรียง และพริกในกลุ่ม *Capsicum chinense* Jacq. หรือพริกผลใหญ่ได้แก่ พริกหนุ่มเขียว พริกย่า พริกหยวก จำนวน 30 ตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเชื้อราสาเหตุโรคออกจากพืชโดยตรง (Direct observation) และโดยการแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค (Tissue transplanting) แยกได้รา *Colletotrichum* spp. จำนวน 80 ไอโซเลต ศึกษาลักษณะการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาลักษณะทางสัณฐาน เก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิชาการเกษตร

2. การศึกษาราส *Colletotrichum* spp. จากส่วนของพืชที่เป็นโรค

แยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากผลพริก แบบ single conidia แล้วตัดปลายเส้นใยที่งอกมาเลี้ยงบน อาหาร PDA ศึกษาลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร ศึกษาลักษณะทางสัณฐานและเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิชาการเกษตร

3. การศึกษาราส *Colletotrichum* spp.

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของรา *Colletotrichum* spp. โดยเปรียบเทียบกับคู่มือการจัดจำแนกชนิดรา *Colletotrichum* spp. ตามเอกสารและวิธีการของ Sutton (1980) Bailey and Jeger (1992) วิรัชและคณะ (2528) รัตยาและคณะ (2553) และ วรานันท์ (2554) จัดกลุ่มของราตามลักษณะรูปร่างของโคนิเดีย เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโคนิเดียรูปร่างทรงกระบอกหรือกระสวยตรง และ กลุ่มโคนิเดียรูปร่างโค้ง จัดจำแนกชนิดของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในเบื้องต้นได้เป็น *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butl. and Bisby (Sutton, 1980) ลักษณะอาการ เริ่มแรกแผลมีลักษณะคอนขางกลมยุบตัวลึกลงจากผิวผล ขยายขนาดตามความยาวของผลเป็นวงรี หรือรูปไข่ บางแผลตรงกลางมีสีเข้มขอบมีสีอ่อน มีจุดสีดำซึ่งเป็นกลุ่มของ acervuli เรียงเป็นวงซ้อนกัน มองเห็นได้ชัด บน acervuli มีกลุ่มสปอร์ (spore mass) สีครีมถึงสีชมพูอมส้ม มักพบ setae สีดำยาวสูงกว่ากลุ่มสปอร์ ส่วนใหญ่พบการเกิดโรคบนผลพริกที่แก่จัดหรือผลพริกที่สุกแดง

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA โคโลนีมีสีเทาถึงสีเทาดำ เส้นใยฟูเหนืออาหารเล็กน้อย บางครั้งแบนราบไปบนอาหาร พบกลุ่มของโคนิเดียเมื่อเชื้อเจริญได้ 10-14 วัน ลักษณะกลุ่มโคนิเดียเป็นเมือกสีครีมถึงส้มอ่อน เกิดซ้อนกันเป็นวง เมื่อดูดด้วยกล้องจุลทรรศน์ เส้นใยของราใสไม่มีสี มีผนัง

กั้น (septum) โคนิเดียเซลล์เดี่ยว ใส (hyaline) ไม่มีสี รูปร่างโค้งคล้ายเคียวหรือพระจันทร์เสี้ยว (falcate) ปลายเรียวแหลม ผนังเรียบ

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. and Sacc (Sutton, 1980)

ลักษณะอาการโรค แผลเริ่มแรกมีลักษณะฉ่ำน้ำสีเข้มยุบตัวลึกลงเป็นแอ่งลึกจากผิวผล รูปร่างค่อนข้างกลมถึงยาวรี แผลจะขยายขนาดตามความยาวของผล บริเวณแผลพบจุดสีดำขนาดเล็ก ซึ่งเป็นกลุ่ม acervuli ของราฝังอยู่ในผิวพืช เรียงซ้อนกันเป็นวง มีกลุ่มสปอร์ (spore mass) ลักษณะเป็นเมือกสีส้มจำนวนมากบริเวณแผล ไม่พบการสร้าง setae ส่วนใหญ่พบการเกิดโรคบนผลพริกที่แก่จัดเริ่มเปลี่ยนสีและผลที่สุกแดง

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA โคลนีมีสีขาวอมเทา เมื่อมีอายุมากขึ้นมีสีเทาถึงสีเทาเข้ม เส้นใยเจริญฟูเหนืออาหาร เมื่อเชื้อเจริญได้ 10-14 วัน เริ่มพบกลุ่มของโคนิเดียเป็นเมือกสีส้ม ลักษณะของโคนิเดีย (conidia) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โคนิเดียรูปร่างกระบอกตรง เซลล์เดี่ยว ปลายมนฐานตัดตรง ผนังเรียบ ใส ไม่มีสี เส้นใยของราใสไม่มีสี มีผนังกั้น

Colletotrichum acutatum Simmonds (Sutton, 1980)

ลักษณะอาการ แผลมีลักษณะฉ่ำน้ำสีเข้ม ยุบตัวลึกลงเป็นแอ่งลึกจากผิวผล เริ่มแรกมีรูปร่างค่อนข้างกลม เมื่อขยายใหญ่ตามความยาวของผล เป็นรูปวงรีหรือรูปร่างไม่แน่นอน ไม่พบการสร้าง setae มีกลุ่มสปอร์ (spore mass) สีสมจำนวนมากบริเวณแผล พบอาการเกิดกับผลพริกทั้งที่ยังอ่อน มีสีเขียวและผลพริกที่แก่จัดเริ่มเปลี่ยนสี

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA มีสีขาวส้มอมชมพู หรือสีเทาอมชมพู เส้นใยคล้ายกำมะหยี่ฟูเหนืออาหารเล็กน้อย เจริญช้ากว่า *C. gloeosporioides* ลักษณะของโคนิเดียเมื่อดูใตกล้องจุลทรรศน์ โคนิเดียเซลล์เดี่ยว ใส ผนังเรียบ รูปร่างหลายแบบมีทั้งรูปกระสวย รูปทรงกระบอกตรง ปลายเรียวแหลมด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้าน และรูปร่างคล้ายกระบอก เส้นใยของราใสไม่มีสี มีผนังกั้น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

-

เอกสารอ้างอิง

- นิรนาม. 2552. *คู่มือโรคผัก* กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 154 หน้า.
- รัตยา พงศ์พิสุทธา วรานันท์ วิญญรัตน์ โชติรส รอดเกตุ และเทพพนม แสงเพลิง. 2553. ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. ปีที่ 41 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) มกราคม-เมษายน. หน้า 318 -321.
- วรานันท์ วิญญรัตน์ รัตยา พงศ์พิสุทธา และชัยณรงค์ รัตนกรिताกุล. 2553. การทดสอบ casein hydrolysis เพื่อจำแนก species ของ *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนส. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. ปีที่ 41 ฉบับที่ 1 (พิเศษ) มกราคม-เมษายน. หน้า 299-302.
- วรานันท์ วิญญรัตน์. 2554. *การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา Colletotrichum สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 136 หน้า.

- วิลาวัลย์ ไคร่ครวญ. 2557. *พริกของไทย.พริกใหญ่ พริกเล็ก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.doa.go.th/pibai/pibai/n17/v_3-apr/korkui.html. (23 กุมภาพันธ์ 2560)
- วีรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ และพัฒนา สนธิรัตน์. 2528. *Colletotrichum spp.* ในประเทศไทย. หน้า128-140. ใน: รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2528. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- 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. *Anthracoese disease of Chili Pepper*. Technical Bulletin. The Asian Seed Health Center (AsSHC), Department of Studies in Applied Botany & Biotechnology, University of Mysore, India. 15 PP.
- Robert, P.D., K.L. Pernezny and T.A. Kucharek. 2001. *Anthracoese 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/PP/PP10400.pdf> (23 February 2017).
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. CMI. Kew Surrey, England. 695 p.
- 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.



Fig.1 Anthracnose symptoms on chilli fruits

ศึกษาชีววิทยาของแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (Fabricius) The Biology of BreadFruit Fly (*Bactrocera umbrosa* (Fabricius))

กรกต ดำรงค์^{1/} สัณญาณี ศรีคชา^{1/}

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

^{1/}กลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ดำเนินการสำรวจและเก็บรวบรวมผลไม้ ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง และส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายในพื้นที่ธรรมชาติหรือพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร เพื่อตรวจหาแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* ในเขตพื้นที่ 16 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี ระยอง ตราด จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล ในเดือนพฤศจิกายน 2561 - สิงหาคม 2562 และนำผลไม้มายังห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาต่อโดยการเลี้ยงหนอนในผลไม้จนเป็นตัวเต็มวัย พบ *B. umbrosa* ในเขตจังหวัดภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช สงขลา และสตูล โดยพบเข้าทำลายผลขนุน จำปาตะ และฝรั่ง ซึ่งจะดำเนินการเก็บรวบรวมผลไม้ในแหล่งสำรวจที่พบ *B. umbrosa* เพิ่มเติมเพื่อนำมาเลี้ยงขยายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ สำหรับการศึกษาวงจรชีวิตและตารางชีวิตต่อไป

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* กลางปีกมีแถบสีน้ำตาลพาดตามแนวขวาง (มนตรี, 2544) ตัวเต็มวัยเพศผู้ถูกดึงดูดได้ด้วยสารล่อ Methyl Eugenol มีพืชอาหารเป็นพืชหลายชนิดในวงศ์เดียวกันหรือวงศ์ใกล้เคียง (oligophagous) (Clarke *et al.*, 2001) พบเข้าทำลายทั่วไปในพืชสกุลขนุน หรือ *Artocarpus* วงศ์ Moraceae (Allwood *et al.*, 1999; Leblanc *et al.*, 2012) และยังมีตัวอย่างตัวเต็มวัยที่ได้จากหนอนในผลมะระ (*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 โดยการฟักจากผลขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) (Drew and Romig, 2013) และมีรายงานว่าพบ *B. umbrosa* ใน

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-01-08-62

ประเทศไทยจากภาคใต้จนถึงบริเวณเพนินซูลา ประเทศมาเลเซีย จึงถือว่าแมลงวันผลไม้ชนิดนี้เป็นชนิดที่พบได้ทั่วไปในภาคใต้ (Clarke *et al.*, 2001) เช่นเดียวกับกับ Danjuma (2013) ที่ได้ทำการศึกษาถึงความหลายของชนิดแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ในสวนฝรั่งทางภาคใต้ของประเทศไทย ด้วยการใช้กับดักสารล่อตัวเต็มวัย Methyl eugenol และ Torula yeast ในจังหวัดนราธิวาส สงขลา ตรัง และสุราษฎร์ธานี พบแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ทั้งหมด 31 ชนิด โดยพบ *B. umbrosa* ซึ่งเป็นหนึ่งใน 8 ชนิดของแมลงวันผลไม้ที่พบได้จากกับดักสารล่อตัวเต็มวัยในทุกสถานประกอบการทดลอง นอกจากนี้ ยูวรินทร์ และคณะ (2554); ยูวรินทร์ และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ในภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย และศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้สกุล *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 และมีแถบขวางปีกสีน้ำตาล จาก costal ลงมาด้านล่าง 3 แถบ และบริเวณ cubital มีสีน้ำตาลแดง ท้องปล้องแรกสีน้ำตาล ปล้องที่ 3-5 มีสีน้ำตาลอ่อน ปล้องท้องด้านบนปล้องที่ 4 และปล้องท้องปล้องที่ 5 มีแถบสีดำขนาดสั้นขวาง โดยมีเขตการแพร่กระจาย จังหวัดกรุงเทพฯ นครปฐม เชียงใหม่ ตรัง กาญจนบุรี จันทบุรี นครราชสีมา ชัยภูมิ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง ภูเก็ต กระบี่ สงขลา และพังงา จากข้อมูลการดังกล่าวจะเห็นได้ว่าแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* มีแนวโน้มเป็นศัตรูพืชที่มีการแพร่กระจายได้ทั่วไป อาจเข้าทำลายในผลผลิตและมีโอกาสปนเปื้อนติดไปกับผลผลิตในภาคการเกษตรที่สำคัญได้ในอนาคต โดยในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ในประเทศไทยมีน้อยมาก และยังขาดข้อมูลทางด้านชีววิทยา ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ และสามารถนำไปใช้สำหรับการศึกษาวิจัยต่อยอดในด้านอื่น ๆ ได้ต่อไป เช่น ทางด้านนิเวศวิทยา การเข้าทำลาย และการป้องกันกำจัด เป็นต้น สามารถนำไปปรับใช้เป็นคำแนะนำและวิธีการที่จะช่วยลดปัญหาการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้ในผลผลิตของเกษตรกร ทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพมากขึ้นและตรงกับความต้องการของตลาดได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างผลไม้ ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายในธรรมชาติหรือในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร
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. กระดาษกรองเบอร์ 91 พู่กัน สำลี ปากคีบ (Forceps)
5. เอทิลแอลกอฮอล์ 95%
6. ชี้อ้อย
7. ตะแกรงร่อนเบอร์ 20
8. Brewer's yeast และน้ำตาลไอซ์ซิ่ง
9. จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
10. กล้อง Stereo microscope
11. อุปกรณ์สำหรับบันทึกข้อมูล และบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera umbrosa* (ปี 2562)

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 โดยใส่กล่องพลาสติกที่รองด้วยตะแกรงวางผลไม้ และรองกันด้วยชี้อ้อยสูงประมาณ 1 นิ้ว เมื่อหนอนแมลงวันผลไม้เข้าสู่ระยะที่ 3 จะออกจากผลไม้มาเข้าดักแต่ในชี้อ้อย คอยตรวจดูดักแต่ในชี้อ้อยทุก 2 วัน เมื่อดักแต่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม จึงร่อนชี้อ้อยด้วยตะแกรงร่อน เพื่อแยกดักแต่ออกมานำไปใส่กล่องพลาสติกและคลุมทับด้วยชี้อ้อยสูงประมาณ 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* (ปี 2563)

เก็บรวบรวมผลไม้ ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* เข้าทำลาย มาเลี้ยงต่อในห้องปฏิบัติการ เมื่อได้ตัวเต็มวัยแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* จึงนำมาเลี้ยงขยายพันธุ์ต่อจนได้รุ่นที่ 1 (F1) เพื่อทำการศึกษชีววิทยาในห้องปฏิบัติการ ดังนี้

2.1 วงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* โดยดำเนินการศึกษาวงจรชีวิตในระยะต่างๆ

ระยะไข่ ศึกษาอายุของไข่ด้วยการทำ Hatching Rate โดยเขียนลงในกระดาษกรองเบอร์ 91 ที่ให้ความชื้นตลอดเวลา แล้วเก็บไว้ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9

เซนติเมตร จากนั้นตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนที่ฟักออกจากไข่ทุก 6 ชั่วโมง ทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 100 ฟอง

ระยะหนอน ศึกษาอายุและลักษณะของหนอนวัยต่าง ๆ โดยเลี้ยงหนอนในเนื้อผลไม้ เช่น ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด บันทึกขนาด ลักษณะ และการตายของหนอนวัยต่าง ๆ โดยศึกษาจากหนอน 100 ตัว

ระยะดักด้ว ศึกษาอายุและลักษณะของดักด้ว โดยทำการบันทึกขนาด และลักษณะของดักด้ว โดยศึกษาจากดักด้ว 100 ดักด้ว

ระยะตัวเต็มวัย ศึกษาอายุวัย 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 ภายในใส่ชิ้นเนื้อผลไม้ เช่น ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด เพื่อล่อให้แมลงวางไข่ บันทึกปริมาณไข่ทุกวันจนตัวเต็มวัยเพศเมียตาย นอกจากนี้ทำการบันทึกลักษณะตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ลักษณะการจับคู่ผสมพันธุ์ และการตายของตัวเต็มวัย โดยศึกษาจากแมลงวันผลไม้จำนวน 10 คู่

2.2 ตารางชีวิต (Life table) ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ทำการศึกษาบนผลไม้ เช่น ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด โดยนำมาเจาะรูขนาด 1x1x1 เซนติเมตร จากนั้นนำกระดาษสีดำขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร วางในช่องที่เจาะไว้ แล้วนำไข่ของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* วางในกระดาษจำนวน 100 ฟองต่อผล ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นปิดช่องที่เจาะไว้ด้วย parafilm บันทึกจำนวนไข่ที่ฟัก หนอนวัยต่าง ๆ ดักด้ว และตัวเต็มวัย แล้วนำมาคำนวณตามวิธีของ Southwood (1966)

- การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลอายุและลักษณะของไข่ หนอน ดักด้ว และตัวเต็มวัย ในการศึกษาวงจรชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa*

- บันทึกข้อมูลจำนวนไข่ที่ฟัก หนอนวัยต่างๆ ดักด้ว และตัวเต็มวัย ในการคำนวณตารางชีวิตของแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa*

เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น ตุลาคม พ.ศ. 2561 สิ้นสุด กันยายน พ.ศ. 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

จากการสำรวจเก็บรวบรวมผลไม้ ขนุน จำปาตะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย (Figure 1) ในธรรมชาติหรือในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร ในเขตพื้นที่ 16 จังหวัด คือ เขตพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร และสุพรรณบุรี เขตพื้นที่ภาคตะวันออก ได้แก่

ระยอง ตราน และจันทบุรี เขตพื้นที่ภาคตะวันออก ได้แก่ กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และ ประจวบคีรีขันธ์ เขตพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล ในเดือนพฤศจิกายน 2561 - สิงหาคม 2562 และนำผลไม้มายังห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาต่อโดยการเลี้ยงหนอนที่พบในผลไม้จนเข้าดักแด้และฟักเป็นตัวเต็มวัย (Figure 2) พบชนิดแมลงวันผลไม้ที่ฟักออกเป็นตัวเต็มวัย มี 4 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera dorsalis*, *Bactrocera correcta* *Bactrocera carambolae* และ *Bactrocera umbrosa* (Figure 2 C.) โดยพบ *B. dorsalis* จำนวนมากที่สุด 6,048 ตัว จากผลขนุน จำปาดะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี ระยอง ตราน จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล พบ *B. correcta* จำนวน 935 ตัว จากผลขนุน สาเก ฝรั่ง ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ พบ *B. carambolae* จำนวน 382 ตัว จากผลขนุน จำปาดะ สาเก ฝรั่ง ส้มมุด ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี ระยอง ตราน จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และพบ *B. umbrosa* จำนวน 638 ตัว (Table 1) จากผลขนุน จำปาดะ ฝรั่ง ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช สงขลา และสตูล โดยจะดำเนินการเลี้ยงขยายพันธุ์แมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ในห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาวงจรชีวิตและตารางชีวิตต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมผลไม้ ขนุน จำปาดะ สาเก ฝรั่ง และส้มมุด ที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลายในพื้นที่ธรรมชาติหรือในพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกร เพื่อตรวจหาแมลงวันผลไม้ชนิด *B. umbrosa* ในเขตพื้นที่ 16 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ราชบุรี ระยอง ตราน จันทบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และสตูล ในเดือนพฤศจิกายน 2561 - สิงหาคม 2562 และนำผลไม้มายังห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาต่อโดยการเลี้ยงหนอนในผลไม้จนเป็นตัวเต็มวัย พบ *B. umbrosa* ในเขตจังหวัดภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช สงขลา และสตูล โดยพบเข้าทำลายผลขนุน จำปาดะ และฝรั่ง ซึ่งจะดำเนินการเก็บรวบรวมผลไม้ในแหล่งสำรวจที่พบ *B. umbrosa* เพิ่มเติมเพื่อนำมาเลี้ยงขยายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ สำหรับการศึกษาวงจรชีวิตและตารางชีวิตต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณอดุลย์รัตน์ แคล้วคลาด นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครปฐม คุณวรเมธ บุญรอด เจ้าพนักงานการเกษตร และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรราชบุรี คุณลัดดา จันทรวงศ์ศรี นักวิชาการเกษตร และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี คุณกองทอง ตรุษศาสน นักวิชาการส่งเสริมการเกษตรชำนาญการ และเจ้าหน้าที่จากสำนักงานเกษตรอำเภอหนองปรือ คุณยุทธ ทนโม๊ะ นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรระยอง คุณกมลภัทร ศิริพงษ์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจันทบุรี คุณเครือวัลย์ ดาวงษ์ นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่จากสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 คุณอุดมพร เสือมาก ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรชุมพร และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรชุมพร คุณสารีรัตน์ ไชยสอง นักวิชาการเกษตร และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาเมล็ดพันธุ์พืชสุ

ราชภัฏธานี คุณชัยศ ศรีศขา สวนผลไม้จังหวัดนครศรีธรรมราช คุณศยามล แก้วบรรจง นักวิชาการเกษตรชำนาญการ และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสงขลา คุณอภิญา สุราวุธ นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ และเจ้าหน้าที่จากสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรที่ 8 คุณสมศักดิ์ แสงพระจันทร์ นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และอาจารย์ ดร.เบญจวรรณ ยันต์วิเศษภักดี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลสถานที่และแหล่งสำรวจเก็บผลไม้ในการทดลอง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มบริหารศัตรูพืชที่ให้การช่วยเหลืองานวิจัยทุกท่าน ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มบริหารศัตรูพืช. 2555. คู่มือแมลงวันผลไม้และการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 50 หน้า.
- กลุ่มบริหารศัตรูพืช. 2557. แมลงศัตรูไม้ผล. เอกสารวิชาการกลุ่มบริหารศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 151 หน้า
- มนตรี จิรสุรัตน์. 2544. แมลงวันผลไม้ในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 244 หน้า.
- ยุวรินทร์ บุญทบ ศิริณี พูนไชยศรี ชลิตา อุณหวุฒิ ลักษณะ บำรุงศรี สิทธิศิโรตม แก้วสวัสดิ์. 2554. อนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera*. หน้า 2009-2025. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่มที่ 3 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. เอกสารวิชาการ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- ยุวรินทร์ บุญทบ ศิริณี พูนไชยศรี ชลิตา อุณหวุฒิ ลักษณะ บำรุงศรี สิทธิศิโรตม แก้วสวัสดิ์. 2555. อนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้ทองสกุล *Bactrocera* จากสารล่อแมลงในเขตภาคใต้ของประเทศไทย. หน้า 1742-1758. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554 เล่มที่ 4 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. เอกสารวิชาการ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.
- 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 pp.
- 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 pp.

Table 1 Species and number of individuals of fruit flies reared from fruits (i.e. jackfruit, breadfruit, champedak, guava and horse mango) in 16 provinces, November 2018 – August 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
04/12/2018	Suphanburi	14°10'16.4"N 99°56'50.5"E	breadfruit	<i>Bactrocera correcta</i>	3
				<i>Bactrocera carambolae</i>	2
				-	-
04/12/2018	Suphanburi	14°18'16.0"N 99°51'46.1"E	breadfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	56
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
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

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

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
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
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'38.2"N 100°12'28.7"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	108
				<i>Bactrocera correcta</i>	126
				<i>Bactrocera carambolae</i>	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	<i>Bactrocera dorsalis</i>	132
				<i>Bactrocera correcta</i>	79
				<i>Bactrocera carambolae</i>	2
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'52.6"N 100°12'22.5"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	1,193
				<i>Bactrocera correcta</i>	229
				<i>Bactrocera carambolae</i>	12

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

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'53.9"N 100°12'19.3"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	154
				<i>Bactrocera correcta</i>	47
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'43.3"N 100°12'16.4"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	178
				<i>Bactrocera correcta</i>	78
				<i>Bactrocera carambolae</i>	1
29/03/2019	Nakhon Pathom	13°46'49.2"N 100°03'13.9"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	225
				<i>Bactrocera correcta</i>	138
				<i>Bactrocera carambolae</i>	4
01/04/2019	Rayong	12°54'09.3"N 101°31'59.0"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	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	<i>Bactrocera dorsalis</i>	82
				<i>Bactrocera carambolae</i>	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	<i>Bactrocera dorsalis</i>	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	-	
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	<i>Bactrocera dorsalis</i>	85
				<i>Bactrocera carambolae</i>	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	<i>Bactrocera dorsalis</i>	165
				<i>Bactrocera carambolae</i>	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	-	

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

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'53.9"N	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	154
		100°12'19.3"E		<i>Bactrocera correcta</i>	47
20/03/2019	Samut Sakhon	13°33'43.3"N	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	178
		100°12'16.4"E		<i>Bactrocera correcta</i>	78
				<i>Bactrocera carambolae</i>	1
29/03/2019	Nakhon Pathom	13°46'49.2"N	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	225
		100°03'13.9"E		<i>Bactrocera correcta</i>	138
				<i>Bactrocera carambolae</i>	4
01/04/2019	Rayong	12°54'09.3"N	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	76
		101°31'59.0"E			
01/04/2019	Rayong	12°53'55.9"N	breadfruit	-	
		101°31'37.1"E			
01/04/2019	Rayong	12°53'54.3"N	jackfruit	-	
		101°31'37.2"E			
01/04/2019	Rayong	12°54'25.1"N	jackfruit	-	
		101°32'06.0"E			
01/04/2019	Rayong	12°54'24.2"N	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	82
		101°32'07.5"E		<i>Bactrocera carambolae</i>	6
02/04/2019	Rayong	12°52'31.3"N	jackfruit	-	
		101°36'23.1"E			
02/04/2019	Rayong	12°52'34.4"N	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	2
		101°36'24.4"E			
02/04/2019	Rayong	12°52'29.2"N	jackfruit	-	
		101°36'31.1"E			
02/04/2019	Rayong	12°52'23.3"N	jackfruit	-	
		101°36'22.2"E			
03/04/2019	Trat	12°18'15.6"N	jackfruit	-	
		102°27'36.1"E			
03/04/2019	Trat	12°17'24.2"N	jackfruit	-	
		102°23'39.3"E			
03/04/2019	Trat	12°18'59.5"N	jackfruit	-	
		102°27'06.6"E			
03/04/2019	Trat	12°18'48.2"N	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	85
		102°27'00.7"E		<i>Bactrocera carambolae</i>	3
03/04/2019	Trat	12°15'42.7"N	breadfruit	-	
		102°30'13.3"E			
03/04/2019	Trat	12°07'09.2"N	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	165
		102°41'39.6"E		<i>Bactrocera carambolae</i>	4
03/04/2019	Trat	12°23'08.1"N	breadfruit	-	
		102°22'19.1"E			
03/04/2019	Chanthaburi	12°31'06.3"N	breadfruit	-	
		102°09'53.6"E			
03/04/2019	Chanthaburi	12°32'14.4"N	breadfruit	-	
		102°07'31.4"E			

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

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
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	<i>Bactrocera dorsalis</i>	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	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	140 7
04/04/2019	Chanthaburi	12°41'17.6"N 102°03'00.5"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	241 18
04/04/2019	Chanthaburi	12°45'27.9"N 102°00'22.2"E	champedak	-	
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	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	29 1
04/06/2019	Phetchaburi	12°50'01.4"N 99°43'60.0"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	98 3
04/06/2019	Prachuap Khiri Khan	11°53'03.8"N 99°47'43.3"E	jackfruit	-	
04/06/2019	Prachuap Khiri Khan	11°20'36.2"N 99°32'59.6"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera correcta</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	88 8 13
26/07/2019	Chumphon	10°49'57.1"N 99°13'07.8"E	jackfruit	<i>Bactrocera umbrosa</i> <i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	53 9 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	champedak	<i>Bactrocera umbrosa</i>	28
26/07/2019	Chumphon	10°48'21.4"N 99°14'22.8"E	horse mango	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	236 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 99°06'20.4"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	250 6
26/07/2019	Surat Thani	9°39'55.3"N 99°06'23.3"E	horse mango	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	52 4

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

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
26/07/2019	Surat Thani	9°39'47.0"N 99°06'13.2"E	champedak	-	0
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°25'09.4"N 99°51'15.0"E	horse mango	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	57 12
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°25'27.2"N 99°51'20.6"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	5
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°23'15.1"N 99°49'43.6"E	guava	-	0
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°26'21.6"N 99°45'56.8"E	champedak	-	0
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°26'07.7"N 99°46'44.4"E	guava	<i>Bactrocera umbrosa</i> <i>Bactrocera dorsalis</i>	9 19
27/07/2019	Nakhon Si Thammarat	8°25'57.5"N 99°46'33.4"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i>	5
19/08/2019	Songkhla	7°11'53.2"N 100°35'24.5"E	breadfruit	-	0
19/08/2019	Songkhla	7°09'10.4"N 100°32'41.1"E	champedak	<i>Bactrocera umbrosa</i> <i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	42 100 17
19/08/2019	Songkhla	7°09'10.4"N 100°32'43.9"E	champedak	<i>Bactrocera umbrosa</i> <i>Bactrocera dorsalis</i>	4 15
19/08/2019	Songkhla	7°09'10.4"N 100°32'41.5"E	champedak	<i>Bactrocera dorsalis</i>	8
20/08/2019	Songkhla	6°53'41.3"N 100°21'19.3"E	champedak	<i>Bactrocera umbrosa</i> <i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	18 386 86
20/08/2019	Songkhla	6°53'23.3"N 100°21'02.1"E	champedak	<i>Bactrocera umbrosa</i>	13
20/08/2019	Songkhla	6°53'19.5"N 100°24'20.6"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	182 6
20/08/2019	Songkhla	6°53'06.6"N 100°23'41.5"E	jackfruit	<i>Bactrocera umbrosa</i> <i>Bactrocera dorsalis</i>	117 19
20/08/2019	Songkhla	6°58'08.1"N 100°26'07.5"E	champedak	<i>Bactrocera umbrosa</i> <i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	89 33 7
20/08/2019	Songkhla	7°00'24.7"N 100°18'13.8"E	jackfruit	<i>Bactrocera umbrosa</i> <i>Bactrocera dorsalis</i>	134 13
20/08/2019	Songkhla	7°00'24.8"N 100°18'13.8"E	champedak	-	
20/08/2019	Songkhla	7°00'27.5"N 100°18'06.8"E	champedak	<i>Bactrocera umbrosa</i>	3
24/08/2019	Chumphon	10°49'56.9"N 99°13'07.9"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	3 1

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

Date	Province	Location	Fruit	Specie	Number of individuals
24/08/2019	Chumphon	10°49'44.6"N 99°13'09.4"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i>	10
24/08/2019	Surat Thani	9°39'46.7"N 99°06'12.8"E	champedak	-	
26/08/2019	Songkhla	6°58'09.0"N 100°34'07.1"E	champedak	<i>Bactrocera dorsalis</i>	91
26/08/2019	Satun	6°46'12.9"N 100°08'35.0"E	champedak	<i>Bactrocera umbrosa</i>	24
26/08/2019	Satun	6°45'54.5"N 100°08'37.5"E	champedak	<i>Bactrocera umbrosa</i>	33
26/08/2019	Satun	6°45'44.1"N 100°03'54.0"E	champedak	<i>Bactrocera umbrosa</i>	71
26/08/2019	Satun	6°47'32.5"N 100°04'59.9"E	guava	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	238 38
26/08/2019	Songkhla	6°57'00.5"N 100°08'03.3"E	champedak	<i>Bactrocera dorsalis</i>	32
27/08/2019	Phatthalung	7°33'52.4"N 100°07'26.5"E	jackfruit	<i>Bactrocera dorsalis</i> <i>Bactrocera carambolae</i>	63 6



Figure 1 Fruit samples



Figure 2 Fruit flies reared from fruit samples

A. Larvae

B. Pupae

C. Adults of *Bactrocera umbrosa*

ศึกษาชนิด ชีววิทยา และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์
ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella*
Species, biology, and geographical distribution
of aquatic pest snail *Physella*

อภิรักษ์ เอี่ยมสุวรรณสุข ดาราพร รินทะรักษ์ ศุภกร วงษ์เรืองพิบูล
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ดำเนินศึกษาชนิด ชีววิทยา และการแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ของหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella* ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 – กันยายน 2563 ได้ตัวอย่างหอย *Physella* ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง จาก 3 จังหวัด (จังหวัดกรุงเทพฯ กาญจนบุรี และนครปฐม) พบว่าเป็นชนิด *Physella acuta* จำนวน 78 ตัวอย่าง และ *Physella* sp. 1 จำนวน 2 ตัวอย่าง หอยชนิดนี้พบอาศัยอยู่กับพืชน้ำบางชนิด ได้แก่ สาหร่ายหางกระรอก และบัวประดับ จากการศึกษาลักษณะการวางไข่ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีลักษณะเป็นเมือกเหนียวห่อหุ้มกลุ่มไข่อีกชั้นหนึ่ง จำนวนไข่ต่อคลัสเตอร์ประมาณ 11-43 ฟอง จะต้องมีการศึกษาชีววิทยา และการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตในห้องปฏิบัติการต่อไป

คำหลัก ชนิด ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ หอยน้ำ *Physella*

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-01-09-62

คำนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์พืชน้ำหลายชนิดที่มีความสวยงาม มี ศักยภาพสูงในการเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ต่างประเทศต้องการและให้ราคาสูง ไม้ น้ำประดับสร้างรายได้ให้กับประเทศนับร้อยล้านบาทและมีแนวโน้มที่จะเติบโตต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามอุปสรรคสำคัญของการผลิตไม้ประดับและการส่งออกคือปัญหาการเข้าทำลายจากหอยน้ำ ศัตรูพืชซึ่งสร้างความเสียหายแก่พรรณไม้ประดับ นอกจากนี้ตัวและไข่หอยยังติดไปกับต้นไม้ ทำให้เสียเวลา ในการล้างทำความสะอาดก่อนนำส่งออก ถ้าหากมีการพบเห็นตัวและไข่หอยติดไปกับพรรณไม้ประดับ จะถูกเผาทำลาย ทำให้ภาพพจน์การส่งออกไม้ประดับของประเทศไทยเสื่อมเสียอีกด้วย

กรมวิชาการเกษตรกำลังทำการวิจัยหอยศัตรูพรรณไม้ประดับและสำรวจความหลากหลายชนิดของหอย น้ำในระบบนิเวศเกษตร พบว่าหอยน้ำศัตรูพืชสกุล *Physella* (วงศ์ Physidae) เป็นหนึ่งในชนิดที่มีความสำคัญเนื่องจากสามารถทำความเสียหายแก่พรรณไม้ประดับเป็นอย่างมาก มักพบหอยและไข่ หอยสกุลนี้ติดไปกับไม้ประดับ และเข้าทำลายโดยการกัดกินใบจนเสียหาย ทั้งนี้หอยชนิดนี้ไม่ได้มีถิ่นอาศัย ดั้งเดิมอยู่ในประเทศไทย มีศักยภาพในการรุกรานสูง จากการสำรวจเบื้องต้นมีรายงานการพบในแหล่ง น้ำในประเทศไทยดังเช่นเขื่อนลำพระเพลิง ณ จังหวัดนครราชสีมา

อย่างไรก็ตาม ยังขาดข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับหอย *Physella* ในด้านของชีววิทยาดังเช่น อนุกรมวิธาน วงจรชีวิต การสืบพันธุ์ แหล่งที่อยู่อาศัย และอาหาร เป็นต้น การแพร่กระจายเชิง ภูมิศาสตร์ ทั้งนี้ข้อมูลทางด้าน ชีววิทยา การแพร่กระจายเชิงภูมิศาสตร์ จะทำให้เข้าใจถึงธรรมชาติ และพฤติกรรมของหอยน้ำศัตรูพืชชนิดนี้ได้ดียิ่งขึ้น และสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอ้างอิงเชิง วิชาการ เพื่อการป้องกันกำจัดและมีความจำเป็นต่อการวางแผนเพื่อการจัดการหอยน้ำศัตรูพืชอย่างมี ประสิทธิภาพ (pest management) ต่อไปได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล่องพลาสติกขนาดต่าง ๆ
- กระดาษอเนกประสงค์
- เวอร์เนีย (เครื่องมือวัดขนาดเปลือกหอย)
- อาหารปลาชนิดเม็ด
- กล้องถ่ายภาพดิจิทัล
- สกรูร่าย 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

- บันทึกชนิดพันธุ์ไม้น้ำที่พบในบริเวณแหล่งน้ำที่หอยสกุล *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 ลักษณะรูปร่างของเปลือก (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 วัดค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิ

3.2) เมื่อหอยเกิดการผสมพันธุ์และวางไข่ บันทึกจำนวนไข่ต่อกลุ่ม ให้นำไข่มาเลี้ยงในกล่องพลาสติกบรรจุน้ำและสาหร่ายหางกระรอกกล่องใหม่ เมื่อลูกหอยรุ่นที่ 1 ฟักออกมาจากไข่แล้ว นับจำนวน ชั่งน้ำหนักและวัดขนาดลูกหอยที่เกิดขึ้นใหม่ทุกสัปดาห์

3.3) เลี้ยงลูกหอยรุ่นที่ 1 จนกระทั่งเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยและสามารถผสมพันธุ์ได้ ให้ดำเนินการตามข้อที่ 3.1 และ 3.2 จนกระทั่งเกิดลูกหอยรุ่นที่ 2

- การบันทึกข้อมูล

- บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก เช่น ลักษณะรูปร่าง สี และลวดลายบนเปลือก ตรวจดูรายละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

- บันทึกความกว้างและความสูงของเปลือก ความกว้างของวงรอบเปลือกความกว้าง ขนาดของปากเปิดเปลือก

เวลาและสถานที่

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

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ได้อุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการเก็บตัวอย่างหอย ได้ตัวอย่างหอยศัตรูพืช *Physella* จากกรุงเทพ 40 ตัวอย่าง และจังหวัดกาญจนบุรี 32 ตัวอย่าง นครปฐม 8 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* sp. 1 ซึ่งจะมีลักษณะเปลือกทรงเหลี่ยม มี apex ที่มีลักษณะแบน โดยพบ *P. acuta* 80 ตัวอย่างในพื้นที่ 3 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพ กาญจนบุรี และนครปฐม ส่วน *Physella* sp. 1 พบเพียง 2 ตัวอย่างในกรุงเทพเท่านั้น จากการศึกษาลักษณะการวางไข่ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีลักษณะของไข่คล้ายกับไข่ของหอยศัตรูพืช *Radix* กล่าวคือ มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวห่อหุ้มกลุ่มไข่อีกชั้นหนึ่ง จำนวนไข่ต่อคลัสเตอร์ประมาณ 11-43 ฟอง ไข่จะฟักเป็นลูกหอยภายใน 2-5 วัน และเริ่มวางไข่ครั้งแรกได้เมื่อลูกหอยอายุ 30-35 วัน จะต้องมีการศึกษาชีววิทยา และการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตในห้องปฏิบัติการต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาตัวอย่างหอยสกุล *Physella* จำนวน 80 ตัวอย่างจากจังหวัดกรุงเทพ กาญจนบุรี และนครปฐม พบว่าเป็นชนิด *Physella acuta* จำนวน 78 ตัวอย่าง และ *Physella* sp. 1 จำนวน 2 ตัวอย่าง หอยชนิดนี้พบอาศัยอยู่กับพืชน้ำบางชนิด ได้แก่ สาหร่ายหางกระรอก และบัวประดับ จากการศึกษาลักษณะการวางไข่ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีลักษณะเป็นเมือกเหนียวห่อหุ้มกลุ่มไข่อีกชั้นหนึ่ง จำนวนไข่ต่อคลัสเตอร์ประมาณ 11-43 ฟอง จะต้องมีการศึกษาชีววิทยา และการเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตในห้องปฏิบัติการต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ยุพา วรยศ. 2534. พันธุ์ไม้น้ำ Aquatic Plants BO351 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 500 หน้า
- วนาพร วงษ์นิตย, ศรุต สุทธิอารมณ, ศรีจันทรรจ ศรีจันทรา, วิภาดา ปลอดภัย, บุชบง มั่นสมั่นคง, พวงผกา อ่างมณี. 2553. การศึกษาชนิดและทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพรรณไม้น้ำ. รายงานวิจัยประจำปี. กลุ่มบริหารศัตรูพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1569-1580.
- สุกัญญา พริกจำรูญ. 2548. คู่มือการเพาะเลี้ยงและส่งออกพรรณไม้น้ำปลาสวยงาม. สำนักพิมพ์นีออนบุ๊คมีเดีย. 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.

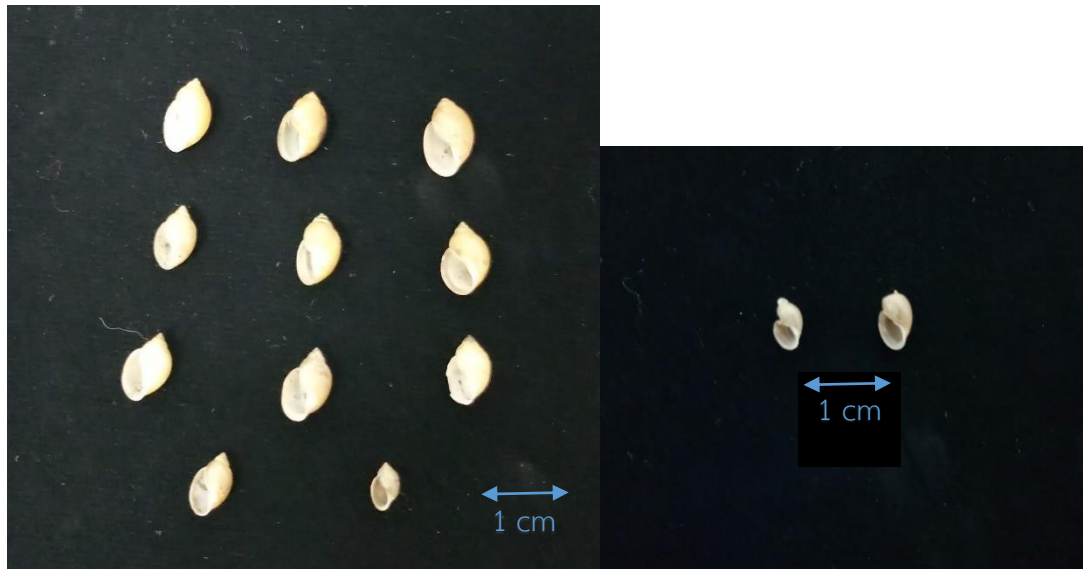


Figure 1 *Physella acuta* (left) and *Physella* sp. 1 (right)

Table 1 All *Physella* samples collected throughout Thailand

Province	Species	
	<i>Physella acuta</i>	<i>Physella</i> sp. 1
Bangkok	40	2
Kanchanaburi	32	-
Nakhon Pathom	8	-
Total	80	2

ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า
Biology of the Bacteria Causal Agent of Leaf Spot Disease
on Mokara Orchid

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

Abstract

Biology of the bacteria causal agent of leaf spot on Mokara orchid was conducted during October 2016– September 2019. The results showed that the bacterial pathogen can grow at temperatures of 10-40°C. Bacteria does not grow on medium containing more than 5 ppm of streptomycin and more than 9,000 ppm of cupric sulfate. Pathogenicity test revealed that the bacteria was able to produce leaf spot symptom on Mokara (Bangkhuntien, Calypso, Jitti), Vanda (Vanda Famui) and Rhynchostylis (Changdaeng) but does not show typical leaf spot symptom on Dendrobium (Bom) and Cattleya orchid. Inoculation of onion bulb exhibited bulb scale turns brown while spraying the bacteria on corn leaves were not appeared disease symptom. For the survival on plant debris, bacteria were recovered from orchid leaf 60 days after fall down which suggests that orchid leaf residues could be a primary source of inoculum. The bacterial pathogen had been pre-identified using specific primer to *P. stewartii* subsp. *indologenes*, which showed the positive reactions. To confirm the identification, phylogenetic reconstruction had been conducted to identify the bacterial isolations collected from previous study. The result of ML analysis of concatenated dataset of four house-keeping genes, namely *gyrB*, *rpoB*, *atpD* and *infB*, confirmed that all bacterial isolations from leaf spot of Mokara orchid in Thailand were resembled of *P. stewartii* subsp. *indologenes* LMG 2632^T.

Keyword : mokara, leaf spot

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-02-03-60

บทคัดย่อ

ศึกษาชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2562 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส เชื้อไม่เจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินความเข้มข้นมากกว่า 5 ppm และทองแดงความเข้มข้นมากกว่า 9,000 ppm สามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางขุนเทียน คาลิปโซ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนดา (ลูกผสมพ้ามุย) และกล้วยไม้สกุลช้าง (ช้างแดง) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย (บอม) และแคทลียา การปลูกเชื้อโดยฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ทำให้กาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนการปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดโดยการพ่นไม่ทำให้เกิดอาการโรคจุดสีข้าว เก็บข้อมูลการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียในเศษซากพืชอาศัย พบว่าใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียหลังจากร่วงแล้วจนถึง 60 วัน เมื่อตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* พบว่าให้ผลของปฏิกิริยาเป็นบวก การจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบโดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) จากยีน *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* ทำให้สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่พบระบาดในประเทศไทยใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* LMG 2632^T

คำหลัก : ม็อคคาร่า โรคใบจุด

คำนำ

ในปี 2554 เกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าในเขตจังหวัดสมุทรสาครและนครปฐม ประสบกับปัญหาการระบาดของโรคใบจุดของกล้วยไม้ โดยมีลักษณะอาการเป็นจุดกลมสีน้ำตาลดำ รอบแผลเห็นวงสีเหลืองชัดเจน ในแปลงที่มีการระบาดของโรครุนแรงทำให้ใบร่วง กลีบดอกไหม้ และช่อดอกหักพับไม่ได้คุณภาพไม่สามารถส่งขายได้ จากการศึกษาเชื้อสาเหตุ พบว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *โคลีนีสีเหลือง* ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ของเชื้อแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการสืบค้นข้อมูล ไม่พบรายงานเชื้อแบคทีเรียสาเหตุที่เป็น Facultative anaerobe *โคลีนีสีเหลือง* ที่ทำให้เกิดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน (นิยมรัฐ, 2544; ปิยรัตน์และคณะ, 2552; Chuenchitt *et al.*, 1983) ดังนั้น เพื่อให้การป้องกันกำจัดโรคนี้นี้ได้ผลและมีประสิทธิภาพจึงจำเป็นต้องทราบชนิดที่ถูกต้องตลอดจนข้อมูลทางด้านชีววิทยาอื่นๆ มากขึ้น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและแนะนำเกษตรกรในการป้องกันกำจัด รวมถึงเป็นข้อมูลสำหรับการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list)

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. ฟันฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาฟันฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. ทดสอบชนิดพืชอาศัยของเชื้อ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ ดังนี้

2.1 กล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์ต่างๆ เช่น บางขุนเทียน คาลิปโซ่ จิตติ

2.2 กล้วยไม้สกุลอื่น เช่น แวนด้า หวาย ช่าง แคนลียา

2.3 พืชที่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Pantoea* เช่น ข้าวโพด หอม

โดยใช้เข็มทำแผลบนพืชทดสอบแล้วหยดเชื้อลงบนแผล 2 ไมโครลิตร หรือใช้วิธีการพ่นเชื้อลงบนพืชทดสอบ คลุมให้ความชื้นด้วยถุงพลาสติก และพิสูจน์โรคตามวิธีการของ Koch (Koch's postulation)

3. สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA และ NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารทุกวันจนถึง 28 วัน

4. การเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะและทองแดง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร mannitol-glutamate (MG) ที่มี 0.025% yeast extract (MGY) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MGY ที่มี cupric sulfate (MGYCu) ความเข้มข้น 375, 500, 750, และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ และอาหาร streptomycin (MGYSm) 50, 75, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ เปรียบเทียบกับเลี้ยงบนอาหาร MGY บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหาร

5. การยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียบนพืชอาศัย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ใช้เข็มทำแผลบนพืชแล้วหยดเชื้อลงบนแผล 2 ไมโครลิตรหรือใช้วิธีการพ่นเชื้อลงบนพืชทดสอบ คลุมให้ความชื้นด้วยถุงพลาสติก ทำการแยกเชื้อจากพืชอาศัย เศษซากพืชอาศัย และวัสดุปลูก ทุก 1 เดือน โดยมีวิธีการดังนี้

การแยกเชื้อจากผิวพีชอ้าย แช่ใบพีชอ้ายในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-6} จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงบนอาหารกึ่งจำเพาะ PA20 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหาร

การแยกเชื้อจากพีชอ้ายหรือเศษซากพีชอ้าย ตัดใบพีชอ้ายเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง บดใบพีชในน้ำกลั่น และเลี้ยงบนอาหาร PSA และอาหารกึ่งจำเพาะ PA20 หลังจากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อสาเหตุบนอาหาร

6. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* ตามรายงานของ Gehring *et al.* (2014) และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. ananatis* ตามรายงานของ Kido *et al.* (2008) โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/ μ l, One PCR Master Mix (GeneDirex[®] Inc., Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.2 μ M เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra[®] (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., UK)

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย multilocus sequence analysis (MLSA)

ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยนำเชื้อแบคทีเรีย 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

ทำการเพิ่มปริมาณ housekeeping gene เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 100 ng/ μ l, One PCR Master Mix (GeneDirex[®] Inc., Taipei, Taiwan) และไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 μ M เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra[®] (Biometra biomedizinische 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 Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., Cambridge, UK) ส่งผลผลิต PCR วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Korea ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Bioedit (Hall, 1999) จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) แล้วนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรีย type strain ที่มีรายงานอยู่ใน GenBank และจัดลำดับความสัมพันธ์ของแบคทีเรียโดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม RAxML v 8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนดค่า model of evolution แบบ GTRGAMMA และกำหนดค่า maximum likelihood bootstrap 1,000 ซ้ำ

เวลาและสถานที่

เวลา	ตุลาคม 2559 – กันยายน 2561
สถานที่	ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ฟันฟูเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาฟันฟู โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถฟันฟูเชื้อแบคทีเรียได้ จำนวน 10 ไอโซเลต

2. ทดสอบชนิดพืชอาศัยของเชื้อ

ทดสอบชนิดกล้วยไม้ที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ โดยใช้เข็มฉีดยาแทงบริเวณผิวใบเพื่อทำแผลบนพืชทดสอบแล้วหยดเชื้อลงบนแผล 2 ไมโครลิตร พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางชนิดเช่น คาลิปโซ่ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนด้า (ลูกผสมฟ้ามุ่ย) และสกุลช้าง (ช้างแดง) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย (บอม) และแคทลียา (Figure 1) การทดสอบในพืชที่มีรายงานการก่อให้เกิดโรคจากเชื้อสาเหตุสกุล *Pantoea* พบว่าหอมหัวใหญ่ที่ทำการปลูกเชื้อโดยวิธีการฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน เมื่อผ่าดูด้านในกาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอาการคล้ายคลึงกับรายงานของ Carr *et al.* (2013) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *P. ananatis* และรายงานของ Stumpf *et al.* (2018) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* การปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดด้วยวิธีการทาผงคาร์โบรเนตัมบนใบข้าวโพดก่อนแล้วพ่นเชื้อสาเหตุ พบว่าข้าวโพด

แสดงอาการใบช้ำเป็นสีเขียวเข้มไม่สอดคล้องกับรายงานของ Krawczyk *et al.* (2010) ซึ่งรายงานอาการของโรคบนใบข้าวโพดมีลักษณะเป็นจุดสีขาวเกิดจากเชื้อ *P. ananatis*

3. สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

ทดสอบสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA และ NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10, 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้ถึงอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4. การเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะและทองแดง

ทดสอบการเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะและทองแดงของเชื้อสาเหตุ พบว่าเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินความเข้มข้น 5 ppm และทองแดงความเข้มข้น 9,000 ppm

5. การอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียบนพืชอาศัย

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า จำนวน 10 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D.600 nm เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ทำการปลูกเชื้อบนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า โดยใช้เข็มฉีดยาแทงบริเวณผิวใบเพื่อทำแผลบนพืชทดสอบแล้วพ่นเชื้อลงบนใบกล้วยไม้ คลุมให้ความชื้นด้วยถุงพลาสติก ทำการแยกเชื้อจากพืชอาศัย เศษซากพืชอาศัย และวัสดุปลูกทุก 1 เดือน ผลการแยกเชื้อบนกล้วยไม้พบแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชบนใบที่แสดงอาการของโรคในทุกเดือนที่ตรวจถึงแม้แผลบนใบจะแห้งแล้วก็ตาม โดยใบที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียจนถึง 60 วัน สอดคล้องกับรายงานของ Sauer *et al.* (2015) ที่ทำการศึกษาศามารถในการมีชีวิตรอดบนเศษซากพืชอาศัยของเชื้อ *P. ananatis* สาเหตุโรคจุดสีขาวของข้าวโพด โดยพบว่าสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียบนเศษซากของข้าวโพดหลังจากเก็บเกี่ยวแล้ว 60 วัน และยังคงตรวจพบเชื้อแบคทีเรียได้บนใบข้าวโพดที่ยังไม่แสดงอาการของโรคและบนพืช *Digitaria horizontalis* ซึ่งไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อ แสดงให้เห็นแหล่งที่เชื้อแบคทีเรียอาศัยและมีชีวิตรอดโดยอาศัยอยู่ในรูปแบบ epiphyte สำหรับการแยกเชื้อจากวัสดุปลูกหรือดินปลูกไม่ได้ดำเนินการเนื่องจากกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าไม่ได้ใช้วัสดุปลูกและไม่มีพืชอาศัยอื่นที่ใช้วัสดุปลูกหรือดินในการเพาะปลูก

จากข้อมูลเชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่อาศัยบนเศษซากพืชได้นาน 60 วัน จึงสามารถเป็นแหล่งในการแพร่กระจายเชื้อไปยังแหล่งอื่นได้ ดังนั้น คำแนะนำในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจึงควรเก็บเศษซากพืชที่เป็นโรคออกจากแปลงและเผาทำลายทิ้ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดแหล่งในการแพร่กระจายของเชื้อภายในแปลงปลูกและแหล่งอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนย้ายไปที่

6. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* และ *P. ananatis* พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวกสอดคล้องกับรายงานของ Gehring *et al.* (2014) โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 267 bp (*galE*) และ 422 bp (*recA*) ของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* และให้ผลการตรวจสอบเป็นลบ โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 343 bp ของเชื้อ *P. ananatis* เมื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียตามรายงานของ Kido *et al.* (2008) (Figure 2)

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย multilocus sequence analysis (MLSA)

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลมีอคคาร่าด้วยเทคนิค PCR จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้ พบว่ายีน *gyrB*, *rpoB*, *infB* มีขนาดประมาณ 1,000 bp และยีน *atpD* มีขนาดประมาณ 800 bp จัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* เพื่อวิเคราะห์แบบ multilocus sequence analysis เปรียบเทียบกับ *Pantoea* spp. ที่เป็น type strain และมีข้อมูลของทั้ง 4 ยีนในฐานข้อมูล Genbank สร้างเป็นแผนภูมิต้นไม้เพื่อจัดจำแนกเชื้อ โดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) ประเมินความเชื่อมั่นของแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยมีเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia* spp. เป็น outgroup พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลมีอคคาร่าจัดกลุ่มร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* LMG 2632^T แยกกลุ่มออกจากเชื้อแบคทีเรีย *P. agglomerans* LMG 1268^T, *P. ananatis* LMG 2665^T และ *P. allii* LMG 24248^T โดยแยกกลุ่มชัดเจนจากเชื้อแบคทีเรีย *P. cyripedii* LMG 2657^T ซึ่งพบในกล้วยไม้ *cyripedium* (*cyripedium* orchids) ของสหรัฐอเมริกา (Figure 3)

เชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* เป็นเชื้อชนิดใหม่ตั้งชื่อตามคุณสมบัติของเชื้อที่สามารถสร้าง indole ได้ พบเข้าทำลายเฉพาะข้าวฟ่างหางกระรอก (foxtail millet: *Setaria italica*) และ pearl millet (*Pennisetum americanum*) ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Grimont and Grimont, 2009) แต่จากการศึกษาของ Stumpf *et al.* (2018) พบว่าเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* ทำให้เกิดอาการเน่ากลางหัวของหอมหัวใหญ่ (center rot of onion) ได้ นับเป็นเชื้อสาเหตุชนิดใหม่ที่ทำให้เกิดโรคในหอมหัวใหญ่นอกจากเชื้อ *P. ananatis*, *P. agglomerans* และ *P. allii* ที่พบรายงานแล้ว สนับสนุนผลการศึกษานี้ที่เริ่มพบการแพร่ระบาดของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* ในพืชชนิดใหม่ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และเป็นรายงานครั้งแรกของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* ที่พบทำให้เกิดโรคใบจุดในกล้วยไม้สกุลมีอคคาร่าและยังไม่เคยมีรายงานการระบาดของเชื้อชนิดนี้ในกล้วยไม้ทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศมาก่อน โดยเชื้อแบคทีเรียมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ใน genus เดียวกันและพบรายงานในพืชวงศ์ Orchidaceae คือ *P. cyripedii* LMG 2657^T ซึ่งพบเป็นสาเหตุโรค brown spot rot ของกล้วยไม้ *cyripedium* ในรัฐแคลิฟอร์เนียของสหรัฐอเมริกา โดยมีข้อสันนิษฐานการระบาดของโรคในครั้งนี้เกิดจากการปรับตัวของเชื้อที่เดิมอาศัยอยู่ในรูปแบบ epiphyte ทำให้เกิดโรคได้แต่ไม่รุนแรง เพราะจากการสอบถามข้อมูลจากเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้ พบว่าเกษตรกรเคยเห็นลักษณะอาการของโรคมามาก่อนแต่ไม่รุนแรง และข้อสันนิษฐานอีกประการหนึ่งคือการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ทำให้เกิดความอ่อนแอต่อเชื้อเนื่องจากกล้วยไม้สกุลมีอคคาร่าเป็นกล้วยไม้ลูกผสม 3 สกุล (*Arachnis* x *Ascocentrum* x *Vanda*) และจากการสำรวจเบื้องต้นพบการระบาดของโรคในกล้วยไม้สกุลแวนด้าและสกุลเข็ม (*Ascocentrum*) แล้ว แต่ไม่รุนแรงเหมือนมีอคคาร่าแต่ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกล้วยไม้สกุลแวนด้าส่วนใหญ่ส่งออกจากต่างประเทศจึงมีการดูแลแปลงอย่างดี เมื่อมีอาการของโรคกล้วยไม้จะถูกแยกออกจากแปลงจึงพบการระบาดของโรคค่อนข้างน้อย ทั้งนี้เชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* เป็นเชื้อแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่ต้องเฝ้าระวังและติดตามสถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อในกล้วยไม้สกุลอื่นๆ เพื่อไม่ให้ส่งผลกระทบต่อ การปลูกและการส่งออกกล้วยไม้ไปต่างประเทศ โดยมีข้อสังเกตจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะในกลุ่มกล้วยไม้ที่เจริญทางยอด (*monopodium*) ได้แก่ มีอคคาร่า แวนด้า และช้าง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคในกล้วยไม้กลุ่มที่มีการ

เจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ (sympodium) ได้แก่ หวายและแคทลียา ทั้งนี้ยังมีกล้วยไม้อีกหลายสกุลที่ต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันข้อสังเกตดังกล่าวโดยกล้วยไม้ที่เจริญทางยอด ได้แก่ กล้วยไม้สกุลเข็ม (Ascozentrum) สกุลฟาแลนอปซิส (Phalaenopsis) สกุลอะแรคนิส (Arachnis) กล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ ได้แก่ รองเท้านารี ออนซิเดียม

การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าโดย ทิพวรรณ และคณะ (2562) เบื้องต้น พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีสีเหลือง สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) และเชื้อสามารถสร้าง indole (indole production) ได้ โดยคุณสมบัติดังกล่าวคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea* spp. จากข้อมูลการจัดลำดับความสัมพันธ์ของเชื้อบริเวณ 16S rDNA ร่วมกับรายงานพีชอาคัยและคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญที่ใช้พิจารณาในการจำแนกเชื้อ *Pantoea* spp. ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *P. stewartii* subsp. *stewartii*, *P. stewartii* subsp. *indologenes*, *P. agglomerans*, *P. ananatis*, *P. allii* และ *P. cypripedii* (*Erwinia cypripedii*) คือความสามารถในการสร้าง indole (indole production) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า เชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* เชื้อ *P. ananatis* และเชื้อ *P. allii* มีคุณสมบัติดังกล่าว โดยเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* พบเข้าทำลายเฉพาะ foxtail millet (*Setaria italica*) และ pearl millet (*Pennisetum americanum*) (Grimont and Grimont, 2009) ส่วนเชื้อ *P. ananatis* มีรายงานทำให้เกิดโรคในพีชอาคัยหลายชนิด เช่น honeydew melons (Wells et al., 1987) แคนตาลูป (Bruton et al., 1991) หอม (Gitaitis and Gay, 1997) sudangrass (Azad et al., 2000) ข้าวโพด (Paccola-Meirelles et al., 2001) ยูคาลิปตัส (Coutinho et al., 2002) netted melon (Kido et al., 2008) ข้าวฟ่าง (Cota et al., 2010) และข้าว (Mondal et al., 2011) เป็นต้น และเชื้อ *P. allii* มีรายงานทำให้เกิดโรคในหอมหัวใหญ่ (Brady et al., 2011) จากรายงานพีชอาคัยของเชื้อ *P. ananatis* ที่ค่อนข้างกว้างสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายวงศ์รวมทั้งรายงานของณัฐริมาและวนิดา (2539) ซึ่งพบเชื้อ *P. ananatis* เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคเนื้อแกนของสับปะรดในประเทศไทย จึงทำให้สรุปในเบื้องต้นว่า เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *P. ananatis* แต่ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบเชื้อเพิ่มเติม พบว่าให้ผลตรวจสอบเป็นบวกเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* และให้ผลตรวจสอบเป็นลบเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *P. ananatis* จากนั้นยืนยันผลการตรวจสอบโดยใช้ multilocus sequence analysis (MLSA) ในการจำแนกชนิดของเชื้อ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA gene เพียงตำแหน่งเดียวไม่สามารถใช้จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันสูงได้ดีเหมือนวิธี DNA-DNA hybridization กับเชื้อสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) เพื่อดูความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย (Stackbrandt and Goebel, 1994) แต่การศึกษาส่วนใหญ่มีข้อจำกัดเรื่องการขาดแคลนเชื้อสายพันธุ์ต้นแบบเพื่อใช้ในการศึกษา ปัจจุบันจึงมีการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิค MLSA วิธีการนี้เป็นการวิเคราะห์กลุ่มของ housekeeping gene ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียจำนวน 4-7 ยีน เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต้นแบบที่รวบรวมไว้ใน Genbank โดยข้อมูลการจำแนกชนิดสอดคล้องกับการศึกษา DNA-DNA hybridization ทำให้นิยมใช้จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียมากขึ้นเนื่องจากสะดวกและสามารถลดข้อจำกัดเรื่องไม่มี type strain ในการศึกษาได้ โดยมีรายงานการใช้เทคนิคนี้สำหรับจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea* หลายชนิดได้สอดคล้องกับวิธี DNA-

DNA reassociation เช่น Brady *et al.* (2008) นำเชื้อ *Pantoea* สาเหตุโรคพืช โรคคน และจากสิ่งแวดล้อม มาศึกษา multilocus gene sequencing ของ housekeeping gene จำนวน 4 ยีน ได้แก่ *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* พบว่าสามารถใช้จำแนกเชื้อได้ดีเหมือนกับเทคนิค DNA-DNA hybridization และ Delétoile (2009) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกเชื้อ *P. agglomerans* โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและ API 20E จำแนกเชื้อเบื้องต้นเป็น *P. agglomerans* จำนวน 28 สายพันธุ์ นำมาศึกษา multilocus gene sequencing ของ 6 ยีน ได้แก่ *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* พบว่าสามารถแยกเชื้อ *P. agglomerans* ออกจากเชื้อ *Pantoea* ต่างสปีชีส์ได้ จากข้อได้เปรียบของเทคนิค MLSA ที่สามารถเปรียบเทียบเชื้อที่ศึกษากับเชื้อสายพันธุ์อื่นจากทั่วโลกโดยใช้ฐานข้อมูล GenBank จึงนับเป็นอีกวิธีหนึ่งซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียเพื่อลดข้อจำกัดเรื่องขาดแคลนเชื้อสายพันธุ์ต้นแบบ (type strain) สำหรับใช้จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี DNA-DNA hybridization ได้ โดยต้องพิจารณาคัดเลือกยีนพื้นฐานที่ทำหน้าที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรียและแบคทีเรียจำเป็นต้องรักษาคุณสมบัติที่ไวให้คงที่โดยหลีกเลี่ยงการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อยีนนั้นน้อยที่สุด จากข้อมูลการศึกษาทั้งหมดนี้ทำให้สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่พบระบาดในประเทศไทยคือ เชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *Indologenes*

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส ไม่เจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินความเข้มข้นมากกว่า 5 ppm และทองแดงความเข้มข้นมากกว่า 9,000 ppm สามารถทำให้เกิดโรคได้บนกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าสายพันธุ์บางชนิด เช่น คาลิปโซ จิตติ กล้วยไม้สกุลแวนด้า (ลูกผสมพ้ามุย) และกล้วยไม้สกุลช้าง (ช้างแดง) แต่ไม่ทำให้เกิดโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย (บอม) และแคทลียา การปลูกเชื้อโดยฉีดเชื้อสาเหตุเข้าสู่หัวหอมใหญ่ทำให้กาบของหัว (bulb scale) เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนการปลูกเชื้อสาเหตุในข้าวโพดโดยการพ่น ไม่ทำให้เกิดอาการโรคจุดสีขาว เชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่รอดในใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการของโรคและร่วงจากต้นแล้วจนถึง 60 วัน ดังนั้น คำแนะนำในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าจึงควรเก็บเศษซากพืชที่เป็นโรคออกจากแปลงและเผาทำลายทิ้ง ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดแหล่งในการแพร่กระจายของเชื้อภายในแปลงปลูกและแหล่งอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนย้ายไปทั้งเชื้อสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะในกลุ่มกล้วยไม้ที่เจริญทางยอด (monopodium) ได้แก่ ม็อคคาร่าแวนด้า และช้าง แต่ไม่ทำให้เกิดโรคในกล้วยไม้กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ (sympodium) ได้แก่ หวายและแคทลียา โดยต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อสนับสนุนผลการศึกษาดังกล่าวในกล้วยไม้ที่เจริญทางยอด ได้แก่ กล้วยไม้สกุลเข็ม (*Ascozentrum*) สกุลฟาแลนอปซิส (*Phalaenopsis*) สกุลอะแรคนิส (*Arachnis*) กล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตด้วยการแตกหน่อ ได้แก่ รongเท้านารี ออนซิเดียม ตรวจสอบเชื้อเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp. *indologenes* พบว่าให้ผลของปฏิกิริยาเป็นบวก การจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบโดยใช้การประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Maximum Likelihood (ML) จากยีน *gyrB*, *rpoB*, *atpD* และ *infB* ทำให้สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าที่พบระบาดในประเทศไทยใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* subsp.

indologenes LMG 2632^T และเป็นรายงานครั้งแรกของเชื้อ *P. stewartii* subsp. *indologenes* ที่พบทำให้เกิดโรคใบจุดในกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐธิดา ไชยจิตเจริญกุล และวนิดา ฐิตะฐาน. 2539. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเนื้อแกนของ สับปะรด. หน้า 60-70. ใน: *รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2539*. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- ทิพวรรณ กันหาญาติ ณัฐธิดา ไชยจิตเจริญกุล บุรณี พัวพงษ์แพทย์ และรุ่งนภา ทองเคิ่ง. 2562. การ จำแนกชนิดแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่า. หน้า 60-73. ใน: *เอกสาร ประกอบการประชุมวิชาการประจำปี 2562 อารักขาพืชสร้างสรรค์ ก้าวทันยุทธศาสตร์ชาติ ภาคแผ่นภาพ*. วันที่ 10-12 มิถุนายน 2562 ณ โรงแรมรอยัล ฮิลล์ กอล์ฟ รีสอร์ท แอนด์ สปา, นครนายก.
- นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. *คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด*. กลุ่มวิจัยโรคพืชผักไม้ดอกไม้ และไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 50 หน้า.
- ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ศรีสุข พูนผลกุล และ จงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2552. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิด จากแบคทีเรีย. หน้า 1947-1967. ใน: *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2552*. สำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- Azad, H.R., G.J. Holmes and D.A. Cooksey. 2000. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. *Plant Dis.* 84: 973–979.
- Brady, C., I. Cleenwerck, S. Venter M. Vancanneyt, J. Swings and T. Coutinho. 2008. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Syst Appl Microbiol* 31: 447–460.
- Brady, C.L., T. Goszczynska, S.N. Venter, I. Cleenwerck, P. De Vos, R.D. Gitaitis and T.A. Coutinho. 2011. *Pantoea allii* sp. Nov., isolated from onion plants and seed. *Int. J. Syst Evol. Microbiol.* 61: 932-937.
- Bruton, B.D., J.M. Wells, G.E. Lester and C.L. Patterson. 1991. Pathogenicity and characterization of *Erwinia ananas* causing a postharvest disease of cantaloupe fruit. *Plant Dis.* 75: 180–183.
- Carr, E.A., A.M. Zaid, J.M. Bonasera, J.W. Lorbeer, and S.V. Beer. 2013. Infection of onion leaves by *Pantoea ananatis* leads to bulb infection. *Plant Dis.* 97: 1524-1528.
- Chuenchitt, S., W. Dhirabhava, S. Karnjanarat, D. Buangsuwon and T. Uematsu. 1983. A new bacterial disease on orchids *Dendrobium* sp. caused by *Pseudomonas gladioli*. *Kasetsart J.* 17: 26-36.
- Cota, L.V. Cota, R.V. Costa, D.D. Silva, D.F. Parreira, U.G.P. Lana and C.R. Casela. 2010. First report of pathogenicity of *Pantoea ananatis* in sorghum (*Sorghum bicolor*) in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes* 5: 120–122.

- Coutinho, T.A., O. Preisig, J. Mergaert, M.C. Cnockaert, K.H. Riedel, J. Swings and M.J. Wingfield. 2002. Bacterial blight and dieback of Eucalyptus species, hybrids, and clones in South Africa. *Plant Dis.* 86: 20–25.
- Delétoile, A., D. Decré, S. Courant, V. Passet, J. Audo, P. Grimont, G. Arlet and S. Brisse. 2009. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 47: 300-310.
- Gehring, I., A. Wensing, M. Gernold, W. Wiedemann, D.L. Coplin and K. Geider. 2014. Molecular differentiation of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* from subspecies *stewartii* and identification of new isolates from maize seeds. *J. Appl. Microbiol.* 116:1553-1562.
- Gitaitis R.D. and J.D. Gay. 1997. First report of a leaf blight, seed stalk rot, and bulb decay of onion by *Pantoea ananas* in Georgia. *Plant Dis.* 81: 1096–1096.
- Grimont, P.A.D. and F. Grimont. 2009. Genus XXIII. *Pantoea*, pp. 713-720. In: P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.-H. Schleifer and W. Whitman, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria*. Springer, New York.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hori, S. 1911. A bacterial leaf-disease of tropical orchids. *Zbl. Bakt. Parasitenk. Abt. II.* 31: 85-92.
- Kido, K., R. Adachi, M. Hasegawa, K. Yano, Y. Hikichi, S. Takeuchi, T. Atsuchi and Y. Takikawa. 2008. Internal fruit rot of netted melon caused by *Pantoea ananatis* (= *Erwinia ananas*) in Japan. *J Gen Plant Pathol.* 74:302–312.
- Krawczyk, K., J. Kamasa, A. Zwolinska and H. Pospieszny. 2010. First report of *Pantoea ananatis* associated with leaf spot disease of maize in Poland. *J. Plant Pathol.* 92: 807-811.
- 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.
- Mondal, K.K., C. Mani, J. Singh, J.G. Kim and M.B. Mudgett. 2011. A new leaf blight of rice caused by *Pantoea ananatis* in India. *Plant Dis.* 95: 1582-1583.
- Paccola-Meirelles L.D., A.S. Ferreira, W.F. Meirelles, I.E. Marriel and C.R. Casela. 2001. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. *Phytopathol.* 149: 275–279.

- Sauer, A.V., K.R. Rocha, R.M. Gonçalves, W.F. Meirelles, J.E.F. Figueiredo, I.E. Marriel and L.D. Paccola-Meirelles. 2015. Survival of *Pantoea ananatis*, causal agent of maize white spot disease in crop debris. *Agronomy Science and Biotechnology*. 1: 21-24.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies". *Bioinformatics*. 30: 1312–1313.
- Stumpf, S., B. Kvitko, R. Gitaitis and B. Dutta. 2018. Isolation and characterization of novel *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* strains exhibiting center rot in onion. *Plant dis*. 102: 727-733.
- Wallis, F.M., J.J. Joubert and I.F. Schlosser. 1975. Bacterial brown rot of *Cypridium* orchids in Natal. *Phytophylactica*. 7: 125-13.
- Wells, J., W. Sheng, M. Ceponis and T. Chen. 1987. Isolation and characterization of strains of *Erwinia ananas* from honeydew melons. *Phytopathol*. 77: 511–514.

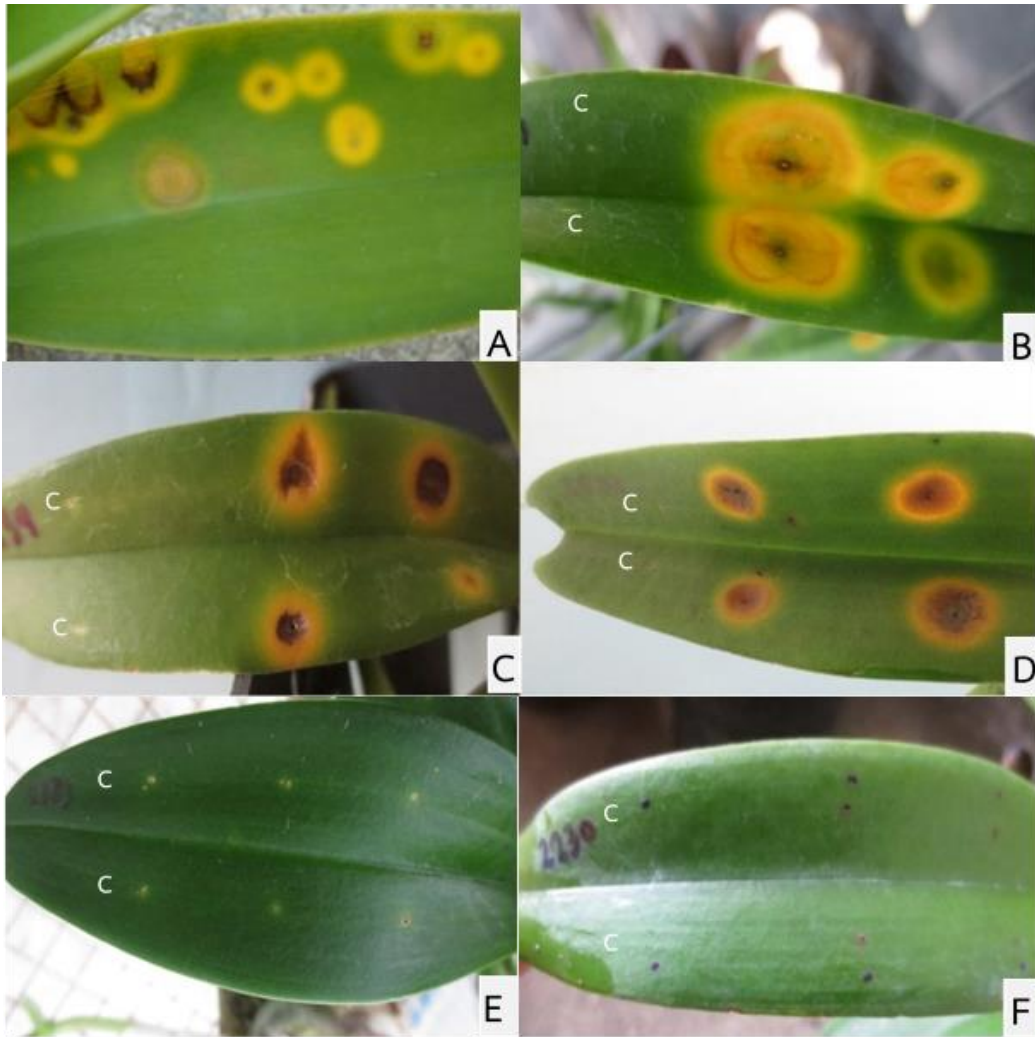


Figure 1 Leaf spot disease of Mokara orchid and pathogenicity test

- A. Disease symptom
- B. Pathogenicity test on Mokara orchid leaf
- C. Pathogenicity test on Vanda orchid leaf
- D. Pathogenicity test on Rhynchostylis orchid leaf
- E. Pathogenicity test on Dendrobium orchid leaf
- F. Pathogenicity test on Cattleya orchid leaf

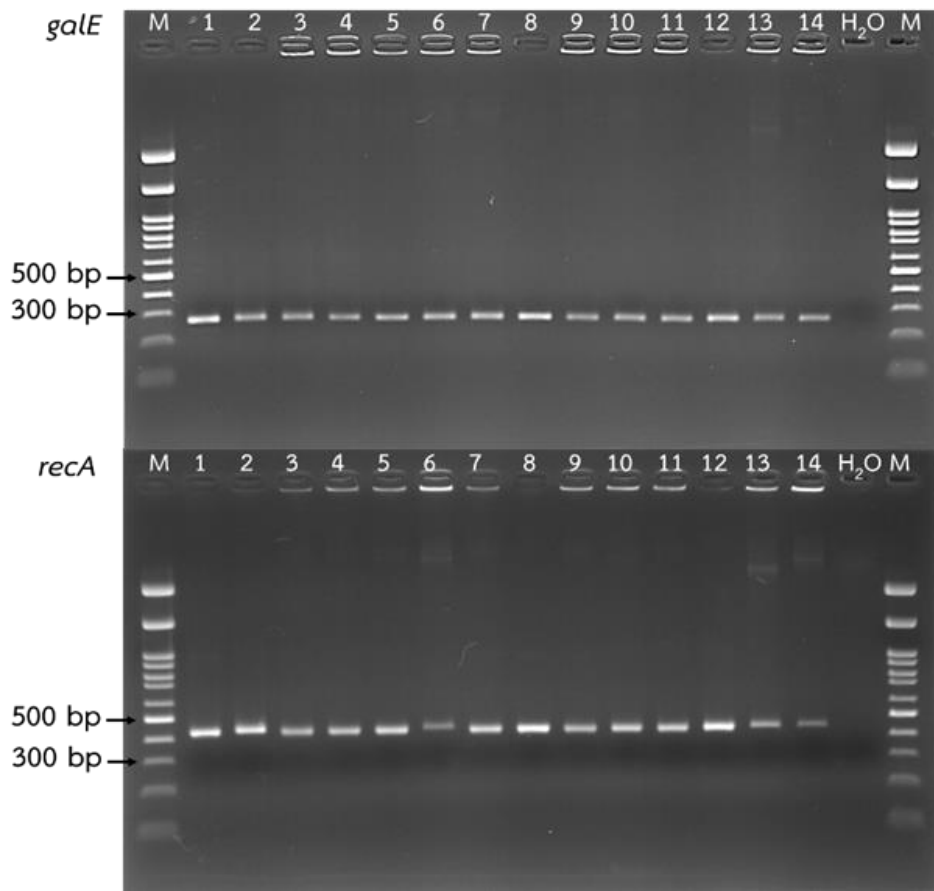


Figure 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified for detection *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* using *galE* and *recA* primers, M: onemark 100, lane 1–14: bacterial isolated from leaf spot disease of mokara orchid

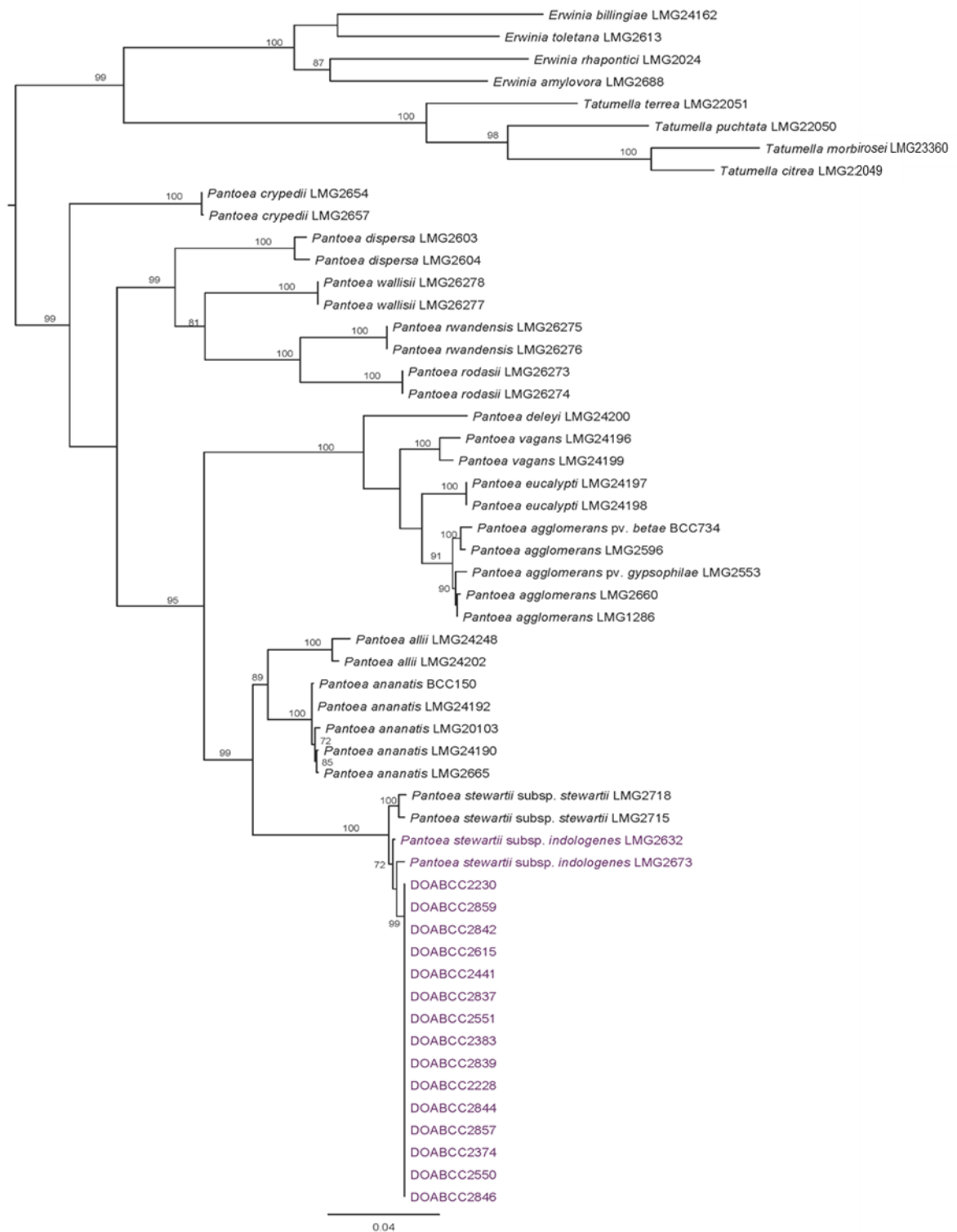


Figure 3 Maximum-likelihood tree based on the concatenated *gyrB*, *rpoB*, *atpD* and *infB* nucleotide sequences showing the relationships of Mokara orchid isolates and type strains of species. Bootstrap values based on 1,000 replicates are shown at branch nodes

ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Curvularia eragrostidis* และรา *C. oryzae*
 Study on biology and ecology of *Curvularia eragrostidis* and *C. oryzae*

มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/}
 ชนินทร ดวงสอาด^{1/} สุณิรัตน์ สีมะเตือ^{1/} อมรรักษ์ คัดใจเดียว^{1/}
^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Leaf spot and leaf blight diseases of oil palm had been collected from Trang, Surat Thani, Krabi, Nakhon Si Thammarat provinces. Specimens of flower rusty spot disease of dendrobium were collected from Nakhon Pathom and Nakhon Nayok provinces. *Curvularia eragrostidis* and *C. oryzae* had been isolated from diseased tissues by tissue transplanting method. It was found that *C. eragrostidis* could be isolated from *Dendrobium* and *C. oryzae* could be isolated from oil palm leaves. To study the biology of these *Curvularia* taxa, *C. eragrostidis* isolate number F028-5, F028-6 and F029-4 and *C. oryzae* isolate number P001, P002 and P003 were selected. The result showed that the growth rate of all *C. eragrostidis* isolates was higher on PDA and CMA when compared to MEA, CZA, OMA and V8. The optimum temperature for *C. eragrostidis* growth was at 25°C. The growth rate of all *C. oryzae* isolates was the best on CMA and the optimum temperature for *C. oryzae* growth was at 30°C. The pathogenicity study revealed that *C. eragrostidis* showed disease symptom on *Dendrobium* leaves after three days of inoculation. In addition, *C. oryzae* showed the symptom of infection on oil palm leaves after 7 days of inoculation.

Keywords : leaf spot, leaf blight, flower rusty spot, *C. eragrostidis*, *C. oryzae*

บทคัดย่อ

ศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Curvularia eragrostidis* และรา *C. oryzae* โดยเก็บตัวอย่างโรคใบจุดและใบไหม้ปาล์มน้ำมันจากจังหวัดตรัง สุราษฎร์ธานี กระบี่ และนครศรีธรรมราช และเก็บตัวอย่างโรคดอกจุดสนิมจากจังหวัดนครปฐมและนครนายก แยกจากตัวอย่างโรคพืชด้วยวิธี tissue transplanting ได้รา *C. eragrostidis* จากกล้วยไม้ จำนวน 10 ไอโซเลท และ *C. oryzae* จากปาล์มน้ำมัน จำนวน 15 ไอโซเลท นำรา *C. eragrostidis* ไอโซเลทที่ F028-5 F028-6 และ F029-4 และ นำรา *C. oryzae* ไอโซเลทที่ P001 P002 และ P003 มาทำการทดสอบชนิดอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา พบว่ารา *C. eragrostidis* ทั้ง 3 ไอโซเลท การเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA และ CMA เมื่อเทียบกับอาหาร MEA CZA OMA และ V8 รา *C. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลท เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร CMA และ CZA เมื่อนำราทั้ง 6 ไอโซเลทมาทดสอบกับอุณหภูมิ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ พบว่ารา *C. eragrostidis* และ *C. oryzae* มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นำเชื้อราทั้ง 6 ไอโซเลทมาทดสอบการเกิดโรคบนพืชอาศัยเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่ารา *C. eragrostidis* สาเหตุโรคดอกจุดสนิมแสดงอาการของโรคบนดอกกล้วยไม้เป็นเวลา 3 วัน หลังปลูกเชื้อ รา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดปาล์มน้ำมันแสดงอาการของโรคบนใบปาล์มน้ำมันเป็นเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ

คำหลัก : โรคใบจุด โรคใบไหม้ โรคดอกจุดสนิม *C. oryzae* *C. Ragrostidis*

คำนำ

รา *Curvularia eragrostidis* และ *C. oryzae* เป็นระยะสืบพันธุ์ของรา *Cochiobolus Drechsler* พบแพร่กระจายทั่วไปและเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน กล้วยไม้ และข้าว เป็นต้น (จิตรรา และคณะ, 2557; วรณิภา และคณะ, 2555; เลขา และคณะ, 2544) นอกจากรายงานการเกิดโรคในปาล์มน้ำมันแล้ว พบมีรายงานการเกิดโรคต่าง ๆ ดังนี้ Muthukumar and Venkatesh (2013) รายงานพบโรคใบไหม้ของต้นกาบหอยแครง (boat lily) เป็นครั้งแรกในอินเดียโดยสาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อรา *C. eragrostidis* และ Ferreira et al. (2014) รายงานพบเชื้อรา *C. eragrostidis* เป็นสาเหตุของโรคเน่าหลังการเก็บเกี่ยว (postharvest rot) ของสับปะรดเป็นครั้งแรกในประเทศบราซิล

ในประเทศไทย Kittimorakul et al. (2013) ทำการสำรวจโรคใบไหม้และใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างโรค 277 ตัวอย่าง จาก 11 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้ 197 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนกเป็น *Curvularia* 149 ไอโซเลท และ *Colletotrichum* 48 ไอโซเลท ในปี 2514 Sunpapoa and Kittimorakul ได้ทำการจัดจำแนกรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างต้นกล้าปาล์มที่มีอายุ 3-4 เดือนที่แสดงอาการโรคใบจุดและนำมาแยกเชื้อราสาเหตุ ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา และนำไปตรวจสอบอีกครั้งโดยวิธีทางอนุชีวโมเลกุลจากการศึกษาพบว่าเชื้อรา *C. oryzae* เป็นเชื้อราสาเหตุที่เข้าทำลายต้นปาล์มในระยะต้นกล้า

นอกจากนี้ อารีรัตน์ (2550) รายงานรา *C. eragrostidis* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคดอกจุดสนิมในดอกกล้วยไม้เชื่อด่างกล่าวเจริญได้ดีในเนื้อเยื่อของดอกกล้วยไม้ในสภาวะที่มีความชื้นสูงของโรงเรือน

อาการของโรคส่วนใหญ่จะสังเกตเห็นได้ชัดในระหว่างการขนส่ง พิธีกรรม และคณะ (2553) สํารวจรวบรวม และจำแนกเชื้อราสกุล *Curvularia* โดยเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการไหม้และจุด มาทำการแยกเชื้อสาเหตุโรค พบว่าสามารถแยก *C. eragrostidis* ได้แก่ โรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน และโรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนดอกไม้สกุล จากที่กล่าวมาในช่วงต้นเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิดนี้สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เพาะปลูกปาล์มน้ำมันและกล้วยไม้เป็นอย่างมาก ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องทำการสำรวจ เก็บรวบรวม และทำการศึกษาวิทยา นิเวศวิทยา และการระบาดของเชื้อรา *C. eragrostidis* และ *C. oryzae* เพื่อหาแนวทางในการป้องกันกำจัดและลดปัญหาการเกิดโรคจากเชื้อสาเหตุทั้ง 2 ชนิดนี้ และสามารถลดการสูญเสียของผลผลิตทำให้เกษตรกรมีผลผลิตที่สามารถเก็บเกี่ยวได้มากขึ้นและหากมีการจัดการและการบำรุงรักษาพืชที่ดีควบคู่ไปด้วยนอกจากช่วยลดการสูญเสียแล้วสามารถช่วยให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพมากยิ่งขึ้นส่งผลดีต่อเศรษฐกิจทั้งในประเทศและต่างประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ มีด กรรไกร กรรไกรตัดกิ่ง ถุงพลาสติก กระดาษบันทึก ปากกาเคมี เครื่องระบุพืช
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เย็นเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน ปีกเกอร์ สไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. เข็มเย็บปลายแหลม หัวง่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด ด้ามมีด
5. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อม กล้องถ่ายภาพ
6. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), ½Potato Dextrose Agar (½PDA) และ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Czapek's Agar (CZA), Corn Meal Agar (CMA), Oat Meal Agar (OMA) และ V-8 juice Agar (V8)
7. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และ เอซิลแอลกอฮอล์ 75%
8. อุปกรณ์ทำตัวอย่างแห้ง ได้แก่ กระดาษหนังสือพิมพ์ ไม้อัดตัวอย่าง กระดาษฟาง และช่องกระดาษสำหรับใส่ตัวอย่าง

วิธีการ

การศึกษาวิทยาและนิเวศวิทยาของรา *C. eragrostidis* และรา *C. oryzae* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

เก็บตัวอย่างโรคพืช สํารวจและเก็บตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกปาล์มน้ำมันและแหล่งปลูกกล้วยไม้ในประเทศไทย ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ ข้อมูลพืช ภูมิศาสตร์ และแบ่งตัวอย่างโรคพืชมาอัดหีบตัวอย่างแห้ง จัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอภิศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน เมื่อพบราสร้าง

เส้นใยหรือ conidia ตรวจดู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือ ใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และ ตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็น โรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซบบน กระจกที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร ½Potato Dextrose Agar, Potato Dextrose Agar หรือ water agar บ่มที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3-7 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *C. eragrostidis* และรา *C. oryzae* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

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 | Corn meal agar (CMA) |
| กรรมวิธีที่ 5 | Oat meal agar (OMA) |
| กรรมวิธีที่ 6 | V-8 juice agar (V8) |

เทอาหารแต่ละชนิดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้อาหารเย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของราที่เตรียมไว้ นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแต่ละชนิด วางทิ้งไว้ในห้องปฏิบัติการ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราที่เจริญบนอาหารแต่ละชนิด เป็นเวลา 7 และ 14 วัน บันทึกผล และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *C. eragrostidis* และรา *C. oryzae* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำ 5 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 |

เทอาหาร PDA ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้อาหารเย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของราที่เตรียมไว้ นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีราที่เจริญบนอาหารแต่ละชนิด ที่บ่มในอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 7 และ 14 วัน บันทึกผล และนำผลมาวิเคราะห์สถิติ

การศึกษาพืชอาศัยของรา *C. eragrostidis* และรา *C. oryzae*

1. ปลูกพืชทดสอบชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ปาล์มน้ำมัน และกล้วยไม้

2. เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของรา *C. eragrostidis* และ *C. oryzae* โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้น เทน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร ใช้แผ่นสไลด์ชุดสปอร์บนผิวหน้าอาหารเบาๆ เทสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ลงในบีกเกอร์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 100 ครั้งต่อนาที นาน 30 นาที เพื่อให้สปอร์กระจายออกจากกันโดยสม่ำเสมอ ตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วย haemocytometer เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

3. ทดสอบการเกิดโรคบนพืชอาศัย

- ทดสอบการเกิดโรคเบื้องต้นบนใบปาล์มน้ำมันและดอกกล้วยไม้ โดยทำแผลบนใบปาล์มน้ำมันจากนั้นพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของรา *C. oryzae* และทำแผลบนดอกกล้วยไม้ พ่นสารแขวนลอยสปอร์ของรา *C. eragrostidis* ที่เตรียมไว้ปริมาณเชื้อ 10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สำหรับกรรมวิธีควบคุมพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียวเพื่อเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7-14 วัน ตรวจบันทึกการเกิดโรคทุกวัน เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการโรคมายกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันการเกิดโรค

- ทดสอบการเกิดโรคบนต้นกล้าปาล์มน้ำมัน เตรียมต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่อายุประมาณ 3-4 เดือน โดยทำแผลบนใบพืชและพ่นสารแขวนลอยสปอร์ *C. oryzae* ที่เตรียมไว้ปริมาณเชื้อ 10^6 โคนิเดียต่อมิลลิลิตรและตัดชิ้นวัชที่มีเชื้อวางบนแผล และทำแผลบนดอกกล้วยไม้พ่นสารแขวนลอยสปอร์รา *C. eragrostidis* และตัดชิ้นวัชที่มีเชื้อวางบนแผล สำหรับกรรมวิธีควบคุมพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเพียงอย่างเดียวเพื่อเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ รดน้ำตามปกติ และ ตรวจบันทึกการเกิดโรคทุกวัน เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการของโรคมายกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันการเกิดโรค

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อราสาเหตุโรค

เก็บตัวอย่างโรคใบจุดและใบไหม้ปาล์มน้ำมันจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ตรัง กระบี่ และนครศรีธรรมราช จำนวน 29 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างโรคดอกจุดสนิมจากแปลงปลูกกล้วยไม้ในจังหวัดนครปฐมและนครนายก จำนวน 13 ตัวอย่าง (Table 1 และ Figure 1) แยกเชื้อราจากตัวอย่างโรคพืชได้ราสกุล *Curvularia* จำนวน 25 ไอโซเลท จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นรา *C. oryzae* จำนวน 15 ไอโซเลท และ *C. eragrostidis* จำนวน 10 ไอโซเลทและจัดเก็บเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ และตัวอย่างโรคพืชจากการศึกษา จำนวน 42 ตัวอย่างจัดทำเป็นตัวอย่างแห้งโรคพืชเข้าพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *C. eragrostidis* และรา *C. oryzae* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

จากการนำรา *C. eragrostidis* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ F028-5 F028-6 และ F029-4 ที่แยกได้จากกล้วยไม้ (Figure 2) มาทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Czapek's Agar (CZA), Corn Meal Agar (CMA), Oat Meal Agar (OMA) และ V-8 juice Agar (V8) เป็นเวลา 14 วัน พบว่า F028-5 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร CMA โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ CZA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.91 เซนติเมตร การเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 2 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหาร OMA PDA V8 และ MEA โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.62 8.46 8.09 และ 6.96 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 2 และ Figure 4)

C. eragrostidis ไอโซเลท F028-6 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร OMA CMA CZA MEA และ PDA ซึ่งมีอัตราการเจริญเท่ากัน คือ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 9.00 เซนติเมตร เซนติเมตร ซึ่งการเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 5 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหาร V8 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.80 เซนติเมตร (Table 2 และ Figure 5)

C. eragrostidis ไอโซเลท F029-4 สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร CMA CZA PDA OMA V-8A และ MEA ซึ่งมีอัตราการเจริญ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 9.00 8.95 8.89 8.88 และ 8.85 เซนติเมตร ตามลำดับ การเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2 และ Figure 6)

จากการนำรา *C. oryzae* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ P001 P002 และ P003 ที่แยกได้จากปาล์มน้ำมัน (Figure 3) มาทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ PDA MEA CZA CMA OMA และ V8 เป็นเวลา 14 วัน พบว่า *C. oryzae* ไอโซเลท P001 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร CMA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.90 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ CZA และ OMA ซึ่งมีอัตราการเจริญเท่ากัน คือ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.86 เซนติเมตร ซึ่งการเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอาหาร V8 และ PDA โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.34 และ 7.17 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 3 และ Figure 7)

C. oryzae ไอโซเลท P002 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร CMA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.88 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ CZA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.88 เซนติเมตร MEA PDA และ V8 ซึ่งมีอัตราการเจริญเท่ากัน คือ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.87 เซนติเมตร และ OMA ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 8.83 เซนติเมตร ซึ่งการเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3 และ Figure 8)

C. oryzae ไอโซเลท P003 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร CZA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.63 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ CMA OMA MEA PDA และ V8 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.88 7.14 7.13 6.65 และ 5.62 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งการเจริญของโคโลนีบนอาหารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ OMA MEA PDA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญกับอาหาร CZA CMA และ V8 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.63 7.88 และ 5.62 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 3 และ Figure 9)

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *C. eragrostidis* และรา *C. oryzae* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *C. eragrostidis* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ F028-5 F028-6 และ F029-4 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน พบว่ารา *C. eragrostidis* ไอโซเลท F028-5 มีการเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.03 และ 6.01 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส การเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (Table 4 และ Figure 10)

C. eragrostidis ไอโซเลท F028-6 มีการเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.50 และ 8.28 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (Table 4 และ Figure 11)

C. eragrostidis ไอโซเลท F029-4 การเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.68 และ 8.25 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส (Table 4 และ Figure 12)

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *C. oryzae* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ P001 P002 และ P003 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ 25 30 35 40 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 14 วัน พบว่ารา รา *C. oryzae* ไอโซเลท P001 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.00 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.12 7.40 และ 6.65 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งรา *C. oryzae* ไอโซเลท P001 มีการเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส แต่การเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Table 5 และ Figure 13)

C. oryzae ไอโซเลท P002 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.71 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.61 4.66 และ 4.23

เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งรา *C. oryzae* ไอโซเลท P001 การเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพบว่าการเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Table 5 และ Figure 14)

C. oryzae ไอโซเลท P003 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.97 เซนติเมตร รองลงมา ได้แก่ อุณหภูมิ 25 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.62 4.23 และ 4.08 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งรา *C. oryzae* ไอโซเลท P003 การเจริญของโคโลนีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอุณหภูมิ 25 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) แต่อุณหภูมิ 25 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (27 องศาเซลเซียส) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 5 และ Figure 15)

การศึกษาพืชอาศัยของรา *C. eragrostidis* และรา *C. oryzae*

นำราทั้ง 6 ไอโซเลทจากข้างต้น *C. eragrostidis* (F028-5 F028-6 และ F029-4) และ *C. oryzae* (P001 P002 และ P003) มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อนำไปทดสอบการเกิดโรคเบื้องต้นบนพืชอาศัยที่เตรียมไว้ ได้แก่ ปาล์มน้ำมัน และ กล้วยไม้ในโรงเรือนทดลอง (Figure 16) ทดสอบพืชอาศัยโดยการพ่นสปอร์ของเชื้อและวางชิ้นวัสดุที่มีเชื้อลงบนพืชที่ทำแผลไว้ พบว่าดอกกล้วยไม้แสดงอาการของโรคภายในเวลา 3 วันหลังปลูกเชื้อ และเมื่อทำการบ่มเชื้อต่อไปอาการของโรครุนแรงมากขึ้นและกระจายทั่วทั้งดอกภายในเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ (Figure 17) ใบปาล์มน้ำมันแสดงอาการของโรคภายในเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ และหากทำการบ่มเชื้อต่อไปแผลมีขนาดใหญ่ขึ้นบนใบปาล์มน้ำมันเริ่มแสดงอาการไหม้ (Figure 18) เมื่อนำดอกกล้วยไม้และใบปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคมารทำการแยกเชื้อ พบว่าสามารถแยกได้เชื้อชนิดเดียวกับเชื้อที่ได้ทำการปลูกทดสอบ

การทดสอบดอกกล้วยไม้และใบปาล์มน้ำมันในเรือนทดลองพบว่าดอกกล้วยไม้แสดงอาการของโรคเพียงเล็กน้อย ใช้เวลานานจึงพบอาการของโรค อาการของโรคจะชะงักและไม่พบการกระจายของโรคเมื่อเทียบกับการทดสอบเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ ส่วนใบปาล์มน้ำมันแสดงอาการของโรคชัดเจนและมีการกระจายของโรคไปยังบริเวณใบที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อโดยพบอาการของโรคที่ใบอ่อนที่บริเวณยอดที่กำลังแตกใหม่ ส่วนใบแก่พบอาการของโรคบ้างเล็กน้อย เมื่อนำดอกกล้วยไม้และใบปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคมารทำการแยกเชื้อพบว่าสามารถแยกได้เชื้อชนิดเดียวกับเชื้อที่ได้ทำการปลูกทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสามารถก่อโรคกับพืชอาศัยได้ และเป็นเชื้อราสาเหตุของโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้และโรคใบจุดปาล์มน้ำมัน แต่เนื่องจากการทดสอบในเรือนทดลองพืชแสดงอาการของโรคน้อยมาก และใช้เวลานานกว่าการทดสอบในห้องปฏิบัติการจึงแสดงอาการของโรค อาจเนื่องจากสภาพแวดล้อมในโรงเรือนไม่เหมาะสมต่อการก่อโรคของเชื้อสาเหตุจึงทำให้ลักษณะอาการของโรคไม่ชัดเจนและไม่รุนแรงเท่ากับทดสอบเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ

นอกจากนี้ ได้สำรวจการเกิดโรคในสภาพแปลงปลูกพืชของเกษตรกร พบว่าในแปลงปลูกดอกกล้วยไม้พบมีการระบาดของโรคในช่วงฤดูฝนและช่วงหลังฤดูการเก็บเกี่ยวข้าวนาปรังในแถบอำเภอบางเลน จังหวัดนครปฐมและมักพบโรคดอกจุดสนิมในแปลงที่กำลังจะรื้อถอนเพื่อปลูกต้นใหม่ เกษตรจะปล่อยแปลงและไม่บำรุงรักษา ในแปลงปลูกดอกกล้วยไม้โดยทั่วไปเกษตรกรมักไม่ปล่อยให้กล้วยไม้

เกิดโรคนี้นี้ เนื่องจากหากเกิดการระบาดจะส่งผลกระทบต่อการทำนายดอก เกษตรกรจึงทำการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดโรคพืชอย่างสม่ำเสมอ และทำการดูแลรักษาต้นกล้วยไม้เป็นอย่างดีจึงไม่พบการระบาดของโรคดอกจุดสนิมในแปลงเกษตร ส่วนโรคใบจุดและใบไหม้ของปาล์มน้ำมันพบทั้งปาล์มระยะต้นกล้าและต้นที่เริ่มให้ผลผลิต แต่พบมากในปาล์มระยะต้นกล้าเนื่องจากสภาพแวดล้อมในโรงเรือนเพาะชำต้นกล้ามีความชื้นสูงและมีการจัดวางต้นกล้าในลักษณะที่ชิดกันและอัดแน่นจึงส่งผลกระทบต่อการแพร่กระจายของเชื้อรวมทั้งการให้น้ำมีผลต่อการกระจายของเชื้อจากต้นที่เป็นโรคไปสู่ต้นที่ปกติได้ส่วนในปาล์มต้นโตการปลูกจะมีระยะห่างและในแปลงปลูกความชื้นต่ำกว่าแปลงเพาะและเนื่องจากการเกิดโรคไม่รุนแรงจึงไม่ส่งผลกระทบต่อการทำผลผลิต

จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับการทำแผลและวางเชื้อโดยตรงกับการพ่นด้วยสปอร์ของเชื้อพบว่า การวางเชื้อบนแผลพืชแสดงอาการชัดเจนกว่าการพ่นด้วยสปอร์ของเชื้อซึ่งอาจเกิดจากความชื้นจากอาหารช่วยให้อาหารสามารถเจริญได้ การพ่นสปอร์ความชื้นจากสภาพแวดล้อมอาจไม่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์จึงส่งผลให้เชื้อมีปริมาณลดจึงทำให้เชื้อก่อโรคได้น้อยกว่าการทำแผลและตัดขึ้นอาหารพร้อมเชื้อสาเหตุลงไปวางบนแผล นอกจากนี้พบว่าใบพืชที่ไม่ทำแผลไม่พบอาการของโรคหรือหากพบมีเพียงเล็กน้อยจากใบอ่อนของปาล์มน้ำมัน ทั้งนี้ในช่วงที่ทำการทดลองเป็นช่วงที่อากาศค่อนข้างร้อน และแห้ง และเป็นโรงเรือนแบบเปิด ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิ ความชื้นได้ ทำให้สภาพอากาศไม่เหมาะสมต่อการเกิดโรค ซึ่งในการศึกษาในครั้งต่อไปอาจต้องมีการปรับปรุงในเรื่องของวิธีการปลูกเชื้อ จำนวนพืชที่ใช้ในการทดลอง และสถานที่ทำการทดลองให้มีความเหมาะสมมากกว่านี้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างโรคใบจุดและใบไหม้ปาล์มน้ำมันจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมัน จำนวน 29 ตัวอย่างจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ตรัง กระบี่ และนครศรีธรรมราช และเก็บตัวอย่างโรคดอกจุดสนิมจากแปลงปลูกกล้วยไม้ จำนวน 13 ตัวอย่าง จากจังหวัดนครปฐมและนครนายก แยกเชื้อราจากตัวอย่างโรคพืชได้ราสกุล *Curvularia* จำนวน 25 ไอโซเลท จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นรา *C. oryzae* จำนวน 15 ไอโซเลท และ *C. eragrostidis* จำนวน 10 ไอโซเลทจัดเก็บเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ และตัวอย่างโรคพืชจากการศึกษาจัดเก็บเป็นตัวอย่างแห้งโรคพืช จำนวน 42 ตัวอย่าง เข้าพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดสอบชนิดอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของราพบว่ารา *C. eragrostidis* ทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร CMA และ PDA เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร MEA CZA OMA และ V8 ผลการทดสอบกับอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่ารา *C. eragrostidis* ทั้ง 3 ไอโซเลทมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การทดสอบชนิดอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของราพบว่ารา *C. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลท P001 และ P002 มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร CMA และ PDA และ P003 เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร CZA และผลการทดสอบกับอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่ารา *C. oryzae* ทั้ง 3 ไอโซเลท มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากการทดสอบการเกิดโรคบนพืชอาศัยพบว่าสภาพแวดล้อม อายุของพืช และการดูแลรักษา มีผลต่อการเกิดโรคโดยสังเกตได้จากการทดสอบเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการและการทดสอบพืชอาศัยใน

สภาพโรงเรือน โดยพบว่าในห้องปฏิบัติการกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการของโรคในเวลา 3 วันหลังปลูกเชื้อ และเมื่อทำการบ่มเชื้อต่อไปพบการกระจายของเชื้อทั่วดอกในเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อ ปาล์มน้ำมันเริ่มแสดงอาการของโรคในเวลา 7 วันหลังปลูกเชื้อและเมื่อทำการบ่มต่อไปพบขนาดของแผลบนใบปาล์ม น้ำมันขยายขนาดใหญ่กว้างขึ้นและเมื่อนำดอกกล้วยไม้และใบปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการของโรคมานำมาทำการแยกเชื้อกลับพบว่าสามารถแยกได้เชื้อชนิดเดียวกับเชื้อที่ทำการปลูกทดสอบในเรือนทดลองอาการของโรคดอกจุดสนิมบนกล้วยไม้แสดงอาการหลังปลูกไม่ชัดเจนมีการชะงักการเจริญของเชื้อโดยบริเวณแผลพบสีเขียวล้อมรอบและไม่พบการกระจายของเชื้อบนดอกกล้วยไม้และพืชแสดงอาการของโรค น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การปลูกเชื้อทดสอบเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ ใบปาล์มน้ำมันแสดงอาการของโรคชัดเจนและมีการกระจายของโรคไปยังบริเวณใบที่ไม่ได้ทำการปลูกเชื้อโดยพบอาการของโรคที่ใบอ่อนที่บริเวณยอดที่กำลังแตกใหม่ ส่วนใบแก่พบอาการของโรคบ้างเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อมในโรงเรือนเป็นสภาพแวดล้อมแบบเปิด ซึ่งมีสภาพที่แตกต่างจากแปลงปลูกพืชของเกษตรกรจึงส่งผลกระทบต่ออาการทดลองทำให้เกิดโรคไม่ชัดเจนและอาการของโรคไม่รุนแรงเท่าสภาพแปลงปลูกพืชของเกษตรกร ดังนั้นการศึกษาในครั้งต่อไปอาจต้องมีการปรับปรุงเรื่องสภาพแวดล้อม อายุพืช วิธีการปลูกเชื้อ จำนวนพืชทดสอบ ระยะเวลา และสถานที่ในการทดลอง เพื่อผลการทดลองที่แม่นยำมากยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาวศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับคำปรึกษา และคำแนะนำในการปฏิบัติงานวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูลในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- จิตรา กิตติโมรากุล วสันต์ เพชรรัตน์ และ เสมอใจ ชื่นจิตต์. 2557. การควบคุมเชื้อ *Curvularia oryzae* สาเหตุโรคใบจุดปาล์มน้ำมัน โดยการใช้สารเคมีและชีววิธี. *วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์*. 1(1): 39-47.
- พีระวรรณ พัฒนวิภาส ทศนาพร ทศคร และ ธารทิพย์ ภาสบุตร. 2555. การป้องกันกำจัดโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia eragrostidis* โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสารเคมี. หน้า 284-293. ใน : *รายงานผลการวิจัยประจำปี 2555*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- เลขา มาโนช กัญญา เจริญไทย คະนิงนิจ บุศราคำ พรพิมล อธิปัญญาคม อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และ อรุมา เจียมจิตต์. 2544. เชื้อราโรคพืช รา endophyte และราดินในประเทศไทย. หน้า 502-510. ใน : *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39*. 5-7 กุมภาพันธ์ 2544. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- วรรณนิภา มธุรส พัฒน ทวีโชค จุฬารณณ์ กำเนิดเพชร อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช และ รัตน์นุช จันทร์เพ็ญ. 2555. หน้า 1144-1150. ใน : *การประชุมวิชาการแห่งชาติ ครั้งที่ 9*. 6-7 ธันวาคม 2555. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

- อารีรัตน์ เทียนขาว. 2550. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *Curvularia eragrostidis* และควบคุมโรคดอกจุดสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 608 p.
- Ellis, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 507 p.
- 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):1,277.
- Kittimorakul, J., C. Pornsuriya, A. Sunpapao and V. Petcharat. 2013. Survey and identification of leaf blight and leaf spot diseases of oil palm seedling in Southern Thailand. *Plant Pathology*. 12(3):149-153.
- Muthukumar, A. and A. Venkatesh. 2013. First report of leaf blight of boat lily caused by *Curvularia eragrostidis* in India. *New Biological Report*. 2(2):167-169.
- Sunpapao, 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.

Table 1 leaf spot and leaf blight of oil palm and flower rusty spot of dendrobium collected from different location during October 2016 to September 2018

Common name	Scientific name	location			
		Province	District	Sub-district	
Oil Palm	<i>Elaeis guineensis</i>	Surat Thani	Khian Sa	-	
				Kanchanadit	Ban Sadet
					Phuang Phrom
		Khon			
		Tha U-thae			
		Takhian Thong			
		-			
		Trang	Tha Chana	-	
			Mueang Surat-Thani	Khlong Noi	
			Ban Na San	Thung Tao- Mai	
			Tha Chang	Khlong Sai	
		Krabi	Sikao	Sikao	
			Huai Yot	-	
Si Thammarat	Mueang Krabi	Khao Khram			
		Krabi Noi			
	Pak Phanang	Khlong Noi			
Dendrobium	<i>Dendrobium</i> spp.	Nakhon Pathom	Bang Len	Naraphirom	
				Khlong Nok	
			Krathung		
	Nakhon Nayok	Ongkharak	Bang Pla Kot		

Table 2 The growth of three isolates of *C. eragrostidis* on different media

Media	028-5		028-6		029-4	
	7 Days	14 Days	7 Days	14 Days	7 Days	14 Days
PDA	7.9450a	8.4600ab	9.0000a	9.0000a	8.8850a	8.9500a
MEA	5.2450c	6.9600c	7.7900b	9.0000a	8.1250b	8.8450a
CZA	7.7950ab	8.9050a	8.7850a	9.0000a	9.0000a	9.0000a
CMA	7.3600ab	9.0000a	9.0000a	9.0000a	9.0000a	9.0000a
OMA	7.5950ab	8.6200ab	9.0000a	9.0000a	8.4900ab	8.8900a
V8	7.1800b	8.0850b	8.6750a	8.8000b	8.5500ab	8.8800a
C.V. (%)	15.27	10.71	7.74	2.02	2.02	2.61

^{1/} 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 The growth of three isolates of *C. oryzae* on different media

Media	P001		P002		P003	
	7 days	14 days	7 days	14 days	7 days	14 days
PDA	4.8750d	7.1700c	6.3900d	8.8600a	3.8600c	6.6500c
MEA	7.8100b	8.6900b	8.8000a	8.8600a	4.4400bc	7.1300c
CZA	8.6550a	8.8600a	8.8850a	8.8650a	4.8500b	8.6250a
CMA	8.8750a	8.8950a	8.9050a	8.8800a	6.5250a	7.8750b
OMA	7.1650c	8.8600a	7.5200b	8.8250a	4.6900b	7.1350c
V8	5.1550d	8.3400b	6.6800c	8.8600a	3.7200c	5.6200d
C.V. (%)	22.92	9.31	14.00	1.32	25.41	24.93

^{1/} 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 4 The growth of three of *C. eragrostidis* at different temperature

Temperature	028-5		028-6		029-4	
	7 Days	14 Days	7 Days	14 Days	7 Days	14 Days
Room Temp. (Control)	7.4850 a	9.0000 a	8.3100 a	9.0000 a	8.6600 a	9.0000 a
25°C	7.3350 a	9.0000 a	7.7900 a	9.0000 a	7.7200 b	9.0000 a
30°C	6.2500 b	7.0250 b	8.3400 a	8.5000 b	8.4600 a	8.6750 b
35°C	4.0700 c	6.0100 c	7.9900 a	8.2800 b	7.8400 b	8.2500 c
40°C	0.0000 d	0.0000 d	0.0000 b	0.0000 c	0.0000 c	0.0000 d
C.V. (%)	57.46	55.32	51.52	51.07	51.48	50.83

^{1/} 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 5 The growth of three of *C. oryzae* at different temperature

Temperature	P001		P002		P003	
	7 Days	14 Days	7 Days	14 Days	7 Days	14 Days
Control (Room Temp.)	7.4545a	8.1227ab	3.2000bc	4.6636bc	3.1318b	4.0773b
25°C	5.5650b	7.3950bc	3.5400ab	5.6050b	3.3450b	4.6200b
30°C	7.3750a	9.0000a	4.0300a	6.7100a	5.0185a	6.9650a
35°C	4.4800b	6.6450c	2.8600c	4.2250c	2.9750b	4.2250b
40°C	0.0000c	0.0000d	0.0000d	0.0000d	0.0000c	0.0000c
C.V. (%)	58.22	53.3	54.81	56.44	59.69	59.01

^{1/} Means followed by the same letter within a column are not significantly different at P=0.05 according to Duncan's Multiple Range Test



Figure 1 Plant disease samples

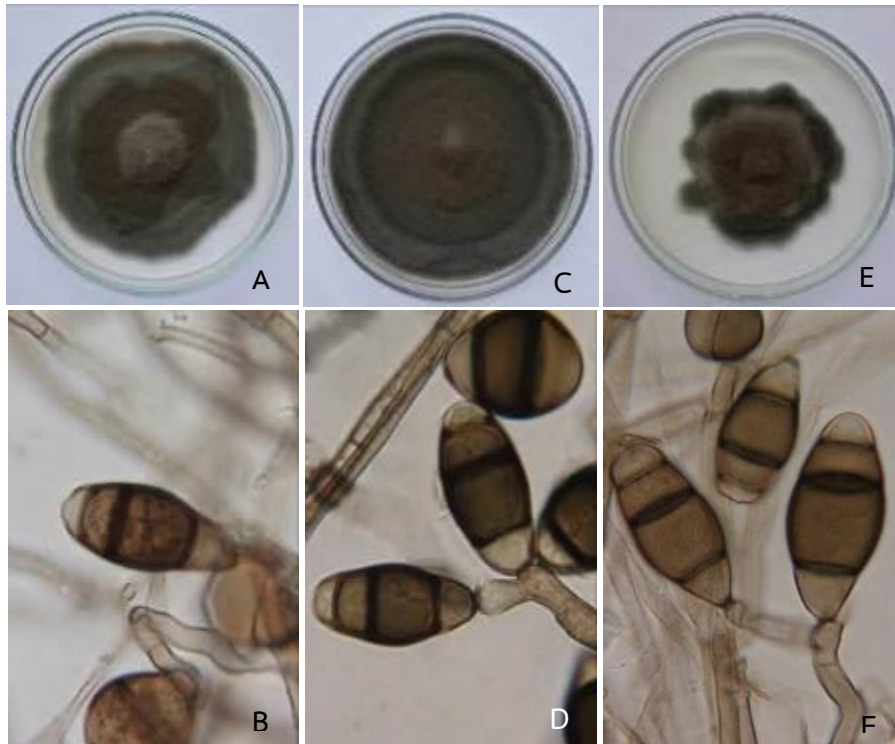


Figure 2 Colonies and conidia of *C. eragrostidis* isolated from flower rusty spot disease of dendrobium : A, B) F028-5, C, D) F028-6 and E, F) F029-4)

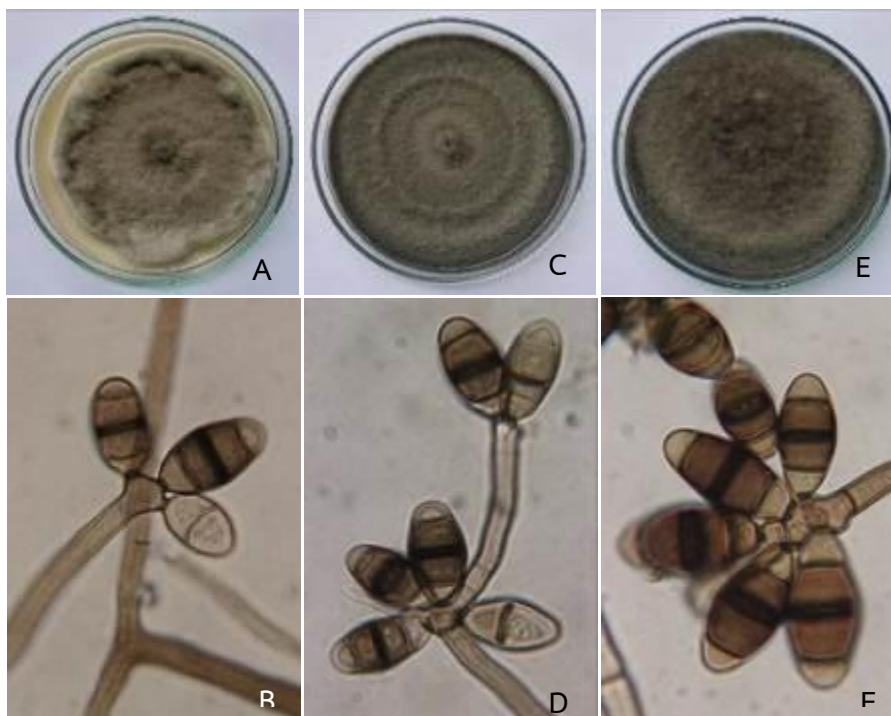


Figure 3 Colonies and conidia of *C. oryzae* 3 isolated from leaf spot disease of oil palm : A, B) P001, C, D) P002 and E, F) P003

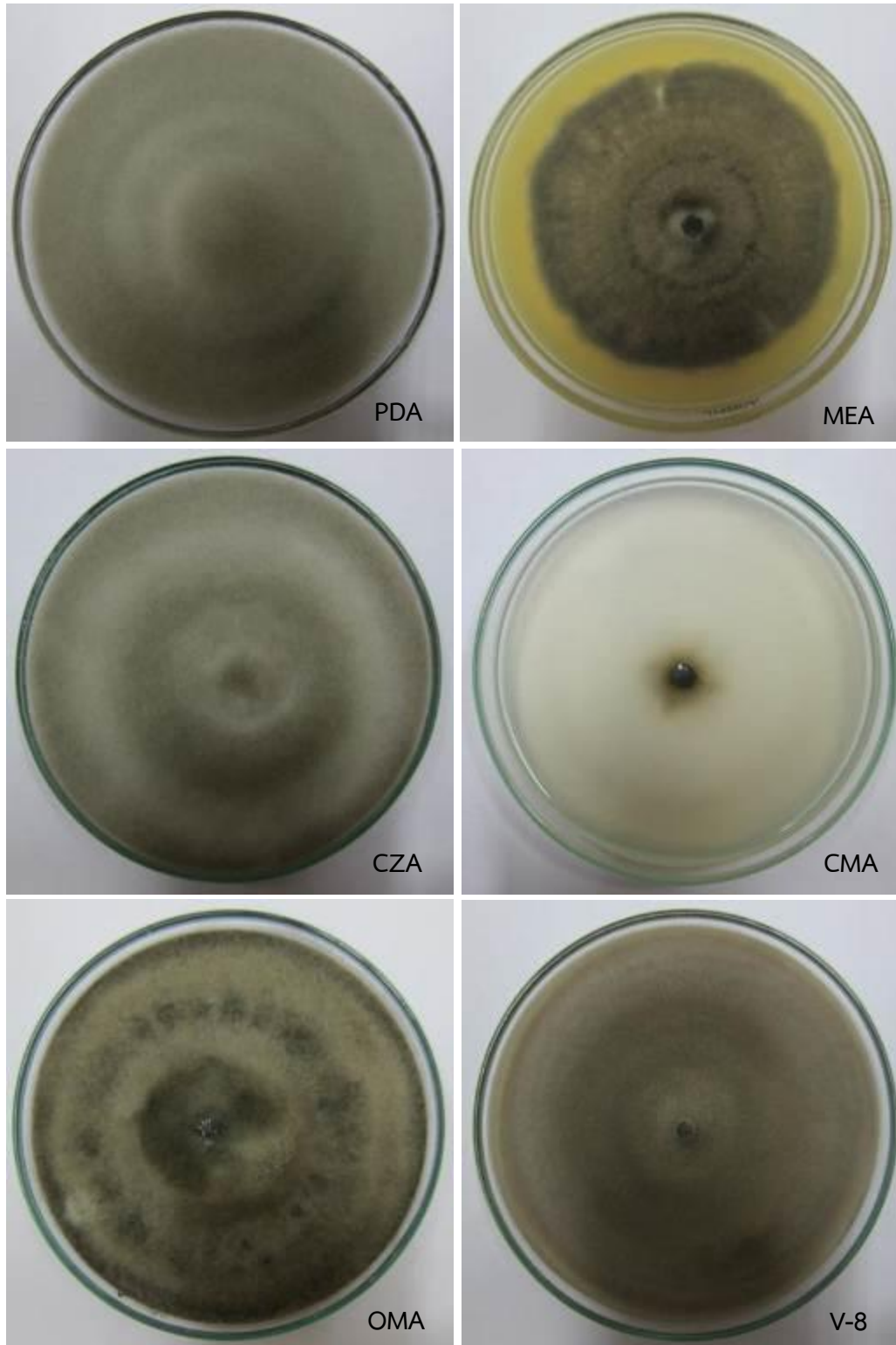


Figure 4 Colonies of *C. eragrostidis* (F028-5) on different media at 14 days

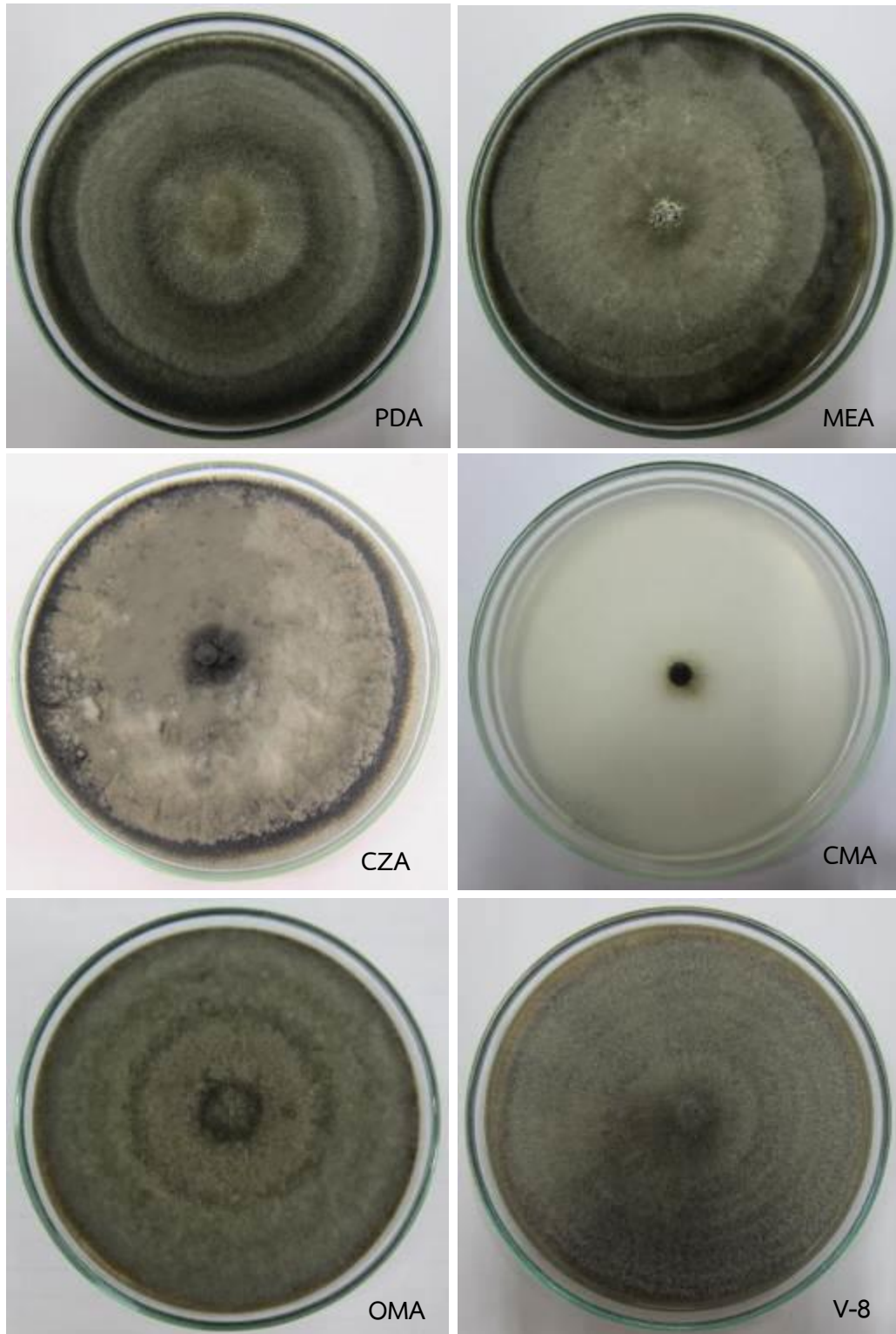


Figure 5 Colonies of *C. eragrostidis* (F028-6) on different media at 14 days

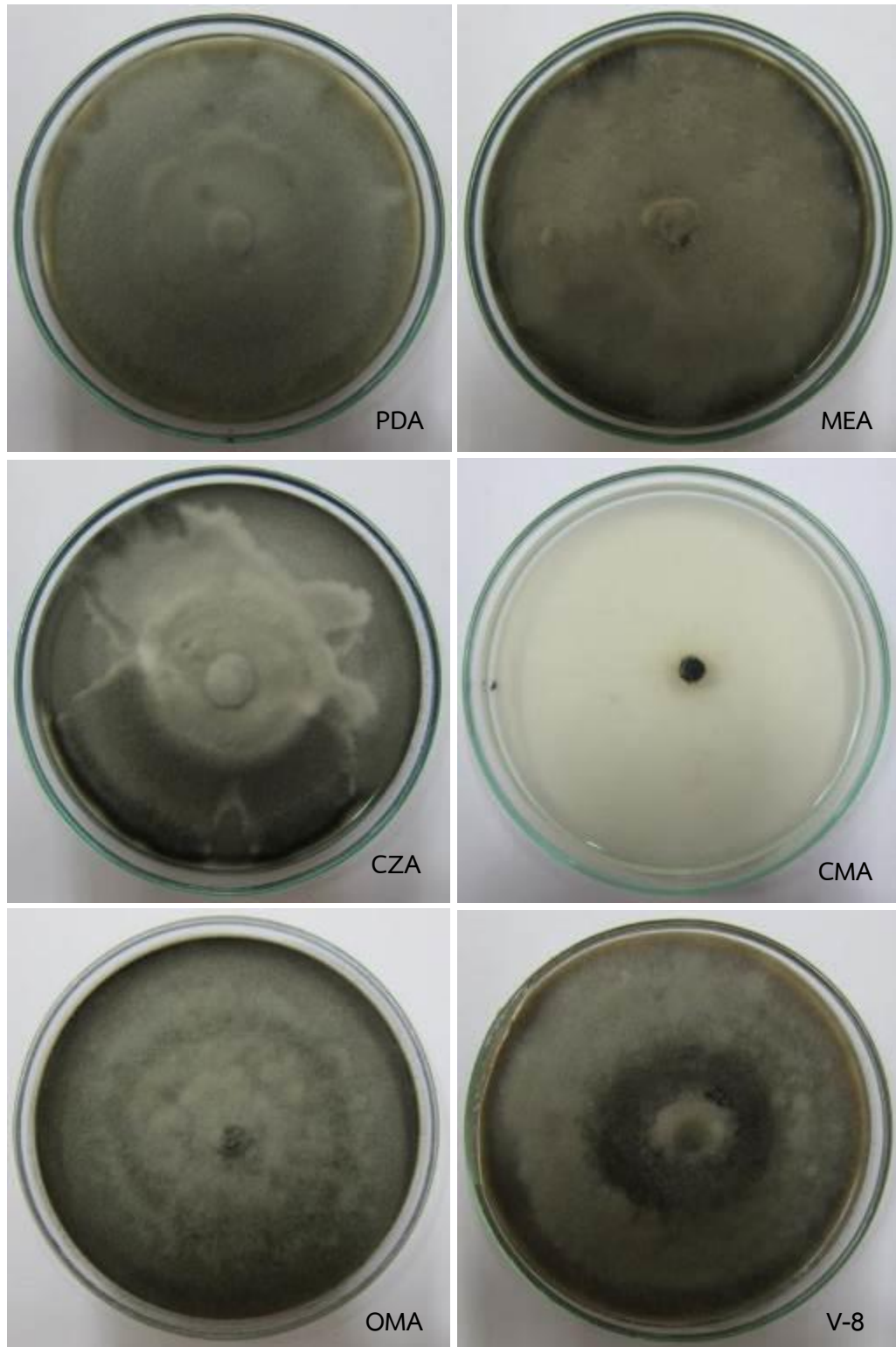


Figure 6 Colonies of *C. eragrostidis* (F029-4) on different media at 14 days

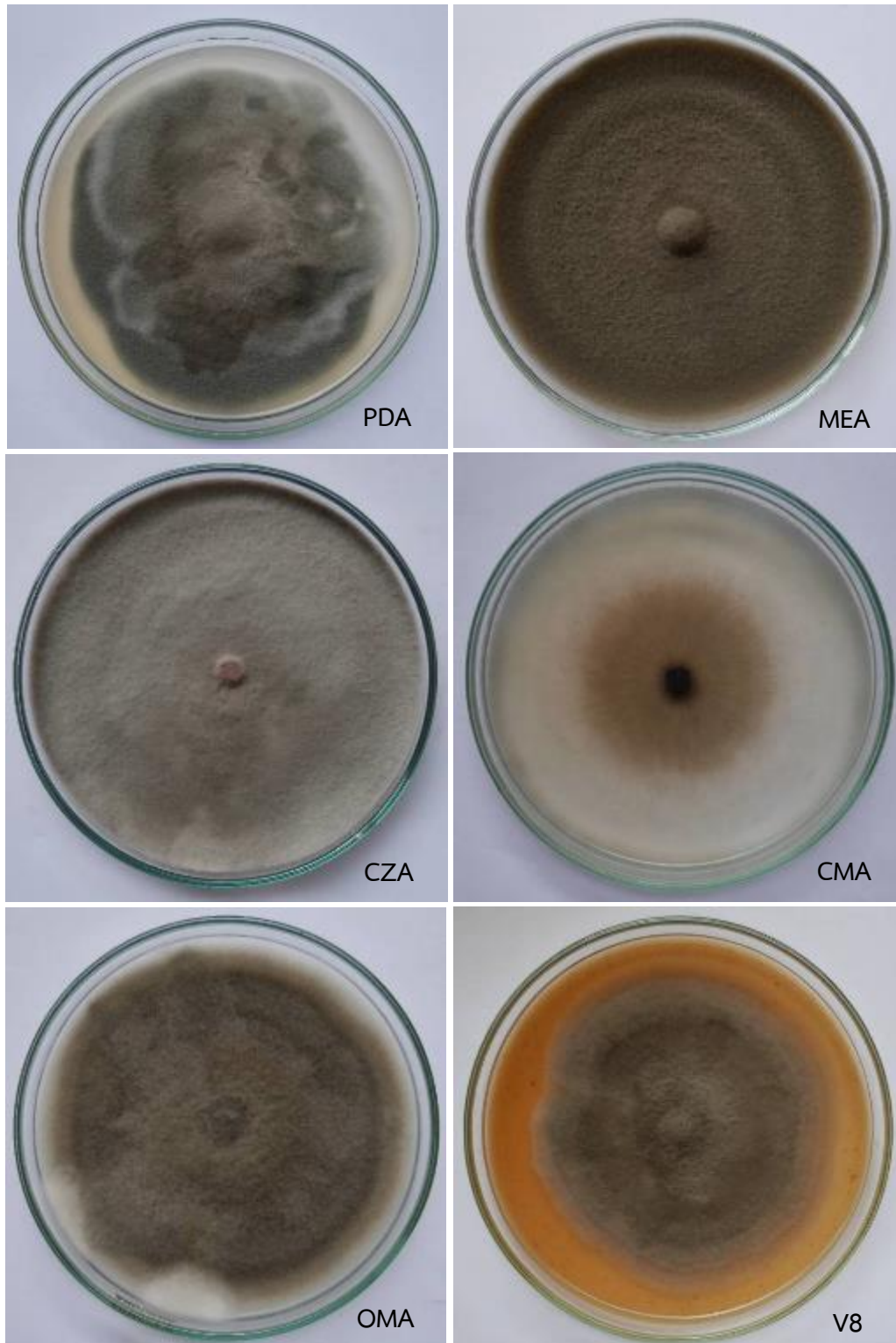


Figure 7 Colonies of *C. oryzae* (P001) on different media at 14 days

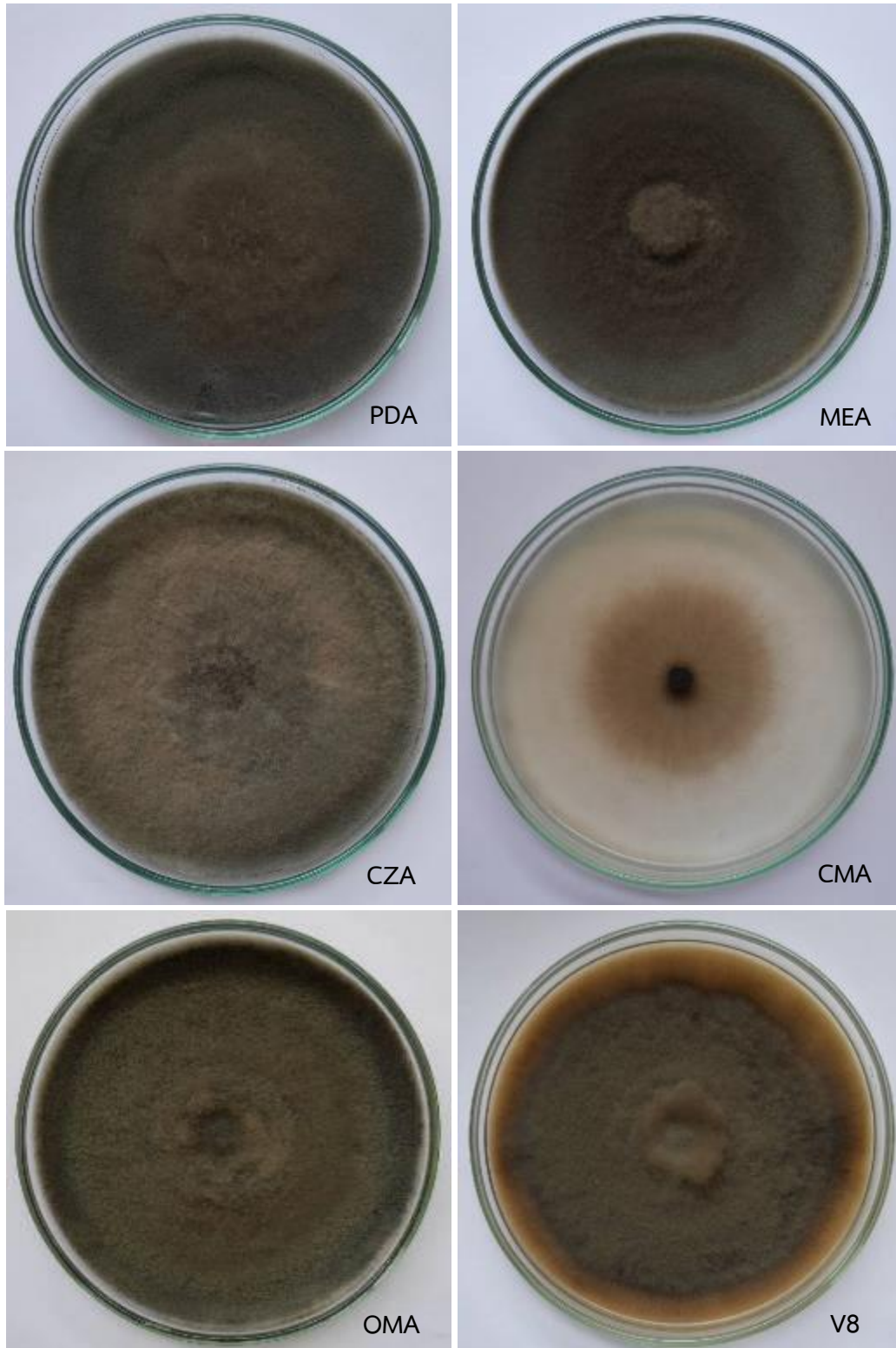


Figure 8 Colonies of *C. oryzae* (P002) on different media at 14 days

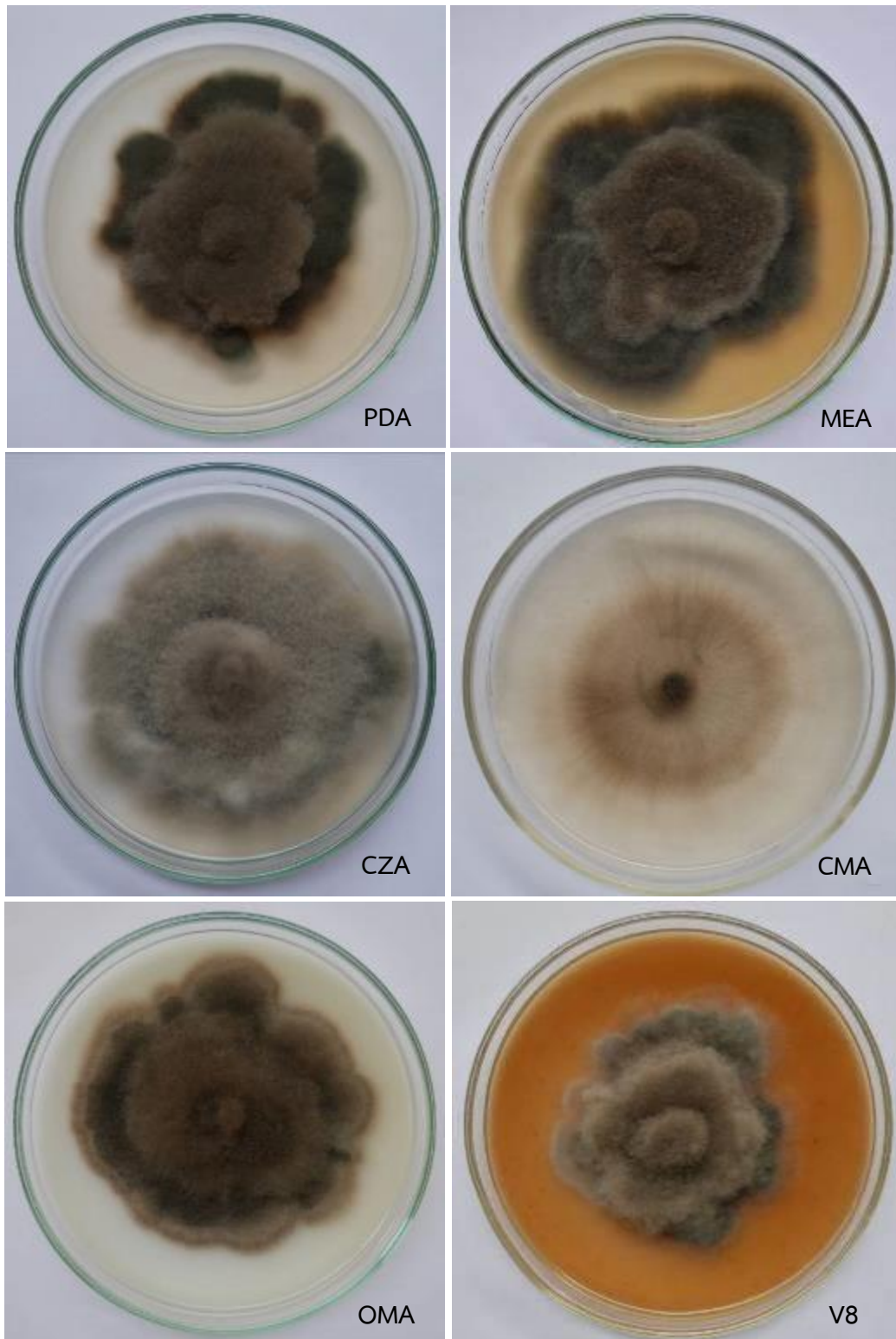


Figure 9 Colonies of *C. oryzae* (P003) on different media at 14 days

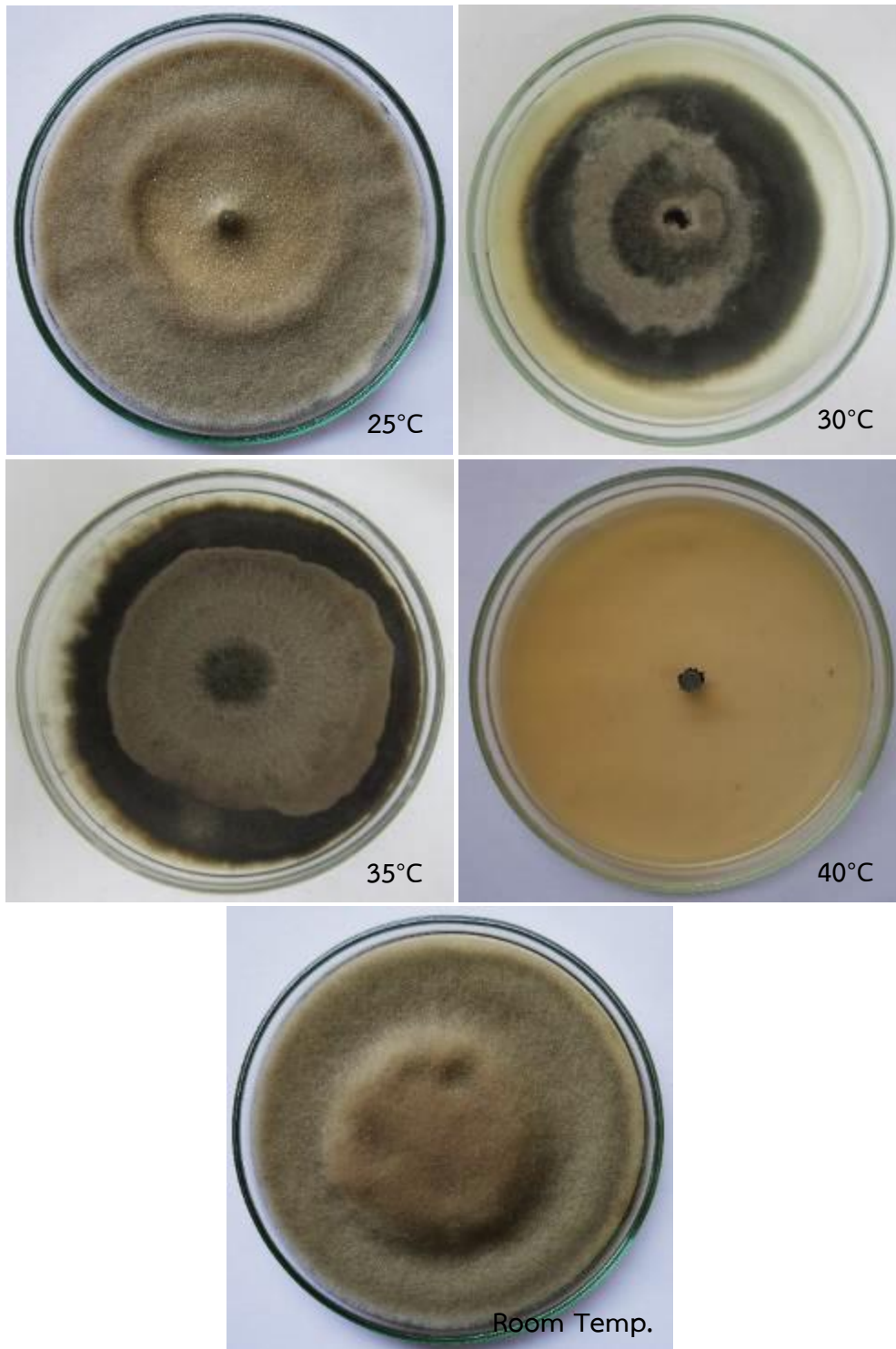


Figure 10 Colonies of *C. eragrostidis* (F028-5) at different temperature at 14 days

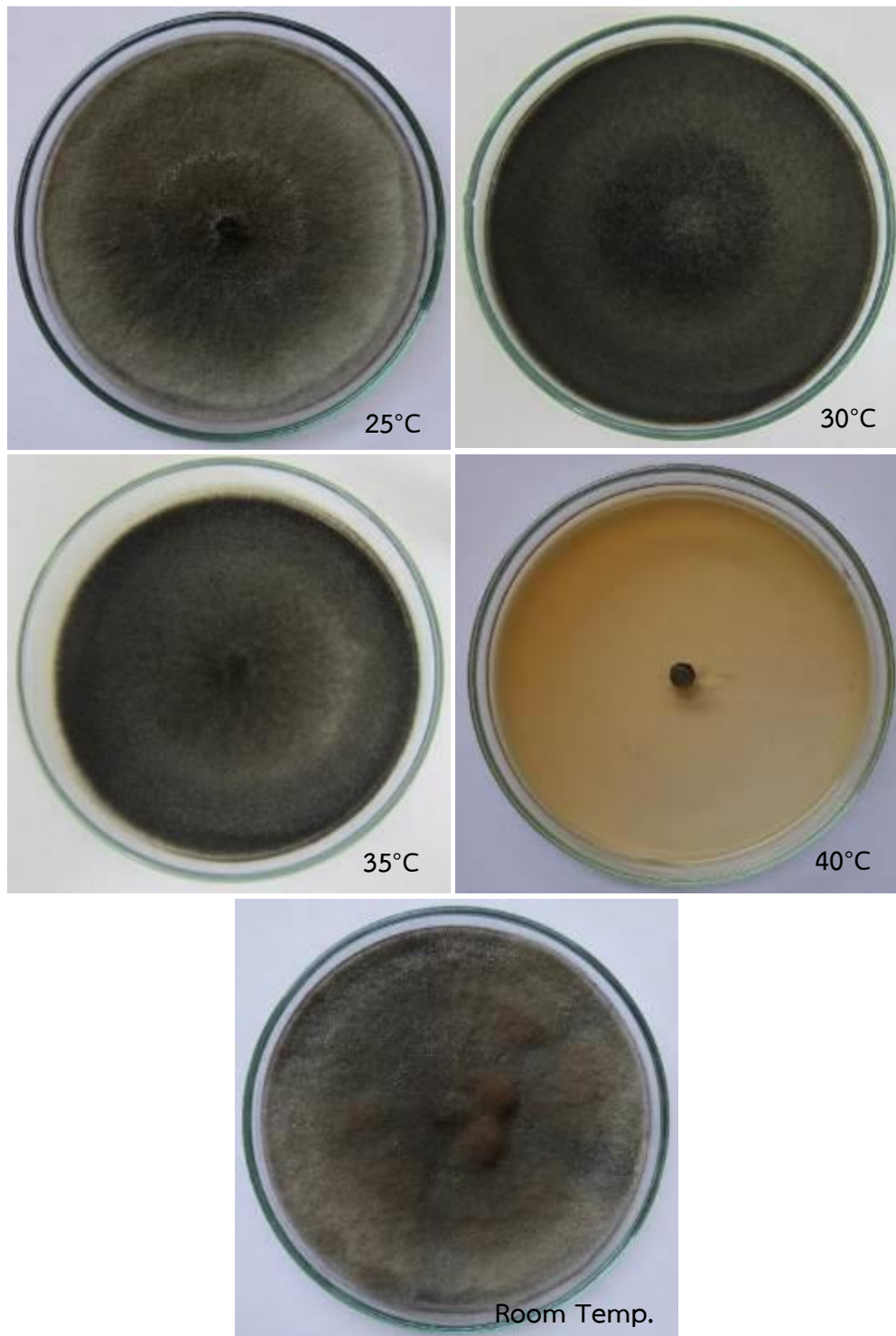


Figure 11 Colonies of *C. eragrostidis* (F028-6) at different temperature at 14 days

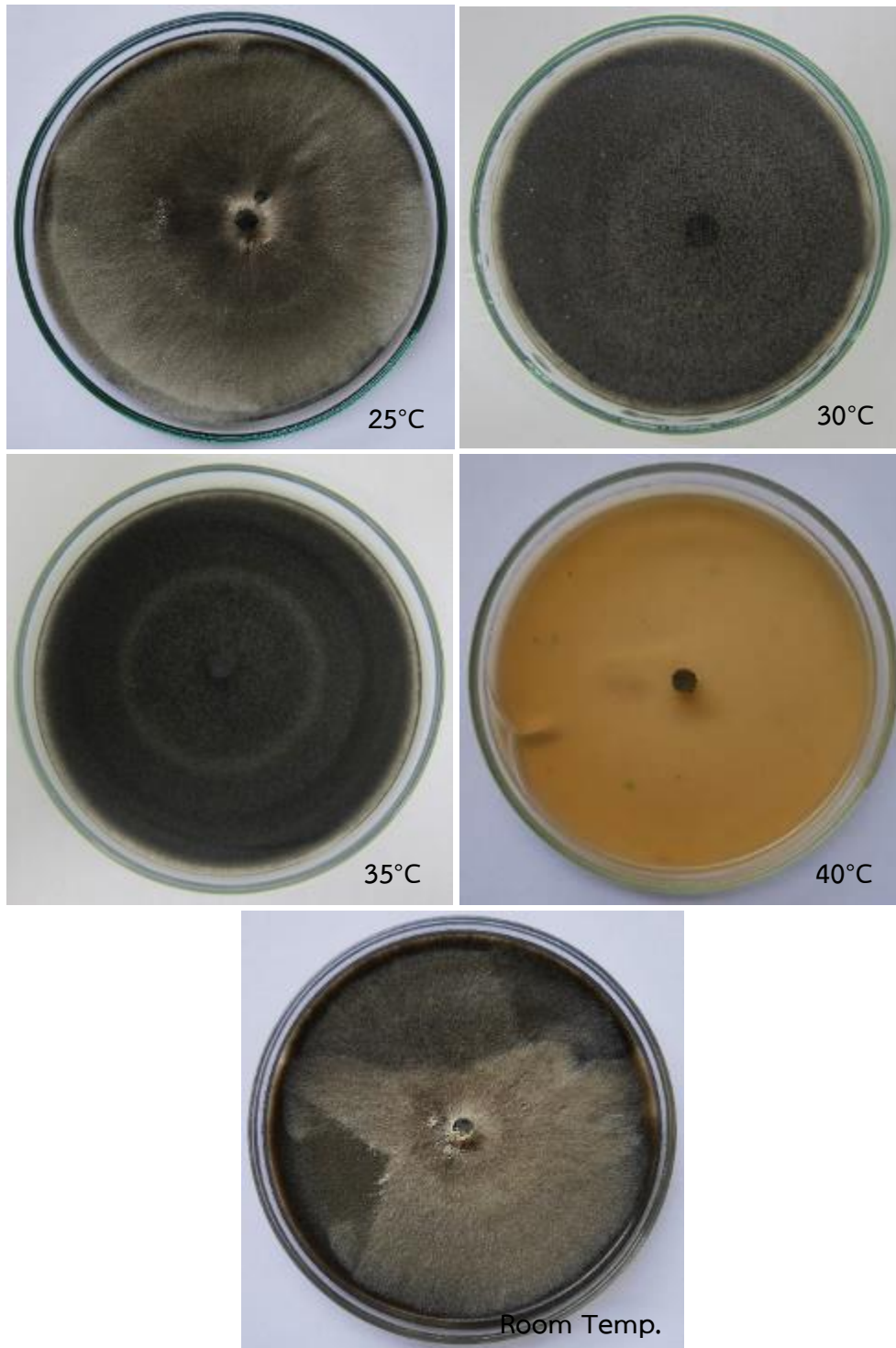


Figure 12 Colonies of *C. eragrostidis* (F029-4) at different temperature at 14 days

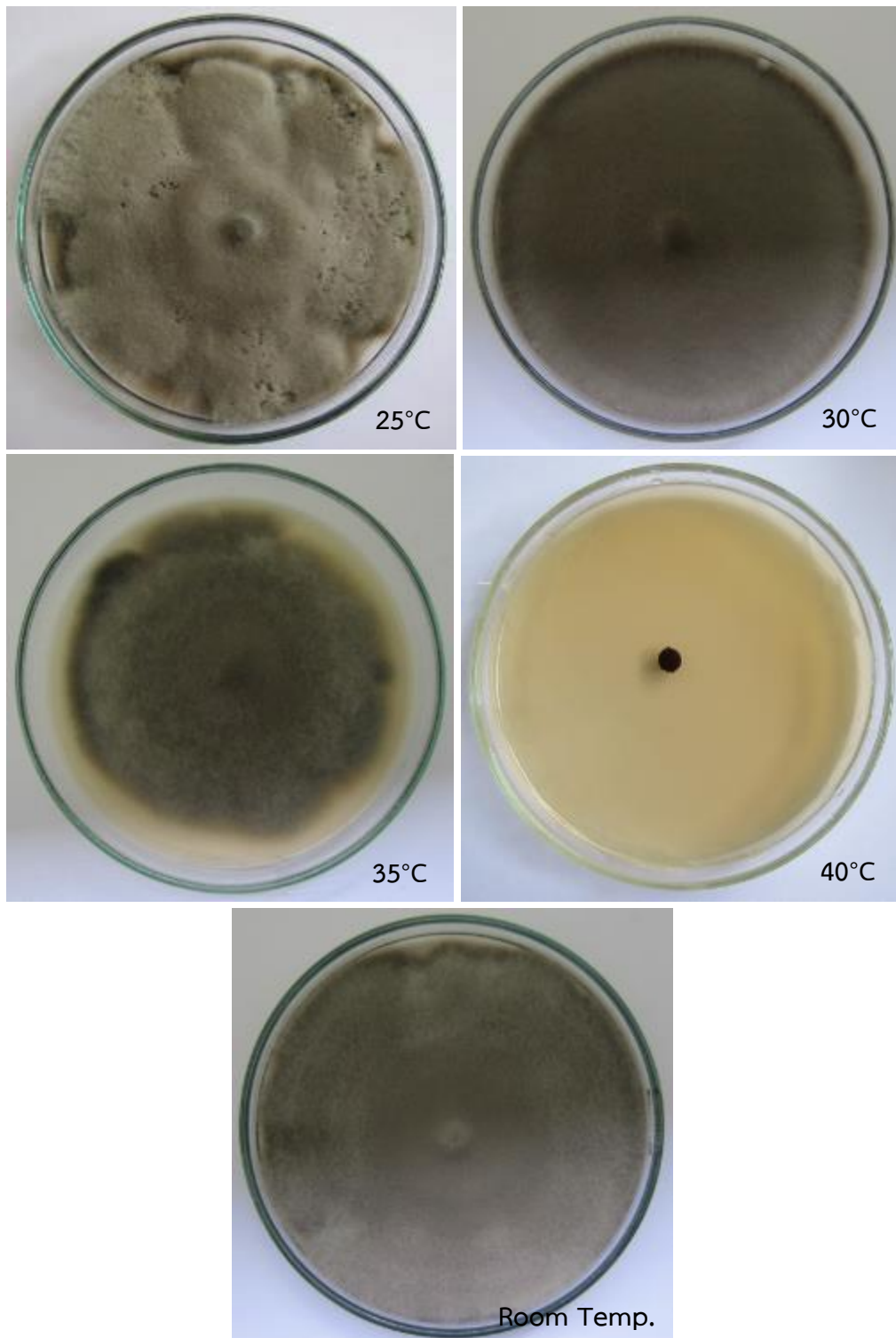


Figure 13 Colonies of *C. oryzae* (P001) on different temperature at 14 days

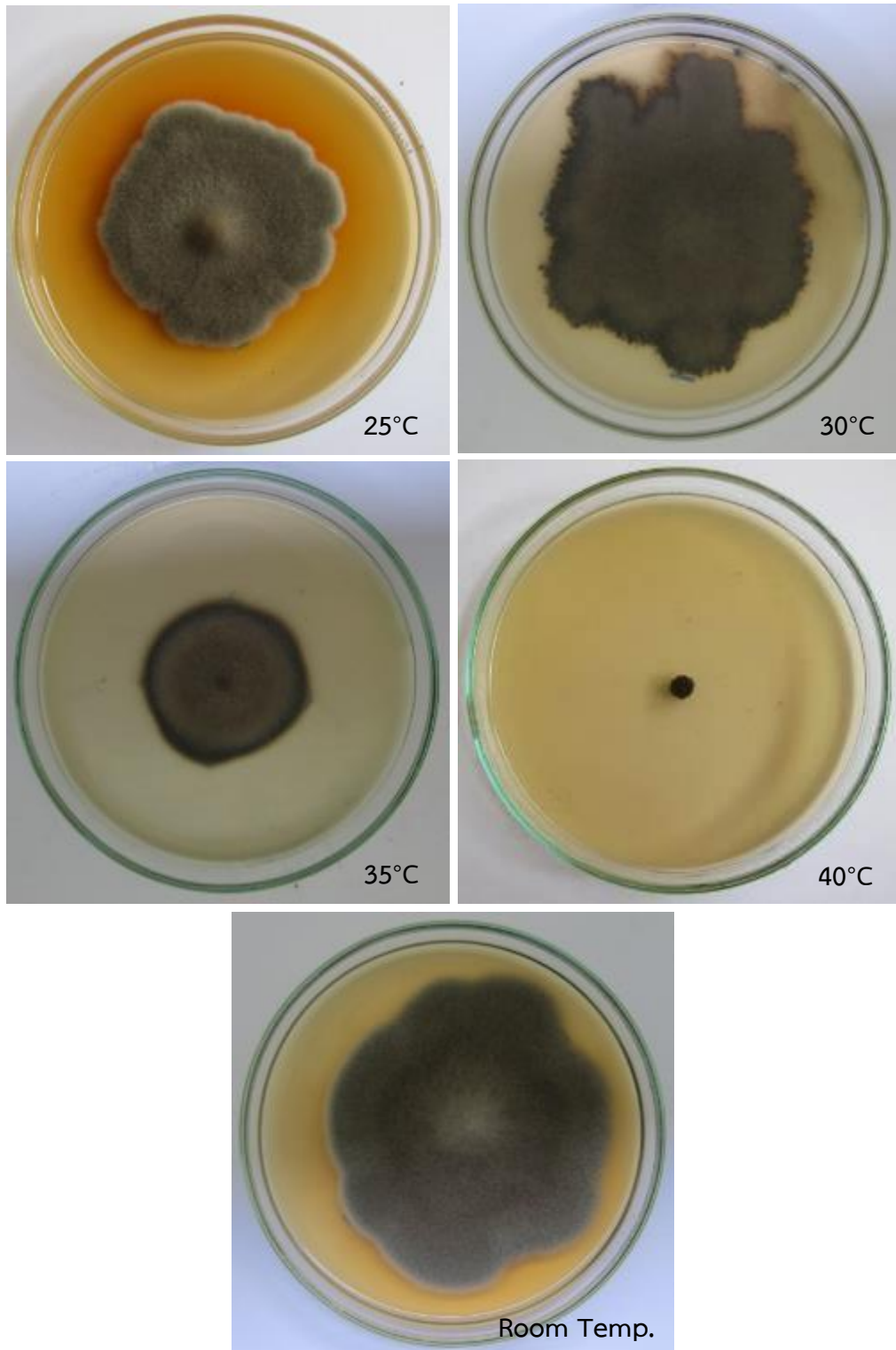


Figure 14 Colonies of *C. oryzae* (P002) at different temperature at 14 days

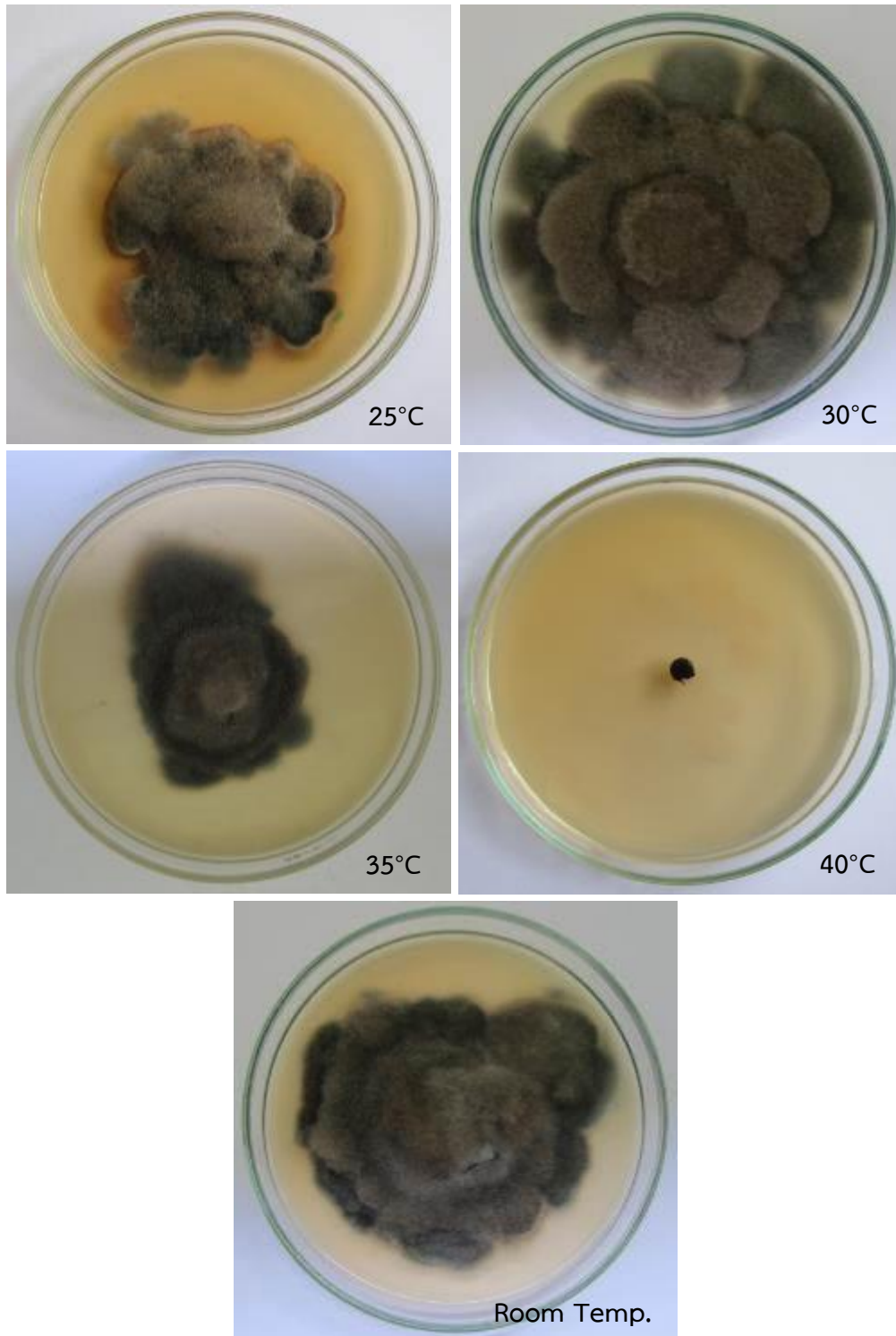


Figure 15 Colonies of *C. oryzae* (P003) at different temperature at 14 days



Figure 16 Oil palm and orchid in greenhouse



Figure 17 The preliminary pathogenicity test results: symptom presented at 7 days after inoculation, spot symptom of *C. eragrostidis* on Dendrobium



Figure 18 The preliminary pathogenicity test results: symptom presented at 14 days after inoculation, spot symptom of *C. oryzae* on oil palm leaves

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 สุตสงวน^{2/}
^{1/} ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

โรคที่สำคัญแก้วมังกรคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem canker) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล ทำให้เกิดความเสียหายกับเกษตรกรเป็นจำนวนมาก สำหรับประเทศไทยนั้นยังมีข้อมูลยังไม่มี การศึกษารายละเอียดของชีววิทยาและนิเวศของรา *N. dimidiatum* เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะทางชีววิทยา นิเวศวิทยาของราชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อเพื่อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม ผลการศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum* ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บกิ่งของแก้วมังกรปกติมาทำการแยกเชื้อ ไม่พบรา *N. dimidiatum* และเก็บส่วนที่เป็นโรคมานำ 3 ระยะ ระยะที่ 1 โรคแสดงอาการจุดขาว มีจุดแดงตรงกลาง จากการศึกษาไม่พบเชื้อ ระยะที่ 2 ลักษณะแผลจากจุดขาว เปลี่ยนเป็นแดงหรือน้ำตาลและต่อมาเปลี่ยนเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลนูนขึ้น จากการศึกษาไม่พบเชื้อ ระยะที่ 3 แผลจากระยะที่ 2 ขยายใหญ่ขึ้น พบส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสีน้ำตาลอยู่ตรงกลาง พบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore อยู่ในส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา เรียกว่า pycnidia และเก็บส่วนของดอกมาศึกษาเชื้อสาเหตุ จากการศึกษาแยกเชื้อบนอาหาร PDA ไม่พบเชื้อสาเหตุ ระยะที่ 4 เก็บผลอ่อน ส่วนที่เป็นโรค ส่วนปกติมาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ผลจากการตรวจแยกเชื้อของผลปกติ ไม่พบเชื้อสาเหตุ ส่วนผลอ่อนที่เป็นโรค มีลักษณะแผลจุดขาว นั้นจากการแยกเชื้อ ไม่พบเชื้อสาเหตุ 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

คำหลัก : แก้วมังกร โรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ โรคแอนแทรคโนส *Neoscytalidium dimidiatum* *Colletotrichum gloeosporioides* *Bipolaris cactivora*

คำนำ

แก้วมังกรเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมสูง เพราะมีสมญานามว่าเป็น ‘ผลไม้สุขภาพ’ ของผู้สูงอายุ ผู้ป่วยโรคเบาหวาน คนอ้วนที่ต้องการลดน้ำหนัก และสามารถป้องกันโรคมะเร็งได้ เนื่องจากในเมล็ดมีสารแอนติออกซิเจนสูง ดังนั้นผู้บริโภคจึงนิยมบริโภคแก้วมังกรกันมากขึ้นและยังเป็นที่ยอดนิยมของผู้บริโภคในต่างประเทศด้วย จึงมีการขยายไปสู่ตลาดต่างประเทศ และในปัจจุบันแก้วมังกรยังเป็นพืชที่นิยมปลูกเป็นการค้าในอีกหลายประเทศ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย บราซิล อินเดีย คอสตาริกา อียิปต์ อิสราเอล ญี่ปุ่น มัลดีเวส เม็กซิโก นิการากัว ไต้หวัน อเมริกา และเวียดนาม อย่างไรก็ตามการส่งออกแก้วมังกรยังจำกัดอยู่กับเฉพาะบางประเทศเท่านั้น ปริมาณการส่งออกแก้วมังกร ในปี 2557 ประเทศไทยส่งออกแก้วมังกรไปประเทศซาอุดีอาระเบีย มีมูลค่ามากเป็นอันดับ 1 จำนวน 3,005,814 บาท รองลงมาได้แก่ประเทศการ์ตาร์และฝรั่งเศส ซึ่งมีมูลค่าการส่งออกเท่ากับ 1,818,238 บาท และ 1,431,945 บาท ตามลำดับ อย่างไรก็ตามประเทศไทยก็มีความพยายามต้องการขยายตลาดไปยังประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งจะทำให้การผลิตแก้วมังกรมีความสำคัญมากขึ้น ถ้าเกษตรกรสามารถผลิตแก้วมังกรที่มีคุณภาพดีก็สามารถเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร แต่ในปัจจุบันปัญหาที่สำคัญต่อการผลิตแก้วมังกรที่สำคัญอย่างหนึ่งคือปัญหาด้านศัตรูพืช โดยเฉพาะปัญหาโรคพืชเป็นปัญหาที่สำคัญมาก มีผลทำให้เกษตรกรเลิกปลูกกันมาก เช่นพื้นที่ปลูกในจังหวัดจันทบุรี จากข้อมูลดังกล่าวเบื้องต้นแล้วในปี 2557 พื้นที่ปลูกแก้วมังกรในจังหวัดจันทบุรีและสมุทรสาครลดลง ซึ่งแต่เดิมเมื่อเริ่มปลูกแก้วมังกรในปี 2540 เกษตรกรได้รับผลผลิตมากมาย ไม่พบปัญหาการระบาดของศัตรูพืช เนื่องมาจากเป็นพืชใหม่ การสะสมของศัตรูพืชยังไม่มาก แต่ในปัจจุบันนี้พบการระบาดของโรคมก เกษตรกรไม่สามารถควบคุมและป้องกันกำจัดโรคได้ โรคระบาดทั้งที่ลำต้นและผล ทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก มีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชกันมาก และใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชไม่ถูกต้อง ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง บางสวนต้องรื้อแปลงปลูกทิ้งเลย การป้องกันกำจัดโรคของแก้วมังกรที่สำคัญที่เกษตรกรจะต้องปฏิบัติคือการกำจัดส่วนที่เป็นโรคทิ้ง แต่เกษตรกรไม่สามารถปฏิบัติได้ ส่วนใหญ่จะทิ้งเศษซากส่วนที่เป็นโรคไว้ในแปลง จึงมีการสะสมของเชื้อโรคมก เมื่อมีการปลูกในฤดูต่อไปก็จะเกิดการระบาดของโรคร้ายและรวดเร็ว และประเทศไทยอยู่ในประเทศเขตร้อน การปลูกแก้วมังกรซึ่งเป็นพืชวงศ์กระบองเพชรนั้น ถ้าปลูกในพื้นที่ๆ มีอากาศร้อนและมีฝนตก ทำให้เชื้อสามารถแพร่กระจายและระบาดได้อย่างรวดเร็ว

สำหรับในประเทศไทยนั้น โรคที่สำคัญคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem cancer) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล (Athipunyakom *et al.*, 2015) ซึ่งในปัจจุบันพบการระบาดของโรคนี้ในหลายประเทศในเขตประเทศเอเชียนั้น ได้แก่ ประเทศไต้หวัน (Chuang *et al.* 2012; Lin *et al.*, 2015) จีน (Yi *et al.*, 2013; 2015). มาเลเซีย (Masratul *et al.*, 2015) และเวียดนาม (Hieu *et al.*, 2015) ดังนั้นปัญหาโรคที่สำคัญที่สุดที่ระบาดในหลายประเทศในเขตเอเชีย คือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ มีการระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว และการป้องกันกำจัดค่อนข้างยาก ซึ่งแต่ละประเทศกำลังเร่งดำเนินงานวิจัยศึกษาอยู่ สำหรับประเทศไทยนั้นยังมีข้อมูลยังไม่มีการศึกษารายละเอียดของชีววิทยาและนิเวศของรา *N. dimidiatum* เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลักษณะทางชีววิทยานิเวศวิทยาของราชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อเพื่อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมตลอดจนสามารถนำข้อมูลนี้ไปวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กระจาด ถุงพลาสติก ปากกาเคมี ดินสอ กรรไกรตัดกิ่ง และ GPS
2. อุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ แผ่นไม้อัดทับตัวอย่าง กระจาด
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ slide cover slip ปากคีบ เข็มเขี่ยปลายแหลม ไบมิคโจน ตะเกียง ยาทาเล็บ
4. สารเคมีสำหรับ mount slide ได้แก่ lactophenol, lactic acid, shear's solution
5. สารเคมี ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ: สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอซิลแอลกอฮอล์ 75%
6. อาหารรุ้นสังเคราะห์ 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 พร้อมกล้องถ่ายรูป และ camera lucida สำหรับวาดภาพจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. ศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

1.1 กำหนดแปลงทดลอง

ติดต่อเกษตรกรแปลงแก้วมังกร จังหวัดนครราชสีมา วัดพิภคภูมิศาสตร์ กำหนดแปลงทดลอง

1.2 เก็บตัวอย่างพืชมาตรวจหาสปอร์ ของรา *N. dimidiatum* บนส่วนต่างๆของพืช

เก็บแก้วมังกรระยะต่าง ๆ โดยระยะที่ 1 เก็บส่วนของแก้วมังกรหลังจากตัดแต่งกิ่งแล้วทั้งที่เป็นโรคและส่วนที่ปกติ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ระยะที่ 2 เก็บส่วนของแก้วมังกรที่แตกออกมาใหม่และที่แตกออกมาแล้ว มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ระยะที่ 3 เก็บดอก มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ระยะที่ 4 เก็บผลอ่อน ส่วนที่เป็นโรค ส่วนปกติมาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ระยะที่ 5 เก็บผลแก่ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ใส่ในถุงพลาสติก เพื่อนำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างที่เก็บมาตรวจหาสปอร์

1.3 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 5-10 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ไบมิคตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

แยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplanting นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมามาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซึบบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

1.4 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 บันทึกรูปภาพ รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope)

1.5 บันทึกข้อมูลสิ่งแวดล้อม

บันทึกข้อมูลสภาพสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิสูงสุด อุณหภูมิต่ำสุด ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณน้ำฝน

1.6 เก็บรักษาตัวอย่างแห้งโรคพืช

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

2. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

2.1 การทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

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* บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

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

3. ศึกษาพีชอาศัยของรา *N. dimidiatum*

3.1 เตรียมพืชทดสอบในต้นกล้า

เตรียมพืชทดสอบชนิดต่างๆ ได้แก่ แก้วมังกร มะม่วง มันสำปะหลัง ส้ม กล้วย เป็นต้น ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

3.2 เตรียมรา conidial suspension ของรา *N. dimidiatum*

เตรียม conidial suspension ของรา *N. dimidiatum* โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้น ล้างสปอร์บนผิวหน้าอาหารด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 100 ครั้งต่อนาที นาน 30 นาที เพื่อให้ conidia กระจายออกจากกันโดยสม่ำเสมอ แล้วตรวจนับจำนวน conidia ด้วย haemocytometer เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^6-10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

3.3. เตรียมรา *N. dimidiatum* บนอาหารสังเคราะห์

เลี้ยงรา *N. dimidiatum* บน อาหารอาหารสังเคราะห์ PDA ในจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 14-21 วัน จากนั้นนำ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะบนอาหารที่มีเชื้อเจริญเติบโตอยู่

3.4 ทดสอบพีชอาศัยในต้นกล้า

เตรียมต้นกล้า และพ่น conidial suspension ของรา *N. dimidiatum* ที่เตรียมไว้ มีปริมาณเชื้อ 10^6-10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร บนพืชทดสอบต่างๆ โดยการทำแผลที่ใบพืช และมีกรรมวิธีพ่นน้ำนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ รดน้ำตามปกติ และ ตรวจสอบที่การเกิดโรคทุกวัน เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการโรคมายกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันการเกิดโรค

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2560 – กันยายน 2563

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

1.1 กำหนดแปลงทดลอง

กำหนดแปลงทดลองเพื่อเก็บตัวอย่างในอำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา

1.2 เก็บตัวอย่างพืชมาตรวจหาสปอร์ ของรา *N. dimidiatum* บนส่วนต่างของพืช

1.3 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืช

1.4 การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการเก็บตัวอย่างโรคแก้วมังกรจากแปลงที่อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา และนำมาแยกเชื้อได้รา 2 ชนิด ได้แก่ *Neoscytalidium dimidiatum* และ *Colletotrichum gloeosporioides* แยกเชื้อบริสุทธิ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 และ -20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษารายละเอียดของเชื้อต่อไป (Figure 1)

เก็บตัวอย่างกิ่งที่ไม่เป็นโรคและไม่เป็นโรคมานอกจากอำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 5 จำนวน 5 ตัวอย่าง จากการแยกเชื้อ และจำแนกชนิดของราโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำแนกชนิดได้เป็นรา *N. dimidiatum* จำนวน 2 ไอโซเลต และ *Colletotrichum* sp จำนวน 3 ไอโซเลต แยกเชื้อบริสุทธิ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 และ -20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษารายละเอียดของเชื้อต่อไป

จากการเก็บตัวอย่างส่วนที่เป็นโรคและส่วนที่ปกติในเดือนพฤศจิกายน 2560 - เดือนมีนาคม 2561 มาแยกเชื้อ พบว่าในเดือนพฤศจิกายน ไม่พบเชื้อกิ่ง ในเดือนธันวาคม กิ่งปกติพบรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในช่วงเดือนมกราคม ไม่พบราที่กิ่งปกติและยังไม่พบกิ่งที่เป็นโรค ในเดือนกุมภาพันธ์ พบรา *N. dimidiatum* และ *C. gloeosporioides* บนส่วนของกิ่งที่เป็นโรคและพบรา *C. gloeosporioides* บนส่วนกิ่งปกติ ในช่วงเดือนมีนาคม - เดือนมิถุนายน พบรา *N. dimidiatum* และ *C. gloeosporioides* บนส่วนของกิ่งที่เป็นโรค ในช่วงเดือนกรกฎาคม - กันยายน เก็บส่วนของผลแก้วมังกรมาแยกเชื้อโดยวิธี Tissue transplanting พบรา *Bipolaris cactivora*, *Colletotrichum truncatum* และ *Neoscytalidium dimidiatum* (Table 1)

1.5 การศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum*

ศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum* ที่อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา

- เก็บกิ่งของแก้วมังกรปกติมาทำการแยกเชื้อ ไม่พบรา *N. dimidiatum* และเก็บส่วนที่เป็นโรคมานาน 3 ระยะ

ระยะที่ 1 โรคแสดงอาการจุดขาว มีจุดแดงตรงกลาง จากการศึกษามิพบเชื้อ (Figure 2)

ระยะที่ 2 ลักษณะแผลจากจุดขาวเปลี่ยนเป็นแดงหรือน้ำตาลและต่อมาเปลี่ยนเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลนูนขึ้น จากการศึกษามิพบเชื้อ (Figure 3)

ระยะที่ 3 แผลจากระยะที่ 2 ขยายใหญ่ขึ้น มีส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราสีดำ

อยู่ตรงกลาง พบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore อยู่ในส่วนขยายพันธ์ของเชื้อรา เรียกว่า pycnidia (Figure 4) และเก็บส่วนของดอกมาศึกษาเชื้อสาเหตุ จากการตรวจแยกเชื้อบนอาหาร PDA ไม่พบเชื้อสาเหตุ

ระยะที่ 4 เก็บผลอ่อน ส่วนที่เป็นโรค ส่วนปกติมาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ผลจากการตรวจแยกเชื้อของผลปกติ ไม่พบเชื้อสาเหตุ ส่วนผลอ่อนที่เป็นโรค มีลักษณะแผลจุดขาวนั้นจากการแยกเชื้อ ไม่พบเชื้อสาเหตุ

2. ศึกษาชนิดของอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *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 โคโลนีของเชื้อมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.93 และ 8.92 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 2 และ Figure 5)

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 2 และ Figure 6)

ผลการศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* ไอโซเลต M 0354 (จากจังหวัดจันทบุรี) ในห้องปฏิบัติการ พบว่าราไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร PDA OMA V-8 A และ CZA โดยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 เซนติเมตร นาน 3 วัน (Table 2 และ Figure 7)

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 2 และ Figure 8)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ศึกษาวงจรชีวิตของรา *N. dimidiatum* ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บกิ่งของแก้วมังกรปกติมาทำการแยกเชื้อ ไม่พบรา *N. dimidiatum* และเก็บส่วนที่เป็นโรคมานาน 3 ระยะ **ระยะที่ 1** โรคแสดงอาการจุดขาว มีจุดแดงตรงกลาง จากการศึกษาไม่พบเชื้อ **ระยะที่ 2** ลักษณะแผลจากจุดขาวเปลี่ยนเป็นแดงหรือน้ำตาลและต่อมาเปลี่ยนเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลนูนขึ้น จากการศึกษาไม่พบเชื้อ **ระยะที่ 3** แผลจากระยะที่ 2 ขยายใหญ่ขึ้น พบส่วนขยายพันธ์ของเชื้อราสีดำอยู่ตรงกลาง พบเชื้อรา *N. dimidiatum* สร้างสปอร์แบบ pycnidiospore อยู่ในส่วนขยายพันธ์ของเชื้อรา เรียกว่า pycnidia และเก็บส่วนของดอกมาศึกษาเชื้อสาเหตุ จากการตรวจแยกเชื้อบนอาหาร PDA ไม่พบเชื้อสาเหตุ **ระยะที่ 4** เก็บผลอ่อน ส่วนที่เป็นโรค ส่วนปกติมาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ผลจากการตรวจแยกเชื้อของผลปกติ ไม่

พบเชื้อสาเหตุ ส่วนผลอ่อนที่เป็นโรค มีลักษณะแผลจุดขาวนั้นจากการแยกเชื้อ ไม่พบเชื้อสาเหตุ การศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *N. dimidiatum* จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ M 0328 (จากจังหวัดสกลนคร) M 0331 (จากจังหวัดอุทัยธานี) M 0354 (จากจังหวัด จันทบุรี) และ M 0355 (จากจังหวัดนครราชสีมา) พบว่า ราทั้ง 4 ไอโซเลตนี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุด บนอาหาร PDA เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 9 เซ็นติเมตร นาน 3 วัน

เอกสารอ้างอิง

- พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตมงคล พจนา ตระกูลสุจริตน์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์
 บูรณี พ่วงศ์แพทย์ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ณีฐิมา โฆษิตเจริญกุล และอมรรัตน์ ภูไพบูลย์.
 2550. การศึกษาชนิดของโรคแก้วมังกรและกวนอิมเพื่อการส่งออก. รายงานผลงานวิจัย
 ประจำปี 2550. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. จตุจักร กรุงเทพฯ หน้า
 1024 – 1034.
- พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเตือ และ ชนินทร ดวงสอาด. 2552. โรคผลเน่าของแก้วมังกร
 สาเหตุเกิดจาก *Bipolaris cactivora*. หน้า 216-223. ใน การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ
 ครั้งที่ 9 “อารักขาพืชไทย เทิดไท้องค์ภูมิ ตามวิถีเศรษฐกิจพอเพียง” ณ โรงแรมสุนีย์แกรนด์
 จังหวัดอุบลราชธานี . 24-26 พฤศจิกายน 2552.
- Athipunyakom, P, S. Likhitekaraj. 2010. Fruit Rot Diseases of Dragon fruit (*Hylocereus*
 spp.) in Thailand, pp. 1 5 6 . In 9 th 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, Frengshan,
 Kaohsiung, Taiwan, 7-9 September 2015.
- Alcorn, J.L. 1 9 8 3 . Generic concepts in Drechslera, Bipolaris and Exserohilum.
 Mycotaxon 17: 1-86.
- Carmichael, J.W., W. Bryce Kendrick, I.L. Connors and Lynne Sigler. 1980 Genera of
 Hyphmycetes. Univ. of Alberta Press. Edmonton, Alberta, Canada. 386 p.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, Surrey, England. 608 pp.
- Ellis, M.B. 1993. More Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, Surrey, England. 507pp.
- 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.
- Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stroma. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. England. 695 p.
- 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.

Table 1 Plant pathogenic fungi isolated from various of plants part affected in different time

Plant Pathogenic fungi	Various parts of plants						Month/year
	Healthy flower	Infected flower	Healthy stem	Infected stem	Healthy fruit	Infected fruit	
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>			-				November 2017
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>			-				November 2017
<i>Colletotrichum truncatum</i>							November 2017
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>							December 2017
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>			√				December 2017
<i>Colletotrichum truncatum</i>							December 2017
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>							January 2018
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>							January 2018
<i>Colletotrichum truncatum</i>							January 2018
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>				√			February 2018
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>			√	√			February 2018
<i>Colletotrichum truncatum</i>							February 2018
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>				√			March 2018
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>				√			March 2018
<i>Colletotrichum truncatum</i>							March 2018
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>				√			April 2018
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>				√			April 2018
<i>Colletotrichum truncatum</i>							April 2018
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>				√			May 2018
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>				√			May 2018
<i>Colletotrichum truncatum</i>							May 2018
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>				√			June 2018
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>				√			June 2018
<i>Colletotrichum truncatum</i>							June 2018
<i>Bipolaris cactivora</i>						√	July 2018
<i>Colletotrichum truncatum</i>						√	July 2018
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>						√	July 2018
<i>Bipolaris cactivora</i>						√	August 2018
<i>Colletotrichum truncatum</i>						√	August 2018
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>						√	August 2018
<i>Bipolaris cactivora</i>						√	September 2018
<i>Colletotrichum truncatum</i>						√	September 2018
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>						√	September 2018

Table 2 Colony growth of 4 isolates of *Neoscytalidium dimidiatum* (after 3 days on various media

Medium	Isolate M0328	Isolate M0331	Isolate M0354	Isolate M0355
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

Remark:
 M0328 isolated from Sakon Nakhon
 M0331 isolated from Uthai Thani
 M0354 isolated from Chanthaburi
 M0355 isolated from Nakhon Ratchasima



Figure 1 Dragon fruit diseases in Pak Chong District, Nakhon Ratchasima Province

- a) Stem canker/brown spot symptom
- b) Anthracnose symptom
- c) *Neoscytalidium dimidiatum* on stem canker/brown spot symptom
- d) *Colletotrichum gloeosporioides* on anthracnose symptom



Figure 2 Stage 1 Minute chlorotic depressed spots often with a red fleck at the center



Figure 3 Stage 2 Elevation of the spot center turning red or grey



Figure 4 Stage 3 Spot expands with the center forming a hard brown scab with pycnidia embedded in surface.

- a-d) Stage 3
- e) pycnidium
- f) pycnidiospore

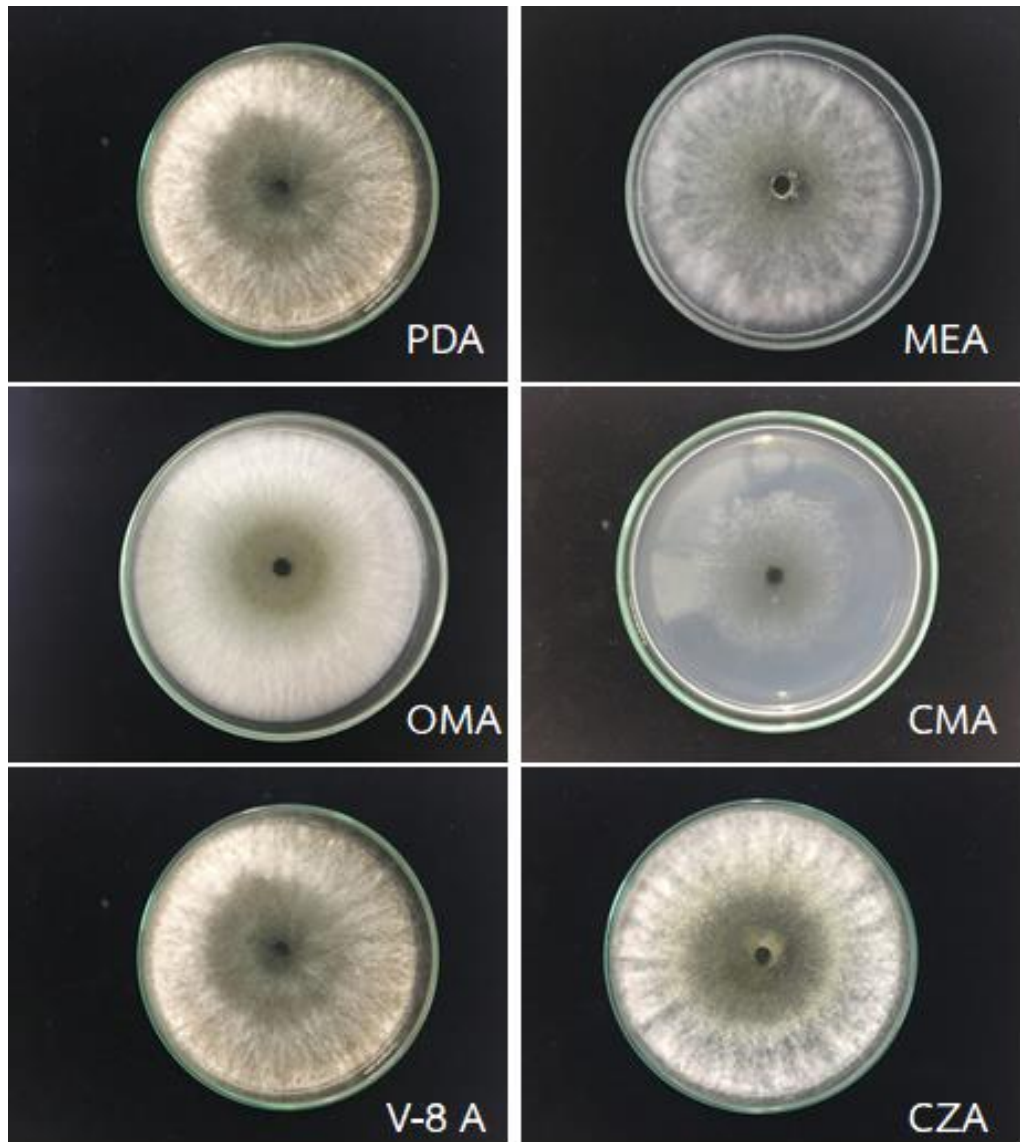


Figure 5 Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0328) collected from Brown spot or stem canker of dragon fruit in Sakon Nakhon after 3 days on various media

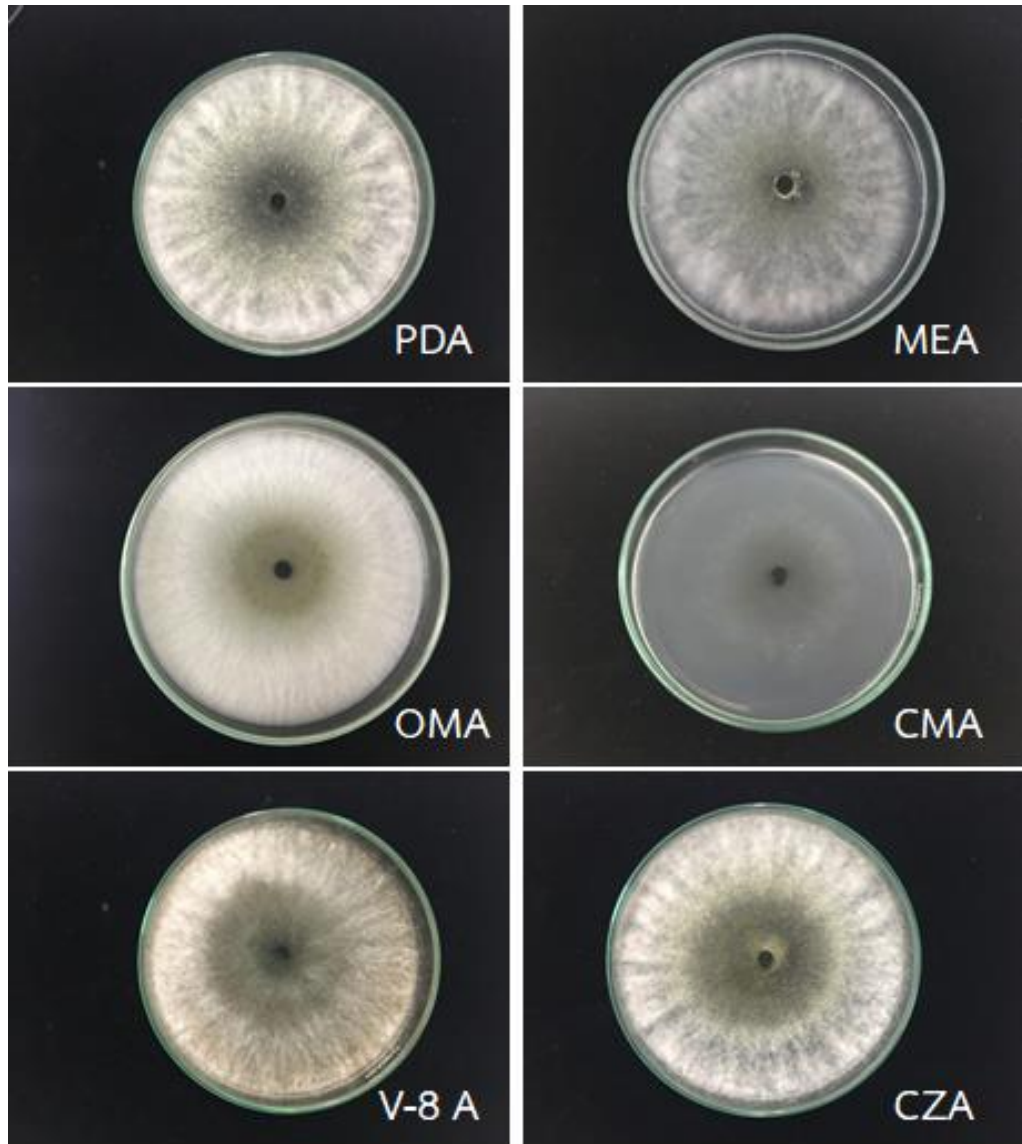


Figure 6 Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0331) collected from Brown spot or stem canker of dragon fruit in Uthai Thani after 3 days on various media

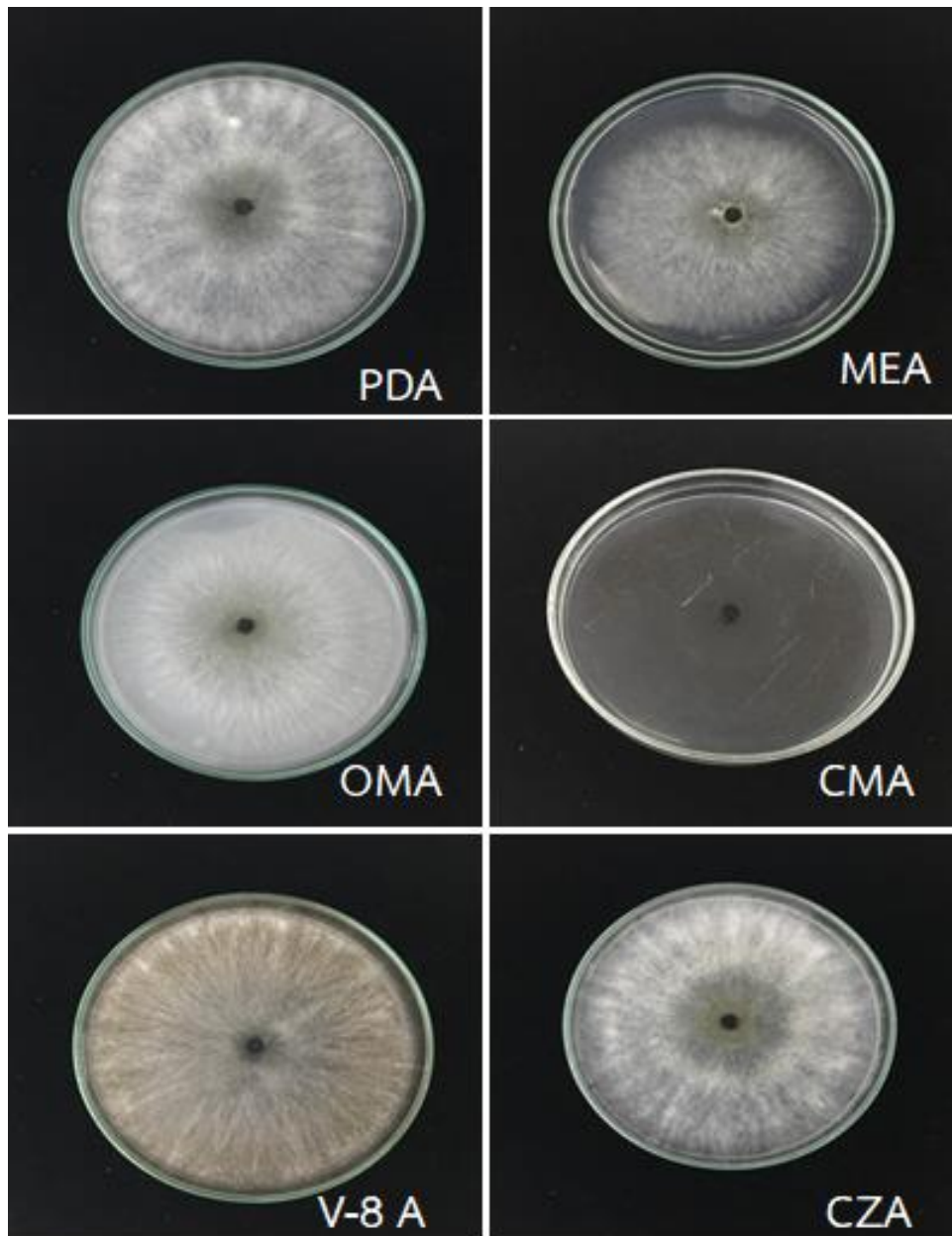


Figure 7 Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0354) collected from Brown spot or stem canker of dragon fruit in Chanthaburi after 3 days on various media

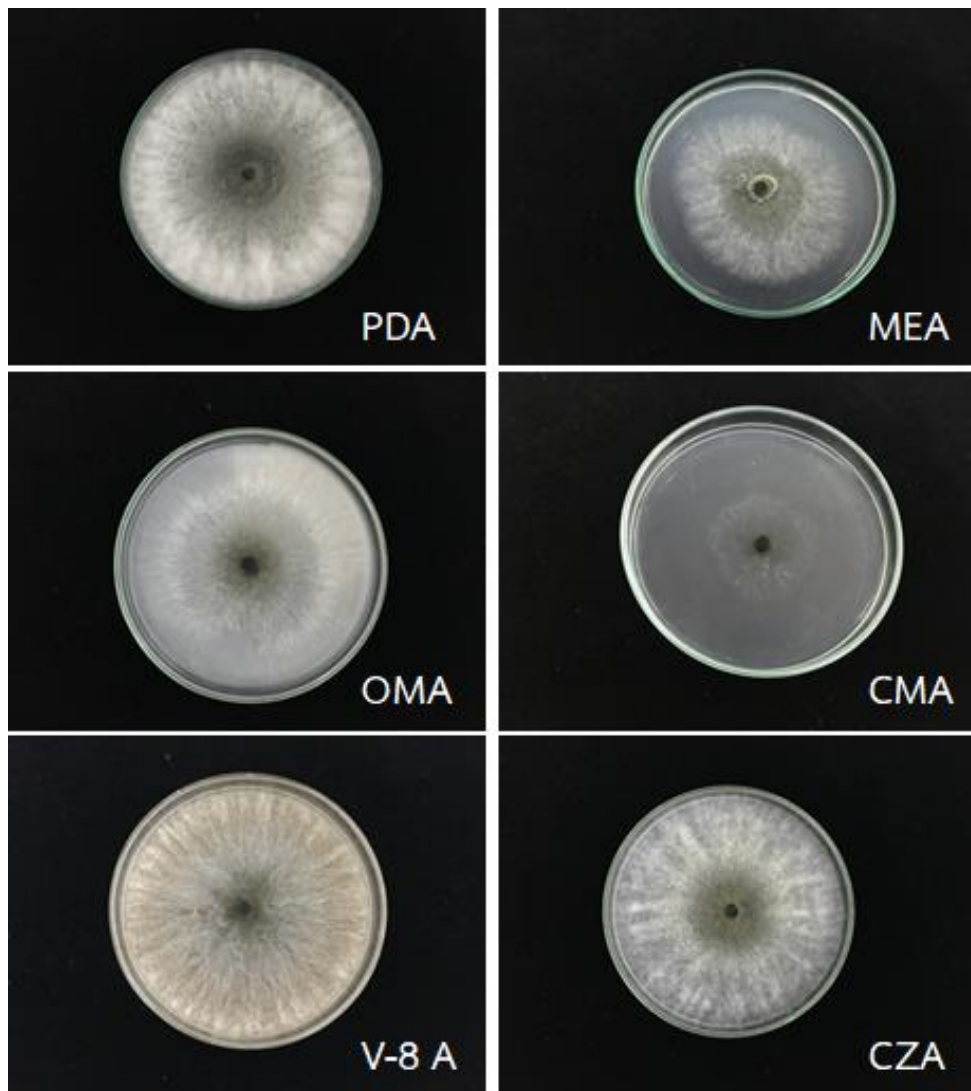


Figure 8 Cultural characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum* (M 0355) collected from Brown spot or stem canker of dragon fruit in Nakhon Ratchasima after 3 days on various media

การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อ *Pepper vein yellows virus*
(PeVYV) ที่เข้าทำลายพริกในประเทศไทย
Study on Biology and Molecular Biology
of *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) infecting Pepper in Thailand

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

^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/} กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{4/} กลุ่มวิชาการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6

รายงานความก้าวหน้า

เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการใบเหลืองคล้ายโรคไวรัสที่เกิดจากเชื้อ PeVYV ได้แก่ อาการเนื่อใบเหลืองคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร เส้นใบเขียว ใบม้วนขึ้น และใบเสียรูปทรง ในจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี จำนวน 2 ตัวอย่าง กรุงเทพมหานคร จำนวน 3 ตัวอย่าง และอยุธยา จำนวน 4 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค One-Step RT-PCR ตรวจพบเชื้อ PeVYV จำนวน 4 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 5' (Untranslated region: UTR) ยีน P0 ยีน P3 (coat protein: CP) และบริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 3' (Untranslated region: UTR) ของเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร (BK) ไอโซเลตกาญจนบุรี (KR) และ ไอโซเลตสุพรรณบุรี (SB) มีความคล้ายคลึงกันของ 5' UTR ที่ระดับ 98-100 เปอร์เซ็นต์ ยีน P0 ที่ระดับ 86.5-91.6 เปอร์เซ็นต์ ยีน P3 ที่ระดับ 99.2-99.8 เปอร์เซ็นต์ และ 3' UTR ที่ระดับ 99-99.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรดอะมิโน มีความคล้ายคลึงกันของยีน P0 ที่ระดับ 86.4-87.7 เปอร์เซ็นต์ ยีน P3 ที่ระดับ 99.1-99.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับไอโซเลตอยุธยาอยู่ระหว่างการดำเนินวิเคราะห์จีโนม

คำนำ

พริกจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการปลูกอย่างกว้างขวางตามแหล่งต่าง ๆ ทั่วโลกเป็นจำนวนมาก ปัญหาและอุปสรรคสำคัญที่มีผลทำให้ผลผลิตนั้นลดลงเป็นอย่างมาก คือ ความเสียหายที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส ซึ่งพบว่ามีเชื้อไวรัสอย่างน้อย 68 ชนิดที่สามารถเข้าทำลายต้นพริกและทำให้ผลผลิตพริกลดลง (Knierim *et al.*, 2013) สำหรับประเทศไทยโรคไวรัสที่ก่อความเสียหายให้กับพริกมากที่สุดคือ โรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Cucumber mosaic, Chilli veinal mottle virus, Tobacco mosaic virus, Pepper yellow leaf curl virus, Capsicum chlorosis virus* (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-02-07-62



และ *Tomato necrosis virus* (Chiemsombat *et al.*, 2010; Hassani-mehraban *et al.*, 2011) นอกจากนี้ Knierim *et al.* (2013) รายงานการพบเชื้อ *Pepper vein yellows virus* (PeVYV) ในพริกที่แสดงอาการของโรค เช่น ใบด่าง ใบเหลือง ใบด่างประ เส้นใบเหลือง ใบลดรูปและเสียรูปและลำต้นแคระแกรน ตามแหล่งปลูกพริกในจังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี

เนื่องจากได้มีการรายงานการพบเชื้อ PeVYV ในแปลงปลูกพริกในประเทศไทย แต่ข้อมูลของเชื้อ PeVYV ยังมีน้อย การวิจัยครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อที่จะศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาและชีวโมเลกุลของเชื้อ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของเชื้อไวรัสซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พริก และยังสามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพริกที่แสดงอาการโรค
2. สารเคมี
 - ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอ
 - ไนโตรเจนเหลว
 - ชุดสกัด RNeasy Mini Kit (QIAGEN)
 - One step RT-PCR (QIAGEN)
 - 100 bp DNA Ladder with 6X Loading Dye (Biotech rabbit, Germany)
 - Agarose gel (SeaKem, USA)
 - RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)
 - 10X 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)
 - เครื่องกำหนดตำแหน่ง GPS eTrex-10 (Garmin, USA)
 - เครื่องผสมสาร Vortex mixer (Fisher Scientific, USA)
 - หลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร
 - หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มล. และ 2 มล.

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรค

สำรวจและเก็บตัวอย่างพริกที่มีลักษณะอาการใบด่าง ใบเหลือง เส้นใบใส และเสียรูป จากแหล่งปลูกพริกจากที่ต่าง ๆ ได้แก่ จังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก

สุพรรณบุรี เชียงใหม่ และเชียงราย โดยการสำรวจ ในพื้นที่ประมาณ 2 ไร่ ทำการสำรวจทุกแถวปลูก
ในกรณีที่พื้นที่สำรวจมีพื้นที่มากกว่า 2 ไร่ขึ้นไป จะทำการสุ่มสำรวจโดยสำรวจแถวเว้นแถว พร้อมทั้ง
ถ่ายภาพในแปลงปลูก ลักษณะอาการที่พบในพริกและบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

2. การตรวจสอบเชื้อไวรัสในพริก

เนื่องจากพริกที่แสดงอาการโรคไวรัสที่กล่าวมาข้างต้นนั้น อาจเกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิด
อื่น หรือมีการติดเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิด ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจหาเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น
CMV, Begomovirus, Potyvirus, Tobamovirus, Tospovirus และ Polerovirus ด้วยเทคนิค PCR
โดยใช้ Universal primers ต่อเชื้อไวรัสแต่ละชนิด หากตัวอย่างพริกที่ให้ผลบวกกับเชื้อ Polerovirus
จะนำมาตรวจสอบและวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PeVYV ต่อไป

3. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืช

โดยใช้ RNeasy Mini Kit (QIAGEN) ตามคำแนะนำของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้ บดใบพริก 100
มิลลิกรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วย้ายใบพริกที่บดละเอียดมาใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร
แล้วเติม Buffer RLT ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วย้ายไปใส่ใน QIAshredder spin
column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสที่ได้ใส่หลอดขนาด 1.5
มิลลิลิตร แล้วเติม 99% ethanol ปริมาตร 0.5 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนผสมนั้น
ไปใส่ใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm นาน 15 วินาที แล้วทิ้งส่วน
ของเหลวใส จากนั้นเติม Buffer RW1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm
นาน 15 วินาที ทิ้งส่วนของเหลวใส แล้วเติม Buffer RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่
ความเร็ว 10,000 rpm นาน 2 นาที แล้วทิ้งส่วนของเหลวใส จากนั้นย้าย RNeasy spin column มา
วางบนหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Nuclease free water ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ปั่น
เหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บอาร์เอ็นเอที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

4. ไพรเมอร์และการสังเคราะห์ส่วนของ Readthrough Domain (RTD) และทั้งจีโนมของเชื้อ PeVYV

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ RTD ของไวรัส โดยใช้ไพรเมอร์ที่รายงานโดย Murakami
and Kawano (2017) ซึ่งจะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 730 คู่เบส

Forward primer PeVYV-F 5'-GAGAAAGACAACCTGTTAAACTCCA-3'

Reverse primer PeVYV-R 5'-TCGTGAGTTTAGTACTATTCCTTCCT-3'

สังเคราะห์ส่วนของ RTD ของเชื้อไวรัส PeVYV จากอาร์เอ็นเอรวมที่เตรียมได้ โดยใช้ส่วนผสม
ของ One step RT-PCR (QIAGEN) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตร
ส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย

Nuclease free water	10	ไมโครลิตร
5x buffer	4	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
10 pmole PeVYV-F	0.5	ไมโครลิตร
10 pmole PeVYV-R	0.5	ไมโครลิตร
enzyme mix	1	ไมโครลิตร
RNA template	3	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	30 วินาที
Annealing	55 °C	30 วินาที
Extension	72 °C	45 วินาที
3) Final extension	72 °C	10 นาที

สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งจีโนมไวรัสโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PeVYV ของประเทศญี่ปุ่นในฐานข้อมูล GenBank (accession no. AB594828) ซึ่งจะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 6,244 คู่เบส

Forward primer	PeVGF-F	5'- ACAAATATACGAAGAGAGAG-3'
Reverse primer	PeVGF-R	5'- ACATCATAGACCAGG-3'

โดยใช้ส่วนผสมของ One step RT-PCR (QIAGEN) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย

Nuclease free water	10	ไมโครลิตร
5x buffer	4	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
10 pmole PeVGF-F	0.5	ไมโครลิตร
10 pmole PeVGF-R	0.5	ไมโครลิตร
enzyme mix	1	ไมโครลิตร
RNA template	3	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	30 วินาที
Annealing	55 °C	30 วินาที
Extension	72 °C	6 นาที 30 วินาที
3) Final extension	72 °C	10 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)

5. 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 ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (E.coli) สายพันธุ์ JM109 โดยใช้วิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2000) คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของ RTD หรือจีโนมของไวรัส ด้วยวิธี blue-white selection แล้วตรวจสอบโคลนของพลาสมิดสายผสมที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาวจำนวน 10 โคโลนีและสีฟ้า 1 โคโลนี มาผสมน้ำปริมาตร 8 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอ ต้นแบบ แล้วตรวจสอบยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ RTD หรือจีโนมของเชื้อ PeVYV

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR มาจำแนกยีนด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ PeVYV ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีนโปรตีนด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ PeVYV ไอโซเลตต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 10 (Kumar *et al.*, 2018)

ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ดำเนินการ

1. ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. แปลงปลูกพริก ในจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก สุพรรณบุรี เชียงใหม่ และเชียงราย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สํารวจและเก็บตัวอย่างพริกแสดงอาการโรคไวรัส

เก็บตัวอย่างพริก จำนวน 12 ตัวอย่างที่แสดงอาการใบเหลืองคล้ายโรคไวรัสที่เกิดจากเชื้อ PeVYV (ภาพที่ 1) ในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี กรุงเทพมหานคร และอยุธยา นำมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค One-Step RT-PCR ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพริกมีดังนี้

จังหวัด	ลักษณะอาการ	จำนวนตัวอย่าง ที่เก็บ	จำนวนตัวอย่าง ที่เป็นโรค
กาญจนบุรี	เนื่อใบเหลืองคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร เส้นใบเขียว และใบเสีयरูปทรง	3	1
สุพรรณบุรี	เนื่อใบเหลือง สีด คล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร เส้นใบเขียว ใบม้วนงอขึ้นและใบเสีयरูปทรง	2	1
กรุงเทพมหานคร	เนื่อใบเหลืองคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร เส้นใบเขียว	3	2
อยุธยา	เนื่อใบเหลืองคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร เส้นใบเขียว	4	1

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ PeVYV แต่ละไอโซเลตหรือแต่ละสายพันธุ์ (strain) ที่พบมีรายงานในฐานข้อมูล GenBank อยู่ระหว่าง 6,125 – 6,244 นิวคลีโอไทด์ จากการศึกษารั้งนี้ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 5' (Untranslated region: UTR) ยีน P0 ยีน P3 (coat protein: CP) และบริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 3' (Untranslated region: UTR) ของเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร (BK) ไอโซเลตกาญจนบุรี (KR) และไอโซเลตสุพรรณบุรี (SB) ดังนี้

2.1 บริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 5 ของเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลต มีขนาด 50 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 2) มีความคล้ายคลึงกันที่ 98% - 100%

2.2 ยีน P0 ของเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลต มีขนาด 750 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 249 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 28.35-28.59 กิโลดาลตัน จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 3) และกรดอะมิโน (ภาพที่ 4) ของโปรตีน P0 พบว่ามีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 86.5% - 91.6% และ 86.4% - 87.7% ตามลำดับ

2.3 ยีน P3 ของเชื้อ PeVYV มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 206 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 22.94 - 22.97 กิโลดาลตัน จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 5) และกรดอะมิโน (ภาพที่ 6) ของโปรตีน P3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.2% - 99.8% และ 99.1% - 99.5% ตามลำดับ

2.4 บริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 3' ของเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลต มีขนาด 402 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 7) มีความคล้ายคลึงกันที่ 99% - 99.5%

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2552. คู่มือโรคผัก. บริษัท เอ-วันฟิวเจอร์ จำกัด กรุงเทพฯ. 153 หน้า.
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 Disease 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., Knyaz C. and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6): 547-1549.
- Murakami, R., Kawano, S., 2017. A natural host and diversity of *Pepper vein yellows virus* in Japan. *JARQ* 51(1), 59-68.



พริกที่พบในแปลงจังหวัดกาญจนบุรี พริกที่พบในแปลงจังหวัดสุพรรณบุรี



พริกที่พบในแปลงกรุงเทพมหานคร พริกที่พบในแปลงจังหวัดอยุธยา

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของพริกที่แสดงอาการใบเหลือง ใบเสียรูปทรง ใบม้วนงอขึ้น พบในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี กรุงเทพมหานคร และ อยุธยา

PBK-5' UTR	ACAAAATATACGAAGAGAGAGAGCCCTTGCCAGTGACTTCTTCAAGTTTT	50
PKR-5' UTR	ACAAAATATACGAAGAGAGAGAGCCCTTGCCAGTGATTCTTCAAGTTTT	50
PSB-5' UTR	ACAAAATATACGAAGAGAGAGAGCCCTTGCCAGTGACTTCTTCAAGTTTT	50

ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 5' ของเชื้อ PeVYV ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW
 PBK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร
 PKR: ไอโซเลตกาญจนบุรี
 PSB: ไอโซเลตสระบุรี
 (*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

PKR-P0	MNFELINGSHLKVSLTRKLGYSRERILNLAVFLTQYLITVQENATTNHFLRSICALLPFL	60
PBK-P0	MNFELINGSHLKVSLTRKLGYSRERILNLAVFLSQYLVTVQENATTNHFLRSICALLPFL	60
PSB-P0	MNFELINGSHLKVSLTRKLGYSRERILNLAVFLSQYLVTVQENATTNHFLRSICALLPFL *****:***:*****	60
PKR-P0	SSQCPFLSGNTPHRNGKREQKRVYRLALYCGVNIAPCWNGEAFSPVWLQTDNKLGA	120
PBK-P0	STRCPFVAGNAPHRNTKREYKRISRLALFCGVNITSSCEGEVTTSAWLQTDNNLGA	120
PSB-P0	SSQCPFLSGNTPHRNGKREQKRVYRLALYCGVNIAPCWNGEAFSPVWLQTDNKLGA *.:***:***:*** ** *: :***:*** . :*. : .*****:***:*	120
PKR-P0	FERGAGSALASYLQRFQTPFLFHGAGEFTKFLRIWTRHCETVVERSPKLPVDRGLIVELW	180
PBK-P0	LKRRAGSAMASYIQRFQTPFLFHGAGEFTKFLRVWTHHCEGVVERSLPKLSVDRGLIVELW	180
PSB-P0	LKRRAGSAMASYIQRFQTPFLFHGAGEFTKFLRVWTHHCEGVVERSLPKLSVDRGLIVELW :.* ***:***:*****:*** ** *: :***:*** ** *: :***:*****	180
PKR-P0	HLGHCLLDLLSSDDFYNSRRMSRIALCLHNIYGDGIAVDVYRLAHMPRSIVYIKSGENYLH	240
PBK-P0	HLGHCLLDLLSGDDIYCARRLSRVALRLYGIYGESIVMDVYRLAHMPRSIVYIKSGEDYLH	240
PSB-P0	HLGHCLLDLLSGDDIYHARRLSRVALCLHRIYGESIAMDVYRLAHLPRSVSFKSGEDYLH *****.*:* :**:*:* * : ***:.*:*****:***. :***:***	240
PKR-P0	GSQIQKELQ	249
PBK-P0	GSQIQKELQ	249
PSB-P0	DSQIQKELQ .*****	249

ภาพที่ 4 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน P0 ของเชื้อ PeVYV ทำการวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW

PBK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร

PKR: ไอโซเลตกาญจนบุรี

PSB: ไอโซเลตสระบุรี

(*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

PBK-P3	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC	60
PKR-P3	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC	60
PSB-P3	ATGAATACGGGAGGGGTTAGGAGAAATAATAATGGAAATGGTGGATCACGTAACACCCGC *****	60
PBK-P3	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTTCGACCCCTGGGCGCACA	120
PKR-P3	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTTCGACCCCTGGGCGCACA	120
PSB-P3	CGTCGTAGACGCCACGACAGGTTTCGCCCTGTCGTTGTGGTTCGACCCCTGGGCGCACA *****	120
PBK-P3	CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT	180
PKR-P3	CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT	180
PSB-P3	CGGCGAGGAAATCGAAGACGACGAAATGGAGGCAGGAACCGAAGAAGCCGAAATAGAGTT *****	180
PBK-P3	GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT	240
PKR-P3	GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT	240
PSB-P3	GGAGGAAGGTCGAGCAACAGCGAAACTTTCATCTTCAACAAGGACTCAATCAAGGATAGT *****	240
PBK-P3	TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA	300
PKR-P3	TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA	300
PSB-P3	TCCTCAGGATCTGTCACCTTCGGGCCGAGTTTATCAGAGAGCGTCGCGCTTTCAGGTGGA *****	300
PBK-P3	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA	360
PKR-P3	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA	360
PSB-P3	GTTCTCAAAGCCTACCATGAATATAAGATCACAATGGTCAACATACGCTTCGTCAGTGAA *****	360
PBK-P3	TCCTCTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCTGCAAGCTTACT	420
PKR-P3	TCCTCTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCTGCAAGCTTACT	420
PSB-P3	TCCTCTCCACAGCGGAGGGCTCCATCGCTTACGAGCTGGACCCCTGCAAGCTTACT *****	420
PBK-P3	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480
PKR-P3	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG	480
PSB-P3	AGTCTCCAATCCACCCTGCGCAAGTTCCCCGTCACCAAAGGCGGGCAAGCGACTTTTCGG *****	480
PBK-P3	GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC	540
PKR-P3	GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC	540
PSB-P3	GCTTCGCAGATTAACGGGGTAGAGTGGCATGATACATCCGAAGATCAATTTAGGCTGCTC *****	540
PBK-P3	TACAGAGGCAACGGGACAAAGAACGTTGCTGCCGGTTtCTTtCAGATCCGGTTTACTGTG	600
PKR-P3	TACAAAGGCAACGGGACGAAAGACGTTGCCCGGTTtCtTTcAGATCCGGTTtACTGtg	600
PSB-P3	TACAAAGGCAACGGGACGAAAGAACGTTGCCCGGTTtCTTtCAGATCCGGTTtACTGTG *** . ***** . ***** ***** *****	600
PBK-P3	CAACTGCACAACCCCAAATGA 621	
PKR-P3	CAaTTGCACAACCCCAAATGA 621	
PSB-P3	CAATTGCACAACCCCAAATGA 621 *** *****	

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน P3 ของเชื้อ PeVYV ทำการวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW

PBK: ไชยเลตกรุงเทพมหานคร

PKR: ไชยเลตกาญจนบุรี

PSB: ไชยเลตสระบุรี

(*) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

PKR-P3	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRP VVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV	60
PBK-P3	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRP VVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV	60
PSB-P3	MNTGGVRRNNNGGSRNTRRRRRPRQVRP VVVVAPPGRTRRGNRRRRNGGRNRRSRNRV *****	60
PKR-P3	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPCLSESVALS SGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE	120
PBK-P3	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPCLSESVALS SGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE	120
PSB-P3	GGRSSNSETFIFNKDSIKDSSSGSVTFGPCLSESVALS SGGVLKAYHEYKITMVNIRFVSE *****	120
PKR-P3	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTS EDQFRL	180
PBK-P3	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTS EDQFRL	180
PSB-P3	SSSTAEGSIAYELDPHCKLTSLSLQSTLRKFPVTKGGQATFRASQINGVEWHDTS EDQFRL *****	180
PKR-P3	YKNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK	206
PBK-P3	YRNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK	206
PSB-P3	YKNGTKNVAAGFFQIRFTVQLHNPK *****	206

ภาพที่ 6 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน P3 ของเชื้อ PeVYV ทำการวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW

PBK: ไอโซเลตกรุงเทพมหานคร

PKR: ไอโซเลตกาญจนบุรี

PSB: ไอโซเลตสระบุรี

(* ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

```

PKR-3' UTR      CTCTGGGACCTTAAATTCCTGTGAGCATAATTTGTAGTCCAAGCTCTATGACTATAAAGAA 60
PBK-3' UTR      CTCTGGGACCTTAAATTCCTGTGAGCATAATTTGTAGTCCAAGCTCTATGACTATAAAGAA 60
PSB-3' UTR      CTCTGGGACCTTAAATTCCTGTGAGCATAATTTGTAGTCCAAGCTCTATGACTATAAAGAA 60
*****

PKR-3' UTR      ACGAGCACACTGAACTCCAAGCCTGTTAGAGTATAACCCAGGCAGTCTAAGCTCTATGAC 120
PBK-3' UTR      ACGAGCACACTGAACTCCAAGCCTGTTAGAGTATAACCCAGGCAGTCTAAGCTCTATGAC 120
PSB-3' UTR      ACGAGCACACTGAACTCCAAGCCTGTTAGAGTATAACCCAGGCAGTCTAAGCTCTATGAC 120
*****

PKR-3' UTR      TTTAAAATAACGAGCATACTGAACTCCAAGCCTGTTAGAGTATAACCCAGGCAGTCTAAG 180
PBK-3' UTR      TTTAAAATAACGAGCATACTGAACTCCAAGCCTGTTAGAGTATAACCCAGGCAGTCTAAG 180
PSB-3' UTR      TTTAAAATAACGAGCATACTGAACTCCAAGCCTGTTAGAGTATAACCCAGGCAGTCTAAG 180
*****

PKR-3' UTR      CTCTATGACTTTAAAATAACGAGCGTACTGAACTCCAAGCCTGTTAGAGTAGAACCCAGG 240
PBK-3' UTR      CTCTATGACTTTAAAATAACGAGCGTACTGAACTCCAAGCCTGTTAGAGTATAACCCAGG 240
PSB-3' UTR      CTCTATGACTTTAAAATAACGAGCGTACTGAACTCCAAGCCTGTTAGAGTATAACCCAGG 240
*****

PKR-3' UTR      TCGTCATTAGCTGTAGACGTAATATCAGCGGTCCAGTGTGGAAGGCTGTAACACTGAG 300
PBK-3' UTR      TCGTCATTAGCTGTAGACGTAATATCAGCGGTCCAGTGTGGAAGGCTGTAACACTGAG 300
PSB-3' UTR      TCGTCATTAGCTGTAGACGTAATATCAGCGGTCCAGTGTGGAAGGCTGTAACACTGAG 300
*****

PKR-3' UTR      TAACTCACAGCAACGAAACCCGCGACAGATCTGTGTGGAAGTAGGCATCATAATTCTTA 360
PBK-3' UTR      TAACTCACAGCAACGAAACCCGCGACAGATCTGTGTGGAAGTAGGCATCATAATTCTTA 360
PSB-3' UTR      TAACTCACAGCAACGAAACCCGCGACAGATCTGTGTGGAAGTAGGCATCATAATTCTTA 360
*****

PKR-3' UTR      GGGTAGGGGGGTGTATAGATACCCCCCTGGTCTATGATGT 402
PBK-3' UTR      GGGTAGGGGGGTGTATAGATACCCCCCTGGTCTATGATGT 402
PSB-3' UTR      GGGTAGGGGGGTGTATAGATACCCCCCTGGTCTATGATGT 402
*****
    
```

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 3' ของเชื้อ PeVYV ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW
 PBK: ไชยเลตกรุงเทพมหานคร
 PKR: ไชยเลตกาญจนบุรี
 PSB: ไชยเลตสระบุรี

การจำแนกชนิดเชื้อ *Crinivirus* ของพืชตระกูลแตงในประเทศไทย
 Identification of *Crinivirus* species infecting cucurbit plants in Thailand

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

^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/} กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{4/} กลุ่มวิชาการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6

รายงานความก้าวหน้า

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา มะระ และ ฟักทอง ที่แสดงอาการเส้นใบ ใบเหลืองและใบเสียรูปทรง ในจังหวัดกาญจนบุรี เชียงราย เชียงใหม่สระแก้ว และ กรุงเทพมหานคร รวมทั้งสิ้น 110 ตัวอย่าง มาตรวจสอบด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ด้วย universal primers ของเชื้อไวรัสในกลุ่ม เชื้อ *Crinivirus* ผลปรากฏว่า ไม่พบแถบดีเอ็นเอเชื้อ *Crinivirus* ในทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค One-Step Reverse transcription polymerase chain reaction (One-Step RT-PCR) ในห้องปฏิบัติการ

คำนำ

พืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา ฟักทอง เมล่อน แตงโม แคนตาลูป สควอช และมะระ เป็นพืชที่มีการปลูกอย่างกว้างขวางทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยซึ่งมีการปลูกมากเพื่อใช้บริโภคและผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งออกโดยเฉพาะในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง การระบาดของโรคพืชโดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญในการผลิตพืชตระกูลแตง เพราะทำให้พืชนั้นเกิดความเสียหายและผลผลิตลดลง ซึ่งถ้าหากพืชถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายในระยะต้นกล้าจะส่งผลให้ต้นพืชแคระแกรนหรือถ้าหากรุนแรงมากก็จะทำให้ต้นพืชตาย ซึ่งเชื้อไวรัสที่สำคัญของพืชตระกูลแตงที่มีรายงานการระบาดในแหล่งปลูกในประเทศไทย 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) โดยพืชที่ติดเชื้อมีแสดงอาการใบซีด จุดซีดระหว่างเส้นใบ ใบต่างลาย ใบเหลือง และลำต้นแคระแกรน การแพร่กระจายของโรคนี้อาจเกิดขึ้นได้ง่ายและรวดเร็วโดยมีแมลงหิวข้าวยาสูบ (*Bemisia tabaci*) เป็นแมลงพาหะ (Kao *et al.*, 2000; Louro *et al.*, 2000; Orfanidou *et al.*, 2014)

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-02-08-62

ในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลของเชื้อ *Crinivirus* หรืออาจจะยังมีน้อย การวิจัยครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อจะจำแนกชนิดของเชื้อ *Crinivirus* ที่แยกจากพืชตระกูลแตง ศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาเกี่ยวกับอาการบนพืชอาศัยและพันธุกรรมของเชื้อ รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อที่พบในแหล่งต่าง ๆ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของเชื้อไวรัสซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชตระกูลแตง และยังสามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชตระกูลที่แสดงอาการโรค
2. สารเคมี
 - ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอ
 - ไนโตรเจนเหลว
 - ชุดสกัด RNeasy Mini Kit (QIAGEN)
 - One step RT-PCR (QIAGEN)
 - 100 bp DNA Ladder with 6X Loading Dye (Biotech rabbit, Germany)
 - Agarose gel (SeaKem, USA)
 - RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)
 - 10X 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)
 - เครื่องกำหนดตำแหน่ง GPS eTrex-10 (Garmin, USA)
 - เครื่องผสมสาร Vortex mixer (Fisher Scientific, USA)
 - หลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร
 - หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มล. และ 2 มล.

วิธีการ

1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการของโรค

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่มีลักษณะอาการใบต่าง ใบเหลือง เส้นใบใส และเสียวรูป จากแหล่งปลูกต่าง ๆ ได้แก่ จังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก สุพรรณบุรี เชียงใหม่ และเชียงราย โดยการสำรวจ ในพื้นที่ประมาณ 2 ไร่ ทำการสำรวจทุกแถวปลูก ในกรณีที่พื้นที่สำรวจมีพื้นที่มากกว่า 2 ไร่ขึ้นไป จะทำการสุ่มสำรวจโดยสำรวจ

แถวเว้นแถว พร้อมทั้งถ่ายภาพในแปลงปลูก ลักษณะอาการที่พบในแปลงปลูกและบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

2 การตรวจสอบเชื้อไวรัสในพืชตระกูลแตง

เนื่องจากพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการโรคไวรัสที่กล่าวมาข้างต้นนั้น อาจเกิดจากการติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น หรือมีการติดเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิด ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจหาเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ เช่น CMV, *Begomovirus*, *Potyvirus*, *Tobamovirus*, *Tospovirus* และ *Polerovirus* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Universal primers ต่อเชื้อไวรัสแต่ละชนิด หากตัวอย่างพืชตระกูลแตง ที่ให้ผลบวกกับเชื้อ *Crinivirus* จะนำมาตรวจสอบและวิเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ CYSDV และ CCYV ต่อไป (รายละเอียดไพรเมอร์ 1.4)

3 การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืช

โดยใช้ RNeasy mini kit (QIAGEN) ตามคำแนะนำของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้ บดใบพืช 100 มิลลิกรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วย้ายใบพืชที่บดละเอียดมาใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติม Buffer RLT ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วย้ายไปใส่ใน QIAshredder spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสที่ได้ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม 99% ethanol ปริมาตร 0.5 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนผสมนั้นไปใส่ใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 15 วินาที แล้วทิ้งส่วนของเหลวใส จากนั้นเติม Buffer RW1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 15 วินาที ทิ้งส่วนของเหลวใส แล้วเติม Buffer RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 2 นาที แล้วทิ้งส่วนของเหลวใส จากนั้นย้าย RNeasy spin column มาวางบนหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Nuclease free water ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บอาร์เอ็นเอที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

4 ไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไวรัสจิ้งนัส *Crinivirus*

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

Forward primer CriniRdRp251F 5'- TNGGNAARGGNGARAG -3'

Reverse primer CriniRdRp995R 5'- GTRTTNGAYAACCAHGTRTTHG -3'

เมื่อมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ universal primers ก็จะนำมาตรวจหาชนิดของไวรัสด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ 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'

โดยใช้ส่วนผสมของ One step RT-PCR (QIAGEN) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย

Nuclease free water 10 ไมโครลิตร

5x buffer	4	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
10 pmole PeVYV-F	0.5	ไมโครลิตร
10 pmole PeVYV-R	0.5	ไมโครลิตร
Enzyme mix	1	ไมโครลิตร
RNA template	3	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	30 วินาที
Annealing	55 °C	30 วินาที
Extension	72 °C	45 วินาที
3) Final extension	72 °C	10 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)

5 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 ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ JM109 โดยใช้วิธี heat shock transformation คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของ Hsp70h ด้วยวิธี Blue-white selection แล้วตรวจสอบโคลนของพลาสมิดสายผสมที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาวจำนวน 10 โคโลนี และสีฟ้า 1 โคโลนี มาผสมน้ำปริมาตร 8 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วตรวจสอบยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน Hsp70h ของเชื้อ Crinivirus

6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR มาจำแนกยีนด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ Crinivirus ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีนโปรตีนด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ CYSDV หรือ CCYV ไอโซเลตต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 10 (Kumar *et al.*, 2018)

ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ดำเนินการ 1. ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. แปลงปลูกพริก ในจังหวัดศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครปฐม กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก สุพรรณบุรี เชียงใหม่ และเชียงราย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา มะระ และ ฟักทอง ที่แสดงอาการเส้นใบและใบเหลืองในจังหวัดกาญจนบุรี เชียงราย เชียงใหม่สระแก้ว และกรุงเทพมหานคร รวมทั้งสิ้น 110 ตัวอย่าง มาตรวจสอบด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ด้วย universal primers ของเชื้อไวรัสในกลุ่มเชื้อ *Crinivirus* ผลปรากฏว่า ไม่พบแถบดีเอ็นเอเชื้อไวรัสในทุกตัวอย่าง

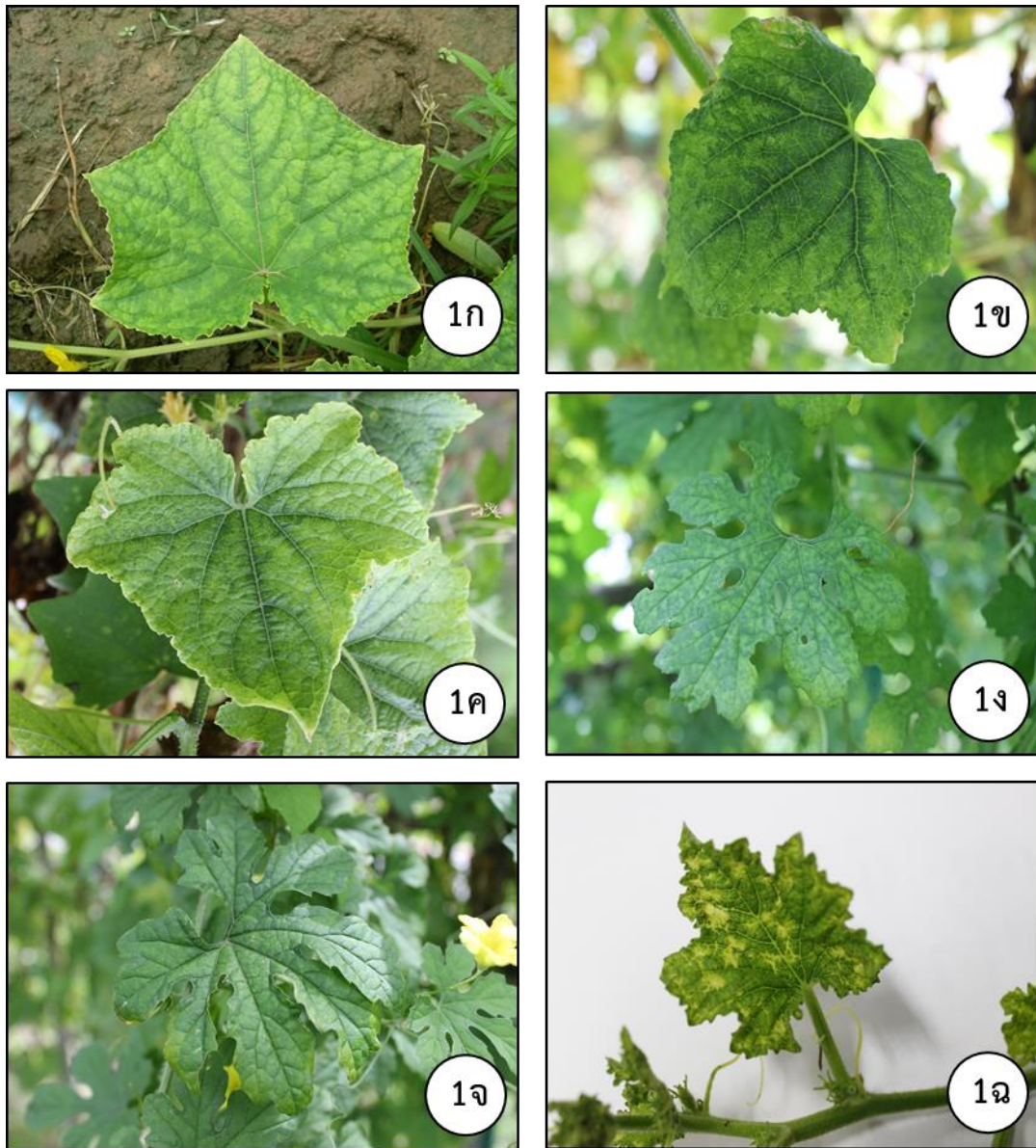
จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ผลการตรวจหาเชื้อ <i>Crinivirus</i>
1. กาญจนบุรี	15	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
2. สุพรรณบุรี	18	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
3. เชียงราย	30	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
4. เชียงใหม่	20	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
5. สระแก้ว	20	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
6. กรุงเทพมหานคร	7	ไม่พบเชื้อ <i>Crinivirus</i>
รวมทั้งสิ้น	110	-

2. เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตง ที่แสดงอาการเส้นใบและใบเหลืองในจังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 10 ตัวอย่าง และสุพรรณบุรี จำนวน 10 ตัวอย่าง เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง และเชียงใหม่ จำนวน 20 ตัวอย่าง มาตรวจสอบด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ด้วย universal primers ของเชื้อไวรัสในกลุ่มเชื้อ *Crinivirus* ผลปรากฏว่า ไม่พบแถบดีเอ็นเอเชื้อไวรัสในทุกตัวอย่าง

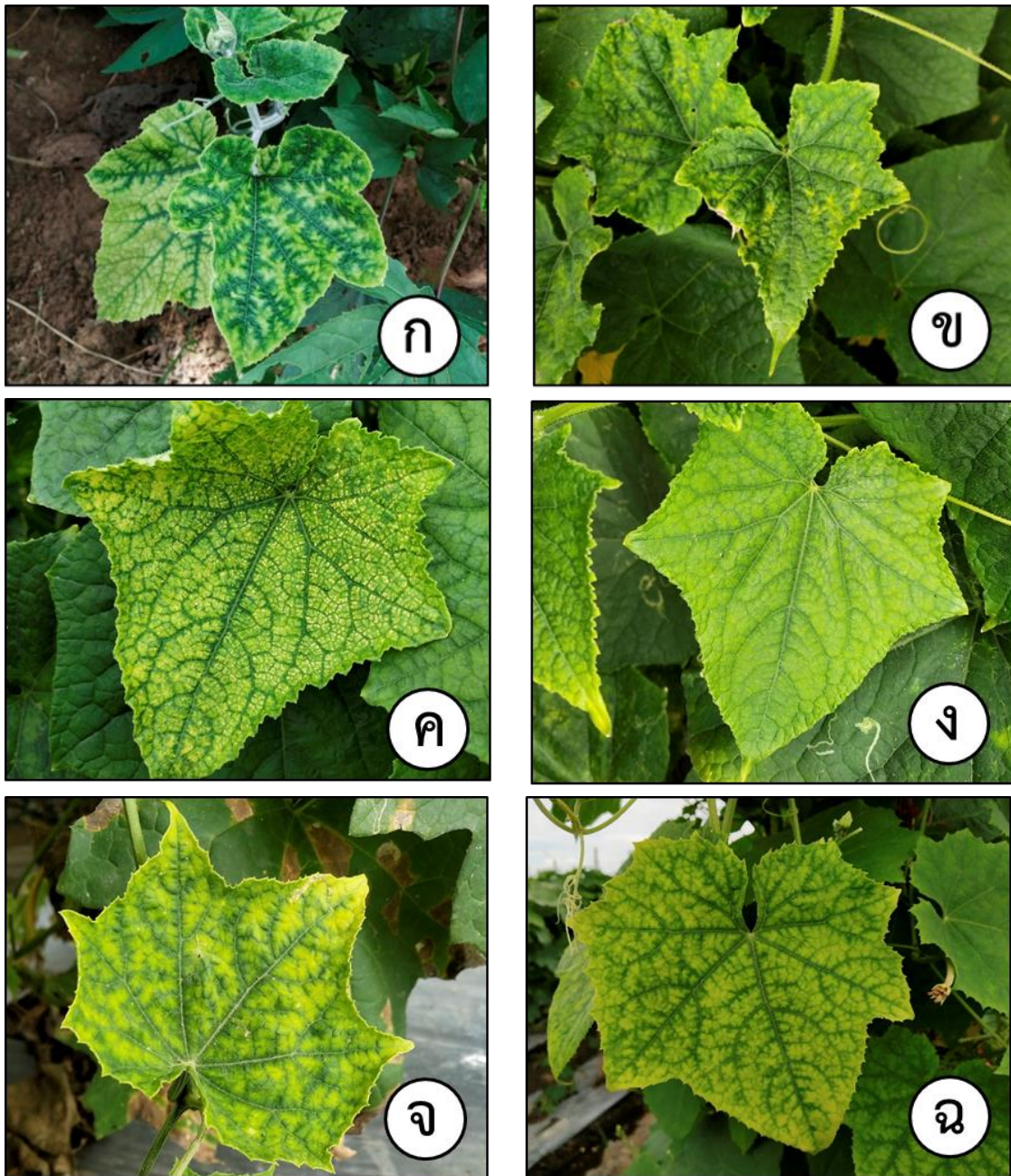
เอกสารอ้างอิง

- 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., 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.
- Kao, J., Jia, L., Tian, T., Rubio, L., Falk, B.W., 2000. First report of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (Genus *Crinivirus*) in North America. *Plant Dis.* 84(1), 101-101.

- Louro, D. , Vicente, M. , Vaira, A. M. , Accotto, G. P. , 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. , Aranda, M. A. , 2005. Genetic diversity of a natural population of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *J. Gen. Virol.* 86(Pt 3), 815-822.
- 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.
- Orfanidou, C. , Maliogka, V. I. , 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. , 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.



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา (1ก-ค) มะระ (1ง-จ) และบวบ (1ฉ) ที่แสดงอาการเนื้อใบเหลือง และใบจุดเหลือง



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของพืชตระกูลแตง ได้แก่ ฟักทอง (ก) (ข-ง) และ บวบ (จ-ฉ) ที่แสดงอาการเนื้อใบเหลือง และใบจุดเหลือง *Crinivirus*

ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของกระดุมใบใหญ่ (*Borreria latifolia* (Aubl), Schum.)
Biology and Ecology of *Borreria latifolia* (Aubl.) Schum.

ธัญชนก จงรักไทย อัญศยา พรพมา เอกรัตน์ ธนุทอง
กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Surveying and collecting specimens of *Spermacoce alata* Aubl. by detection survey method in agricultural and environmental areas in the north region, central region, Eastern region, Western region, Northeastern region and Southern region. It was found in the rubber plantations. And palm oil Chanthaburi Province Pineapple farm in Prachuap Khiri Khan province and along the coconut plantation walkway In Nakhon Si Thammarat province. The germination was not found under laboratory conditions. But the percentage of germination in the net house 86 percent. *S. alata* had life cycle average 231 days. A life cycles could produce 2,850 seeds per plant. It was growth rate non-significant between the competition of single and multi-plant. A fruit had. 2 loops, each loop has 1 seed, yellow-brown, 2.0-3.4 mm in length, 0.6-1.6 mm in width. *S. alata* can re-planting from all parts, including the base, the middle and shoot of plant. The seeds could germinate at the soil surface. Now, the botanist has change scientific name from *Borreria latifolia* (Aubl), Schum. to *spermacoce alata* Aubl.

Keywords: Biology ecology *Borreria latifolia*



บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดกระดุมใบใหญ่ โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ พบกระดุมใบใหญ่ในพื้นที่ในสวนยางพารา และปาล์มน้ำมัน จังหวัดจันทบุรี ไร่สับปะรดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และบริเวณริมทางเดินสวนมะพร้าว ในจังหวัดนครศรีธรรมราช ไม่พบการงอกภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ แต่มีเปอร์เซ็นต์ความงอกในสภาพเรือนทดลอง 86 เปอร์เซ็นต์ กระดุมใบใหญ่ มีวงจรชีวิต 231 วันโดยเฉลี่ย เนื่องจากมีการติดดอก และเมล็ดไม่พร้อมกัน โดย 1 ต้น ที่สมบูรณ์ สามารถผลิตเมล็ดได้ จำนวน 2,850 เมล็ด ทั้งนี้กระดุมใบใหญ่มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน ทั้งในสภาพการแข่งขัน และไม่มีการแข่งขัน กระดุมใบใหญ่ 1 ผลมี 2 ลูก แต่ละลูก มี 1 เมล็ดมีสีเหลือง-น้ำตาล มีขนาดยาว 2.0-3.4 มิลลิเมตร กว้าง 0.6-1.6 มิลลิเมตร โดยกระดุมใบใหญ่ สามารถขยายพันธุ์ได้จากทุกส่วนของต้น และเมล็ดงอกได้เพียงที่ระดับผิวดิน และจากการปรับเปลี่ยนข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ ปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงชื่อวิทยาศาสตร์จากเดิม *Borreria latifolia* (Aubl), Schum. เป็น *Spermacoce alata* Aubl.

คำหลัก : ชีววิทยา นิเวศวิทยา กระดุมใบใหญ่

คำนำ

กระดุมใบใหญ่ (*Spermacoce alata* Aubl.) เป็นพืชฤดูเดียว ลำต้นตั้งตรงหรือทอดแผ่ไปตามพื้นดินชูยอดขึ้น ต้นเป็นสี่เหลี่ยม ตามเหลี่ยมแผ่เป็นปีก แตกแขนงน้อย มีขนเล็กน้อย สูงถึง 60 ซม. ใบเดี่ยวเรียงตรงข้าม รูปไข่กลับหรือรูปรี แผ่นใบมีขนประปรายทั้ง 2 ด้าน ผิวใบด้านบนระคายมือเล็กน้อย ผิวใบด้านล่างมีขนอ่อนนุ่มปกคลุม ก้านใบสั้น ดอก ออกเป็นกระจุกตามซอกใบ กลีบดอกมีสีขาวหรือสีชมพู ผลรูปทรงรีหรือค่อนข้างกลม เปลือกผลย่นและมีขน ผลแก่จะแตกตามยาว เมล็ดสีน้ำตาลรูปทรงรียาว (วิรัช และคณะ, 2547) ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด เนื่องจากเมล็ดค่อนข้างสมบูรณ์ แต่ขณะงอกจำเป็นต้องมีแสง เมื่องอกแล้วจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และสามารถขยายพันธุ์ได้อีกภายในระยะเวลา 2 เดือน การที่กระดุมใบใหญ่สามารถผลิตเมล็ดได้มาก จึงมีความสามารถในการแข่งขันกับพืช แย่งแย่งอาหารและน้ำ ทำให้น้ำหนักแห้ง และความสูงของยางพารา ในระยะเริ่มปลูกลดลง 12 และ 17% ตามลำดับ การเจริญเติบโตร่วมกันกับพืชอื่น ๆ กระดุมใบใหญ่ จะมีช่วงวิกฤตของการแข่งขันในยางพาราที่ระยะ 4-6 สัปดาห์หลังปลูก (Suryaningtyas and Terry, 1993) ในข้าวไร่ที่ระยะ 4-8 สัปดาห์หลังหยอดเมล็ด (Tjitrosoedirdjo, 1992)

กระดุมใบใหญ่เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนชื้น พื้นที่ที่มีฤดูแล้งสั้น มีทั้งแดดและร่มเงา ในพื้นที่ทำการเกษตร นอกพื้นที่ทำการเกษตร ริมถนน หรือริมแม่น้ำ สามารถเติบโตได้ในดินที่ขาดความอุดมสมบูรณ์ และโดยชอบดินทราย (Soerjani *et al.*, 1987) นอกจากนี้ยังพบได้ถึงระดับความสูง 1,600 เมตรในไทย (Harada *et al.*, 1987) กระดุมใบใหญ่เป็นวัชพืชที่พบในอ้อย ยางพารา ปาล์มน้ำมัน สวนผลไม้ ชา มันสำปะหลัง และพืชไร่หลายปี เช่น ข้าวโพดถั่วเหลือง และข้าว (Holm, 1982; Alcantara and Carvalho, 1983; Barnes and Chan, 1990; Tjitrosemito, 1990; Tjitrosoedirdjo, 1992; Tiw *et al.*, 1994; Kon *et al.*, 1995)

จากการสำรวจพบว่า กระดุมใบใหญ่ มีแนวโน้มในการแพร่กระจายได้ดีมาก ดังนั้นจึงเห็นควรที่จะทำการศึกษาค้นคว้าข้อมูลทางด้านชีววิทยา และนิเวศวิทยาเพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการหาแนวทางการ

ป้องกันกำจัดวัชพืชสกุลนี้ เนื่องจากพื้นฐานทางด้านชีววิทยาของวัชพืชช่วยให้สามารถวางแผนในการจัดการวัชพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพทำให้สามารถลดการใช้สารกำจัดวัชพืชที่เกินความจำเป็นที่อาจมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และระบบนิเวศเกษตร ความสัมพันธ์ระหว่างวัชพืช และสิ่งแวดล้อม ระบบการปลูกพืช และการจัดการพื้นที่เพาะปลูก หรือหากเกษตรกรไม่ต้องการใช้สารกำจัดวัชพืช ก็หันมาใช้แรงงานคน แต่ปัจจุบันอยู่ในภาวะขาดแคลนแรงงานภาคการเกษตร และราคาแพง เกษตรกรบางรายเลือกที่จะปล่อยให้วัชพืชตายเอง ซึ่งเป็นการปล่อยเมล็ดลงสู่ดิน และพร้อมที่จะระบาดในฤดูปลูกถัดไป หรือเมื่อดินมีความชื้นพอ ประกอบกับมีการใช้เครื่องจักรกลทางการเกษตรมากขึ้น ตั้งแต่ขั้นตอนเตรียมดิน จนถึงการเก็บเกี่ยว ซึ่งการเคลื่อนย้ายเครื่องจักรกลเหล่านี้มักไม่มีการคำนึงถึงเมล็ดวัชพืชที่ติดไปกับเครื่องจักรกล และนำไปแพร่พันธุ์ในพื้นที่อื่นต่อไป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยา เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสนับสนุนการแจ้งเตือนเกษตรกร และแนวทางการจัดการวัชพืชชนิดนี้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กล้องถ่ายภาพแบบดิจิทัล
2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
3. เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
4. จานแก้ว ปีกเกอร์ กระบอกตวง หลอดแก้วก้นตัด และเครื่องแก้วอื่นๆ ที่จำเป็น สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ
5. กระดาษกรอง ผงวุ้น ผงเซลลูโลส พลาสติกใสสำหรับปิดอาหาร
6. กรรไกร มีด เสียม หรือพั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
7. ดินและกระดาษ สำหรับปลูกพืชทดสอบในเรือนทดลอง
8. แฉกอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกใส่ตะเกียง และป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
9. กระดาษติดตัวอย่างพืช พร้อมแฟ้มปก
10. ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)
11. น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริกคลอไรด์ เอทิลอัลกอฮอล์
12. การบูร
13. เครื่องรับสัญญาณดาวเทียม เพื่อระบุพิกัด
14. อุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น เช่น ถังพลาสติกขนาดต่าง ๆ กระดาษขนาดต่าง ๆ พร้อมดินและป้ายปัก สำหรับปลูกพืชตัวอย่างเพื่อเก็บเมล็ด และศึกษารายละเอียดของพืชเพิ่มเติม
15. สมุดบันทึก

วิธีการ

1. ศึกษานิเวศวิทยา

1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดกระดุมใบใหญ่ ใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย แม่ฮ่องสอน ลำปาง และอุตรดิตถ์) ภาคกลาง (จังหวัดนครสวรรค์ นครปฐม ลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี และอยุธยา) ภาคตะวันออก (จังหวัดจันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และระยอง) ภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรี ตาก

และราชบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดนครราชสีมา นครพนม บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ และหนองคาย) และภาคใต้ (จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระนอง นครราชสีมา และสงขลา) บันทึกข้อมูลสถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ อำเภอ จังหวัด และพิกัดภูมิศาสตร์ สภาพนิเวศ ได้แก่ สภาพพื้นที่ที่ขึ้นเป็นพื้นที่แห้ง ชื้นและ น้ำท่วมขัง หรือร่มเงา พืชปลูก ได้แก่ ชนิดพืชปลูก อายุพืชปลูก หรือระยะการเจริญของพืชปลูก เช่น อยู่ในระยะต้นกล้า ออกดอก หรือให้ผลผลิต สภาพวัชพืช ได้แก่ การถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติ ระยะต้นกล้า ออกดอก สร้างเมล็ด หรือแห้งตาย

1.2 การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างกระดุมใบใหญ่มาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้ายระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์กรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

1.3 เมล็ด นำเมล็ดที่เก็บได้ไปทำความสะอาด ผึ่งในที่ร่มให้แห้ง แบ่งเป็นสองส่วน คือ ส่วนที่ 1 นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ ส่วนที่ 2 เก็บใส่กล่องพลาสติกพร้อมติดป้ายระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2. ศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่าง ๆ มารวมกัน เลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร ที่บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ปิดฝา จำนวน 10 ซ้ำนำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิห้อง บันทึกจำนวนเมล็ดงอกทุกวัน ในระยะเวลา 30 วัน หรือจนเมล็ดงอกหมด

3. การเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

- กรรมวิธีที่ 1. ต้นวัชพืชจำนวน 1 ต้นต่อกระบะ
- กรรมวิธีที่ 2. ต้นวัชพืชจำนวน 3 ต้นต่อกระบะ
- กรรมวิธีที่ 3. ต้นวัชพืชจำนวน 5 ต้นต่อกระบะ
- กรรมวิธีที่ 4. ต้นวัชพืชทั้งหมดที่งอก

วิธีการปฏิบัติการทดลอง หว่านเมล็ดวัชพืช จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออกให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง จำนวนตามกรรมวิธีต่าง ๆ ที่กำหนด กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ บันทึกการเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 3 เดือนหรือจนพืชตาย บันทึก ความสูงต้น จำนวนกิ่ง ทุกสัปดาห์ วันที่ออกดอก ระยะเวลาที่พัฒนาจากดอกเป็นผล ผลแก่ จำนวนผลต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อผล คำนวณการผลิตเมล็ดต่อต้น การผลิตเมล็ด/ตารางเมตร วงจรชีวิต

4. ความสามารถในการขยายพันธุ์ จากส่วนของต้น

หว่านเมล็ดวัชพืช จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังวัชพืชงอก 1 สัปดาห์ ถอนออกให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง เมื่อต้นมีอายุ 1 เดือน นำขึ้นส่วนเหนือดินของวัชพืชมาตัดแบ่งเป็นท่อนๆ ละ 5-10 เซนติเมตร แยกท่อนพันธุ์ออกตามระยะห่างจากโคน ได้แก่ ท่อนโคน กลางต้น และปลายยอด นำมาปักชำในกระถางขนาด 12 นิ้ว กระถางละ 10 ท่อน จำนวน 10 ซ้ำ บันทึกจำนวนกิ่งที่แตกยอดใหม่ จากกิ่งที่ปักชำ แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย

5. ศึกษาการงอกของเมล็ดที่ความลึกของระดับดินระดับต่าง ๆ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

- กรรมวิธีที่ 1 วางเมล็ดบนผิวดิน
- กรรมวิธีที่ 2 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 5 เซนติเมตร
- กรรมวิธีที่ 3 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 10 เซนติเมตร
- กรรมวิธีที่ 4 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 15 เซนติเมตร
- กรรมวิธีที่ 5 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 20 เซนติเมตร
- กรรมวิธีที่ 6 ที่ระดับความลึกจากผิวดิน 25 เซนติเมตร

บรรจุดินใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร สูง 45 เซนติเมตร ให้ผิวดินห่างจากขอบบนของกระถาง 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เซนติเมตร นำเมล็ดที่แก่และมีลักษณะสมบูรณ์จำนวน 100 เมล็ด โรยลงให้ทั่วกระถาง แล้วเติมดินจนถึงระดับห่างจากขอบบนของกระถาง 5 เซนติเมตร บันทึกจำนวนเมล็ดงอกในแต่ละกรรมวิธีทุกวัน นาน 60 วัน หรือจนกว่าเมล็ดจะงอกหมด **เวลาและสถานที่**

ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 – กันยายน 2562 ณ ภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ (จังหวัดเชียงราย แม่ฮ่องสอน ลำปาง และอุตรดิตถ์) ภาคกลาง (จังหวัดนครสวรรค์ นครปฐม ลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี และอยุธยา) ภาคตะวันออก (จังหวัดจันทบุรี ตราด ปราจีนบุรี และระยอง) ภาคตะวันตก (จังหวัดกาญจนบุรี ตาก และราชบุรี) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จังหวัดนครราชสีมา นครพนม บุรีรัมย์ ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ และหนองคาย) และภาคใต้ (จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระนอง นครราชสีมา และสงขลา) และศึกษาชีววิทยา ในห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการปรับเปลี่ยนข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ ปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงชื่อวิทยาศาสตร์จากเดิม *Borreria latifolia* (Aubl), Schum. เป็น (*Spermacoce alata* Aubl.)

1. ศึกษาชีววิทยา

1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดกระดุมใบใหญ่ โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำพูน ลำปาง และน่าน ภาคกลาง จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดพิจิตร ลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี และเพชรบูรณ์ ภาคตะวันออก จำนวน 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด ภาคตะวันตก 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 จังหวัด ได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิ บุรีรัมย์ และเลย ภาคใต้ จำนวน 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด ชุมพร นครศรีธรรมราช ภูเก็ต พังงา และระนอง) พบกระดุมใบใหญ่ในพื้นที่ในสวนยางพารา และปาล์มน้ำมัน จังหวัดจันทบุรี ไร่สับปะรดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และบริเวณริมทางเดินสวนมะพร้าว ในจังหวัดนครศรีธรรมราช (Table 1) (Figure 1)

1.2 การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างกระดุมใบใหญ่มาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้ายระบุ ชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์กรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร

1.3 เมล็ด สีเหลือง-น้ำตาล มีขนาดยาว 2.0-3.4 มิลลิเมตร กว้าง 0.6-1.6 มิลลิเมตร โดยตัวอย่างเมล็ด เก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

2) **ศึกษาการงอกในห้องปฏิบัติการ** พบว่า ในสภาพอุณหภูมิห้อง ไม่พบการงอก และได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาการงอกในสภาพเรือนทดลองเพิ่มเติม ในกระถาง พบเริ่มมีการงอกตั้งแต่วันที่ระยะ 7 วันหลังปลูก และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงถึง 86 เปอร์เซ็นต์

3) **การเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตเมล็ด** พบว่า จากการทดลองในทุกรวมวิธีมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยกระดุมใบใหญ่มีการเจริญแบบเลื้อยไปกับพื้น มีความกว้างทรงพุ่มเฉลี่ย 49.9 เซนติเมตร ความกว้างสูงสุด 66.2 เซนติเมตร ต่ำสุด 39.0 เซนติเมตร มีจำนวนแขนงที่แตกจากต้นหลักเฉลี่ย 27.4 แขนง โดยมีจำนวนสูงสุด 65.0 แขนงต่อต้น ต่ำสุด 10.0 แขนงต่อต้น มีจำนวนใบต่อต้นเฉลี่ย 326.0 ใบต่อต้น มีจำนวนสูงสุด 734.0 ใบต่อต้น ต่ำสุด 162.0 ต่อต้น มีน้ำหนักแห้งเฉลี่ย 17.1 กรัมต่อต้น โดยมีค่าสูงสุด 30.8 กรัมต่อต้น ต่ำสุด 8.2 กรัมต่อต้น กระดุมใบใหญ่ จะงอกหลังจากเพาะเมล็ด 7 วัน ออกดอกที่ระยะ 56-62 วันหลังงอก ดอกบานที่ 8-10 วันหลังออกดอก ติดผลที่ระยะ 7-12 วันหลังดอกบาน เมล็ดแก่ที่ระยะ 18-23 วันหลังติดผล และต้นเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่ระยะ 127 หลังติดผลชุดแรก โดยกระดุมใบใหญ่ มีการติดดอก และเมล็ดเกิดขึ้นไม่พร้อมกัน เป็นแบบทยอยไปเรื่อย ๆ ทั้งนี้ 1 ต้น ที่สมบูรณ์ 1 รอบวงจรชีวิต สามารถผลิตเมล็ดได้ จำนวน 2,850 เมล็ด ซึ่งในแต่ละกรรมวิธีมีความสูง ขนาดทรงพุ่ม และจำนวนกิ่งต่อต้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ กระดุมใบใหญ่ 1 ผลมี 2 ลูก แต่ละลูก มี 1

4) **ความสามารถในการขยายพันธุ์ จากส่วนของต้น** พบว่า กิ่งที่ปักชำ ท่อนโคน กลางต้น และปลายยอด ของต้น มีจำนวนกิ่งที่แตกยอดใหม่ 49, 68 และ 52 เปอร์เซ็นต์ (Table 3)

5) **ศึกษาการงอกของเมล็ดที่ความลึกของระดับดินระดับต่าง ๆ** พบว่า เมล็ดงอกเพียงที่ระยะ 5 เซนติเมตร จากผิวดิน โดยมีความงอก 53 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับอื่น ๆ ไม่มีการงอกของเมล็ด แต่เมื่อมีการพลิกดินกลับขึ้นมาพบว่า เมล็ดสามารถงอกได้อีก (Table 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดกระดุมใบใหญ่ โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำพูน ลำปาง และน่าน ภาคกลาง จำนวน 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดพิจิตร ลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี และเพชรบูรณ์ ภาคตะวันออก จำนวน 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด ภาคตะวันตก 4 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ตาก ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 จังหวัด ได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิ บุรีรัมย์ และเลย ภาคใต้ จำนวน 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด ชุมพร นครศรีธรรมราช ภูเก็ต พังงา และระนอง พบกระดุมใบใหญ่ในพื้นที่ในสวนยางพารา และปาล์มน้ำมัน จังหวัดจันทบุรี ไร่สับปะรดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และบริเวณริมทางเดินสวนมะพร้าว ในจังหวัดนครศรีธรรมราช ไม่พบการงอกภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ แต่มีเปอร์เซ็นต์ความงอกในสภาพเรือนทดลอง 86 เปอร์เซ็นต์ กระดุมใบใหญ่ จะงอกหลังจากเพาะเมล็ด 7 วัน ออกดอกที่ระยะ 56-62 วันหลังงอก ดอกบานที่ 8-10 วันหลังออกดอก ติดผลที่ระยะ 7-12 วันหลังดอกบาน เมล็ดแก่ที่ระยะ 18-23 วันหลังติดผล และต้นเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่ระยะ 127 หลังติดผลชุดแรก กระดุมใบใหญ่ มีการติดดอก และเมล็ดไม่พร้อมกัน โดย 1 ต้น ที่สมบูรณ์ 1 รอบวงจรชีวิต สามารถผลิตเมล็ดได้ จำนวน 2,850 เมล็ด ซึ่งในแต่ละ

กรรมวิธีมีความสูง ขนาดทรงพุ่ม และจำนวนกิ่งต่อต้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ กระจุมใบใหญ่ 1 ผลมี 2 ลูก แต่ละลูก มี 1 เมล็ด สีเหลือง-น้ำตาล มีขนาดยาว 2.0-3.4 มิลลิเมตร กว้าง 0.6-1.6 มิลลิเมตร โดยกระจุมใบใหญ่ สามารถขยายพันธุ์ได้ จากทุกส่วนของต้นทั้ง ท่อนโคน กลางต้น และปลายยอด และเมล็ดงอกได้เพียงที่ระดับ 5 เซนติเมตรจากผิวดิน และจากการปรับเปลี่ยนข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ ปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงชื่อวิทยาศาสตร์จากเดิม *Borreria latifolia* (Aubl), Schum. เป็น (*Spermacoce alata* Aubl.)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมา ของกลุ่มวิจัยวัชพืช ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- วิรัช จันทรศรีมี ช่อมุ่ เปรมัชเสีเยร ทวี แสงทอง จันทรเพ็ญ ประคองวงศ์ ไชยยศ สุพัฒน์กุล มาลี ณ นคร สุนันทา เพ็ญสุต ศรีสม สุวรรณวงศ์ ศิริพร ซึ่งสนธิพร. 2547. *วัชพืชสามัญภาคกลาง*. สมาคมวิชาการวัชพืชแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 135 น.
- Alcantara EN de, Carvalho DAde, 1983. Survey of weeds in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in the mining district of Diamantina (Alto Jequitinhonha), *Minas Gerais. Planta Daninha*, 6(2):138-143
- Barnes DE, Chan LG, 1990. *Common Weeds of Malaysia and their Control*. Kuala Lumpur, Malaysia: Ancom Berhad Persiaran Selangor. Chee, 1994 p.
- Harada J, Paisooksantivatana Y, Zunsontiporn, 1987. *Weeds in the Highlands of Northern Thailand*. National Weed Science Research Institute Project. Bangkok, Thailand: Department of Agriculture.
- Holm L, 1982. The biology and distribution of some weeds important to the tropics. In: Heong KL, Lee BS, Lim TM, Teoh CH, Ibrahim Y, ed. Proceedings of the International Conference on Plant Protection in the Tropics. *Malaysian Plant Protection Society Kuala Lumpur Malaysia*, 85-97.
- Suryaningtyas H, Terry PJ, 1993. Critical period of weed competition in rubber seedlings. Brighton crop protection conference, weeds. Proceedings of an international conference, Brighton, UK, 22-25 November 1993 Farnham, UK; *British Crop Protection Council (BCPC)*, Vol. 3:1177-1181
- Soerjani M, Kostermans AJGH, Tjitrosoepomo G, 1987. *Weeds of Indonesia*. Jakarta, Indonesia: Balai Pustaka, 716 pp.
- Tjitrosemito S, 1990. A study on weed control in soybean. *BIOTROPIA*, No. 4:49-56
- Tjitrosoedirdjo SS, 1992. *Borreria latifolia* (Aubl.) K. Sch. Weed Info Sheet No. 13. Bogor, Indonesia: The Southeast Asian Weed Information Centre (SEAWIC).

Tiw KP, Allard JL, Kon KF, 1994. Weed management in full and zero tillage: comparative efficiency and weed dynamics. In: Proceedings of the Fourth International Conference on Plant Protection in the Tropics. Kuala Lumpur, Malaysia: *Malaysian Plant Protection in the Tropics*, 228-230.

Table 1 Survey location of *Spermacoce alata* Aubl

Region	Province	Present	Absent	Location
North	Chiang Rai		✓	
	Chiang Mai		✓	
	Mae Hong Son		✓	
	Lamphun		✓	
	Lampang		✓	
	Nan		✓	
	Central	Phichit		✓
Lop Buri			✓	
Saraburi			✓	
Suphan Buri			✓	
Sing Buri			✓	
Phetchabun			✓	
East	Chon Buri		✓	
	Rayong		✓	
	Chanthaburi	✓		Oil palm and para rubber (N 12.631647, E 101.898024)
	Trad		✓	
Northeastern	Nakhon Ratchasima		✓	
	Khon Kaen		✓	
	Chaiyaphum		✓	
	Buri Ram		✓	
	Loei		✓	
Western	Kanchanaburi		✓	
	Tak		✓	
	Ratchaburi		✓	
	Prachuap Khiri Khan	✓		Pineapple crop (N 12.269229, E 99.834116)

Table 1 Survey location of *Spermacoce alata* Aubl (continue)

Region	Province	Present	Absent	Location
Southern	Chumphon		✓	
	Nakhon Sri Thammarat Phuket	✓	✓	Coconut crop
	Phang Nga		✓	
	Ranong		✓	

Table 2 The ability to propagate from part of *Spermacoce alata* Aubl

Treatments	Number of brunching (brunch/plant)
Base part	49.00 a
Central part	68.00 a
Shoot part	52.00 a
C.V. (%)	14.5

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

Table 3 Seed germination at various soil depths

Treatments	Germination (%)
Place seeds on the soil surface	53.00 a ^{1/}
Place seeds at 5 Cm. soil depths	0.00 b
Place seeds at 10 Cm. soil depths	0.00 b
Place seeds at 15 Cm. soil depths	0.00 b
Place seeds at 20 Cm. soil depths	0.00 b
Place seeds at 25 Cm. soil depths	0.00 b
C.V. (%)	76.08

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by LSD

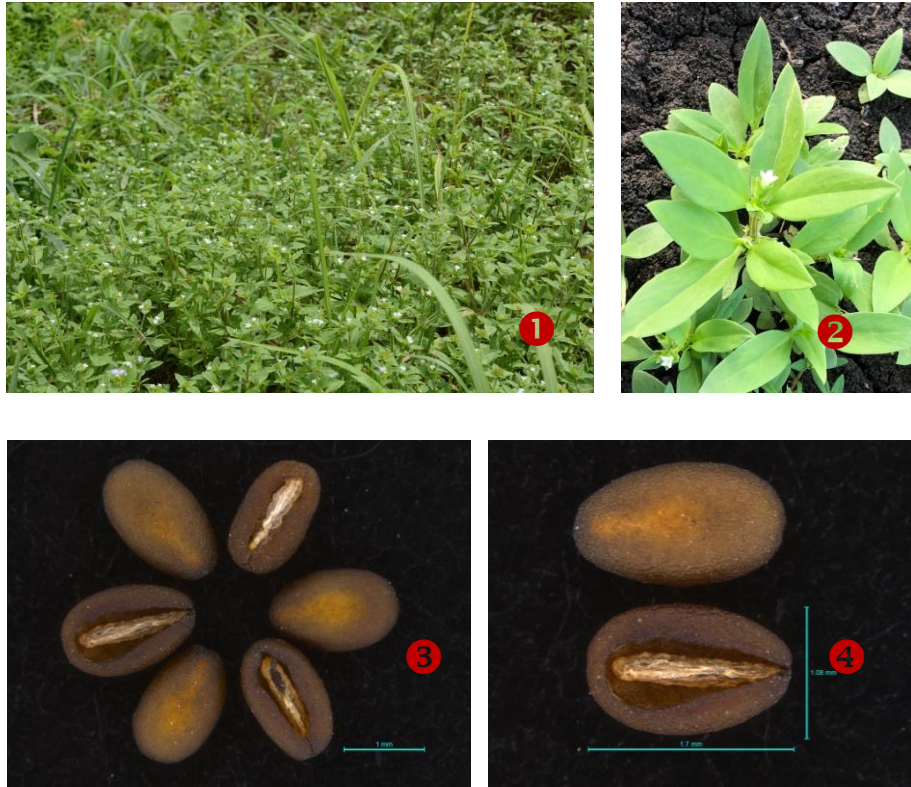


Figure 1 *Spermacoce alata* Aubl (1) Flowers (2) Seed (3, 4)

การสำรวจโรคและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช
Disease Survey and DNA Barcoding of Plant Pathogenic
Cercosporoid fungi

ชนินทร์ ดวงสะอาด^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} สุณิรัตน์ สิมะเต็อ^{1/}
อมรรักษ์ คัดใจเดียว^{1/} มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{3/}
^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/} กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

Abstract

Plant disease samples caused by cercosporoid fungi had been collected during October 2016 – September 2019. Plant disease samples were collected from plantation located in Krabi, Phangnga, Nakhon Si Thammarat, Surat Thani, Yasothon, Chaiyaphum, Chiangrai, Chiangmai, Lampang, Bangkok, Phetchabun, Ratchaburi and Phetchaburi provinces. Sixty-nine specimens had been observed and identified using morphological and molecular data of Internal Transcribed Spacer (ITS) and translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) gene regions. It was found that the causal agent could be identified as *Corynespora cassiicola*, *Passalora arachidicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. abelmoschi* *Pseu. cruenta* and *Cercospora zinnia*, which isolated from *Carica papaya*, *Arachis hypogaea*, *Orchid* sp., *Abelmoschus* sp., *Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *Unguiculata* and *Zinnia* sp., respectively.

Keywords: leaf spot Cercosporoid DNA barcoding

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-03-60

บทคัดย่อ

เพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการใบจุดที่เกิดจากรา cercosporoid ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 จากจังหวัดกระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยะโสธร ชัยภูมิ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง กรุงเทพฯ เพชรบูรณ์ ราชบุรี และเพชรบุรี จำนวน 69 ตัวอย่าง ศึกษาและจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) และ translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) ของรา cercosporoid จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบจุดมะละกอ ใบจุดถั่วลิสง ปั้นเหลืองกล้วยไม้ ใบจุดกระเจี๊ยบเขียว ใบจุดถั่วฝักยาว และใบจุดบานไม่รู้โรย พบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Corynespora cassiicola*, *Passalora arachidicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. abelmoschi* *Pseu. cruenta* และ *Cercospora zinnia* ตามลำดับ

คำหลัก: ใบจุด cercosporoid ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

คำนำ

Cercosporoid เป็นกลุ่มของราที่จัดอยู่ใน order Capnodiales family Mycosphaerellaceae ราในกลุ่ม cercosporoid เป็นสาเหตุของโรคพืชและทำความเสียหายให้แก่พืชหลายชนิด ทั้งในกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ รวมถึงพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Pollack, 1987) ราในกลุ่มนี้ประกอบด้วยกว่า 40 genera (Groenewald, 2013) โดยราส่วนใหญ่อยู่ใน genus *Pseudocercospora* *Cercospora* *Passalora* ราในกลุ่ม cercosporoid ส่วนใหญ่ลักษณะการเข้าทำลายที่พบได้โดยทั่วไปคือจะพบอาการใบจุด (leaf spot) และสามารถพบว่าทำให้เกิดแผล (necrotic lesion) บนดอกไม้ ผล และส่วนอื่นๆของพืช (Agrios, 2005) รวมถึงก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชหลังการเก็บเกี่ยว เช่น ผลเน่า (Silva and Pereira, 2008)

รา cercosporoid เป็นราในกลุ่มใหญ่ในกลุ่ม Hyphomycetes (Crous and Braun, 2003) มีการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีที่มีการปฏิบัติกันมา โดยแต่เดิมนำกลุ่ม cercosporoid ประกอบไปด้วยสองระยะของวงจรชีวิต คือระยะ teleomorph และ anamorph ซึ่งระยะ teleomorph ของรา cercosporoid มักอยู่ใน genus *Mycosphaerella* Johanson และราชนิดนี้ยังเป็นระยะ teleomorph ของราอื่นๆอีกหลายสกุลของ Coelmycetes และ Hyphomycetes (Crous et al., 2007) ความซ้ำซ้อนและซับซ้อนของทั้งสองระยะการเจริญนี้ทำให้เกิดความยุ่งยากและสับสนในการจัดจำแนกชนิดของราในกลุ่ม cercosporoid ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยบ่งชี้ หรือแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์และวิวัฒนาการ (phylogeny) ของราในหลายสกุลหรือสปีชีส์ ที่มีความใกล้เคียงกัน บนพืชอาศัยต่างๆกัน หรือพืชอาศัยที่มีความใกล้เคียงกัน โดยนำข้อมูลจากหลายๆด้านเช่น ข้อมูลชีวโมเลกุลจากหลายตำแหน่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย ลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่เก็บตัวอย่าง มาวิเคราะห์รวมกันอย่างเป็นระบบ (systematics study) ทำให้พบว่า ราที่จัดว่าเป็น *Mycosphaerella* ที่แท้จริงนั้น มีเพียงเชื้อรา *Ramularia* (Braun, 1998) เพียงชนิดเดียว อีกทั้งการศึกษาที่ใช้ลักษณะของข้อมูลทางพันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง แสดงให้เห็นว่ารา cercosporoid อื่นๆ ก็มีความจำเพาะในระดับ genus นั้นๆ โดยไม่มีความเกี่ยวข้องใดๆกับ genus อื่นๆ ในแง่ของลักษณะการสืบพันธุ์ของวงจรชีวิต ดังนั้นในการจำแนกชนิดของรา โดยราแต่ละชนิดจะมีเพียง 1 ชื่อ ทั้งสองระยะของการสืบพันธุ์ โดยลักษณะของ

teleomorph และ anamorph จะเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อการจำแนกชนิดของราชนิดนั้นๆ ตามข้อกำหนดของการกำหนดชื่อตามหลักสากล (Article 59 of the International Code for Nomenclature of algae, fungi and plants (ICN) (Hawksworth, 2011; Norvell, 2011)

การจำแนกชนิดของรา cercosporoid โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกได้จากลักษณะของ conidia เช่น การจำแนกชนิดของรา *Cercospora* โดยหนึ่งในลักษณะที่ใช้บ่งชี้คือความหนา (thickening) ของ conidial scars (Deighton, 1987) ซึ่งลักษณะความหนาของส่วนนี้มีความคล้ายคลึงกับราหลายชนิดที่มีลักษณะที่มีความใกล้เคียงกับรา *Cercospora* เช่น *Camptomeris Cercosporella Cercosporidium Fusicladium Mycovelloisella Passalora Phaeoisariopsis Phaeoramularia Sirosporium Cercoseptoria Mycocentrospora Pseudocercospora* และ *Stigmia* (Deighton, 1967, 1974, 1976, 1979) นอกจากลักษณะของ conidia แล้ว ยังมีลักษณะอื่นที่ใช้ในการจำแนกรรา *Cercospora* ออกจากรากลุ่มอื่นที่มีความใกล้เคียงกัน เช่น Braun (1995) จำแนกรรา *Cercospora* ออกจากเชื้อรา *Passalora* และ *Phaeoisariopsis* โดยอาศัยลักษณะของ stroma

ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันทำให้การจำแนกชนิดค่อนข้าง มีความสับสน ทำให้พบว่ามีมีการจัดกลุ่มของรา *Cercospora* ขึ้นมาใหม่ หลังจากการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ซับซ้อนมากขึ้น เช่น Crous และ Braun (2003) จัดกลุ่มของรา cercosporoid ใหม่ หลังจากที่ได้ศึกษาตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน สกุล *Cercospora* และ *Passalora* กว่า 3,500 ตัวอย่าง โดยอาศัยลักษณะของ conidial scar hila และลักษณะความเข้มของ conidia และ conidiophore มีราหลายชนิดที่ถูกจำแนกให้เป็น *Pseudocercospora* แม้จะมีลักษณะของ scar ที่หนา ทั้งนี้เพราะลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ค่อนข้างที่จะเข้า ลักษณะของรา *Pseudocercospora* มากกว่าที่จะเป็นรา *Cercospora* เช่น *P. mississippiensis P. madhaultiensis* (Ruiz and Braun, 1989) และยังพบอีกว่าลักษณะ scar ของ *Pseudocercospora* มีความคล้ายคลึง (synapomorphy) กับรา *Parapithomyces clitoriae* (Alcorn, 1992) นอกจากนี้ยังพบการวินิจฉัยรา *Cercospora* ในบางสปีชีส์ ถูกจัดเป็นกลุ่มสปีชีส์ เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนก ทำให้ราในกลุ่มนี้จัดเป็น complex species เช่นกัน เช่น *Cercospora apii* ประกอบไปด้วยมากกว่า 280 ไอโซเลท ที่จำแนกเป็น *C. apii* โดยทุกไอโซเลทมีความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ลักษณะความแตกต่างดังกล่าวไม่เพียงพอในการจำแนกรราไอโซเลทนั้นๆ ออกจาก *C. apii* (Ellis, 1971; Crous and Braun, 2003; Nicoli *et al.*, 2011)

ในประเทศไทยมีการศึกษาโรคพืชที่เกิดจากราในกลุ่ม cercosporoid แล้วในระดับหนึ่ง แต่ในการจำแนกราชนิดนี้ส่วนใหญ่ยังคงใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น สนธิรัตน์ และคณะ (2523) รายงานพบรา *Cercospora* จำนวน 21 สปีชีส์ นอกจากนี้ ในดรชรณีโรคพืชของประเทศไทย รายงานพบเชื้อรา *Cercospora* จำนวน 47 สปีชีส์ และไม่สามารถวินิจฉัยในระดับสปีชีส์ได้อีก 13 ชนิด และอีก 49 สปีชีส์ รายงานโดย Petcharat และ Kanjanamaneesathian (1989) Phengsintham *et al.* (2012) รายงานพบการเข้าทำลายของรา cercosporoid ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ *Cercospora Passalora Pseudocercospora* และ *Zasmidium* โดยเป็นการพบเป็นครั้งแรกจำนวน 2 ชนิดในประเทศไทยคือ *Cercospora verniciferae* และ *Zasmidium cassicola*

ปัจจุบันได้มีการนำข้อมูลของรหัสพันธุกรรมหรือ DNA มาใช้ประกอบการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ โดยมีการถอดรหัสพันธุกรรมจากแต่ละตำแหน่งบน DNA ซึ่งจะมีความจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยแต่ละตำแหน่งก็จะมีค่าความแปรผันในระดับที่แตกต่างกัน โดยรหัสพันธุกรรมที่ถอดรหัสได้จากแต่ละตำแหน่งสามารถ

ใช้เป็นข้อมูลเพื่อการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) (Crütlein *et al.*, 2011) โดยการนำไปเปรียบเทียบกับรหัสพัทธ์กรรมอ้างอิง (reference libraries) ที่ทราบชนิดแล้ว ตำแหน่งของรหัสพันธุกรรม (locus) ของราที่นิยมนำมาถอดรหัส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจำแนก ศึกษาวิวัฒนาการ และประชากรของสิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายตำแหน่ง หรือแม้กระทั่งมีการถอดรหัสทั้งจีโนมซึ่งจะบรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Next Generation Sequencing) เช่น Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ (Seifert, 2009) ซึ่งตำแหน่งนี้สามารถบอกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ (White *et al.*, 1990) เนื่องจากการถอดรหัสข้อมูลจากตำแหน่ง ITS บางครั้งไม่เพียงพอในการจัดจำแนก จึงต้องอาศัยข้อมูลของดีเอ็นเอจากยีนตำแหน่งอื่นมากกว่าหนึ่งตำแหน่งร่วมในการวิเคราะห์ (Liu *et al.*, 2012) เพื่อจำแนกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ เช่น Small Subunit (SSU) Large Subunit (LSU) Intergenic Spacer (IGS) Mitochondria cytochrome oxidase subunit 3 (CO3) และอื่นๆ (Aime, 2006; Beenken *et al.*, 2012; Bennett *et al.*, 2011; Dixon *et al.*, 2010; Minnis *et al.*, 2012; Goodwin *et al.* 2001; Yun *et al.*, 2011)

ในประเทศไทย ถึงแม้พบว่ามียางรายงานได้มีการนำข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลมาประกอบการศึกษาของรากลุ่ม cercosporoid เช่น การศึกษาโดย To-Anun *et al.* (2011) Nakashia *et al.* (2007) และ Phensintham *et al.* (2013) แต่ข้อมูลที่มีก็ยังไม่มีความหลากหลาย อีกทั้งรากลุ่ม cercosporoid สามารถเข้าทำลายพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะสินค้าทางเกษตรเกษตรที่มีการส่งออก เช่น พืชผัก ไม้ดอก ดังนั้นหากข้อมูลของบัญชีรายชื่อศัตรูพืชมีความครอบคลุม และมีรายละเอียดข้อมูลในเชิงลึกมาสนับสนุน จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

เนื่องจากปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทในงานด้านอนุกรมวิธานมากขึ้น โดยมีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยเปรียบเทียบในบ่งการชี้หรือจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ (genealogical concordance) ควบคู่กับการวินิจฉัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่ได้ นั้น สามารถใช้เป็นข้อมูลเฉพาะเพื่อการวินิจฉัยรายชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) ทำให้ทำให้สามารถชี้ชัดในการจำแนก ในกรณีที่การวินิจฉัยเชื้อสาเหตุไม่สามารถชี้ชัดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของรา cercosporoid สาเหตุโรคพืชในระดับสปีชีส์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลด้านชีวโมเลกุล และได้ DNA barcode ของรา cercosporoid เพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชเพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

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 ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง 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) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) และ the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) EF1-728F/EF1-986R (Carbone and Kohn, 1999) และ EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999)/EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998)
 - อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และ rose bengal agar (RBA)
6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012)

วิธีการ

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ จ.เชียงใหม่ จ.เชียงราย จ.พะเยา จ.ลำพูน จ.อุตรดิตถ์ ภาคกลาง จ.สุโขทัย จ.พิษณุโลก จ.สุพรรณบุรี จ.นครสวรรค์ จ.นครปฐม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จ.นครราชสีมา จ.ขอนแก่น จ.สุรินทร์ จ.ศรีสะเกษ จ.อุดรธานี ภาคตะวันตก จ.ตาก จ.กาญจนบุรี จ.เพชรบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ จ.ราชบุรี ภาคใต้ จ.ชุมพร จ.สุราษฎร์ธานี จ.ตรัง จ.กระบี่ โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุม เนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียดของการเก็บตัวอย่าง วันที่ พิกัด สถานที่ ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอสังคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของรากกลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา

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

3. แยกราโดยวิธี Tissue transplanting และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

- แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมารดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 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 จากนั้นนำมาวางบนอาหาร PDA ที่หยดน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ เอียงจานเลี้ยงเชื้อโดยวนเป็นลักษณะวงกลมนานประมาณ 1-3 นาที จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ ลงบน PDA จานใหม่ หากผิวหน้าอาหาร PDA เริ่มแห้ง ให้เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อประมาณอีกประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำซ้ำแบบเดิมอีกจนได้จานเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 3 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน หากพบราเจริญขึ้นก่อนเวลา 10 วัน ให้ทำการคัดทิ้ง เนื่องจากราในกลุ่ม cercosporoid เจริญช้า ซึ่งจะใช้ระยะเวลานานกว่า 10 วัน จึงจะพบ colony

ศึกษาลักษณะของรา

นำราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) ศึกษา และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆของราที่วัดขนาดไว้

จำแนกชนิดรา cercosporoid สาเหตุโรคพืช

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

4. จำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรมสกัดดีเอ็นเอ

ตัด และย้ายเส้นใยของรา cercosporoid ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) และ the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) EF1-728F/EF1-986R (Carbone and Kohn, 1999) และ EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999)/EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998) ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เตรียม gel 1% และผสม SERVA HiSens Stain G ในอัตราส่วน 1:50,000 ผสม pcr product 5 ไมโครลิตร ด้วย loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ pcr product ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (<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) แต่ละตำแหน่งมาจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) ตรวจสอบการจัดเรียงของชุดข้อมูล (alignment) ด้วยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) ใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) เพื่อกรองส่วนที่เป็น ambiguous sequence

ทำ dataset ของแต่ละตำแหน่ง และ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง TEF1 และ ITS บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ .nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดของรา cercosporoid โดยวิเคราะห์จากตำแหน่ง ITS และ TEF1 วิเคราะห์ combined dataset ของ TEF1 และ ITS (1,239 bases/taxa; TEF1 = 679, ITS = 560) ด้วย phylogenetic criteria คือ 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

- การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการศึกษา เชื้อราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ consensus sequences) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูล ประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงปลูกพืชในประเทศไทย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุด (Figure 1) จากจังหวัด กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร ชัยภูมิ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง กรุงเทพฯ เพชรบูรณ์ ราชบุรี และเพชรบุรี จำนวน 69 ตัวอย่าง (Table 1) นำตัวอย่างมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สกัดและเพิ่ม ปริมาณของ DNA ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) และ translation elongation factor (EF1- α) ของรา cercosporoid จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบจุดมะละกอ ใบจุดถั่วลิสง ปั้นเหลืองกล้วยไม้ ใบจุดกระเจี๊ยบเขียว และใบจุดบานไม่รู้โรย ทำการวิเคราะห์ ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence และวิเคราะห์ชนิดพบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Corynespora cassiicola*, *Passalora arachidicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. abelmoschi* และ *Cercospora zinnia* ตามลำดับ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ใบจุดมะละกอ

เชื้อราสาเหตุ

Corynespora cassiicola (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, Mycological Papers 34: 5 (1950)

Synonymy:

= *Helminthosporium cassiicola* Berk. & M.A. Curtis (1868)

= *Helminthosporium cassiicola* Berk. & M.A. Curtis, Journal of the Linnean Society. Botany 10: 361 (1869)

= *Cercospora melonis* Cooke, Gardeners' Chronicle: 271 (1896)

= *Corynespora mazei* Güssow, Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 16: 13 (1906)

= *Helminthosporium warpuriae* Wakef., Bulletin of Miscellaneous Informations of the Royal Botanical Gardens Kew 1918: 233 (1918)

= *Helminthosporium papayae* Syd., Annales Mycologici 21 (1-2): 105 (1923)

= *Cercospora vignicola* E. Kawam., Kin-rui (Fungi) 1 (2): 20 (1931)

= *Helminthosporium vignae* L.S. Olive, Phytoprotection 35: 830 (1945)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Subclass	Pleosporomycetidae
Order	Pleosporales
Family	Corynesporascaceae
Genus	<i>Corynespora</i>
Species	<i>cassiicola</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบมะละกอ (*Carica papaya*)

ลักษณะอาการของโรค พบอาการบนใบโดยพบลักษณะแผลจุดน้ำตาลอ่อนตรงกลางสีเขียว และมีสีเหลืองล้อมรอบ ขนาดแผลมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แผลมีทั้งลักษณะเป็นวงกลมหรือแบบเหลี่ยม (Figure 2) มักพบการแสดงอาการในใบล่างๆหรือใบแก่ หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราเจริญได้ดีบนอาหาร PDA เส้นใยสีเขียวเข้ม ก้านสปอร์เป็นกลุ่มสีน้ำตาลอ่อน มีผนังกันไม่แตกกัน ขนาดประมาณ 100-800 x 4-11 μm พบทั้งลักษณะตรงและโค้ง มีลักษณะโป่งพองตรงผนังกัน สปอร์หรือโคนิเดียยาวต่อกันเป็นเส้น ลักษณะเป็นแท่งยาวหรือคล้ายกระบอก มีสีจางแต่จะมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นเมื่อสปอร์เริ่มแก่ ผนังเซลล์ตรงฐานหนา ผนังเรียบ สปอร์มีผนังกันพบได้ระหว่าง 4-20 ช่อง ขนาดประมาณ 40-500 x 9-22 μm

พืชอาศัย ราชนิดนี้มีพืชอาศัยที่กว้างทั้ง พืชไร่ พืชสวน ไม้ดอกไม้ประดับ รวมถึงวัชพืช เช่น ยางพารา มันสำปะหลัง มะเขือ มะละกอ พริก ถั่วเหลือง แตงกวา อย่างไรก็ตาม Dixon *et al.* (2009) รายงานว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบเชื้อรา *C. cassiicola* ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อราดังกล่าวมีความหลากหลายทางชีวภาพและเป็น complex species และพบว่าเชื้อรา *C. cassiicola* มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย เช่น *C. cassiicola* ที่แยกได้จากมะละกอ

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

GTAGGGGCTCGCCCCCTCGAGATAGCACCTTTGTTATGAGCACCTCTCGTTTCCTCGGCAGGCTCGCCTG
 CCAACGGGGACCCACCACAAACCCATTGTAGTACAAGAAGTACACGTCTGAACAAAACAAAACAACTATTTAC
 AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTG
 CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCTTAGGGCATGCCTGTTTCGA
 GCGTCATTTCAACCTCAAGCCTAGCTTGGTGTGGGCGTCTGTCCCGCCTCCGCGCCTGGACTCGCCTCA
 AAAGCATTGGCGCCGGTTCCAGCAGGCCACGAGCGCAGCAGAGCAAGCGCTGAAGTGGCTGCGGGTCGGC
 GCACCATGAGCCCCCACACCGAATTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAG

Translation Elongation Factor 1 (EF1- α)

CACCAACAGCGACGGTTTGACGCATGTCACGGACAGCGAAACGACCGAGAGGAGGGTAGTCAGTGAAAGCCTC
AACGCACATGGGCTTGGAGGGAACCATCTTGACGATGGCGGCGTCACCGACTTGATGAACTTGGGAGAGTTC
TCAACAGACTTTCCGGTACGGCGGTCAATCTTCTCGAGGAGCTCAGAGAAGCTTGCAAGCAATGTGGGCGGTGT
GGCAGTTCGAGGACTGGGGCGTAACCAGCACCGACCTGACCAGGGTGGTTGAGGACGATGACCTGGGCGTTGAA
GGACTCGGCACCCCTTGGGGGGTTCGTTCTTGAGTACCGGCAACGTTACCACGACGGATCTCCTTGACGGAG
ACGTTCTTGACGTTGAAGCCGACGTTGTACCGGGGACACCCTCGGTGAGCTGCTCGTGGTGCATCTCGACGG
ACTTGACTTCAGTGGTGACACAGCGGGGGCGAAAGTGACGACCATAACCGCCTTGATGATACCGGTCTCGACA
CGACCGACGGGCACCGTGCCAATACCACCAATCTTGTAACATCCTGGAAGGGGAAAACGGAAGGGCTTGTCC
GTGGGACGGCTGGGAGGGTCGATGGCGTCGATGGCCTCGAGGAGGGTCTTACCAGTGGCCTTGGCCTTGGTCT
CCTTCTCCCAACCTTGTACCAGGGGCGAGTTGGATGAGGCCTCAATCATGTTGTACCGTTGAAACCGGAGATG
GGGACGAAGGGAACGTGCTTGGGGTTGTAGCCGACCTTCTTGATGAAGTTGGAGGTCTCCTTGATGATCTCCT
GGTAACGCTCCTCGGACCACTTGGTGGTGTCCATTTTGTGATGGCAACGATGAGCTGCTTGACACCGAGGGT
GTAAGCGAGGAGAGCGTGCTCACGAGTCTGGCCATCCTTGAGATAACCAGCCTCGAACTCACCAGTACCGGGC
GCAATGATGAGAATAGCGCAGTCGGCCTGGGAGGTACCAGTGATCATGTTCTTGATAAAATCACCATGACCAG

ใบจุดถั่วลิสง

เชื้อราสาเหตุ

Passalora arachidicola (Hori) U. Braun, New Zealand Journal of Botany 37 (2): 303 (1999)

Synonymy:

- =*Cercospora arachidicola* Hori, Rep. (Annual) Nishigahara Agric. Exp. Sta. Tokyo: 26 (1917)
- =*Cercospora arachidis* var. *macrospora* Maffei, Riv. Patol. Veg.: 7 (1922)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Subclass	Dothideomycetidae
Order	Capnodiales
Family	Mycosphaerellaceae
Genus	<i>Passalora</i>
Species	<i>arachidicola</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วลิสง

ลักษณะอาการของโรค พบอาการบนใบโดยพบลักษณะแผลจุดกลมสีน้ำตาลเข้มและมีสีเหลืองล้อมรอบ ขนาดแผลมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-10 มิลลิเมตร (Figure 3) การเข้าทำลายของเชื้อราชนิดนี้มักพบในระยะแรกของการปลูกหรือต้นอ่อน จึงเรียกโรคใบจุดที่พบในระยะนี้ว่า early leaf spot หากในระยะต้นแก่อาจพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cercosporidium personatum* (late leaf spot)

ลักษณะของเชื้อ ก้านชูสปอร์เป็นกลุ่มสีน้ำตาลอ่อน มีผนังกัน 0-2 septate ไม่แตกก้าน มักจะพบลักษณะคล้ายข้อต่อ (Figure 3) ขนาดประมาณ 3-5 x 15-45 μm สปอร์หรือโคนเดี่ยวสีน้ำตาลอ่อนหรือสีจาง ลักษณะคล้ายกระบอง เป็นเส้นยาว บางครั้งพบลักษณะโค้ง สปอร์มีผนังกันพบได้ระหว่าง 3-12 septate ขนาดประมาณ 3-5 x 35-110 μm ฐานของสปอร์ลักษณะกว้างกว่าส่วนปลาย ยอดมีลักษณะมนเล็กน้อย

พืชอาศัย ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.)

Consensus sequence

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

GTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCGCGAGCCCGACCTCCAACCCTTTGTGCACCAACT
CTGTTGCTTCGGGGGCGACCCCGCGTCTGGGCGACGGCGCCCCGGAGGTCGTCAAAACACTGCATCTCTGC
GTCGGAGTCGTCAAGTAAATTGAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCG
TGGTATTCCGCGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTACCACTCAAGCCTAGCTTGGTATTGGGCGTGCGGTT
CCGCGCGCCTTAAAGTCTCCGGCTGAGCAGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGCACATATTTGCTGCAGAGTCCG
GGCGGCTTTCGGCCGTTAAATCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG

ใบปิ่นเหือง

เชื้อราสาเหตุ

Pseudocercospora dendrobii (H.C. Burnett) U. Braun & Crous, *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*: 156 (2003)

Synonymy:

- *Cercospora dendrobii* H.C. Burnett, Proc. Florida State Hort. Soc.: 465-466 (1965)
- = *Pseudocercospora dendrobii* Goh & W.H. Hsieh, *Cercospora* and similar fungi from Taiwan: 255 (1990)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Subclass	Dothideomycetidae
Order	Capnodiales
Family	Mycosphaerellaceae
Genus	<i>Pseudocercospora</i>
Species	<i>dendrobii</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบกล้วยไม้

ลักษณะอาการของโรค พบอาการบนใบโดยพบลักษณะเป็นปื้น ไม่มีขอบแผลชัดเจน อาการเริ่มแรกพบลักษณะสีเหลืองซีดบนผิวใบหรือหน้าใบ ขนาดแผลประมาณ 3-10 mm เมื่อแผลขยายหรือเริ่มแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือเทาดำ (Figure 4) หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน

ลักษณะของเชื้อ พบการสร้าง fruiting body สีเขียวมะกอกบนกระจายผิวใบ อาจพบการเกาะกลุ่มเป็นจุดเล็ก ๆ สีเข้ม ไม่พบการสร้าง secondary mycelium stromata มีขนาดเล็กขนาดความกว้างประมาณ 90 µm ลักษณะกลม สีเขียวมะกอกบนน้ำตาล conidiophores พบเป็นช่อหลวม (loosely fasciculate) หรืออัดกันแน่น (densely fasciculate) โผล่ออกมาจาก stromata และแตกกิ่งก้านอย่างชัดเจน conidiophores มีสีเขียวมะกอก หรือ สีเขียวมะกอกบนน้ำตาล สีอ่อนตรงปลาย ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีผนังที่ชัดเจน 1-5 septate ขนาด 40-80 x 3-4.5 µm conidial scars ลักษณะบาง conidia มีลักษณะ acicular หรือ aciculo-obclavate สีเขียวมะกอกอ่อน หรือเข้มเล็กน้อย ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย conidia มี 5-9 septate ลักษณะกลมมนตรงปลาย และส่วนฐานค่อนข้างป้าน ขนาด 40-80 x 3-3.5 µm hilum ไม่หนาและไม่ติดกัน (inconspicuous)

พืชอาศัย กล้วยไม้ (*Orchid* sp.)

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

```
AACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCTCACGCCGACCTCCAACCCCTTTGTGAACACATCTTGTTGCT
TCGGGGGCGACCCTGCCGGCACTACTTAGCCGGGCGCCCCGAAGGTCTCCAACACTGCATCTTTGCGTCGG
AGTTTCAACAAATTAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTC
CGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGCTCCGCGC
GCCTTAAAGTCTCCGGCTGAGCCATTCGCTCTAAGCGTTGTGGATTTTCTAATTCGCTTCGGAGTGCGGGTGG
CCGCGGCCGTTAAATCTTACTTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG
```

Translation Elongation Factor 1 (EF1- α)

```
CGAGAAGGTAAGCTACCACCATCACCACATCGCCGCCGTACACGACTGCAACACCACTTTTTTCGCTCTTATC
ATCGTTGCGCTGGCGACGAGGGGCAAATTTGGTGGGGTGCAGAAATTTGGCGCTTCGGCTCCACAGCCAATG
ACCTCACCCCATATCCACTTCACATTCCTCCGCTCATTTAGCGACGACGGCGACGGCGATGTGCTTCACACTT
GAACAGCTCGCTAACGACATGCCTCACAGGAAGCTGCCGAACCTGGTAAGGGTTTCCTCAAGTA
```

ใบจุดกระเจี๊ยบเขียว

เชื้อราสาเหตุ

Pseudocercospora abelmoschi (Ellis & Everh.) Deighton, Mycological Papers 140: 138 (1976)

Synonymy:

- *Cercospora abelmoschi* Ellis & Everh., J. Inst. Jamaica: 347 (1893)
- = *Cercospora hibisci* Tracy & Earle, Bulletin of the Torrey Botanical Club 22: 179 (1895)
- = *Cercospora hibisci-manihotis* Henn., Hedwigia 43: 146 (1904)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Subclass	Dothideomycetidae
Order	Capnodiales
Family	Mycosphaerellaceae
Genus	<i>Pseudocercospora</i>
Species	<i>abelmoschi</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบกระเจียบเขียว

ลักษณะอาการของโรค พบอาการที่ชัดเจนบริเวณใต้ใบโดยพบลักษณะของเชื้ออยู่เป็นกลุ่ม ปื้นสีน้ำตาลเข้มถึงเทาดำ บนผิวใบหรือหน้าใบจะพบลักษณะสีซีดไม่ชัดเจน หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน (Figure 5)

ลักษณะของเชื้อ พบการสร้าง fruiting body สีน้ำตาลเข้มหรือเทาดำใต้ผิวใบ stromata มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-30 µm conidiophores อัดกันแน่น (densely fasciculate) โผล่ออกมาจาก stromata และแตกกิ่งก้านอย่างชัดเจน conidiophores มีสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีผนังที่ชัดเจน 1-5 septate ขนาด 60-150 x 3.5-4.5 µm conidial scars ลักษณะหนา conidia มีลักษณะ solitary หรือ acropleurogenous สีน้ำตาลอ่อน ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย conidia มี 3-6 septate ขนาด 33-58 x 4.5-8.5 µm (Figure 5)

พืชอาศัย กระเจียบเขียว (*Abelmoschus* sp.)

Consensus sequences**Internal Transcribed Spacer (ITS) region**

ACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCTCACGCCGACCTCCAACCCTTTGTGAACCAAACCTTGTTGCTT
CGGGGGCGACCCTGCCGACTTCGTGCGCGGGCGCCCCGGAGGTCTTCTAAACTGCATCTTTGCGTGC
GAGTTTAAACAAATTAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
TGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATT
CCGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAATTCACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGCGTTCGCGGTGTTTCC
GCGCGCCTTAAAGTCTCCGGCTGAGCTGTCCGTCTTAAGCGTTGTGGATTTTTCAATTCGCTTCGGAGTGCG
GATGGCCGCGCCGTTAAATCTTTATTCAAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGAT

Translation Elongation Factor 1 (EF1- α)

AAGGTAAGCCATCGCCATCACTTTTTTCGCGGCCGCCGCTCGACTACAACACCATTTTTTCGCTCTTATCATCGT
 TGCGCTGGCGACGAGGGGCAAATTTTGGTGGGGTGGCAGAATTTTCGACTCGGCTCCACAGCCAATGACTTCAT
 CTCAAGCCCAGTGCCCATCCCTCTTCCATCACTTCTGGCATCGACAGCGATGTTCAATTCGTGAACAACGGCATC
 GACGATCGCCTCTTCTCTATCTGAACAGCTCACTAACGATGTCCCTCACAGGAAGCCGCCGAACCTGGCAAG
 GGTTCT

ใบจุดบานขึ้น**เชื้อราสาเหตุ**

Cercospora zinniae Ellis & G. Martin, Journal of Mycology 1 (1): 20 (1885)

Synonymy:

=*Cercospora atrocincta* Heald & F.A. Wolf (1911)

=*Cercospora atricincta* Heald & F.A. Wolf, Mycologia 3 (1): 14 (1911)

=*Cercosporina zinniae* Takah. & Yosh., Pl. Protect. Tokyo: 17 (1953)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Subclass	Dothideomycetidae
Order	Capnodiales
Family	Mycosphaerellaceae
Genus	<i>Cercospora</i>
Species	<i>zinniae</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบและกลีบดอกบานขึ้น

ลักษณะอาการของโรค พบอาการที่ชัดเจนทั้งบนผิวใบ หากอาการรุนแรงจะพบอาการบนกลีบดอก เริ่มแรกแผลมีขนาดเล็กประมาณ 0.5 mm. และเมื่อแผลขยายอาจมีขนาดใหญ่ถึง 8 mm. แผลมีลักษณะกลมจนถึงรูปร่างไม่แน่นอน ตรงกลางแผลมีสีขาวจนถึงเทา ขอบแผลสีน้ำตาล น้ำตาลแดง หรือน้ำตาลเข้ม เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน (Figure 6)

ลักษณะของเชื้อ พบการสร้าง fruiting body ทั้งผิวใบและใต้ใบ แต่พบมากกว่าบนผิวใบ พบ stomata น้อย สีน้ำตาลเข้ม conidiophores อัดกันแน่นเป็นกลุ่ม (densely fasciculate) กลุ่มละประมาณ 2-20 และแตกกิ่งก้านอย่างชัดเจน conidiophores มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงเขียวมะกอกปนน้ำตาลอ่อน ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย ลักษณะเรียวยาวเล็ก มักพบ 2-3 spore scars ตรงบริเวณส่วนยอดหรือปลายของ conidiophore ขนาด 4-6 x 10-120 μm conidial ใสไม่มีสี จำนวน septate ไม่แน่นอน conidia มีลักษณะ acicular หรือ obclavate ปลายมนเล็กน้อย ขนาด 2-4 x 20-140 μm

พืชอาศัย บานขึ้น (*Zinnia* sp.)

ใบจุดถั่วฝักยาว

เชื้อราสาเหตุ

Pseudocercospora cruenta (Sacc.) Deighton, Mycological Papers 140: 142 (1976)

Synonymy:

- *Cercospora cruenta* Sacc., Michelia 2 (6): 149 (1880)
- = *Cercospora phaseolorum* Cooke, Grevillea 12 (61): 30 (1883)
- = *Cercospora vignae* Ellis & Everh., Journal of Mycology 3 (2): 19 (1887)
- = *Cercospora viguae* Ellis & Everh., Journal of Mycology 3 (2): 19 (1887)
- = *Cercospora dolichi* Ellis & Everh., Journal of Mycology 5 (2): 71 (1889)
- = *Cercospora vignae* Racib., Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 8: 66 (1898)
- = *Cercospora raciborskii* Matsumoto & Nagaoka, J. Plant Protect.: 714 (1931)
- = *Cercospora vignae-sinensis* F.L. Tai & C.T. Wei, Sinensia 4: 126 (1933)
- = *Cercospora neovignae* W. Yamam., Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc.: 142 (1934)
- = *Cercospora vignae-sinensis* Sawada, Report of the Department of Agriculture Government Research Institute of Formosa 85: 125 (1943)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Subclass	Dothideomycetidae
Order	Capnodiales
Family	Mycosphaerellaceae
Genus	<i>Pseudocercospora</i>
Species	<i>cruenta</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วฝักยาว

ลักษณะอาการของโรค พบอาการที่ชัดเจนบริเวณใต้ใบโดยพบลักษณะของเชื้ออยู่เป็นกลุ่ม ปื้นสีน้ำตาลเข้มถึงเทาดำ บนผิวใบหรือหน้าใบจะพบลักษณะสีซีดไม่ชัดเจน หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน

ลักษณะของเชื้อ พบการสร้าง fruiting body สีน้ำตาลเข้มหรือเทาดำใต้ผิวใบ stromata มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-30 µm conidiophores อัดกันแน่น (densely fasciculate) โผล่ออกมาจาก stromata และแตกกิ่งก้านอย่างชัดเจน conidiophores มีสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีผนังที่ชัดเจน 0-3 septate ลักษณะยอดแบบ conic ขนาด 10-75 x 3-5 µm conidia มีลักษณะ cylindric หรือ cylindro-obclavate หรือลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงใส conidia มี 3-14 septate ขนาด 25-120 x 2-5 µm

พืชอาศัย ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata*)

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

AACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCTCACGCCGACCTCCAACCCCTTTGTGAACCAAACCTTGTTGCT
TCGGGGGCGACCCTGCCGACACTTCGTGCGCGGGCGCCCCGGAGGTCTTCTAAACTGCATCTTTGCGTC
GGAGTTTAAACAAATTAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTAT
TCCGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTGTTCC
GCGCGCCTTAAAGTCTTCCGGCTGAGCTGTCCGTCTAAGCGTTGTGGATTTTTCAATTCGCTTCGGAGTGCG

Translation Elongation Factor 1 (EF1- α)

TCGAGAAGGTAAGCCATCGCCATCACCTTTTACGACCGCCGCTCGACTACAATACCATTTTTTTCGCTCTTAT
CATCGTTGCGCTGGCGACGAGGGGCAAAATTTGGTGGGGTGCAGAAATTTCTACTCGGCTCCACAGCCAATGA
CTTCATCTCAAGCCCACTACCCATTCCGTCTCCGTACCTCTGGCATCGACAGCGATGTTATCTGTGAACAATG
GCATCGACGAGCGCTTGTGTCACTATCTGAACAGTCCACTAACGACATGCCTCACAGGAAGCCGCCGAATC
GGTAAGGGTTCTTCAAGTA

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุดที่เกิดจากรา cercosporoid จำนวน 69 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 จากจังหวัด กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร ชัยภูมิ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง กรุงเทพฯ เพชรบูรณ์ ราชบุรี และเพชรบุรี สกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) และ translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) ของรา cercosporoid จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบจุดมะละกอ ใบจุดถั่วลิสง ปั้นเหลืองกล้วยไม้ ใบจุดกระเจี๊ยบเขียว ใบจุดถั่วฝักยาว และใบจุดบานไม่รู้โรย ทำการวิเคราะห์ ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence วิเคราะห์ชนิดเบื้องต้นพบว่าเชื้อราดังกล่าว คือ คือ *Corynespora cassicola*, *Passalora arachidicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. abelmoschi* *Pseu. cruenta* และ *Cercospora zinnia* ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ กลุ่มงานวิทยาโมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ โคน. 2523. รา *Cercospora* สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 51 หน้า.
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ โคน. 2537. *ดรรรชนีโรคพืชในประเทศไทย*. 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., S. Zoller and R. Berndt. 2012. Rust fungi on Annonaceae II: the genus *Dasyscypha* Berk. & M.A. Curtis. *Mycologia* 104: 659-681.
- Bennett, C., M.C. Aime 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.
- Cräutlein, M., H. Korpelainen, M. Pietiläinen 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., U. Braun and J.Z. Groenewald. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in mycology* 58: 1-32.
- Crous, P.W., C.L. Schoch, K.D. Hyde, A.R. Wood, C. Gueidan, G.S. de Hoog and J.Z. Groenewald. 2009. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Studies in Mycology* 64: 17-47.
- Deighton, F. C. 1967. Studies on *Cercospora* and allied genera. II. *Passalora*, *Cercosporidium*, and some species of *Fusicladium* on *Euphorbia*. *Mycological Papers*. 112: 1-80.

- Deighton, F.C. 1974. Studies on *Cercospora* and allied genera. V. *Mycovellosiella* Rangel, and a new species of *Ramulariopsis*. *Mycological Paper*.137: 1-76.
- Deighton, F.C. 1976. Studies on *Cercospora* and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Spag., *Pantospora* Cif. and *Cercoseptoria* Petr. *Mycological Paper*.140: 1-168.
- Deighton, F.C. 1979. Studies on *Cercospora* and allied genera VII. New species and redispersions. *Mycological Paper*.137: 1-56.
- Dixon, L.J., L.A. Castlebury, C.A. Aime, N.C. Glynn and J.C. Comstock. 2010. Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. *Mycological Progress* 9: 459-468.
- 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.
- Goodwin, S.B., L.D. Dunkle 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., C. Nakashima, J. Nishikawa, H.D. Shin, J.H. Park, A.N. Jama, M. Groenewald, U. Braun 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.
- 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.
- 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. *Apply Environmental Microbiology* 78: 1523-1533.
- Minnis, A.M., A.R. McTaggart, A.Y. Rossman and M.C. Aime. 2012. Taxonomy of mayapple rust: the genus *Allodus* resurrected. *Mycologia* 104: 942-950.
- Nakashima, C., J. Meeboon, K. Motohashi and C. To-anun. 2007. Studies on *Cercospora* and allied genera in northern Thailand. *Fungal Diversity* 26: 257-270.
- Nicoli, A., L. Zambolim, E.G.C. Nasu, D.B. Pinho, O.L. Pereira, P.G.C. Cabral 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., D.L. Hawksworth, R.H. Petersen and S. A. Redhead. 2010. Fungal nomenclature. *Mycotaxon* 113: 503-514.

- 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.
- Petcharat, V. and M. Kanjanamaneesathian. 1989. Species of plant pathogen *Cercospora* in Southern Thailand. *Thai Phytopathology* 9: 23–27.
- Phengsintham, P., U. Braun, E.H.C. McKenzie, E. Chukeatirote, L. Cai and K.D. Hyde. 2013. Monograph of Cercosporoid fungi from Thailand. *Plant Pathology & Quarantine Online* 3: 67-138.
- Phengsintham, P., E. Chukeatirote, E.H.C. McKenzie, M.A. Moslem, K.D. Hyde 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*. Berlin: J. Cramer. 212 p.
- 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.
- Taylor, J.W. 2011. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2: 113-120.
- To-anun, C., I. Hidayat and J. Meeboon. 2011. Genus *Cercospora* in Thailand: Taxonomy and Phylogeny (with a dichotomous key to species). *Plant Pathology & Quarantine* 1: 11-87.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. M Innis, D Gelfand, J Shinsky, T White: Academic Press. Number of 315-322 pp.
- Yun, Y.H., A.M. Minnis, Y.H. Kim, L.A. Castlebury and M.C. Aime. 2011. The rust genus *Frommeella* revisited: a later synonym of *Phragmidium* after all. *Mycologia* 103: 1451-163.

Table 1 Leaf spot specimens caused by cercosporoid fungi collected from this study (2016-2019)

Host	Locations
<i>Lilium</i>	Mueang district, Khon Kaen province
<i>Nelumbo nucifera</i>	Nongham sub-district, Mueang district, Chiangmai province
<i>Amaryllis</i>	Um Mao sub-district, Thawat Buri district, Roi Et province
<i>Vigna sinensis</i>	Ban Sai Nung, Tha Koi sub-district, Tha Yang district, Phetchaburi province
<i>Zinnia</i> sp.	Thung Song district, Nakhon Si Thammarat province
<i>Manihot esculenta</i>	Fhahoun sub-district, Ko Wang district, Yasothon province
<i>Allium ascalonicum</i>	Fhahoun sub-district, Ko Wang district, Yasothon province
<i>Streblus aspera</i>	Fhahoun sub-district, Ko Wang district, Yasothon province
Weed	Lum Lam Chee sub-district, Ban Khwao district, Chaiyaphum province
Weed	Ban Thung, Kao Kham sub-district, Mueang district, Krabi province
<i>Pennisetum polystachyon</i>	Krabi Noi sub-district, Mueang district, Krabi province
<i>Streblus aspera</i>	Huay Yod district, Krabi province
<i>Arachis hypogaea</i>	Huay Sai Nuea sub-district, Cha-am district, Phetchaburi
<i>Gomphrena globosa</i>	Thung Song district, Nakhon Si Thammarat province
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Ban Bang Por, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat province
<i>Carica papaya</i>	Ban Bang Por, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat
<i>Moringa oleifera</i>	Ban Bang Por, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat
<i>Aeschynanthus hildebrandii</i>	Ban Bang Por, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat province
<i>Euphorbia heterophylla</i>	Ban Bang Nien, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat province
<i>Rhynchosyilis coelestis</i>	Klong Noi sub-district, Pak Panang district, Nakhon Si Thammarat province
<i>Abelmoschus</i> sp.	Mueang district, Surat Thani province
<i>Persea americana</i>	Tha Chana district, Surat Thani province
<i>Coccinia grandis</i>	Tha Chana district, Surat Thani province
<i>Helianthus anuus</i>	KG farm, Nhong Kwai sub-district, Hang Dong district, Chiangmai province
<i>Dendrobium</i> sp.	Nabirom sub-district, Bang lan district, Nakhon Pathom province



Figure 1 Leaf spot specimens caused by cercosporoid fungi collected from this study (2016-2019)

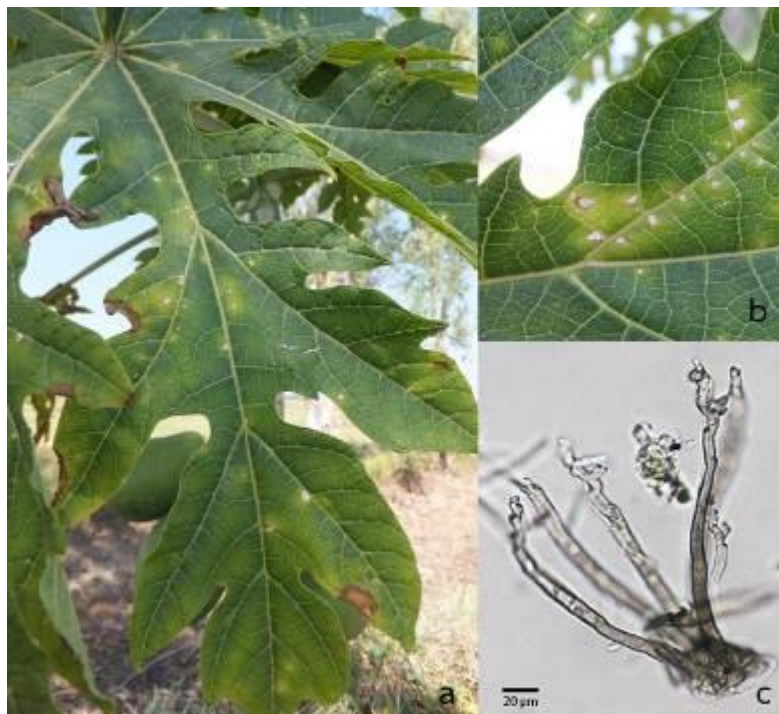


Figure 2 Leaf spot symptom on *Carica papaya* (a-b), conidiophores of *C. cassicola* (c)

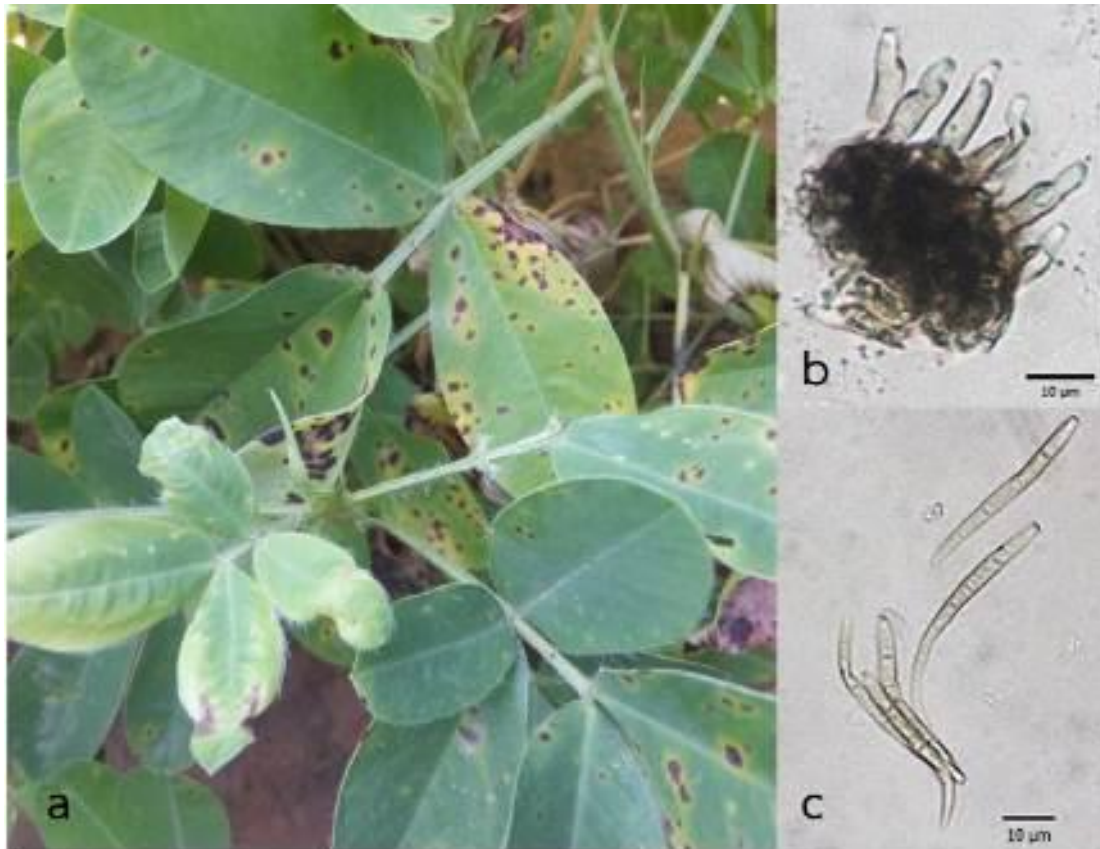


Figure 3 Leaf spot symptom on *Arachis hypogaea*
 (a) conidiophores (b) and conidia
 (c) of *P. arachidicola*



Figure 4 Leaf spot symptom on *Orchid* sp. and conidia of *Pseudocercospora dendrobii*



Figure 5 Leaf spot symptom on *Abelmoschus* sp. and characters of conidiophore and conidia



Figure 6 Leaf spot symptoms on leaves and petals of *Zinnia* sp.

การสำรวจโรคและจัดทำรหัสดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคราพืช Disease Survey and DNA Barcoding of Plant Pathogenic Rust Fungi

ชนินทร์ ดวงสอาด^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} สุณิรัตน์ สีมะเต็อ^{1/}
อมรรักษ์ คัดใจเดียว^{1/} มะโนรัตน์ สุตสงวน^{1/} สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{3/}
^{1/} กลุ่มวิจัยโรคราพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/} กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

Abstract

Plant disease samples caused by rust fungi had been collected during October 2016 – September 2019. Plant disease samples were collected from plantation located in Lampang, Uttaradit, Chiangrai, Chiangmai, Phichit Phayao, Phrae, Phetchabun, Phitsanulok, Phetchaburi, Krabi, Phangnga, Nakhon Si Thammarat, Surat Thani, Nakhon Ratchasima, Lop Buri, Yasothon, and Chaiyaphum provinces. Sixty-two specimens had been observed and identified using morphological and molecular data of the Large Subunit (LSU), the Small Subunit (SSU) and Internal Transcribed Spacer (ITS) gene regions. It was found that the causal agent could be identified as *Olivea tectonae*, *Puccinia horiana*, *Hemileia vastatrix*, *Uromyces appendiculatus*, *Phakopsora pachyrhizi* and *Puccinia sorghi*, which isolated from *Tectona grandis*, *Chrysanthemum* sp., *Coffea robusta*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* and *Zea mays*, respectively.

Keywords: rust fungi, DNA barcoding

บทคัดย่อ

เพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสนิมสาเหตุโรคราพืช เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคราสนิมระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 จากจังหวัด ลำปาง อุตรดิตถ์ เชียงราย เชียงใหม่ พิจิตร พะเยาแพร่ เพชรบูรณ์ พิษณุโลก เพชรบุรี กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี นครราชสีมา ลพบุรี ยโสธร และชัยภูมิ จำนวน 62 ตัวอย่าง ศึกษาและจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง Large Subunit (LSU) Small Subunit (SSU) และตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ของราสนิม จำนวน 6 ไอโซเลท จากตัวอย่างใบที่พบสปอร์ของราสนิม ได้แก่ สัก เบญจมาศ ถั่วฝักยาว กาแฟ ถั่วเหลือง และข้าวโพดหวาน พบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Olivea tectonae* *Puccinia horiana* *Hemileia vastatrix* *Uromyces appendiculatus* *Phakopsora pachyrhizi* และ *Puccinia sorghi* ตามลำดับ

คำหลัก : ราสนิม ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-04-60

คำนำ

ราสนิม (Rust fungi) ใน order Pucciniales, sub-phylum Pucciniomycotina, phylum Basidiomycota (Aime, 2006; Cummins and Hiratsuka, 2003) ราสนิม จัดเป็นราสาเหตุโรคพืชกลุ่มใหญ่ (Kirk *et al.*, 2008; Kolmer *et al.*, 2009) ที่ประกอบด้วย มากกว่า 7,000 สปีชีส์จาก 160 วงศ์ ภายใต้ 14 สกุล (Aime, 2006; Cummins and Hiratsuka, 2003; Cline *et al.*, 2013; Kolmer *et al.*, 2009; Ono and Aime, 2006; Swann *et al.*, 2001; Webster and Weber, 2007) และคาดการณ์ว่ายังมีอีกหลายชนิดที่ยังไม่ถูกค้นพบ โดยเฉพาะในพื้นที่เขตร้อนชื้น (Shivas and Hyde, 1997) ราสนิมสามารถเข้าทำลายและสร้างความเสียหายให้แก่พืชได้อย่างหลากหลาย เช่น อ้อย กาแฟ ข้าวโพด ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ไม้ดอกไม้ประดับ พืชตระกูลขิง และอื่นๆ ราสนิม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะขึ้นกับระยะของการเจริญเติบโตของวงจรชีวิตที่มีมากถึง 5 ระยะ และในแต่ละระยะมีการสร้างสปอร์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน (Cummins and Hiratsuka, 2003; Eckardt, 2006; Petersen, 1974) อีกทั้งราสนิมบางชนิดสามารถเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ได้บนพืชอาศัยเพียงชนิดเดียว แต่บางชนิดต้องอาศัยบนพืชต่างชนิดกันอย่างน้อยสองชนิดเพื่อให้ครบวงจรชีวิต (Cunningham, 1931) เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างส่วนขยายพันธุ์ในระยะที่จำเพาะเจาะจง เนื่องจากราสนิมมีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย และมีระยะการเจริญเติบโตในวงจรชีวิตที่ซับซ้อน ดังนั้น ในการจำแนกชนิดของราสนิมแต่เดิมจึงอาศัยข้อมูลของพืชอาศัย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะวงจรชีวิตของราสนิม มาใช้ในการจัดจำแนกชนิด

ในประเทศไทย ราสนิมสามารถเข้าทำลายและทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น โรคราสนิมของข้าวโพด ที่เกิดจาก *Puccinia polysora* และ *Puccinia sorghi* (ชุตินันต์ และคณะ, 2547) โรคราสนิมของกาแฟ ที่เกิดจาก *Hemileia vastatrix* โรคราสนิมของอ้อย ที่เกิดจาก *Puccinia melanocephala* (เฉลิมพล และคณะ, 2547; ธนาคร และคณะ, 2526) โรคราสนิมของข้าวสาลี ที่เกิดจาก *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* โรคราสนิมของถั่วเหลือง ที่เกิดจาก *Phakopsora pachyrhizi* โรคราสนิมของถั่วลิสง ที่เกิดจาก *Puccinia arachidis* โรคราสนิมของถั่วฝักยาวที่เกิดจาก *Uromyces phaseoli varvignae* (วิจัย, 2551) ระหว่างปี 1980-1994 มีการสำรวจโรคราสนิมในประเทศไทย พบว่ามีจำนวนประมาณ 64 สปีชีส์ จาก 17 วงศ์ โดยพบบนพืชจำนวน 66 สปีชีส์ (Giatgong, 1980; Gjaerum, 1995; Kakishima *et al.*, 1988; Lohsomboon *et al.*, 1986, 1988, 1992, 1994; Lorsuwan *et al.*, 1984; Ono *et al.*, 1988a,b) ซึ่งการจำแนกชนิดใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการสำรวจล่าสุดโดย Engkhaninum *et al.* (2005) รายงานพบราสนิมจำนวน 10 สปีชีส์ จาก 7 วงศ์ ได้แก่ *Crossospora ficis* *Crossospora zizyphi* *Maravalia achroa* *Pileolaria shiraiana* *Puccinia cara* *Ravenelia japonica* *Sphaerophragmium clemensiae* *Uredo musae* *Uredo operculinae* *Uromyces commelinae* โดยเป็นรายงานการพบครั้งแรกบนพืชจำนวน 6 ชนิด

เนื่องจากปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทในงานด้านอนุกรมวิธานมากขึ้น โดยมีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยเปรียบเทียบในบ่งการชี้หรือจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ (genealogical concordance) ควบคู่กับการวินิจฉัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่ได้นั้น สามารถใช้เป็นข้อมูลเฉพาะเพื่อการวินิจฉัยรายชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) (Cräutlein *et al.*, 2011) โดยการนำไปเปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมอ้างอิง (reference libraries) ที่ทราบชนิดแล้ว ตำแหน่งของรหัสพันธุกรรม (locus) ของเชื้อราที่นิยม

นำมาถอดรหัส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจำแนก ศึกษาวิวัฒนาการ และประชากรของสิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายตำแหน่ง เช่น Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ (Seifert, 2009) ซึ่งตำแหน่งนี้สามารถบอกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ (White *et al.*, 1990) ทำให้มีการค้นพบราสาเหตุโรคพืชใหม่หลายชนิด รวมถึงราสนิม อย่างไรก็ตาม การถอดรหัสข้อมูลจากตำแหน่ง ITS ในราสนิมค่อนข้างยาก (Liu *et al.*, 2012) ดังนั้นจึงมีการใช้ข้อมูลของพันธุกรรมในตำแหน่งอื่นประกอบเพื่อจำแนกและแนกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ เช่น the Small Subunit (SSU) the Large Subunit (LSU) the Intergenic Spacer (IGS) Mitochondria cytochrome oxidase subunit 3 (CO3) และอื่นๆ (Aime, 2006; Beenken *et al.*, 2012; Bennett *et al.*, 2011; Dixon *et al.*, 2010; Minnis *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2011)

การรายงานและการศึกษาราสนิมในประเทศไทยเป็นการรายงาน และจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลการจำแนกชนิดของราสนิมที่มีข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลเข้ามาประกอบยังน้อยหรือไม่ครอบคลุม อีกทั้งยังมีการศึกษาและรายงานว่า ราสนิมหลายสปีชีส์มีแนวโน้มว่ามีความซับซ้อน (complex species) จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่เพียงพอต่อการจำแนก รวมถึงความซับซ้อนในการจัดจำแนกของราสนิม ทำให้การจำแนกชนิดของราสนิมโดยใช้ข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา ร่วมกับข้อมูลชีวโมเลกุลจึงมีความสำคัญ หากทราบถึงชนิดของราสนิมบนพืชอาศัยต่างๆ นอกจากสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านการศึกษาการจำแนกชนิดของราสนิมแล้ว ยังสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิวัฒนาการของราสนิม ประโยชน์ในทางด้านโรคพืช การเกษตรทั่วไป และสามารถใช้ข้อมูลเหล่านี้ในการใช้สำหรับการอ้างอิงหรือยืนยันในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชเพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของราสนิม (Pucciniales) สาเหตุโรคพืชโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลด้านชีวโมเลกุล และได้ DNA barcode ของราสนิม (Pucciniales) สาเหตุโรคพืช เพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชเพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

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 เข็มเย็บปลายแหลม ปากคีบ
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ปิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง 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) ITS1F/ITS4B (Gardes and Bruns, 1993) the Large Subunit (LSU) Rust2inv (Aime, 2006)/ LR7 (Vilgalys and Hester, 1990) และ ทำ nested PCR ด้วย LROR/LR6 (Vilgalys and Hester, 1990) และ the Small Subunit (SSU) NS1 (White *et al.*, 1990)/Rust18SR (Aime, 2006)
6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 20.0.3 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012)

วิธีการ

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิม

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราสนิมวงศ์ Pucciniales จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ในเขตภาคเหนือได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา ลำพูน อุตรดิตถ์ ภาคกลางได้แก่ จังหวัด สุโขทัย พิษณุโลก สุพรรณบุรี นครสวรรค์ นครปฐม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ จังหวัด นครราชสีมา ขอนแก่น สุรินทร์ ศรีสะเกษ อุตรธานี ภาคตะวันตกได้แก่ ตาก กาญจนบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ ชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง กระบี่ โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลที่เกิดจากราสนิมอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ และลดความชื้นเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากเชื้อราชนิดอื่นที่จะขึ้นปกคลุม บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาจำแนกชนิดและทำการสกัดดีเอ็นเอ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ดีกิ้งคตริกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากราสนิม ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของราสนิมสาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของ teliospore urediniospore 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.* (2009) Ono and Aime (2006) และ Swann *et al.* (2001)

3. จำแนกชนิดของราสนิมสาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

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

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง the Large Subunit (LSU) Small Subunit (SSU) Internal Transcribed Spacer (ITS) และ Cytochrome Oxidase 3 (CO3) ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion 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

ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เตรียม gel 1% และผสม SERVA HiSens Stain G ในอัตราส่วน 1:50,000 ผสม pcr product 5 ไมโครลิตร ด้วย loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ pcr product ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาที่ฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

- การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการศึกษา เชื้อราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ consensus sequences) จะถูกเก็บบันทึกและรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
แปลงปลูกพืชในประเทศไทย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการของโรคราสนิม (Figure 1) จากจังหวัดลำปาง อุตรดิตถ์ เชียงราย เชียงใหม่ พิจิตร พะเยาแพร่ เพชรบูรณ์ พิษณุโลก เพชรบุรี กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี นครราชสีมา ลพบุรี ยโสธร และชัยภูมิ จำนวน 62 ตัวอย่าง (Table 1) นำตัวอย่างมา ทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตักสปอร์จากตัวอย่างใบที่พบสปอร์ของราสนิม ได้แก สัก เบญจมาศ ถั่วฝักยาว และกาแฟ ภายใต้กล้อง stereo microscope จากนั้นสกัดดีเอ็นเอตามวิธี ของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตำแหน่ง Large Subunit (LSU) the Small Subunit (SSU) และตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) โดยใช้ Phusion DNA Polymerase วิเคราะห์เพื่อการจัดจำแนกด้วยวิธี Phylogenetic reconstruction ได้ผลดังนี้

ราสนิมสัก**เชื้อราสาเหตุ**

Olivea tectonae (Racib.) Thirum., Current Science 18 (5): 176 (1949)

Synonymy:

- *Chaconia tectonae* T.S. Ramakr. & K. Ramakr., Indian Phytopathology 2 (1): 19 (1949)
- *Olivea neotectonae* Buriticá & Salazar-Yepes, Revista, Facultad Nacional de Agronomía Medellín: 3652 (2007)
- *Olivea tectonae* (T.S. Ramakr. & K. Ramakr.) J.L. Mulder, CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria 365 (1973)
- = *Tegillum neotectonae* (Buriticá & Salazar-Yepes) Doweld, Index Fungorum 36: 1 (2013)
- = *Tegillum tectonae* (Racib.) Doweld: 1 (2013)
- = *Uredo tectonae* Racib., Parasitische Algen und Pilze Java's 1: 28 (1900)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Chaconiaceae
Genus	<i>Olivea</i>
Species	<i>tectonae</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบสัก

ลักษณะอาการของโรค พบจุดสีน้ำตาลส้มกระจายทั่วไป เมื่อลูบหรือดูบริเวณใต้ใบจะพบสปอร์เป็นผงฝุ่นสีส้มหรือน้ำตาล พบกระจายทั่วไป หากอาการรุนแรงจะทำให้ใบร่วง (Figure 2)

ลักษณะของเชื้อ uredenia อยู่บริเวณใต้ผิวใบ สีส้มเหลือง เป็นจุดขนาดเล็กประมาณ 0.2-0.5 mm. เมื่อเจริญเต็มที่ uredenia จะปรือออก ภายในบรรจุ urediniospores รูปร่างรีคล้ายไข่ สีเหลืองส้มขนาดประมาณ 18-28 × 14-22 μm ผนังเซลล์ของสปอร์ใสไม่มีสีหนาประมาณ 2 μm ไม่มี germ pore มักพบปนกับ telia

พืชอาศัย สัก (*Tectona grandis* L.)

Consensus sequence

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

```

CCCGAAGGTAAACCTCTGACCCACATGTGACCTTGTAGTTGCTTCTGTTGATTCTGTCGGCGTCTGGACGGCC
GTCGCGCCGCCCCGCGACCCGGAACCAGGCGGCCCTGGGACCAATATCAACTCTTTGTATCCACTAGTCTTC
TGATCAGCCGCACGGCACCAAGAAATGGATCAAACTTTCTTACAGAAGGGAGGGATCCGTGAATTGGAAAA
CGCAACGAACCGTGAAAAGTAAAGGGAATTGTGGAATTCTAGGAATCATGCAATCTTTGAATGTTTCATTGCGCC
TGCCAGCATTTTGGCGGGGATGGCTGTTGAGGGACATTTCAACCCTCGAGCTCCCCTTTGGAAGTCCGGGAG
TTGGGACCTGTAGACTTACCGTTTGTGAAACCATGGATTTGTGGCTGTGATTCATTTACCTCCGCGTAGAATCT
ATACACCGCATCGGAAACTCGGCGGGGCCACCCCGCAAACCCCTTAATTTGGGAACATTTATCATTGAACAAG
AAAGATTACCCGCTGAACTTAATCATAACAATGTAACGGAAG
  
```

ราสนิมขาวเบญจมาศ

เชื้อราสาเหตุ

Puccinia horiana Henn., Hedwigia Beiblätter 40: 25 (1901)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Pucciniaceae
Genus	<i>Puccinia</i>
Species	<i>horiana</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบเบญจมาศ

ลักษณะอาการของโรค พบจุดสีน้ำตาลส้มกระจายทั่วไป เมื่อลูบหรือดูบริเวณใต้ใบจะพบสปอร์เป็นผงฝุ่นสีส้มหรือน้ำตาล พบกระจายทั่วไป หากอาการรุนแรงจะทำให้ใบร่วง (Figure 3)

ลักษณะของเชื้อ uredenia อยู่บริเวณใต้ผิวใบ สีส้มเหลือง เป็นจุดขนาดเล็กประมาณ 0.2-0.5 mm. เมื่อเจริญเต็มที่ uredenia จะปรือออก ภายในบรรจุ urediniospores รูปร่างรีคล้ายไข่ สีเหลืองส้มขนาดประมาณ 18-28 × 14-22 μm ผนังเซลล์ของสปอร์ใสไม่มีสีหนาประมาณ 2 μm ไม่มี germ pore มักพบปนกับ telia teliospore มีสีเหลืองใส แบบ 2 เซลล์ มีระยะคอร์ดตรงปลายยอด

พืชอาศัย เบญจมาศ (*Chrysanthemum*)

Consensus sequence

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

GGAAGTAAAGTCGTAACAAGTTTTCTGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTATTAAGAAGACTAGAGTGACAC
 TTTATTGTGGCTTGACCCCTTTTAAATATATCACCCAACTATTTAACACTTGGATGCATGAATTTTTGAAAGG
 TTCATTGCAATTGAGTATAAGTAACTTCTTTTTACTAAGAAATGTTACATTACCCCCCCCCCTTTATTTTTTA
 CCCCCTTTTTTATTATATAACACAAGTTTAAATGAATGTAAAAACCTTTAATTATAAAATAACTTTTAAACAAT
 GGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
 ATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCACCTTTTGGTATCCAAAAGGTACACCTGTTTGAGTGTGCATGAAACC
 CTCTCACAAAATAATTTTTGTTAATTATTTAGTGGATGTTGAGTGTGCTGTCATTAGCTCACTTTAAATATATC
 AGTCACTTTTTTTTTTTTTTCAAATAAGTTGGATTGACTTGGTGAATAATTTTTTCATCAAGGAAAGTAGCAAT
 ACTTGCCAGCTTTTGTGTTTTGAAAAAAGAAAGACTTCTAAAAACCCAAAATTAATCTTTAAGACCTCAAATC
 AGGTGGGACTACCCGCTGAACCTTAAG

ราสนิมกาแฟ

เชื้อราสาเหตุ

Hemileia vastatrix Berk. & Broome, Gardeners' Chronicle: 1157 (1869)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Genus	<i>Hemileia</i>
Species	<i>vastatrix</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบกาแฟ (*Coffea robusta*)

ลักษณะอาการของโรค เริ่มพบเป็นจุดสีเหลืองขนาดเล็กบนผิวใบเมื่อโรคเริ่มพัฒนาจะพบจุดขยายใหญ่ขึ้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-25 mm. โดยสีเหลืองจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลส้มพบการสร้างสปอร์บริเวณใต้ใบ โดยบนใบจะเห็นเป็นจุดสีซีด หากพบอาการรุนแรงบริเวณแผลจะกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มและแผลมีลักษณะแห้งและใบกาแฟจะร่วง เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยลม (Figure 4)

ลักษณะของเชื้อ sori สร้างบริเวณใต้ใบ อยู่เป็นกลุ่มลักษณะเป็นวงขนาดประมาณ 3-25 mm. มีสีเหลืองถึงเหลืองส้ม (Figure 4) มี clavate filaments รอบ stomata โดยตรงส่วนปลายของ filaments จะติดกับ pedicels ของ urediospores ซึ่งมีลักษณะใส ขนาด 28-36 x 18-28 μm ผิวของ urediospore มีลักษณะเป็น warty ตรงส่วนโค้ง และเรียบตรงส่วนโคน หรือด้านเรียบ พ้องหนา 1 μm teliospores รูปร่างแบบ spherical ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-28 μm พ้องใส เรียบหนา 1 μm

พืชอาศัย *Coffea arabica*, *C. canephora*, *C. liberica* และ *Coffea* spp.

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

CGAATTTAACCCCGGCGGTTAGGCATATATAATTCTCTCTGAGGGTGTATGTGTTCTAATCTTTTTTTTTTTAT
 TTTCAACCACAAATTTATACATATGTATATATGTATTATTTACTATCAAGTAAATAAATAAAAACTTTTAAACAA
 TGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTG
 AATCATCGAATTTTTGAACGCATATTGCGCCTTTTGGCTATTCCAAAAGGTACACCTGTTTGAGAGTATGAAAG
 GTCAGGGTGTGAGAGAGTTATTAAGGAAAGGCAAGTAACACTTTAAGTGTATTTTGTCTTTGAT
 TTTTTTTTCTTTAGCATCTTGGATATTGGGTGCTTCCATTATTAAGTTTGTGAGGCTCACCTTAAATTTATAA
 GTTGTTTTTTATTAAGGATGAAAAGTCTTTTGTGAGGCTTGTATTGATATATGAAATGTCATTCATCAAGAA
 ATCAGGGGGGTGACTAACCTTGATGAGAAATGTTGACTTT

Large Subunit (LSU)

CTAACAAAGGATTCCCCTAGTAATGGCGAATGAAGAGGGAAAAGCCCAATTTTGTAACTGCGCCCTTTTAGGGTC
 CGAGTTGTAAAGTGAAGAGGTCTTTCTTGTGCTGGACCATATATAAGTCTGTTGGAATACAGCATCATTGAAG
 GTGAGAATCCTGTCTAATGATATGGACTACCAAGTCTTTTATGAAGCAGTCTCTAAGAGTCGAGTTGTTGGGA
 ATGCAGCTCAAATGGGTGGTAAATCCATCTAAGGCTAAATATTGGTGAGAGACCGATAGCAAACAAGTACCG
 TGAGGGAAAGATGAAAAGAAGTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTATGTGAAATTGTTAAAAGGGAAACACTTGAAG
 TTAGACTTGATAATGTCAGTTCAGCCTTTTATTAGGGTGTATTCTGTGCATTATCAGACCAACATCAATTTGGG
 TGTTAGATAAGGGTTTGGGAAATGTAGCAACTTTGGTTGTGTTATAGTCTGAATTTTCATATATAATGCCAAG
 ATTGAGGAGATTACAGTAAGCTGGAAAGAGATTTTCAAGTAGGTCACCAAAATGGTTGACTCTTACTATGGA
 TGTTGGTGCAATAGCTTTAAATGACCCGTCTTGAACACGACCAAGGAGTCTAACATGCTTGCAAGTATTTGA
 GTGGTAAAACCTCACATGCGCAATGAAAGTGAATGTAATGGGATCCAAAA

Large Subunit (SSU)

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAAAATTAAGAGTGCACCTAATTGTGGCTTGAAATTTTACTTAT
 TTACACCCAACGTCTTCGGGACACTGCGGCAATTTATTGCTTAGCGAATTTAACCCCTGCGGTTAGGCATATAT
 AATTCTCTCTGAGGGTGTATGTGTTCTAATCTTTGTTTTTTTTTATTTTCAACCACAAATTTATACATATGTATA
 TATGTATTATTTACTATCAAGTAAATAAATAAAAACTTTTAACAAATGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAG
 AACACAGTGAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATTTTGAACGCATATTGCG
 CCTTTTGGCTATTCCAAAAGGTACACCTGTTTGGAGAGTATGAAAGGTCAGGGTGTGAGAGAGTTATTAAGGAA
 AAAGAAAAGGCAAAGTAACACTTTAAGTGTATTTTGTCTTTGATTTTTTTTTTTCTTTAGCATCTTGGATAT
 TGGGTGCTTGCCATTATTAAGTTTGTGAGGCTCACCTTAAATTTATAAGTTGTTTTTTTATTAAGGATGAAAAGTC
 TTTTGTGAGGCTTGTATTGATATATGAAATGTCATTCATCAAGAAATCAGGGGGGTGACTAACCTTGATGA
 GAAATGTTGACTTTATAAACACATGTTAAAAGATAAATAAAAAGTAAAAGATAAAAAAATTTAAAAATTTAAAAAT
 TAAAGGGAAAGAAGTAAAAGAATGAGAGGTATGACATATT

ราสนิมถั่วฝักยาว

เชื้อราสาเหตุ

Uromyces appendiculatus F. Strauss, Exantheme der Pflanzen. Up.: 277 (1833)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Pucciniaceae
Genus	<i>Uromyces</i>
Species	<i>appendiculatus</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วฝักยาว (*Phaseolus vulgaris*)

ลักษณะอาการของโรค พบได้มากที่สุดบนใบ อาการเริ่มแรกเริ่มจุดสีเขียวซีดหรือเหลืองที่มีลักษณะกลมเล็กต่อมาตอนกลางจุดจะนูนขึ้น ต่อมาจะแตกออกพบผงหรือกลุ่มของสปอร์สีน้ำตาลแดง กรณีที่เป็นรุนแรงจะพบจุดแผลสนิมเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากมาย จนปกคลุมทั่วใบ (Figure 5) เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยลม

ลักษณะของเชื้อ pycnia หรือ aecia พบได้ทั้งบริเวณผิวใบและใต้ใบ อยู่เป็นกลุ่มเล็ก (Figure 5) ขนาดประมาณ 8 mm. ลักษณะแบบ cupulate aecia มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25-0.3 mm. aeciospores มีรูปร่างแบบ angular ellipsoidal ขนาด 15-26 μm ผนังใสไม่มีสี ผิวแบบ verrucose หนา 1-1.5 μm urediospores รูปร่างแบบ ellipsoidal จนถึง obovoidal ขนาด 20-30 x 20-26 μm ผนังหนา 1-2 μm มีจำนวน 2 pores แบบ \pm equatorial หรือ superequatorial teliospores รูปร่างแบบ ellipsoidal มีลักษณะ umbonate ตรงส่วนปลายยอด ขนาด 28-38 x 20-36 μm ผนังเรียบ อาจพบลักษณะ warty หรือ striate ได้บางครั้ง ผนังด้านข้างหนา 2.5-3.5 μm และมีความหนาของผนังตรงส่วนยอด 4-8 μm pedicels แบบ fragile ลักษณะใส จนถึงสีน้ำตาลจาง pedicels ยาวประมาณ 20 μm (Figure 5)

พืชอาศัย *Phaseolus* spp. และ *Vigna* spp.

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

```
AAATGAGTGCACCTTTATTGTGGCTCAAACTTTTTATTTTTTAACCCCAAGACTTGTGGTGGCGTCTTTGCC
ATTGCACTCAGGTATACGTAACACTTTTTGTGTTACATTACCCCTCCCAATTTTTTTTTTTTATAAACACAT
GTTGAAATAAGAATGTAATATATATATATCTTGAAAATAACTTTTAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGAT
GAAGAACACAGTGAAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACCT
TGCATCTTTTGGTATTCCAAAAGGTATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAAATCTCTCATCAAATTAATTTTTGGTGG
ATTTTGAGTGCCTGTTATCTAGCTCACTTTAAATATATAAGTTCCTTATCTTATTATGTTGGATTGACTTGGTGT
AATATTTAACTTTTTGTTTACCAAGGAAAGCTGCAATGCTTGCCAATGTTTTCAAGTCA
```

Large Subunit (LSU)

```
CCCCTAGTAATGGCGAATGAAAAGGGAAAAGCCCAAATTTGTAATCTGGCTCTCCTGAGACCGAATTGTCATCC
TTTTAACTGTTTTAGTGGTGGACCATATATCAGACCGTCTGACAACGCTTCATCATATAAGGAGAGAATCCTG
GTAATGATATGGACTCCATTGCGATATGATACAGACTCTAAGAACCAAGTTGTTTGGGAATGCATCTCAAAGA
CGGCGGTAAATCCATCTAAGGCTAAATATTGATGACAGACCGATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGA
CCAGAACTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTTGTTAAAAGGGAAACAATTGAAGTTAGACTTGTATT
```

GTTAGTTCAACCTTTTTTTTAAAGGGAGTATTCTGATGATTAACAGACCAACATCAACTTTTGAGTGTTGGAGA
 AGGGTTTAAGGAAATGTAGCAGTCTCTGATTGTGTTATAGTCCTGAGCTTTGATACAATGCTTAAGGTTGAGGA
 TTGCAGTAAGCCTTTTTTTTTTTGGGGGAAACA

ราสนิมถั่วเหลือง

เชื้อราสาเหตุ

Phakopsora pachyrhizi Syd. & P. Syd., Annales Mycologici 12 (2): 108 (1914)

Synonymy:

□ *Physopella pachyrhizi* (Syd. & P. Syd.) Azbukina, Novosti Sistematiki Nizshikh Rastenii 7: 224 (1970)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota
Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Phakopsoraceae
Genus	<i>Phakopsora</i>
Species	<i>pachyrhizi</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วเหลือง

ลักษณะอาการของโรค พบได้มากที่สุดบนใบ อาการเริ่มแรกเริ่มจุดสีเขียวซีดหรือเหลืองที่มีลักษณะกลมเล็กต่อมาตอนกลางจุดจะนูนขึ้น ต่อมาจะแตกออกพบผงหรือกลุ่มของสปอร์สีน้ำตาลแดง กรณีที่เป็นรุนแรงจะพบจุดแผลสนิมเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากมาย จนปกคลุมทั่วไป (Figure 6) เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยลม

ลักษณะของเชื้อ ไม่พบการสร้าง pycnia หรือ aecia แต่พบ uredia ใต้ใบขนาดประมาณ 0.4 mm ภายในพบ paraphyses ลักษณะโค้ง สีใส ขนาดยาว 25-45 µm ปลายยอหนา 8-13 µm peridium อยู่รวมเป็นกลุ่ม มีผนังเซลล์หนาขนาด 10-15 x 8-12 µm urediospores รูปร่างแบบ globose ถึง subglobose หรือบางครั้งพบลักษณะแบบ ellipsoid มีสีส้ม ไม่ค่อยพบ germ pores มีขนาด 20-28 x 18-22 µm ส่วนใหญ่พบแต่ urediospores ไม่ค่อยพบการสร้าง teliospores บนถั่วเหลือง

พืชอาศัย ถั่วเหลือง (*Glycine max*)

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATAAAAAGCTAAAGAGTGCACTT
 TATTGTGGCTCAAACTAACTTTTTAATAAACCCATTTAATTGGCTCATTGATTGATAAGATCTTTGGGCAATG
 GTAGCTTTGAAAAAGCTGCAACCCACCTATTAATCATAATCTTTTTTTTTAACTCAAAGTCAAATAGAATGT
 TTTATAAATTTAAATATATATAACTTTTAAACAATGGATCTCTAGGCTCTCATATCGATGAAGAACACAGTGAA

ATGTGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCAAGTTTTTGAACGCACCTTGACCTTTTGGTATT
 CAAAAGGTACACCTGTTTGAGTGTGATGAAATCTTCTCAACATTATTTCTTTTTTTAAAGGGAAATTGTTGGA
 TTTTGAGTGTGCTGTTGCTTTTTTTTGCAGCTCACTTAAATAAATAAATATATATAAGTTTCAGTATATTTTG
 ATGTAATAATAAAATCATTTTCATCAAAAAATAAATATATGTGAGATTTATTATAACATTAATTGAATGTAAATT
 TTTTTTAAGACCTCAAATCAGGTGAGACTACCCACTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG

Small Subunit (SSU)

GCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGATACCTTACTACATGGATAACTGTGGTAATTCTAGA
 GCTAATACATGCTGAAAAACCCTAACCTTTTGAAGGGGTGATTTATTAGATAAAAAACCAATGGCCCTCGGG
 TCTCTTTGGTGATTACATAAACTTCTCGAATCGCATGGCCTTTGTGCTGGTGATGCTTCATTCAAATATCTGCC
 CTATCAACTTTGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGATGACGGGTAACGGGGAATAAGGGTTCCGATTCC
 GGAGAGAGGGCCTGAGAAACGGCCCTCAAATCTAAGGATTGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCTGACAC
 AGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGTATGGCTCTTTGGGTCTTACAATTGGAATGAGTACAATTTAAATC
 TCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATT
 AAAGTTGTTGACGTTAAAAAGCTCGTAGTCGAACTTCGGTCTCTGGCAGTTGGTCCGCCATTTGGTGTGACTG
 ATTTGTTGGAGGCTTACCTCTTGGTGAGCCTCAATGCACCTTACTGGGTGTTGAGGGGAACCAGGATTTTACT
 TTGAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTATTGCTGAATACATTAGCATGGAATAATAAAATAGGACGTGTG
 ATCCTATTTTGTGGTTTCTAGGATTACCGTAATGATTAATAGGGTCAGTTGGGGCATTGTATTACATCGTC
 AGAGGTGAAATCTTGGATTGATGTAAGACAACTACTGCGAAAGCATCTGCCAAGGATGACTTCATTGATCAA
 GAACGAAGGTTAAGGGTTCAAAAACGATCAGATACCGTTGTAGTCTTAACAGTAACTATGCCGACTGGGGATC
 AGACAAGGATTTAATGACTTGTGGCACCCTGAAGTTTAGGTTCTGGGGGAGTACGGTC
 ACAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGTGTGGAGCCTGCGGCTTAAATTTGACTCAA
 CACGGGGAACTCACCAGTCCAGACACAGTAAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTCGTGATTTTGTGGTTGG
 TGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGATAACGAACGAGACCTTCTCCTGC
 TAAATAGTCCAGCTGGCTACGGCTGGCTGCTGACTTCTAGAGGGACTATCAACGTTTAGTTGATGGAAGTTGG
 AGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGACGCGCTACACTGACCAGGCCAGCGAGT
 ATATCACCTTATCTGAAAAGATTGGGTAATCTTGGGAACTGGTCTGATGGGGATAGAGCATTGCAATTATT
 GCTCTTCAACGAGGAATACCTAGTAAGCGTATGTCATCAGCATGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA
 CCGCCCGTCTGCTACTACCGATTGGATGGCTTAGTGAGGCGTTCGGAGAGCCTATAAGGAGCTGGCAACAGCAC

ราสนิมข้าวโพดหวาน

เชื้อราสาเหตุ

Puccinia sorghi Schwein., Transac. of the American Philosophical Society 4 (2): 295

Synonymy:

- *Dicaeoma sorghi* (Schwein.) Kuntze, Revisio generum plantarum 3 (2): 1-576 (1898)
- = *Puccinia maydis* Berenger, Atti Ruin. sc. ital. Milano: 475 (1844)
- = *Puccinia zae* Berenger, Herb. Viv. Mycol. Suppl. no. 18: no. 18 (1851)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Basidiomycota

Subphylum	Pucciniomycotina
Class	Pucciniomycetes
Order	Pucciniales
Family	Pucciniaceae
Genus	<i>Puccinia</i>
Species	<i>sorghii</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบข้าวโพดหวาน

ลักษณะอาการของโรค พบได้มากที่สุดบนใบ อาการเริ่มแรกเริ่มจุดสีเขียวซีดหรือเหลืองที่มีลักษณะกลมเล็กต่อมาตอนกลางจุดจะนูนขึ้น ต่อมาจะแตกออกพบผงหรือกลุ่มของสปอร์สีน้ำตาลแดง กรณีที่เป็นรุนแรงจะพบจุดแผลสนิมเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากมาย จนปกคลุมทั่วใบ ส่วนใหญ่จะพบบนผิวใบ (Figure 7) เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยลม

ลักษณะของเชื้อ ไม่พบการสร้าง pycnia หรือ aecia แต่พบ uredia บนผิวใบเป็นจำนวนมาก สร้างตามแนวยาวของใบ เมื่อ uredia แตกหรือเปิด ภายในมี urediospores สีน้ำตาลทองจำนวนมากมีขนาด (22-)23-31(-33) x (20-)21-28 รูปร่างแบบ globose ถึง short-ellipsoid ผนังด้านนอกหนา 1.3-2.3 μm สีเหลืองทอง ด้านนอกสีเข้มน้ำตาลเหลือง ผนังด้านในหนา 2.0-3.3 μm มี germ pores จำนวน 3 หรือ 3-4((-5)) บริเวณกึ่งกลางสปอร์

พืชอาศัย ข้าวโพด (*Zea mays* L.)

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

GCACTTAATTGTGGCTCGACCCCTTTTAAACTCACCCCAAACCTTCAAAGACTCTTTTGCATGGTTTGTAAACA
ATCATTGCACCTGAGTAAAAGTAACATTCTTGATTGAATGTTACATTACCCACCCCTTTTATTTTTCCAAAAC
TTTTTTTTACACATACACACAAGTTTAAAAGAATGTAAACAACCACCTTTAATTATAAAAATAACTTTTAAACAATG
GATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAATGTGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA
TCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCCTTTTGGTATTCCAAAAGGCACACCTGTTTGAGTGCATGAAACCC
TCTCACAAAATAAATAATTTTTATTATGATTTTTGTGGATGTTGAGTGCTGCTGTGTTACACATAGCTCACTTTA
AATGTATAAGTCATCTTCTTTATATAGCAAAAAAGAAGAGATGGATTGACTTGATGTGAATAATTTTTTTTTCA
TCACATTGAGGAAAGTAGCAATACTTGCCATCTTTATATTATTTTGTGTTGAGATAGAGACTACTAAACAAACA
ATTTAAAATTTAAGACCTCAAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Large Subunit (LSU)

ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCCTTTTGGTATTCCAAAAGGCACACCTGT
TTGAGTGCATGAAACCCTCTCACAAAATAAATAATTTTTATTATGATTTTTGTGGATGTTGAGTGCTGCTGTG
TACACATAGCTCACTTTAAATGTATAAGTCATCTTCTTTATATAGCAAAAAAGAAGAGATGGATTGACTTGATGT
GTAATAATTTTTTTTTCATCATTGAGGAAAGTAGCAATACTTGCCATCTTTATATTATTTTGTGTTGAGATA
GAGACTACTAAACAAACAATTTAAAATTTAAGACCTCAAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACAAAGGATTCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGAGGGAAAAGCCCAAATTTG
TAATCTGACTCTTCAGAGTCCGAGTTGTAATTTTGAAGACTGTTTCAGTGCTGGACCATGTATAAGTCTGTT
GAAAAGCAGCATCATTGAGGGTGATAATCCCGTTTATGATATGGACTACCAGTGCATTATGATACAGTCTCTAA
GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGTAATTCATCTAAGGCTAAATATAGGTGAGAGACC

GATAGCAAACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGAACCTTTGGAAAGAGAGTTAACAGTGCGTGAAATTGTTA
 AAAGGGAAACAATTGAAGTTAGACTTGTTATTATTAGTTCAACCTTTTTGGAGTATTCTAATGATTAACAGACCA
 ACATCAATTTTTGAGTGTTGGAGAAGGGTTAAGGAAATGTAGCAGTCTCTGACTGTGTTATAGTCCTGAGCTT
 TGATACAATGCTTAAGATTGAGGAAGGCAGTAAGCGCATGTTGTGTGTGTGGAACAACTAATGTTCTTCTTAC
 TGAGGATGTTGGTGAATAGCTTTAAATGACCCGCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGT
 ATTTGGGTGCTTGAAACCTTATGCGTAATGAAAGTAAATGTAATGGGATCTGTTAAAAGTGACCAATTGACC
 AGTCCAGATTATTTATATGATGGTACTGAGTAAGAGCAAGTATGTTGGGACCCGAAAGATGGTGAAGTATGCCT
 GAATAGGGTGAAGCCAGAGGAACTCTGGTGAAGCTCGTAGCGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATT
 TGGGTATAGGGGCGAAAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGTTTCTGCCGAAGTTTCCCTCAGGAT

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคราสนิมจากแหล่งปลูกในพื้นที่จังหวัดลำปาง อุตรดิตถ์ เชียงราย เชียงใหม่ พิจิตร พะเยาแพร่ เพชรบูรณ์ พิษณุโลก เพชรบุรี กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี นครราชสีมา ลพบุรี ยโสธร และชัยภูมิ จำนวน 62 ตัวอย่าง ศึกษาและจำแนกด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง Large Subunit (LSU) Small Subunit (SSU) และตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ของราสนิม จำนวน 6 ไอโซเลท จากตัวอย่างใบที่พบสปอร์ของราสนิม ได้แก่ สัก เบญจมาศ ถั่วฝักยาว กาแฟ ถั่วเหลือง และข้าวโพดหวาน พบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Olivea tectonae* *Puccinia horiana* *Hemileia vastatrix* *Uromyces appendiculatus* *Phakopsora pachyrhizi* และ *Puccinia sorghi* ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง อุดม เลียบวัน อรรถสิทธิ์ บุญธรรม ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ วันทนีย์ อุวานิชย์ ฌันทรฤติ พิทักษ์ วลลิกา สุขชาติ สมศักดิ์ ทองศรี และตุลย์ อินทร์มพรรย์. 2547. *เอกสารวิชาการอ้อย*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 147 หน้า
- ชุตินันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา โกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล และอดิศักดิ์ คำนวนศิลป์. 2547. *โรคข้าวโพดและการป้องกันกำจัด*. เอกสารวิชาการ สถาบันวิจัยพืชไร่ ปี 2547 พิมพ์ครั้งที่ 2 สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร , กรุงเทพฯ. 69 หน้า
- ธนากร จารุพัฒน์ วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล นิพนธ์ ทวีชัย และ ศศินาฏ แสงวงศ์. 2526. *โรคอ้อยในประเทศไทย*. สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 180 หน้า.

- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแพงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2537. *พรรณานี้โรคพืชในประเทศไทย*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.
- วิจัย รักรักษาศาสตร์. 2546. *ราวิทยาเบื้องต้น*. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 351 หน้า.
- Aime, M. C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47: 112-122.
- Beenken, L., S. Zoller and R. Berndt. 2012. Rust fungi on Annonaceae II: the genus *Dasyscypha* Berk. & M.A. Curtis. *Mycologia* 104: 659-681.
- Bennett, C., M.C. Aime and G. Newcombe. 2011. Molecular and pathogenic variation within *Melampsora* on *Salix* in western North America reveals numerous cryptic species. *Mycologia* 103: 1004-1018.
- Cline, E.T., D.F. Farr, A.Y. Rossman, M.E. Palm 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).
- Cräutlein, M., H. Korpelainen, M. Pietiläinen and J. Rikkinen. 2011. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodivers Conserv* 20: 373-389.
- 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.
- Dixon, L. J., L. A. Castlebury, C. A. Aime, N. C. Glynn and J. C. Comstock. 2010. Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. *Mycological Progress* 9: 459-468.
- 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.
- Eckardt, N.A. 2006. Identification of Rust Fungi Avirulence Elicitors. *Plant Cell* 18: 1-3.
- Engkhaninun, J., S. Chatasiri, C. To-anun, N. Visarathanonth, M. Kakishima and Y. Ono. 2005. New geographical distribution and host records of rust fungi from northern Thailand. *Mycoscience* 46: 137-142.
- Gardes, M. and T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113 –118. doi:10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x

- Giatgong, P. 1980. *Host index of plant diseases in Thailand*. 2nd edn. Department of Agriculture, Ministry of Agricultural Cooperative, Thailand. 124 p.
- Gjaerum, H.B. 1995. Rust fungi from various countries. *Lidia* 3: 145–170.
- Kakishima, M., P. Lohsomboon, Y. Ono, L. Manoch and V. Nippon. 1988. *Newinia thaiana*, a new rust fungus from Thailand. *Mycologia* 80: 397-400.
- 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.
- Kirk, P. M., P. E. Cannon, J. C. David and J. A. Stalpers. 2008. *Dictionary of The Fungi*. Egham, UK: CABI Bioscience. 655 pp.
- Kolmer, J.A., M.E. Ordonez and J.V. Groth. 2009. *The Rust Fungi*. (Online). Available. <https://pdfs.semanticscholar.org/e98d/72543aa518854295b26e576df3f24b287250.pdf>. (February 1, 2019)
- 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. *Apply Environmental Microbiology* 78: 1523-1533.
- Lohsomboon, P., Kakishima, M., Ono, Y., Manoch, L. and N. Visarathanonth. 1988. Materials for the rust flora in Thailand III. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 29: 225-234.
- Lohsomboon, P., L. Manoch and N. Visarathanonth. 1992. The rust fungi of Thailand 1. on Graminicolous plants. *Kasetsart Journal: Natural Science* 26: 244-256.
- Lohsomboon, P., L. Manoch, N. Visarathanonth, M. Kakishima, Y. Ono and S. Sato. 1986. Materials for the rust flora in Thailand II. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 27: 271-281.
- Lohsomboon, P., M. Kakishima and Y. Ono. 1994. A monograph of *Sphaerophragmium* (Uredinales). *Mycological Research* 98: 907–919.
- Lorsuwan, C., S. Tontyaporn, N. Virasathanonth, L. Manoch and M. Kakishima. 1984. Materials for the rust flora in Thailand I. *Transaction of the Mycological Society of Japan* 25: 57-65.
- Minnis, A. M., A. R. McTaggart, A. Y. Rossman and M. C. Aime. 2012. Taxonomy of mayapple rust: the genus *Allodus* resurrected. *Mycologia* 104: 942-950.
- Ono, Y. and M.C. Aime. 2006. Recent advances in rust systematics. *Mycoscience* 47: 111.
- Ono, Y., M. Kakishima, P. Lohsomboon, L. Manoch and N. Visarathanonth. 1988a. Two new species of Uredinales from Thailand. *Mycologia* 80: 261–263.

- Ono, Y., M. Kakishima, P. Lohsomboon, S. Sato, L. Manoch 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.
- Seifert, K. A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9 Suppl s1: 83.
- Shivas, R.G. and K. D. Hyde. 1997. Biodiversity of plant pathogenic fungi in the tropics, pp. 47-56. In : KD Hyde., ed. *Biodiversity of tropical microfungi*. Hong Kong: Hong Kong University Press.
- Swann, E.C., E.M. Frieders and D.J. McLaughlin. 2001. Urediniomycetes. pp. 37-55. In : D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin and P.A. Lemke., eds. *The Mycota*. Verlag, Berlin: Springer.
- 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 W.S. Weber. 2007. *Introduction to fungi*. New York: Cambridge University Press. 841 p.
- 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.
- Yun, Y.H., A.M. Minnis, Y.H. Kim, L.A. Castlebury and M.C. Aime. 2011. The rust genus *Frommeïlla* revisited: a later synonym of *Phragmidium* after all. *Mycologia* 103: 1451-163.

Table 1 Rust disease specimens collected from this study (2016-2019)

Common name	Scientific name	location	Lat.	Long.
Sorghum	<i>Sorghum bicolor</i>	Nakhoratchasima	15° 11' 40.0622"	101° 29' 42.5740"
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	Lopburi	14° 57' 26.8660"	101° 16' 21.0011"
Bamboo	<i>Bambusa vulgaris</i>	Lampang	18° 19' 33.7337"	99° 16' 31.8475"
Teak	<i>Tectona grandis</i>	Phrae	18° 01' 01.9"	99° 42' 55.8"
Guinea grass	<i>Megathyrsus maximus</i>	Nakhoratchasima	15° 8' 32.5187"	101° 50' 58.3782"
Bermuda grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Uttaradit	17° 34' 49.6"	100° 07' 08.1"
Maize	<i>Zea mays</i>	Uttaradit	70° 34' 49.7451"	100° 07' 8.1989"
Coffee	<i>Coffea robusta</i>	Chiang Rai	20° 5' 19.4812"	99° 58' 39.8915"
Blady grass	<i>Imperata cylindrica</i>	Chiang Rai	20° 3' 40.2543"	99° 57' 23.8213"
Grass	<i>Apluda sp.</i>	Uttaradit	17° 50' 14.3338"	100° 3' 20.2243"
Bermuda grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Uttaradit	17° 49' 31.9007"	100° 4' 31.9007"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Uttaradit	17° 49' 31.7298"	100° 4' 15.1078"
Golden shower	<i>Cassia fistula</i>	Phichit	16° 16' 37.2320"	100° 35' 57.2604"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Uttaradit	17° 50' 14.3629"	100° 3' 23.6889"
Sorghum	<i>Sorghum bicolor</i>	Nakhoratchasima	15° 6' 2.0426"	101° 25' 47.3486"
Weed	<i>Cynodon dactylon</i>	Uttaradit	17° 50' 14.3338"	100° 3' 20.2243"
Teak	<i>Tectona grandis</i>	Nakhoratchasima	15° 6' 2.0426"	101° 25' 42.3486"
Globe amaranth	<i>Gomphrena globosa</i>	Phayao	19° 5' 38.7834"	99° 54' 37.6888"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Phrae	18° 15' 12.4412"	100° 13' 41.4469"
Weed	<i>Cynodon dactylon</i>	Phrae	18° 15' 12.4413"	100° 13' 41.4469"
Wild sugarcane	<i>Saccharum spontaneum</i>	Phitsanulok	17° 42' 31.9007"	100° 4' 11.4627"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Phitsanulok	17° 50' 14.3629"	100° 3' 23.5859"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Chiang Rai	19° 39' 37.7013"	99° 32' 49.4195"
Globe amaranth	<i>Gomphrena globosa</i>	Chiang Mai	18° 57' 58.8930"	99° 14' 30.2139"
Maize	<i>Zea mays</i>	Chiang Mai	18° 56' 45.8935"	98° 58' 55.8608"
Soybean	<i>Glycine max</i>	Chiang Mai	18° 54' 20.6499"	99° 00' 42.0400"
Blady grass	<i>Imperata cylindrica</i>	Chiang Rai	19° 49' 28.8331"	99° 45' 39.8342"
Lemon Grass	<i>Cymbopogon citratus</i>	Chiang Rai	19° 46' 29.4117"	99° 39' 12.6582"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Chiang Rai	19° 46' 29.7841"	99° 39' 12.9850"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Chiang Rai	19° 46' 29.7841"	99° 39' 12.9850"
Bamboo	<i>Bambusa vulgaris</i>	Chiang Rai	19° 46' 32.0395"	99° 39' 8.2557"
Spanish needles	<i>Bidens biternata</i>	Chiang Rai	19° 46' 31.4483"	99° 39' 8.0433"
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	Chiang Rai	19° 46' 29.4112"	99° 39' 12.6582"
Grass	<i>Cynodon dactylon</i>	Chiang Rai	19° 49' 28.8331"	99° 45' 39.8342"



Figure 1 Rust disease specimens collected from this study (2016-2019)

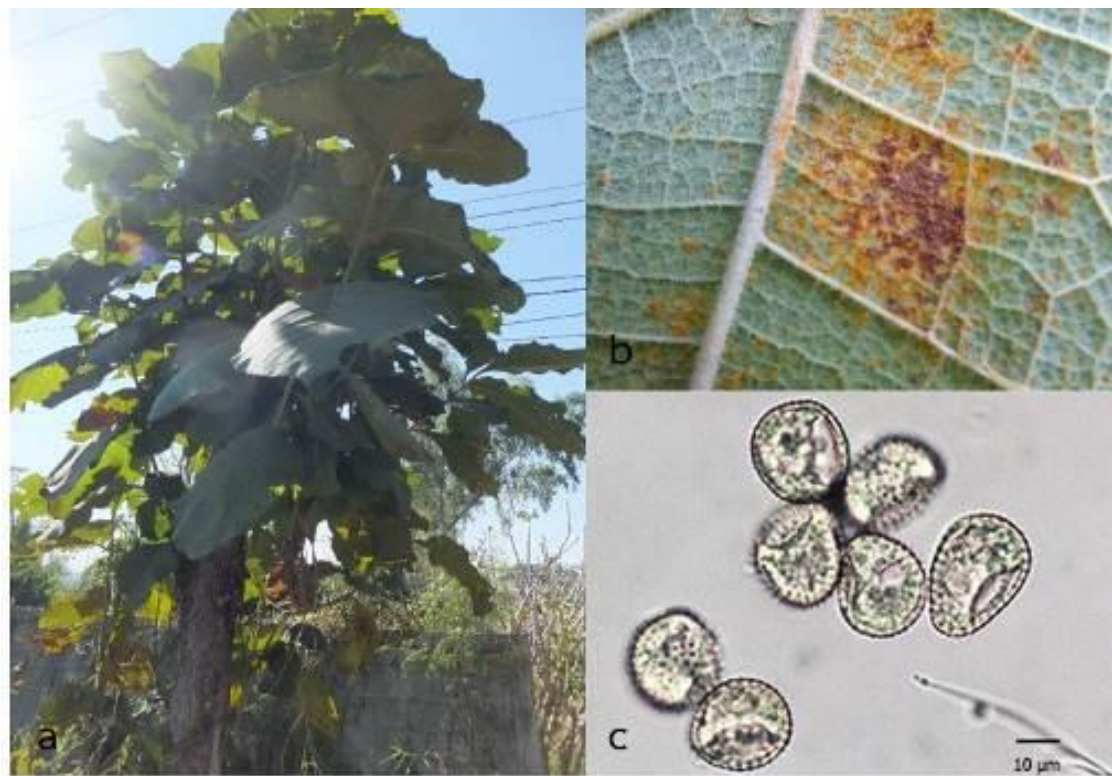


Figure 2 Rust disease symptom on *Tectona grandis* (a) sori on lower leaf
(b) urediniospores of *O. tectonae* (c)



Figure 3 Rust disease symptom on *Chrysanthemum* (a-d) teliospore of *P. horiana* (e)



Figure 4 Rust disease symptom on coffee and sori of *H. vastatrix*

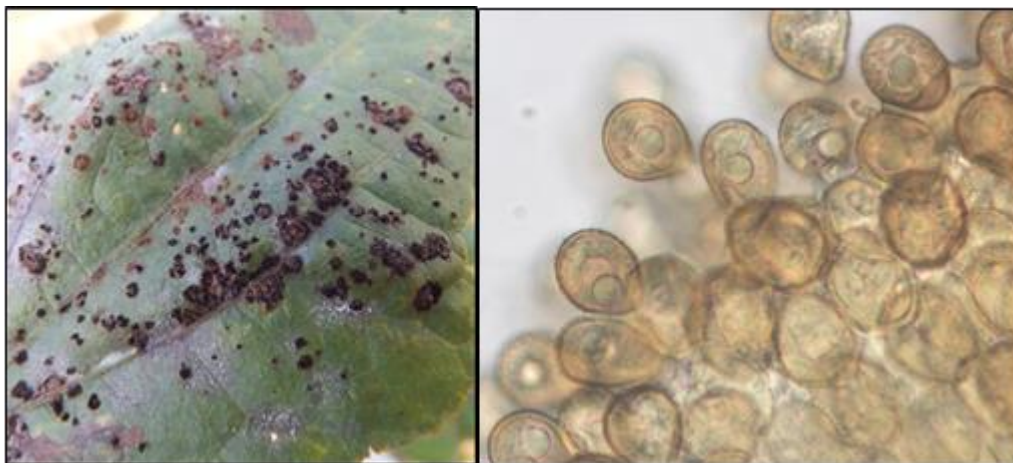


Figure 5 Aecia of rust on *P. vulgaris* and teliospore of *U. appendiculatus*



Figure 6 Rust disease symptom on *Glycine max*



Figure 7 Rust disease symptom on *Zea mays*

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกชนิดแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย
DNA Barcoding for Identification Spider Fauna in Genus *Latrodectus*

วิมลวรรณ โชติวงศ์^{1/} คมสัน หงษ์ทรี^{2/}

พงศกร สรรค์วิทยากุล^{3/} พิเชฐ เชาว์วัฒนวงศ์^{4/}

^{1/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}ศูนย์ศึกษาเรียนรู้ระบบนิเวศป่าชายเลนสิรินาถราชินี

^{3/}สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

^{4/}รักษาการผู้เชี่ยวชาญด้านศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Spider genus *Latrodectus* or widow spiders is an important in public health medical. These spiders have an unusually potent venom containing the neurotoxin latrotoxin and found in cassava plantations, which are economic crops that can be grown in every region and may harm to farmers. Unfortunately, species of this genus are notoriously difficult to identify using morphology. Molecular diagnostic tools provide valuable support for the rapid and accurate identification of morphologically indistinct widow spider species. DNA barcoding of the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COX1) gene could be employed to increase the accuracy of Spider genus *Latrodectus* identifications. The samples were collected from all regions of Thailand. A 652 bp portion of COX1 was sequenced from 58 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 three species of the widow spiders complex (*L. geometricus*, *L. thoracicus* and *L. tredecimguttatus*) 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 widow spiders sequences with other *Latrodectus* from origin country. Cox1 proved effective in resolving *L. geometricus* separate from *L. thoracicus*

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-07-60

กับ *L. tredecimguttatus* meanwhile *L. thoracicus* กับ *L. tredecimguttatus* are the same species. This study provides basic information on the number of species of spider genus *Latrodectus* present in Thailand. However, an understanding of the classification within the *Latrodectus* group will requires further study making use of additional genes, including the potentially informative ITS and ribosomal RNA.

Keywords: widow spiders, *Latrodectus*, DNA barcoding, mitochondrial DNA COI gene, molecular diagnostics

บทคัดย่อ

แมงมุมสกุล *Latrodectus* หรือแมงมุมแม่มาย (widow spider) เป็นแมงมุมที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขเนื่องจากเป็นกลุ่มแมงมุมที่มีพิษต่อระบบประสาทและพบในแปลงปลูกมันสำปะหลังซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่ปลูกได้ทุกภาค จึงอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกร แมงมุมกลุ่มนี้มีลักษณะโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ ตลอดจนสีสันบนลำตัวที่คล้ายกันหรือเหมือนกัน ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดแมงมุมโดยวิธีสัณฐานวิทยา ดังนั้นการใช้เทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดช่วยในการวินิจฉัยชนิด ทำให้ได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาคั้งนี้คือ การใช้ลักษณะทางพันธุกรรม หรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด จำแนกและยืนยันชนิดแมงมุมสกุล *Latrodectus* โดยเก็บตัวอย่างแมงมุมแม่มายจากทุกภูมิภาคของประเทศไทย และสกัด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนตำแหน่ง COX1 และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (standard nucleotide BLAST) พบแมงมุมสกุล *Latrodectus* ทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ *L. geometricus*, *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* และจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเพื่อช่วยยืนยันการจำแนกแมงมุมสกุล *Latrodectus* โดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของตำแหน่ง COX1 จาก 58 ตัวอย่าง ได้แก่ *L. geometricus* จำนวน 48 ตัวอย่าง *L. thoracicus* จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *L. tredecimguttatus* จำนวน 5 ตัวอย่าง นำไปวิเคราะห์ด้วย Neighbor Joining และ Maximum Likelihood พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน *L. geometricus* แยกออกมาจาก *L. thoracicus* กับ *L. tredecimguttatus* อย่างชัดเจน และความสัมพันธ์ภายในกลุ่ม *L. geometricus* มีลักษณะเป็น monophyletic ในขณะที่ *L. thoracicus* กับ *L. tredecimguttatus* เป็นแมงมุมชนิดเดียวกัน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาคั้งนี้สามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมแม่มาย *L. geometricus* มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากกลุ่ม *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาคั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของ แมงมุมสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย แต่การจำแนกชนิด ต้องมีการศึกษาต่อไปโดยเพิ่มข้อมูลของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์

คำหลัก: *Latrodectus* แมงมุมแม่มาย widow spider ดีเอ็นเอบาร์โค้ด พันธุกรรม

คำนำ

แมงมุมสกุล *Latrodectus* หรือแมงมุมแม่ม่าย (widow spider) จัดอยู่ในวงศ์ Theridiidae นับว่าเป็นแมงมุมที่มีความสำคัญทางด้านสาธารณสุขเนื่องจากเป็นกลุ่มแมงมุมที่มีพิษ พิษของแมงมุมแม่ม่ายมีชื่อเรียกเฉพาะว่า Latrotoxin มีผลหลักต่อระบบประสาท (neurotoxin) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยพิษจะทำให้เกิดช่องว่างบริเวณปลายเซลล์ประสาท ส่งผลให้แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ไหลเข้าสู่ปลายเซลล์ประสาทซึ่งเป็นกลไกให้เกิดการปล่อยสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ตลอดเวลา ทำให้เกิดการส่งกระแสประสาทอย่างต่อเนื่องและมากกว่าปกติ ทำให้กล้ามเนื้อเกร็งจนเป็นอัมพาต ซึ่งสาเหตุการเสียชีวิตเกิดจากกล้ามเนื้อกระบังลมและกล้ามเนื้อหัวใจหยุดทำงาน (Cristopher *et al.*, 2004; Shukla and Broome, 2007) แมงมุมแม่ม่ายเป็นกลุ่มแมงมุมที่มีการแพร่กระจายกว้างขวางทั่วโลก พบได้ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นทั้งบริเวณที่เป็นแผ่นดินใหญ่ และเกาะในมหาสมุทร (Shukla & Broome, 2007) หลายชนิดแพร่กระจายจากการติดไปกับภาชนะขนส่งสินค้าของมนุษย์ และส่วนใหญ่มักพบอาศัยอยู่ในแหล่งชุมชน ปัจจุบันทั่วโลกพบทั้งสิ้น 31 ชนิด (Platnick, 2014) โดยในทวีปเอเชียมีรายงานการพบ 4 ชนิด คือ *L. geometricus*, *L. erythromelas*, *L. hasselti* และ *L. elegans* (Schmidt and Klaas, 1991; Knoflach and van Harten, 2002; Yoshida, 2003) จากการสืบค้นเอกสารทางวิชาการ มีงานที่เกี่ยวข้องกับแมงมุมแม่ม่ายในประเทศไทย 2 เรื่อง เรื่องแรกเป็นงานวิจัยที่กล่าวถึงการพบแมงมุมแม่ม่ายสีน้ำตาล *L. geometricus* ในประเทศไทยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1987 (พ.ศ. 2530) หรือเมื่อ 26 ปีที่แล้วที่ระดับความสูง 1,500 เมตร บนดอยสุเทพที่จังหวัดเชียงใหม่ โดย Dr. Konrad Thaler (Knoflach and van Harten, 2002) และบทความวิชาการในวารสารสารศิริราชปีที่ 32 ฉบับที่ 11 ซึ่งตีพิมพ์ในปี พ.ศ. 2523 รายงานว่ามีผู้ป่วยถูกแมงมุมกัดที่จังหวัดขอนแก่น และคาดว่าเป็นชนิด *L. curacaviensis* (Sucharit, 1980) แต่การวินิจฉัยและจำแนกชนิดของแมงมุมไม่มีความถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธานแมงมุมเนื่องจากในบทความดังกล่าวกล่าวถึงแมงมุมที่มีลักษณะตัวสีน้ำตาลและมีขนบนลำตัวจำนวนมาก อาศัยอยู่บนพื้นดินและใช้เพียงความยาวของเขี้ยว (chelicera) ในการจำแนกชนิดแมงมุม แต่ลักษณะดังกล่าวแตกต่างจากลักษณะของแมงมุมแม่ม่ายอย่างสิ้นเชิงโดยแมงมุมแม่ม่ายสีน้ำตาลไม่มีขนบนลำตัวจำนวนมากและไม่ได้อาศัยอยู่บนพื้น และที่สำคัญความยาวของเขี้ยว (chelicera) ไม่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของแมงมุมได้ อย่างไรก็ตามเอกสารเหล่านี้ไม่ได้รายงานการพบแมงมุมแม่ม่ายอย่างเป็นทางการในประเทศไทย รวมถึงไม่มีตัวอย่างแมงมุมที่ใช้เป็นหลักฐานในการตรวจสอบเพื่อยืนยันชนิดดังนั้นข้อมูลดังกล่าวจึงไม่สามารถนำมาอ้างอิงหรือใช้ประโยชน์ได้

แมงมุมแม่ม่ายสกุล *Latrodectus* ได้แยกสายวิวัฒนาการมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน (monophyletic group) เพียงไม่กี่กลุ่ม โดยแบ่งเป็นสายวิวัฒนาการสองกลุ่มหลัก ๆ คือ กลุ่มสายวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ม่ายดำ (*Latrodectus mactans* clade) และกลุ่มสายวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ม่ายสีน้ำตาล (*Latrodectus geometricus* clade) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายชนิดที่ยังหาข้อสรุปไม่ได้ โดยในแต่ละกลุ่มสายวิวัฒนาการจะมีลักษณะโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ตลอดจนสีขนบนลำตัวที่คล้ายกันหรือเหมือนกัน และหลายชนิดในกลุ่มเดียวกันยังสามารถผสมพันธุ์ข้ามชนิดกันและให้ลูกที่เป็นหมันได้ ทำให้เกิดปัญหาในการจำแนกทางอนุกรมวิธานของแมงมุมกลุ่มนี้เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (complex species) (Garb *et al.*, 2004)

การจำแนกชนิดแมงมุมโดยใช้วิธีสัณฐานวิทยานั้นจะศึกษาแมงมุมระยะที่เป็นตัวเต็มวัยเท่านั้นและมักใช้เวลานาน ส่วนมากแมงมุมที่พบมักจะอยู่ในระยะตัวอ่อนทำให้มีปัญหาในการจำแนก

เนื่องจากอวัยวะเพศยังพัฒนาการไม่สมบูรณ์ทำให้วินิจฉัยชนิดผิด 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 ขวดดองตัวอย่างแมงมุมขนาดต่าง ๆ กัน กล่องพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กัน กระดาษทิชชู ปากคีบ ฟู่กัน ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ 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)

วิธีดำเนินการวิจัยในการเก็บตัวอย่างตัวอ่อนและตัวเต็มวัยแมงมุมแม่ข่ายเพื่อนำมาศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

1.1 การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมงมุมแม่ข่ายตามใต้โต๊ะ เก้าอี้ ใต้พื้นรถยนต์ แปลงมันสำปะหลัง และขอบชายป่า ทั้งช่วงเวลากลางวันและกลางคืนโดยสังเกตโยที่ใช้ในการดักเหยื่อ ทำการเก็บตัวอย่างแมงมุมโดยวิธีจับโดยตรงด้วยหลอดพลาสติกใส โดยจะเก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ 18 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ภาคเหนือได้แก่ ลำปาง น่าน แพร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ภาคกลางได้แก่ กรุงเทพมหานคร ชัยนาท เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ภาคตะวันออกได้แก่ ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตกได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ (Global Positioning System: GPS) โดยแบ่งเป็น พื้นที่ต่าง ๆ ดังนี้

- (1) แปลงผลไม้ พีชไร่
- (2) โกดังสินค้า

(3) พื้นที่ป่าธรรมชาติ เช่น สวนพฤกษศาสตร์ อุทยานแห่งชาติ
รายละเอียดจังหวัดที่เป็นตัวแทนพื้นที่ที่ต้องการไปเก็บตัวอย่างแมงมุม

ปี 2560 สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 2 ภาคดังนี้

- (1) ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสงคราม สมุทรปราการ นนทบุรี อยุธยา สระบุรี
กำแพงเพชร
- (2) ภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ตาก และประจวบคีรีขันธ์

ปี 2561 สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 2 ภาคดังนี้

- (1) ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดสระแก้ว ปราจีนบุรี ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด
- (2) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด นครราชสีมา ขอนแก่น เลย หนองคาย
หนองบัวลำภู

ปี 2562 สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างจาก 2 ภาคดังนี้

- (1) ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเพชรบูรณ์ พิษณุโลก น่าน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน แพร่ ลำปาง
และลำพูน
- (2) ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พังงา พัทลุง ตรัง และ
สงขลา

1.2 นำตัวอย่างที่ได้มาฆ่าด้วยขดน็อกแมลงที่บรรจุด้วยสารเอทิลอะซิเตต จากนั้นเก็บรักษา
ตัวอย่างแมงมุมในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 95% เพื่อนำไปศึกษาดีเอ็นเอ สําหรับตัวอย่างที่
ต้องการเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์ให้เก็บรักษาในหลอดแก้วที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75%

1.3 บันทึกชื่อแมงมุม วันที่จับ สถานที่จับ ชื่อผู้เก็บ ลงในป้ายกระดาษขาวแผ่นเล็ก ๆ แล้วใส่
ลงในหลอดแก้วที่ต้องแมงมุม

1.4 เก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมที่ศึกษาดีเอ็นเอไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
เพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอและนำไปใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน (ดำเนินการปี 2560-2561)

- วิธีการเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างออกจากหลอดแก้วโดยใช้ฟู่กันเขี่ยตัวอย่างให้ขึ้นมาด้านบนของหลอดแก้ว ใช้คีมคีบ
ตัวอย่างออกมาและใช้เข็มเขี่ยเขี่ยขาแมงมุมให้กางออก วางตัวอย่างไว้ในจานแก้วที่มีซิลิกาเจลสี
ขาวและถูกแช่ด้วยแอลกอฮอล์ 95% ให้เต็ม จากนั้นนำไปวางไว้ใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป
รุ่น Olympus SZH-ILLD stereomicroscope สําหรับการเตรียมอวัยวะเพศเมีย (epigynum) จะ
ใช้เข็มเขี่ยเจาะรอบ ๆ อวัยวะเพศ จากนั้นจึงดึง spermathecae และ copulatory duct ออกมาและ
นำไปแช่ในโปรตีนเนสเค (proteinase K) ประมาณ 3-5 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ต้องการ
ออกไป จากนั้นนำไปล้างในน้ำสะอาด นำ spermathecae และ copulatory duct ใส่ในหลอดแก้ว
ขนาดเล็กแล้วจึงนำกลับไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม สําหรับการเตรียม pedipalps ให้ดึงออกทางด้านซ้าย
ของตัวแมงมุมใส่จานแก้วที่มีแอลกอฮอล์ 75% จากนั้นนำ 10% KOH มาต้มที่อุณหภูมิ 60°C
ประมาณ 5-10 นาที และนำมาเทลงในจานแก้วที่มี pedipalp ให้ท่วมตัวอย่างโดยการเทแอลกอฮอล์
75% ทิ้งไปก่อน แช่จนกระทั่งอวัยวะเพศผู้ขยายตัวออก จึงนำไปศึกษาดูรายละเอียดต่าง ๆ ใต้กล้อง
จุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป เมื่อจำแนกชนิดเสร็จจึงนำ pedipalp ใส่ในหลอดแก้วขนาดเล็กและนำ
กลับไปแช่ในขวดตัวอย่างเดิม

- การจำแนกชนิด

นำตัวอย่างแมงมุม อวัยวะเพศเมีย และ อวัยวะเพศผู้ มาจำแนกชนิดด้วยคู่มือวินิจฉัยการจำแนกชนิดและจากตำราต่าง ๆ โดยเฉพาะเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ Yoshida (2003, 2009), Ono (2002), Song *et al.* (1999) จากนั้นบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน วัดความยาวของทั้งลำตัว ความยาวและความกว้างของ ส่วนหัวรวมกับส่วนอก (carapace) ความยาวและความกว้างของ ส่วนท้อง (abdomen) ความยาวของขาในแต่ละปล้อง ได้แก่ ปล้องที่ 3 (femur), ปล้องที่ 4 (patella), ปล้องที่ 5 (tibia), ปล้องที่ 6 (metatarsus), ปล้องที่ 7 (tarsus) บันทึกรูปและบรรยายลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธาน เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

3. การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ดำเนินการปี 2561-2562)

2.1 นำตัวอย่างแมงมุมแม่ข่ายที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตามคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit; Favorgen, Taiwan) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยใช้คีมคีบดึงขาด้านขวาของแมงมุมจำนวนหนึ่งข้าง (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (ตัวอย่างแมงมุมที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ เพื่อเป็น Voucher specimen) เติม FATG1 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และ Protinase K Solution (0.3g/ml) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ปิดหลอดให้สนิท พร้อมทั้งพันด้วยพาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติม RNase A (0.5g/ml) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร แล้วเติม FATG2 buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 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 และชะล้างอีเอ็นเอด้วยสารละลาย Elution Buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอ ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่มือวิธีดังนี้

Primer Name	Sequence	Base
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	26

แมงมุมแม่ม้าย *Latrodectus geometricus* เตรียมปฏิกิริยา PCR ปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

		1 reaction (ไมโครลิตร)
Green mastermix		26
ddH ₂ O		20
Primer Forward	LCO1490	1
Primer Reverse	HCO2198	1
DNA		2
Total		50

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

2.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยหยดผลิตภัณฑ์ PCR ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.2% และให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ 400 mp เป็นเวลา 45 นาที

2.4 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์ PCR ของแมงมุมแม่ม้ายที่ได้ไปทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

2.5 นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *Cox1* ที่ผ่านการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมแม่ม้ายที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (assemble) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในแมงมุมแม่ม้ายแต่ละชนิด ด้วยโปรแกรม ClustalW (Thomson *et al.*, 1994) ศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ภายในและระหว่างชนิด ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor Joining (NJ) และ Maximum Likelihood (ML) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007)

2.6 บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดนำผลที่ได้มาตรวจสอบชนิด กับฐานข้อมูล Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ รวบรวมฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ 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 รวมทั้งนำไปใช้อ้างอิงทางวิชาการสำหรับงานอนุกรมวิธานและงานกีฏวิทยาอื่น ๆ สำหรับดีเอ็นเอที่สกัด

ได้ จะจัดเก็บไว้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมงมุม กลุ่มงานวิจัยไร และแมงมุม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- 2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมงมุมแม่ข่ายที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี สถานที่เก็บตัวอย่างแมงมุมแม่ข่ายแต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง
- 3) ชื่อวิทยาศาสตร์ของแมงมุมแม่ข่าย เขตการแพร่กระจาย และแนวทางการวินิจฉัยชนิด

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2559 - กันยายน 2562

สถานที่ : 1) พื้นที่ 18 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ภาคเหนือได้แก่ ลำปาง น่าน แพร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ภาคกลางได้แก่ กรุงเทพมหานคร ชัยนาท เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ภาคตะวันออกได้แก่ ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตกได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมแม่ข่าย

ผลจากการสำรวจชนิดแมงมุมแม่ข่ายในประเทศไทยตามได้โต๊ะ เก้าอี้ ใต้พื้นรถยนต์ แปลงมันสำปะหลัง และขอบชายป่า (Table 1) ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562 ในพื้นที่ 18 จังหวัด พบแมงมุมแม่ข่ายในประเทศไทย จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Latrodectus geometricus* C. L. Koch, 1841 และ *Latrodectus elegans* Thorell, 1898 จำนวน 205 ตัวอย่าง โดยแมงมุมทั้ง 2 ชนิดมีแหล่งที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกัน *L. geometricus* อาศัยในแหล่งชุมชนและใกล้ชิดกับคนและมีการกระจายตัวทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ซึ่งแตกต่างจาก *L. elegans* ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ป่าห่างไกลจากแหล่งชุมชนและมีการกระจายตัวในภาคกลาง ตะวันออก ตะวันออกเฉียงเหนือ และตะวันตกของประเทศไทย (Figure 1)

จากการสำรวจในบางพื้นที่อย่างต่อเนื่องพบว่าประชากรของแมงมุมแม่ข่ายทั้งสองชนิดลดลงอย่างเห็นได้ชัดจากพื้นที่เดิม โดยสาเหตุเกิดมาจากแหล่งอาศัยเดิมได้มีการเปลี่ยนแปลงไป การถูกแตนเบียนในวงศ์ Eurytomidae เบียดเบียน นอกจากนี้ยังพบว่าแมงมุมขยายว Pholcidae และแมงมุม Scytodidae (Figure 6) เป็นศัตรูธรรมชาติที่ช่วยควบคุมปริมาณแมงมุมแม่ข่ายสีน้ำตาล อีกทั้งแมงมุมแม่ข่ายมีพฤติกรรมการล่าพวกเดียวกันเอง (cannibalism) จึงทำให้จำนวนประชากรลดลงอย่างเห็นได้ชัด เที่ยงไปกว่านี้จากข่าวสารที่มีความคลาดเคลื่อนเกี่ยวกับพิษของแมงมุมแม่ข่ายสีน้ำตาลในสื่อออนไลน์ และช่องข่าวต่าง ๆ ทำให้ประชาชนมีการตื่นตระหนกและหวาดกลัวต่อแมงมุมทุกชนิดจึงฉีดยาพิษสารเคมีเพื่อทำลายแมงมุมทุกชนิดที่พบ จึงทำให้ปัจจุบันแมงมุมแม่ข่ายอยู่ในสถานะที่พบได้ยาก ยิ่งไปกว่านี้แมงมุมแม่ข่ายหลังเพลิงเป็นแมงมุมที่มีนิสัยชอบสันโดษ มีแหล่งอาศัยที่ไม่เฉพาะเจาะจง และมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้น้อยจึงทำให้มีโอกาสที่จะสูญพันธุ์

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

จากการศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมแม่ข่ายในประเทศไทยเพื่อจำแนกชนิด ตัวอย่างแมงมุมทั้งหมดที่เก็บได้ในห้องปฏิบัติการโดยการใช้ลักษณะที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น ลักษณะการจัดเรียงของตา ลักษณะของ endite ลักษณะของ fovea ระยะห่างระหว่างตา ลักษณะ sternum labium maxillae ความยาวของขา ลักษณะรูปร่างและลวดลายบนด้านหลังของส่วนท้อง แอบสีส้มหรือสีแดงรูปร่างคล้ายนาฬิกาทรายบริเวณด้านล่างของส่วนท้อง ขนแข็งที่มีลักษณะโค้งงอเป็นพื่นเลื้อยเรียงต่อกันคล้ายซี่หวีที่บริเวณขาปล้องสุดท้าย (tarsus) ของขาคู่ที่ 4 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย พบแมงมุมในสกุล *Latrodectus* ทั้งหมด 2 ชนิดสามารถจำแนกชนิดได้ 2 ชนิด ได้แก่ *Latrodectus geometricus* C. L. Koch, 1841 และ *Latrodectus elegans* Thorell, 1898 จากการศึกษาโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ของ *L. geometricus* พบว่า spermatheca วางขนานชิดกัน กระเปาะส่วนหน้า (anterior lobes) และกระเปาะส่วนท้าย (posterior lobes) มีขนาดเท่ากัน ส่วน copulatory duct ขดเป็นวงจำนวน 4 วง สัมพันธ์กับวงขดของ embolus ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่มี 4 วงเท่ากัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Garb *et al.* (2004) ส่วน *L. elegans* พบว่า spermatheca ที่กระเปาะส่วนหน้า (anterior lobes) อยู่ในตำแหน่งห่างกัน และกระเปาะส่วนท้ายอยู่ในตำแหน่งชิดกัน (v – shape) กระเปาะส่วนหน้าและส่วนท้ายมีขนาดแตกต่างกันชัดเจน ส่วน copulatory duct ขดเป็นวงจำนวน 3 วง สัมพันธ์กับลักษณะวงขดของ embolus ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่มี 3 วงเท่ากัน (Lotz, 1994; Levi, 1983)

เนื่องด้วยกลุ่มแมงมุมแม่ข่ายหลายชนิดมีสีสันและลักษณะภายนอกที่ใกล้เคียงกัน (sibling species) และยังมีอีกหลายตัวอย่างที่มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาจำกัดระหว่าง *L. hasselti* และ *L. elegans* จึงทำการเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ และศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดต่อไป

สำหรับคู่มือการวินิจฉัยชนิดที่ใช้ในการจำแนกและลักษณะอนุกรมวิธานของแมงมุมแม่ข่ายในสกุล *Latrodectus* แต่ละชนิดมีดังนี้

Key to species of *Latrodectus* in Thailand

Female:

1. Dorsum of abdomen have symmetrical markings consist loop-like brown spots, Distinct orange or dark brown hourglass marking on the ventral surface present. 3(E).....2
 - Abdomen black with bright red pattern on dorsum taking the shape of streaks, posterior half chevron shape extending laterally and on anterior half two curved bands (5D.); ventrally an hour-glass mark.....2
2. Seminal receptacles pararell (2 B) , Copulatory ducts coiled, dumb-bellshaped spermathecae paired, spermathecae ducts with 4 loops (2B).....*geometricus*

- Copulatory ducts coiled three times around the seminal receptacles (4B)..... *elegans*

Male:

1. Dorsum of abdomen have symmetrical markings consist loop-like brown spots similar with female (3F).....2
- Dorsal region of the abdomen is transverse irregular bars by white and black, longitudinal orange patch at the posterior dorsal (5C).....2
2. Embolus with 4 loops (2D)..... *geometricus*
- Embolus with 3 loops (4C).....*elegans*

วงศ์ Theridiidae Sundevall, 1833 (แมงมุมขาหวี, comb-footed or cobweb spiders)

แมงมุมขาหวี เป็นแมงมุมที่มีความหลากหลายทางด้านสัณฐานวิทยา ประกอบด้วยสมาชิกที่ถูกจำแนกชนิดเรียบร้อยแล้วจำนวน 124 สกุล 2,514 ชนิด ซึ่งแต่ละสกุลจะมีรูปร่างลักษณะที่ผันแปรแตกต่างกันเช่น สกุล *Argyrodes* จะมีส่วนท้องที่ยาวมากกว่าปกติซึ่งถ้ามองด้านข้างจะเห็นเป็นลักษณะคล้ายรูปสามเหลี่ยม สกุล *Ariamnes* ส่วนท้องมีรูปร่างลักษณะคล้ายเส้น สกุล *Prorondida* จะมีหนามยาวรอบ ๆ บริเวณส่วนท้อง โดยทั่วไปแมงมุมมีนิสัยแยกกันอยู่เนื่องจากถ้าอยู่รวมกันจะมีพฤติกรรมกินกันเอง (cannibalism) แต่แมงมุมขาหวีส่วนใหญ่เป็นแมงมุมที่อาศัยอยู่รวมกันเป็นสังคม (Avilés, 1997) เช่น *Anelosimus eximius* (Keyserling, 1884) จะอยู่รวมกันเป็นพันตัวและช่วยกันสร้างรังขนาดใหญ่ (Agnarsson, 2002) และ เป็นที่รู้จักอย่างดี ว่าสกุล *Argyrodes* ชอบอาศัยอยู่ร่วมกับแมงมุมชนิดอื่นที่เป็นเจ้าของรังแบบลักษณะ Kleptoparasitic ซึ่งเป็นรูปแบบปฏิสัมพันธ์ที่ผิดปกติโดยการที่อาศัยอยู่ร่วมกับเจ้าของรังและขโมยพวกเศษซากอาหารจากเจ้าของรัง (Elgar, 1993) ส่วนใหญ่แมงมุมวงศ์นี้พบอาศัยอยู่ในทรงพุ่มของต้นไม้ ตามใบไม้ บางชนิดอาศัยอยู่ใต้ใบไม้โดยสร้างเส้นใยอยู่ ๆ กระจายคลุมตัว เช่น สกุล *Chryso* สำหรับสกุล *Nihonhimea* จะนำไปไม้แห้งมาฉีกแล้วสร้างเป็นรังนอนและสร้างเส้นใย 3 มิติเพื่อดักเหยื่อ

สกุล *Latrodectus* Walckenaer, 1805

N.B.: ถูกพิจารณาว่าเป็น senior synonym ของ *Chacoca* Badcock, 1932 โดย Levi, 1959

ตัวอย่างต้นแบบ (Type species): *L. 13decimguttatus* Walckenaer, 1805

ลักษณะประจำสกุล (Generic description):

มีการจัดเรียงตาเป็น 2 แถวโดยตาด้านข้างถูกแยกออกมาจากตากกลางคู่หน้าและตาด้านหลังอย่างชัดเจน ไม่มีฟันบน chelicerae แผ่นแข็งด้านบน (carapace) มีลักษณะรูปร่างคล้ายลูกแพร์ fovea มีลักษณะเป็นหลุมตามด้านขวาง ท้องของเพศเมียมีลักษณะเป็นรูปทรงกลมป่อง ส่วนเพศผู้มีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมผืนผ้า สีและลวดลายของส่วนท้องมีความผันแปรตั้งแต่สีครีม แดง ไปจนกระทั่งสีดำ ส่วนเครื่องหมายที่มีลักษณะคล้ายรูปนาฬิกาทรายสีส้มที่อยู่ด้านใต้ของส่วนท้องมักจะปรากฏให้เห็น เพศเมียมีขนาดใหญ่มากโดยมีขนาดลำตัวเกือบถึง 1 เซนติเมตร เพศผู้มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมียประมาณ 4-5 เท่า บริเวณขาปล้องสุดท้าย (tarsus) ของขาคู่ที่ 4 มีขนแข็งที่มีลักษณะโค้งงอเป็นฟัน

เลื้อยเรียงต่อกันเป็นแถวเห็นชัดเจนคล้ายซี่หวี สร้างใยไม่เป็นระเบียบเป็นลักษณะ 3 มิติเพื่อทำรัง แต่สร้าง gumfoot lines (Figure 3B) เพื่อเป็นใยดักเหยื่อในเวลากลางคืน ขนาด spinneret คู่กลางมีขนาดเล็กกว่าคู่หน้าและคู่หลังมาก ขาคู่ที่ 1 และ 4 ยาวมากกว่าคู่ที่ 2 และ 3 และมี cololus ขนาดใหญ่

Latrodectus geometricus C.L. Koch, 1841 (Figure 3E, F)

ตัวอย่างต้นแบบ (Holotype): ปัจจุบันเก็บไว้ที่ Museum für Naturkunde, Berlin (ZMB) ประเทศเยอรมัน

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Koch ในปี 1841 และพบแพร่กระจายที่ Vaterland ประเทศนอร์เวย์ อเมริกาใต้ และโคลัมเบีย ต่อมาปี 1875 Thorell ได้พบตัวอย่างที่ประเทศแอฟริกา Karsch (1878) พบตัวอย่างที่แอฟริกาได้จำแนกชนิดผิดและตั้งชื่อว่า *Theridium zickzack* ในปี Keyserling รายงานเพิ่มเติมว่าแมงมุมชนิดนี้แพร่กระจายไปยังแถบประเทศเขตอบอุ่นและประเทศอเมริกา จนกระทั่ง Badcock (1932) ได้จำแนกชนิดผิดโดยเขาได้คิดแมงมุมที่พบเป็น new species โดยเขาได้ตั้งชื่อ genus และ species ใหม่เป็น *Chacoca distincta* โดยให้เหตุผลว่าสกุล *Chacoca* แตกต่างจากสกุล *Latrodectus* ตรงที่ตาข้างแยกออกจากตาคู่กลางและคู่หลังอย่างชัดเจน แต่เมื่อดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียพบว่า เป็นชนิดเดียวกัน Smithers, 1944 ได้พิจารณาทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพบว่า *L. concinnus* ที่ถูกตั้งขึ้นโดย Pickard-Cambridge ในปี 1904 เป็น synonym ของ *L. geometricus* ต่อมา Caporiacco, 1949 ได้จำแนกชนิดผิดและคิดว่า เป็น new species จึงตั้งชื่อ *L. geometricus modestus*, *L. geometricus subalbicans* และ *L. geometricus obscuratus*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย: เพศผู้ 2.56 มิลลิเมตร เพศเมีย 7.60 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): สีน้ำตาลเข้มถึงดำ มีความยาวมากกว่าความกว้าง แผ่นแข็งด้านบน (carapace) มีลักษณะรูปร่างคล้ายลูกแพร์ fovea มีลักษณะเป็นหลุมตามด้านขวาง ส่วนหัวแคบกว่าส่วนอก มี 8 ตา เรียง 2 แถว (4-4) แบบ recurve โดยแถวหน้าเรียงโค้งมากกว่าแถวหลัง ระยะห่างระหว่างตาข้างด้านหน้ากับตากลางคู่หน้ามีขนาดเท่ากัน ตาข้างของตาแถวหลังแยกห่างออกจากตาคู่กลางแถวหลังอย่างเด่นชัด sternum สีน้ำตาลอ่อนปกคลุมด้วยขน labium ยาวมากกว่าด้านกว้าง maxillae ยาวมากกว่าด้านกว้าง เห็น scapulae ชัดเจน chelicerae สีน้ำตาลเหลืองมีขนาดเล็ก ไม่มีฟันบน chelicerae ขามีสีน้ำตาลอ่อนบริเวณข้อต่อระหว่างปล้องขามีสีดำเข้ม ความยาวขา 4 ขา เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 4, 2, 3

ท้อง (Abdomen): สีพื้นของส่วนท้อง (abdomen) มีความหลากหลายสูงตั้งแต่สีขาวสว่าง สีเทา สีน้ำตาลอ่อน สีน้ำตาลเข้ม ไปจนถึงสีดำ กึ่งกลางด้านบนของส่วนท้องมีจุดรูปวงกลมหรือสามเหลี่ยมสีส้ม แดง หรือสีน้ำตาลเข้ม ล้อมรอบด้วยขอบสีขาว เรียงต่อกันเป็นแถว 3 จุด เชื่อมต่อกันด้วยแถบสีเดียวกันพาดไปทางด้านท้ายลำตัว สองข้างของแนวกลางตัวด้านบนส่วนท้อง มีจุดสีดำ เรียงต่อกันข้างละ 4 จุด เห็นชัดในแมงมุมขนาดเล็ก ส่วนแมงมุมที่มีอายุมากจะเห็นชัดเพียงข้างละ 3 จุด แต่ละจุดมีแถบสีอ่อนเชื่อมต่อกันพาดไปด้านข้างของส่วนท้องเกิดเป็นลวดลายสีอ่อนสลับเข้มตัดกับสีพื้นของส่วนท้อง ด้านล่างของส่วนท้องมีแถบสีส้มหรือสีแดงรูปร่างคล้ายนาฬิกาทรายเป็นลักษณะเด่น

(ภาพที่ 3D) ส่วนของอวัยวะชักใย (spinnerets) ล้อมรอบด้วยแถบสีเข้มเรียงสลับกับสีอ่อนอย่างละ 6 แถบ โครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์มีส่วนของ spermatheca รูปร่างคล้ายดัมเบล 1 คู่ วางชิดขนานกัน (parallel spermatheca) (Figure 2B) โดย spermatheca แต่ละอัน มีกระเปาะส่วนหน้า (anterior lobes) และกระเปาะส่วนท้าย (posterior lobes) ที่มีขนาดเท่ากัน ส่วน spermatheca เชื่อมต่อกับท่อ copulatory ducts ที่ขัดซ้อนกันจำนวนข้างละ 4 วง (Figure 2B) สำหรับโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะอยู่บริเวณด้านหน้าสุดของตัวเต็มวัยเพศผู้ จะมีส่วนของขาแปลง (palp) 1 คู่ ทำหน้าที่สำหรับเก็บน้ำเชื้อชั่วคราวและส่งถ่ายน้ำเชื้อต่อไปยังเพศเมีย โดยบนขาแปลงแต่ละข้าง มีส่วนของ embolus ที่ยาวและพันเป็นเกลียวขดเป็นวงซ้อนกัน จำนวน 4 วง (Figure 2C และ D) และมี colulus ขนาดใหญ่

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): แอฟริกา อเมริกา โปแลนด์ ตะวันออกกลาง ปากีสถาน อินเดีย ไทย ญี่ปุ่น ปาปัวนิวกินี ออสเตรเลีย และฮาวาย ในประเทศไทยสามารถพบทั่วทุกภาค ภาคเหนือได้แก่ ลำปาง น่าน แพร่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ภาคกลางได้แก่ กรุงเทพมหานคร นครปฐม เพชรบูรณ์ พิษณุโลก ภาคตะวันออกได้แก่ ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ภาคตะวันตกได้แก่ กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี ภาคใต้ได้แก่ สุราษฎร์ธานี

Latrodectus elegans Thorell, 1898 (Figure 5C และ D)

ประวัติทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic history):

ค้นพบครั้งแรกโดย Thorell ในปี 1898 บริเวณภูเขา Carin Chebà ประเทศพม่า ต่อมาในปี 1909 Simon ได้พบตัวอย่างที่ ฮานอย ประเทศเวียดนามแต่เนื่องจากตัวอย่างที่พบมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับ *L. hasselti* จากประเทศออสเตรเลีย และใกล้เคียงกับ *L. elegans* ดังนั้นจึงตัดสินใจตั้งชื่อว่า *Latrodectus hasselti elegans* ในปี 1998 Zhu ได้จำแนกชนิดผิดโดยได้ตั้งชื่อว่าเป็น *L. mactans* ต่อมา Song, Zhu and Chen, 1999 ได้จำแนกชนิดผิดโดยได้ตั้งชื่อว่าเป็น *L. mactans* ปี 2002 ได้รายงานพบ *L. elegans* ในประเทศญี่ปุ่นโดย Ono ต่อมา Kananbala, et al., 2012 รายงานการพบ *L. elegans* ครั้งแรกที่หมู่บ้าน Thawai เมือง Ukhrul รัฐ Manipur ประเทศอินเดีย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Description)

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย : เพศผู้ 2.28 มิลลิเมตร เพศเมีย 7.22 มิลลิเมตร

หัวและอก (Carapace): Carapace ถูกปกคลุมด้วยขนสั้น ๆ สีดำกระจายตัวแบบไม่สม่ำเสมอ มีความยาวมากกว่าความกว้าง แผ่นแข็งด้านบน (carapace) มีลักษณะรูปร่างคล้ายลูกแพร์ fovea มีลักษณะเป็นหลุมตามด้านขวาง ส่วนหัวแคบกว่าส่วนอก มี 8 ตา เรียง 2 แถว (4-4) แบบ recurve โดยแถวหน้าเรียงโค้งมากกว่าแถวหลัง ระยะห่างระหว่างตาข้างด้านหน้ากับตากลางคู่หน้ามีขนาดเท่ากัน ตาข้างของตาแถวหลังแยกห่างออกจากตาคู่กลางแถวหลังอย่างเด่นชัด sternum สีน้ำตาลอ่อนปกคลุมด้วยขน labium ยาวมากกว่าด้านกว้าง maxillae ยาวมากกว่าด้านกว้าง เห็น scapulae ชัดเจน chelicerae สีน้ำตาลเหลืองมีขนาดเล็ก ไม่มีฟันบน chelicerae ส่วนขาไม่มีสีดำเข้ม ความยาวขา 4 ขา เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 4, 2, 3

ท้อง (Abdomen): สีพื้นของส่วนท้อง (abdomen) มีสีดำสนิท ด้านบนของส่วนท้องมีแถบสีแดงหรือสีส้มสตัดขวางจากข้างลำตัวด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งจำนวน 4 แถบ โดยแถบสีที่สองถึงสี่ด้านท้ายตัวเชื่อมต่อกัน (Figure 5A, D) แถบสีดังกล่าวมีรูปร่างคล้ายเปลวเพลิง สำหรับเพศผู้ส่วนท้อง

มีสีขาวสลัปดาห์ ตอนท้ายด้านบนส่วนหลังมีแถบสีแดง ด้านล่างของส่วนท้องมีแถบสีแดงรูปร่างคล้ายนาฬิกาทรายซึ่งบางพื้นที่ไม่พบแถบสีแดงนี้ โครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์มีส่วนของ spermatheca รูปร่างคล้ายดัมเบล 1 คู่ วางตัวในลักษณะที่กระเปาะส่วนหน้า (anterior lobes) อยู่ห่างกัน และกระเปาะส่วนท้าย (posterior lobes) อยู่ชิดกัน มองดูคล้ายตัววี (V-shaped spermatheca) โดยกระเปาะส่วนหน้า (anterior lobes) มีขนาดใหญ่กว่ากระเปาะส่วนท้าย (posterior lobes) อย่างชัดเจน ส่วน spermatheca เชื่อมต่อกับท่อ copulatory ducts ที่ขัดซ้อนกันจำนวนข้างละ 3 วง (Figure 4B)

สำหรับโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะอยู่บริเวณด้านหน้าสุดของตัวเต็มวัยเพศผู้ จะมีส่วนของขาแปลง (palp) 1 คู่ ทำหน้าที่สำหรับเก็บน้ำเชื้อชั่วคราวและส่งถ่ายน้ำเชื้อต่อไปยังเพศเมีย โดยบนขาแปลงแต่ละข้าง มีส่วนของ embolus ที่ยาวและพันเป็นเกลียวขดเป็นวงซ้อนกัน จำนวน 3 วง (Figure 4C) และมี colulus ขนาดใหญ่

เขตการแพร่กระจาย (Distribution): อินเดีย พม่า จีน และญี่ปุ่น สำหรับในประเทศไทยพบที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ฉะเชิงเทรา ขอนแก่น อุบลราชธานี ลพบุรี ชลบุรี และชัยนาท

3. การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การศึกษาค้างนี้ทำการสกัดดีเอ็นเอของแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* 100 ตัวอย่าง *L. elegans* 30 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน COX1 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* จำนวน 48 ตัวอย่าง *L. thoracicus* จำนวน 5 ตัวอย่าง และ *L. tredecimguttatus* จำนวน 5 ตัวอย่าง บันทึกผลนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode (ภาคผนวกที่ 1) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างแมงมุมแม่ข่ายที่ทำการศึกษามาเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมแม่ข่ายที่รายงานในฐานข้อมูลสากล คือ Gen Bank เพื่อเป็นการยืนยันความถูกต้องของดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมงมุมแม่ข่ายที่ทำการศึกษามีความคล้ายคลึงกับฐานข้อมูลสูงถึง 99 - 100%

จากการศึกษาค้างนี้พบว่าแมงมุมแม่ข่ายบางตัวอย่างเมื่อนำ 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

C1N2191 CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC (Simon *et al.*, 1994)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus*

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* เพื่อยืนยันข้อมูลการจัดจำแนกชนิด โดยทำการวิเคราะห์ sequences ของตำแหน่ง COX1 จาก 58 ตัวอย่าง ได้แก่ *L. geometricus* จำนวน 48 ตัวอย่าง และ *L. elegans* จำนวน 10 ตัวอย่าง และสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COX1 ของแมงมุมแม่ข่าย *Steatoda triangulosa* จำนวน 1 ชนิด เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน COX1 ของ *L. geometricus* จาก อาร์เจนตินา ฟลอริดา และแอฟริกาใต้ ซึ่งเป็นแหล่งที่พบแมงมุมแม่ข่ายสีน้ำตาลครั้งแรกร่วมในการวิเคราะห์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย Neighbor Joining (NJ) และ Maximum Likelihood (ML) พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้งสองวิธีการมีผลที่สอดคล้องกัน (Figure 8-9) โดยแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* ได้แยกกลุ่มออกมาจาก

L. thoracicus และ *L. tredecimguttatus* อย่างชัดเจน และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลุ่มแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* พบว่าความสัมพันธ์ภายในกลุ่มมีลักษณะเป็น monophyletic ส่วนกลุ่ม *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่เหมือนกันนั่นคือเป็นชนิดเดียวกัน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาสามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* สามารถจัดจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ แต่การจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มต้องเพิ่มข้อมูลของดีเอ็นเอของยีนตำแหน่งอื่นมาร่วมวิเคราะห์ ซึ่งยีนตำแหน่ง COX1 สามารถจำแนกได้เพียงความแตกต่างในระดับกลุ่มของ *L. geometricus* *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* เท่านั้น อย่างไรก็ตามข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นของจำนวนชนิดของแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย แต่การยืนยันชนิดหรือจัดจำแนกชนิดภายในกลุ่มของ *Latrodectus* complex นั้นต้องมีการศึกษาต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยตามใต้โต๊ะ เก้าอี้ ใต้พื้นรถยนต์ แปลงมันสำปะหลัง และขอบชายป่า ทั้งช่วงเวลากลางวันและกลางคืนโดยสังเกตโดยใช้ในการดักเหยื่อ จากพื้นที่ภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ พบแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* จำนวน 205 ตัวอย่าง และในการจำแนกทางอนุกรมวิธานโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบแมงมุมแม่ข่าย จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *L. geometricus* และ *L. elegans* จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในแอลกอฮอล์ 95% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอ ทำการสกัดดีเอ็นเอและพีซีอาร์ บริเวณยีน COX1 ได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* จำนวน 48 ตัวอย่าง และ *L. thoracicus* จำนวน 5 ตัวอย่าง *L. tredecimguttatus* จำนวน 5 ตัวอย่าง

จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลทางชีวโมเลกุลของแมงมุมแม่ข่ายที่มีความซับซ้อนหรือใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นการยากที่จะใช้เพียงลักษณะสัณฐานวิทยานอกมาเป็นตัวจัดจำแนก และยืนยันว่า COX1 เป็นยีนที่สามารถใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแมงมุมแม่ข่ายกลุ่ม *Latrodectus* complex ได้ เนื่องจากยีน COX1 มีความแตกต่างมากพอที่จะทำให้แยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากรันได้ เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve area) มีขนาดนิวคลีโอไทด์มีความเหมาะสมคือประมาณ 500-800 คู่เบส ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนั้น ไพรเมอร์ที่เป็น universal primer จะสามารถเข้ามาจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ได้ง่ายและรวดเร็ว นอกจากนี้ลำดับดีเอ็นเอของยีน COX1 ยังสามารถแยกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้อีกด้วย และการเลือกบริเวณที่จะนำมาใช้เป็นนั้นมีความสำคัญมาก เพราะหากเลือกขนาดและบริเวณที่นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้เหมาะสมกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาจะทำให้สามารถนำไปใช้ได้ง่ายสะดวกและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อใช้ COX1 มีบางตัวอย่างที่ไม่สามารถแสดงผลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมงมุมแม่ข่ายได้เลย ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ C1J1718 และ C1N2191 แสดงผลผลิต PCR แสดงแถบแบนบนแผ่นเจล นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธีการ Neighbor Joining และ Maximum Likelihood พบว่าแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Latrodectus* แยกออกมาจากแมงมุมแม่ข่ายสกุล *Steatoda* อย่างเห็นได้ชัดเจน ในขณะที่กลุ่ม *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus* มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่เหมือนกันนั่นคือเป็นชนิดเดียวกัน เนื่องจากฐานข้อมูล *L. elegans* ไม่ได้อยู่ใน Genbank จึงทำให้ประมวลผลพันธุกรรมออกมาเป็นชนิดที่ใกล้เคียงกัน นั่นก็คือ *L. thoracicus* และ *L. tredecimguttatus*

หากต้องการศึกษาการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนมากขึ้นจะต้องใช้จำนวนยีนที่มาศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้น ดังเช่นงานวิจัยของ Garb *et al.*, 2004 ที่ใช้ยีนในการศึกษาถึง 5 ตำแหน่ง (COX1, H3, 28S rRNA, 18S rRNA, 16S rRNA) งานวิจัยของ Vink *et al.*, 2008 ที่ใช้ยีนศึกษามากกว่า 1 ชนิด เช่น (COX1, ITS1, ITS2)

นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ยังช่วยยืนยันจำนวนชนิดของแมงมุมม่ายสกุล *Latrodectus* ในประเทศไทย ให้มีความสอดคล้องและทันสมัยเทียบเท่าระดับสากล ดังเช่นงานวิจัยของ Garb *et al.*, 2004 ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแมงมุมม่ายสกุล *Latrodectus* ชีวภูมิศาสตร์ และประวัติการแพร่กระจาย พบว่า *geometricus* clade เป็นแมงมุมม่ายที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นและเป็นพี่น้องกับ the African *L. Rhodensis* ส่วน *mactans* clade ประกอบด้วย *Latrodectus* ชนิดอื่นที่มาจาก แอฟริกา อิสราเอล สเปน ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้

คำขอบคุณ

คุณพงศ์พัฒนา วิวรรณนาวิน ช่วยอนุเคราะห์ถ่ายภาพ คุณคมสัน หงษ์ทรีศรี คุณเขาวลิต สองแสงโชติ และคุณเฉลิมเกียรติ เลี่ยมยองใย ที่ช่วยอนุเคราะห์เก็บตัวอย่าง และให้ข้อมูลสถานที่การเก็บตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

- Agnarsson, I. 2002. Morphological phylogeny of cobweb spiders and their relatives (Araneae, Araneoidea, Theridiidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2004, 141, 447–626p.
- Avilés, L. 1997. Causes and consequences of cooperation and permanent-sociality in spiders. In: Choe JC, Crespi BJ, eds. *The evolution of social insects and arachnids*. Cambridge: Cambridge University Press, 476–498p.
- Badcock, A.D. 1932. Reports of an expedition to Paraguay and Brazil in 1926-1927 supported by the Trustes of the Percy Sladen Memorial Fund and the Executive Committee of the Carnegie Trust for the Universities of Scotland. *Arachnida from the Paraguayan Chaco*. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology* 38: 1-48p.
- Bettini, S. 1964. Epidemiology of latrodectism. *Toxicon*. 2:93-101p.
- Caporiacco, L.di. 1949. Aracnidi della colonia del Kenya raccolti da Toschi e Meneghetti negli anni 1944- 1946. *Commentationes Pontificia Academia Scientiarum* 13: 309-492p.
- Costello, M.J., and K.M. Daane. 1998. Influence of ground cover on spider populations in a table grape vineyard. *Ecological Entomology* 23: 33–40p.

- Cristopher J.M., S.R. Tomlinson, P.V. Perestenko, D.D. Pomeroy, I.R. Duce, N.R. Usherwood and D.R. Bell. 2004. Latrophilin is required for toxicity of black widow spider venom in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* (2004) 378, 185–191p.
- Elgar, M.A. 1993. Inter-specific associations involving spiders: kleptoparasitism, mimicry and mutualism. *Memoirs of the Queensland Museum* 33:411–430p.
- Forster, L. 1995. The behavioural ecology of *Latrodectus hasselti* (Thorell), the Australian redback spider (Araneae: Theridiidae): a review. *Records of the Western Australian Museum. Supplements.* 52, 13-24p.
- Garb, J.E., A. Gonzalez and R.G. Gillespie. 2004. The black widow spider genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae): phylogeny, biogeography and invasion history. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 31: 1127-1142p.
- Garb, J.E., A. Gonzalez and R.G. Gillespie. 2004. The black widow spider genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae): phylogeny, biogeography and invasion history. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 31: 1127-1142p.
- Koch, C.L. 1841. *Die Arachniden*. Nürnberg, Achter Band, pp. 41-131, Neunter Band, 1-56p.
- Kananbala, A., K. Manoj, M. Bhubaneshwari, A. Binarani and M. Siliwal. 2012. The first report of the widow spider *Latrodectus elegans* (Araneae: Theridiidae) from India. *Journal of Threatened Taxa* 4: 2718-2722p.
- Karsch, F. 1878. Über einige von Herrn JM Hildebrandt im Zanzibargebiete erbeutete Arachniden. *Zeitschrift für die Gesamten Naturwissenschaften* 51: 311-322.
- Keyserling, E. 1884. *Die Spinnen Amerikas II. Theridiidae*. Nürnberg 1, 1-222.
- Knoflach, B. and A. van Harten. 2002. The genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae) From mainland Yemen, the Socotra Archipelago and adjacent countries. *Fauna of Arabia* 19: 321-361p.
- Levi, H.W. 1983. On the value of genitalic structures and coloration in separating species of widow spiders (*Latrodectus* sp.) (Arachnida: Araneae: Theridiidae). *Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg* 26, 195-200.
- Litovitz, T.L., W. Klein-Schwartz, K.S. Dyer, M. Shannon, S. Lee and M. Powers. 1998. Annual reports of the American Association of Poison Control Centers toxic exposure surveillance system. *American Journal of Emergency Medicine.* 16:443–497p.
- Lotz, L.N. 1994. Revision of the genus *Latrodectus* (Araneae: Theridiidae) in Africa. *Navorsinge van die Nasionale Museum Bloemfontein.* 10 (1): 1-60p.
- Müller, G.J. 1993. Black and brown widow spider bites in South Africa-a series of 45 cases. *South African Medical Journal.* 83, 399–405p.
- Ono, H. 2002. Note on the Japanese red back spider and American black widows. *Orthobula's Box.* 11: 3-6p.

- Pickard-Cambridge, O. 1904. Descriptions of some new species and characters of three new genera, of Araneidea from South Africa. *Annals of the South African Museum* 3: 143-165p.
- 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>
- Schmidt, G. and P. Klaas. 1991. Eine neue *Latrodectus*-Spezies aus Sri Lanka (Araneida: Theridiidae). *Arachnologischer Anzeiger*. 14: 6-9p.
- Shukla, S. and V.G. Broome. 2007. First report of the brown widow spider, *Latrodectus geometricus* C. L. Koch (Araneae: Theridiidae) from India. *Current Science*. 93(6): 775-777p.
- Simon, E. 1909. Etude sur les arachnides du Tonkin (1re partie). *Bulletin Scientifique de la France et de la Belgique* 42: 69-147p.
- Simon C., F. Frati, A. Beckenbach, B. Crespi, H. Liu and P. Flook. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651–701p.
- Smithers, R. H. N. 1944. Contributions to our knowledge of the genus *Latrodectus* (Araneae) in South Africa. *Annals of the South African Museum*. 36: 263-312p.
- Song, D.X., Z. Mingsheng and C. Jun. 1999. The Spiders of China. Hebei Science and Technology Publishing House. p. 398-401p.
- Sucharit, S. 1980. A poisonous spider bite by *Latrodectus* sp. from Northeast Thailand. *Siriraj. Hosp. Gaz.* 32(11): 675-676p.
- 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.* 22:4673-4680p.
- Thorell, T. 1875. On some spiders from New-Caledonia, Madagascar and Réunion. *Proceedings of the Zoological Society of London*. 43(2): 130-149, Pl. XXV.
- Thorell, T. 1898. Viaggio di Leonardo Fea in Birmania e regioni vicine. LXXX. Secondo Saggio sui Ragni birmani. II. Retitelariae et Orbitelariae. *Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Genova* (2) 19[=39]: 271-378p.
- Vink, C.J, P.J. Sirvid, J. Malumbres-Olarte, J.W. Griffiths, P. Paquin and A.M. Paterson. 2008. Species status and conservation issues of New Zealand's endemic *Latrodectus* spider species (Araneae : Theridiidae). *Invertebrate Systematics* 22(6) 589-604p.

- World Spider Catalog. 2019. World Spider Catalog, Version 20.5. Natural History Museum Bern. Available at URL <http://wsc.nmbe.ch> (Accessed on 10/05/2019).
- Yoshida, H. 2003. The spider family Theridiidae (Arachnida: Araneae) from Japan. The arachnological Society of Japan. 224p.
- Yoshida, H. 2009. Uloboridae, Theridiidae, Ctenidae. *In*: Ono, H. (ed.) The spiders of Japan with keys to the families and genera and illustrations of the species. Tokai University Press, Kanagawa, pp. 142-147, 356-393, 467-468p.
- Zhu, M.S. 1998. Fauna Sinica: Arachnida: Araneae: Theridiidae. Science Press, Beijing, xi + 436 pp.

Table 1 Spider Fauna in genus *Latrodectus* found in Thailand between 2016 until 2019

Scientific name	Habitat	Location	Reference
<i>Latrodectus</i>	Restaurant	Suan Phueng, Rachaburi	W. Chotwong
<i>geometricus</i>	Rest room	Nong Kum, Kanchanaburi	W. Chotwong
C. L. Koch, 1841	Cricket shop	Chatuchak, Bangkok	J. Bangtha
	House	Pranburi, Prachuap Khiri Khan	W. Chotwong
	Restaurant	Nakronpathom	R. Pongpattana
	Restaurant	Lampang	R. Pongpattana
	Restaurant	Chokchai, Nakhon Ratchasima	W. Chotwong
	Cactus greenhouse	Tha Ang, Nakhon Ratchasima	W. Chotwong
	Restaurant	Nai Wiang, Nan	W. Chotwong
	Restaurant	Ban Phai, Phrae	W. Chotwong
	Restaurant	Wang Thong, Phitsanulok	W. Chotwong
	Restaurant	Nong Ruea, Khon Kaen	J. Bangtha
	Restaurant	Sao Thong Chai, Si Sa Ket	J. Bangtha
	Abandoned shop	Nong Ya Lat, Sisaket	J. Bangtha
	Restaurant	Khok Makham, Buri Ram	J. Bangtha
	Forest	Na Chaluai, Ubon Ratchathani	J. Bangtha
	Local market	Thakhanon, Surat Thani	J. Bangtha
	Cricket farm	Wang Yai, Phetchabun	Phetchabun highland agricultural
	House	Thung Phaya, Chachoengsao	J. Bangtha
		Chon Buri	R. Pongpattana
<i>Latrodectus</i>	Edge of forest	Pranburi, Prachuap Khiri Khan	J. Bangtha
<i>elegans</i>	Cassava field	Thung Phaya, Chachoengsao	S. Chaowarit
Thorell, 1898	Edge of cassava field	Nai meuang, Khon Kaen	L. Chalermkiat
	Grass	Na Chaluai, Ubon Ratchathani	R. Pongpattana
	Grass	Lop Buri	R. Pongpattana
	Laterite pond	Lop Buri	R. Pongpattana
	Edge of cassava field	Thammamun, Chai Nat	L. Chalermkiat

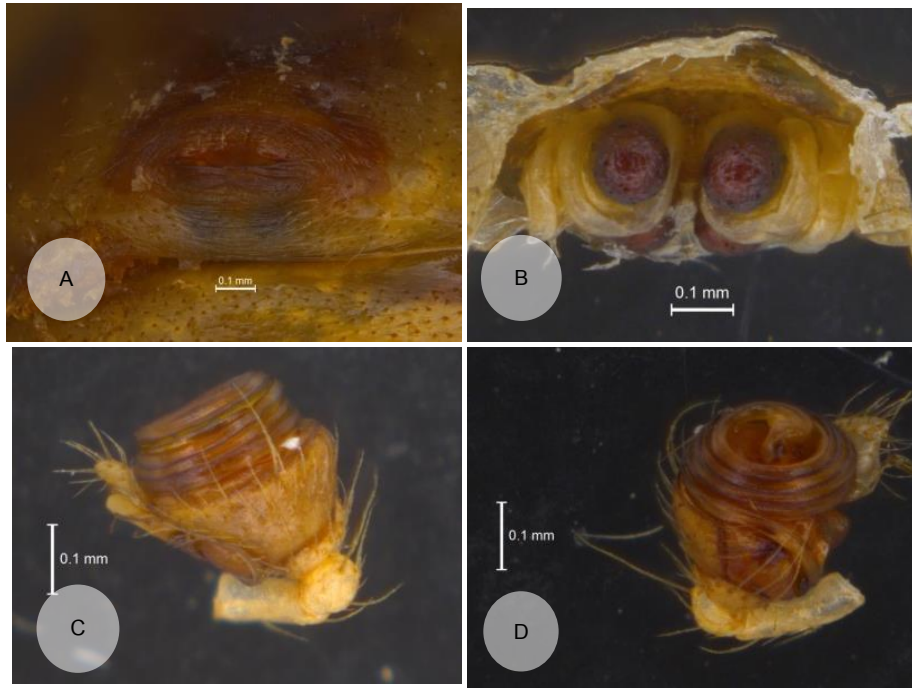


Figure 2 Genitalia and Epigyne structure of *Latrodectus geometricus*

- A. Epigyne
- B. Spermathecae and copulatory duct
- C, D. left palpus show embolus with 4 loops

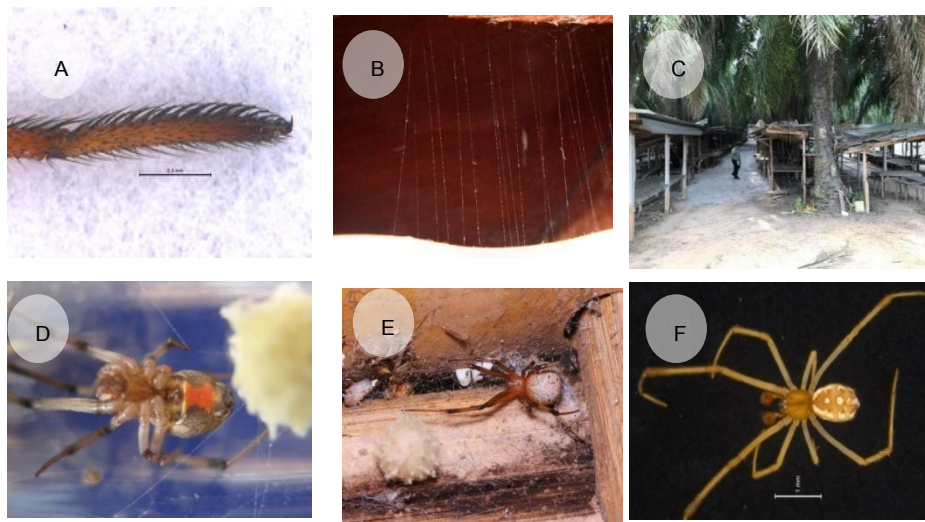


Figure 3 *Latrodectus geometricus*

- A. the comb on the fourth tarsus
- B. gumfoot lines
- C. Habitat
- D. red abdominal "hour-glass" mark
- E. Adult female with egg sac
- F. Adult male

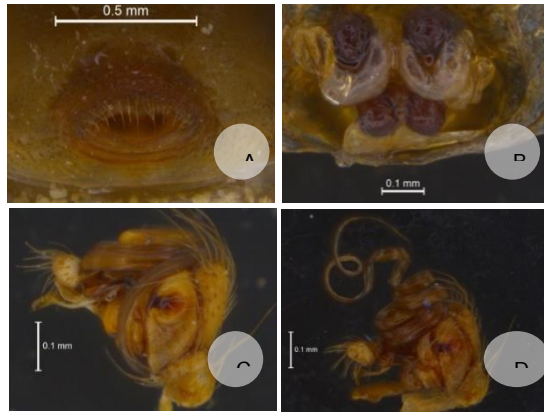


Figure 4 Genitalia and Epigyne structure of *Latrodectus elegans* A. Epigyne B. Spermathecae and copulatory duct C. Left palp of male show embolus with 3 loops D. Left palp of male show extending embolus



Figure 5 *Latrodectus elegans* A. Habitat B. Egg sacs C. subadult male D. subadult female



Figure 6 *Scytodes fusca* A. Dorsal part B. Ventral part and epigynum

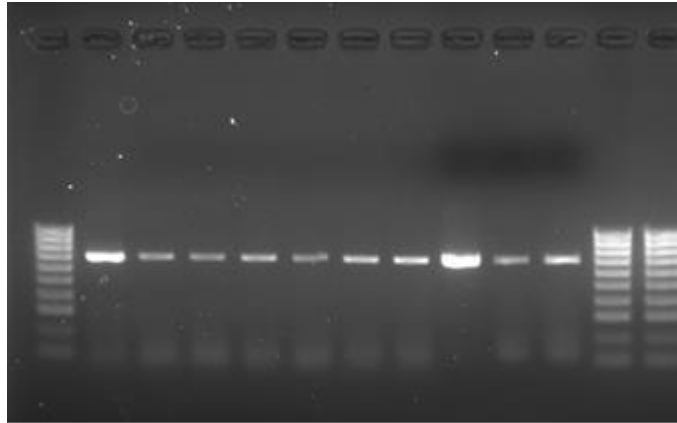


Figure 7 PCR product from gene COX1 from *L. geometricus* (lanes 1 – 5), *L. thoracicus* (lanes 6 - 8) and *L. tredecimguttatus* (lanes 9 - 10)

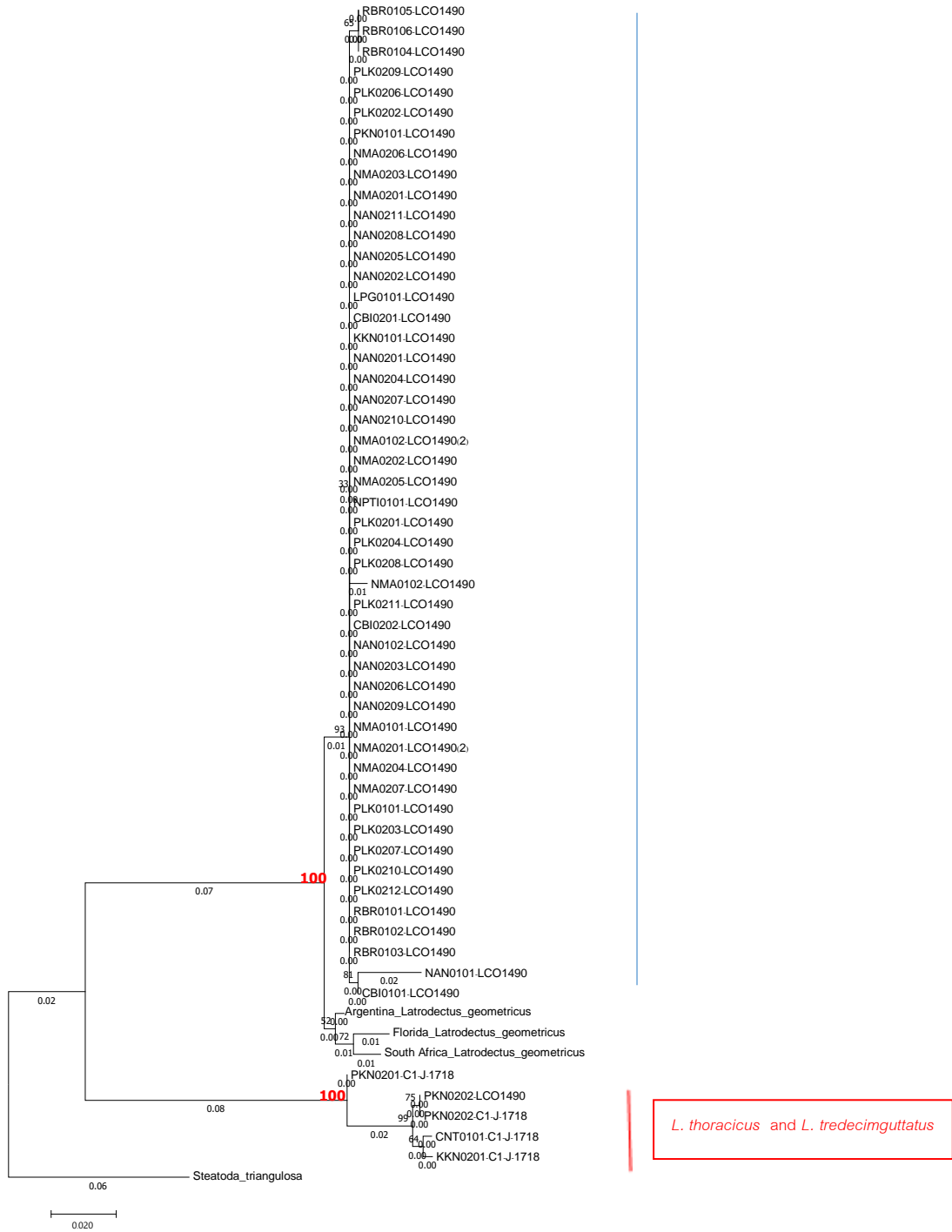


Figure 8 Neighbor joining analysis phylogenetic tree based on COX1 gene sequences. *Steatoda triangulosa* was used as outgroup. The scale bar = 0.02 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.

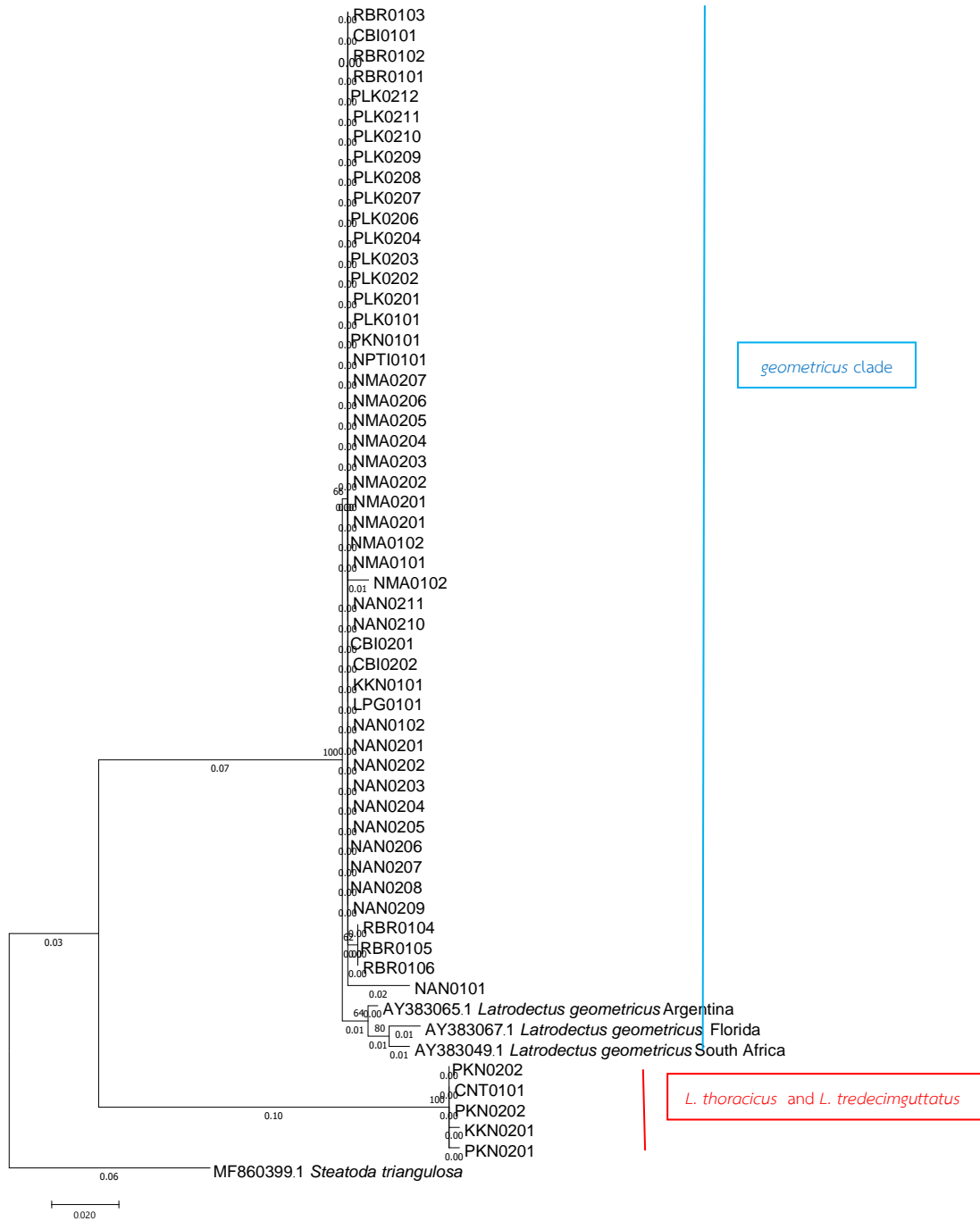


Figure 9 Maximum likelihood phylogenetic tree based on COX1 gene sequences, showing the phylogenetic relationship among *Latrodectus* sp. Specimens and *Steatoda triangulosa* was used as outgroup. The number of sites are 650, and scale bar = 0.02 substitutions per nucleotide position. Percent bootstrap values above 50 (1000 replicates) are indicated at notes.

ภาคผนวก

DNA Barcode ของแมงมุมแม่ข่าย *Latrodectus geometricus* เพิ่มปริมาณ DNA ด้วย COX1

รายละเอียดของ DNA Barcode ของแมงมุมแม่ข่าย *L. geometricus* จำนวน 10 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 CBI0101

ATCGNATTAANTTTTCNATCCGNAATAATATAGNAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAA
TTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAATAGTAGAAATAAAATTAATA
GCTCCTATAAATTGAAGATGCCCGAGCTAAGTGTAAAGAAAAATAGCAAAATCTACTGATCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGG
ATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATGAGGGAGGTAA
TAATCAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCACCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCC
CCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGTTACAATTACATTATACAACCTGATCATCCCCTAA
TATTCTCCAGGTTGACCTAATTCAATTCGAATAAGAACTTTATGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAAT
ACAAAGTCCCAATATCTTTATGNNTTGTT

ตัวอย่างที่ 2 CBI0201

AAATAGGATCCCTCCCTGCAGGGTCAAAAAAGATGTATTAATTTTCGATCCGTCATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAA
TACAGGTAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATA
AACGTATATCAAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCGAGCTAAGTGTAAAGAAAAATAGCAAA
ATCTACTGATCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTTTCTATA
GAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCAC
CCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACC
GGTTACAATTACATTATACAACCTGATCATCCCCTAATTTCTCCAGGTTGACCTAATTCGAATAAGAACTCTTATGGCAG
TTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGTTGACACA

ตัวอย่างที่ 3 LPG0101

TTGAACAAATAGGATCCCTCCCTGCAGGGTCAAAAAAGATGTATTAATTTTCGATCCGTCATAATATAGTAATAGCTCC
TGCTAATACAGGTAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATT
CATATAAACGTATATTCAAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCGAGCTAAGTGTAAAGAAAAAT
AGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTCT
TCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCG
GTGCACCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATTACAAAAGC
ATGACCGGTTACAATTACATTATACAACCTGATCATCCCCTAATTTCTCCAGGTTGACCTAATTCGAATAAGAACTCTTA
TGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAAGTCCCAATATCTTTATGATTTTGTGACCA

ตัวอย่างที่ 4 NAN0101

TTTAGATTTGTTGANACTCTTTCNGTGCAGGGGCAAAAAAGATCGTATTAGAATTTTCGATCCGTCATAATATAGTAATAGCTC
CTGCTAATACAGGTAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATT
CCATATAAACGTATATTCAAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCGAGCTAAGTGTAAAGAAAAAT
TAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTC
TTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCG
GTGCACCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATTACAAAAGC
ATGACCGGTTACAATTACATTATACAACCTGATCATCCCCTAATTTCTCCAGGTTGACCTAATTCGAATAAAAACTCTTA
TGGCAGTTCCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAAGTCCCAATATCTTTATGNNTTGTGTTGACAC

ตัวอย่างที่ 5 NAN0102

TAGATTTGTTGACATCTTTACGTGAAGGGGAAAAAAGATGATTAGAATTTCTATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTA
ATACAGGTAATGATAATAAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATAT
AAACGTATATTCAAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCGAGCTAAGTGTAAAGAAAAATAGCAA
AATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTCTTCTAT
AGAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGCA
CCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATTACAAAAGCATGAC

CGGTTACAATTACATTATACAACCTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCGAATGAAGAACTCTTATGGCA
GTTCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGGTTGACA

ตัวอย่างที่ 6 NAN0201

TTTAGATTTGTTGANATCTCCGGTGGAGGGGCAAAAAAGATGTATTAGAATTTTCGATCCGTCGAATAATATAGTAATAGCTCCT
GCTAATACAGGTAATGATAATAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCC
ATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAATAAATAATAGCTCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAAATA
GCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTT
CTATAGAAGAAATAAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGGAATGCTATATCCGG
TGCACCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATTACAAAAGCA
TGACCGGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCGAATAAGAAGCTTTAT
GGCAGTTCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGGTTGACAC

ตัวอย่างที่ 7 NAN0202

CCCTTCCCGTGCAGGGGAGAAAAAGATGTATTAATTTTCGATCCGTCGAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAAT
GATAATAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATT
CAAAATAGTAGAAATAAATAATAGCTCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGAT
CTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAGAAATAA
ATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGGAATGCTATATCCGGTGCACCAACATTAG
CGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTA
CATTATACAAGTATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCGAATAAGAAGCTTTATGGCAGTTCTACTATA
GCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGGTTGAA

ตัวอย่างที่ 8 NMA0101

AAATAGGATCCCTCCCTCGCAGGGTCAAAAAAGATGTATTAATTTTCGATCCGTCGAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAA
TACAGGTAATGATAATAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATA
AACGTATATTCAAAATAGTAGAAATAAATAATAGCTCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAAATAGCAAA
ATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATA
GAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGGAATGCTATATCCGGTGCAC
CCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACC
GGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCGAATAAGAAGCTTTATGGCAG
TTCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGGTTGAA

ตัวอย่างที่ 9 NPT0101

GGGATGATCAGTTGTATAATGTAATTGTAACCGGTCATGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTAATACCAGTATTAATTGGGGGA
TTTGAAAATTGGTTGGTCCGCTAATGTTGGGTGCACCGGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACC
TCCCTCATTATTATTATTTTCTTCTATAGAAGATAGGGGTAGGGGAGGATGAACGATTTATCCCCCTTATCCGGAT
TAGAAGGCCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGTATTTTCTTTACACTTAGCTGGGGCATCTTCAATTATAGGAGCTATTAA
TTTTATTTCTACTATTTGAATATACGTTTATATGGAATGAGAATGGAGAAGGTTAGATTATTTGTTGATCAGTGTTAATTACAG
CTGTTTTACTTTTTATTACATTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTGACGGATCGAAATTTAATACATCTTTTTTT
GACCCTGCAGGGGGAGGGGATCCTATTTGTTTCAACATTTGTTTTGATTTTTGNTCACCC

ตัวอย่างที่ 10 PLK0101

AAATAGGATCCCTCCCTCGCAGGGTCAAAAAAGATGTATTAATTTTCGATCCGTCGAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAA
TACAGGTAATGATAATAAAGTAAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAACAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATA
AACGTATATTCAAAATAGTAGAAATAAATAATAGCTCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGTAAGAAAAAATAGCAAA
ATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCCTACCCCTATCTCTTCTATA
GAAGAAATAAATAATAATAATAATGAGGGAGGTAATAATCAAATCTTAAATTATTTATTCGAGGGGAATGCTATATCCGGTGCAC
CCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTATTACAAAAGCATGACC
GGTTACAATTACATTATACAACTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTCGAATAAGAAGCTTTATGGCAG
TTCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTTTGGTTGACCCA

รายละเอียดของ DNA Barcode ของ แมงมุมแม่ม้าย *L. elegans* จำนวน 10 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 PKN0201

TGAACTATTTMTCCTCCTTTTRCAAGATTAGARGGTCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGCAATTTTTCTTTACATTTTRGCAG
GNGCNTCTTCTATTATRGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATNAATWTACGTTTGGTTGGNATATCTATRGAAAARGTAAG
ATTATTTGTTTGNCTNGTWTTNATTACTGCNGTNTTNTTATTATTATCATTACCTGTNTTGGCAGGGGCNATNACNATANTATTA
ACTGATCGTAATTTAATACNTCATTNTTTTGGATCCNGCAGGAGGGGTGATCCTATNTTGTTCNACATTTGTTTTGATTTTTTGG
NCANCCTGAAGTTTATATTTTANTTTTACCGGGA

ตัวอย่างที่ 2 PKN0202

GCAAATCANAACAAATGTTGAACAAGATAGGATCACCCCTCCTGCAGGATCAAAAAATGAAGTATTAATAATTACGATCAGTTAA
TAATATTGTAATTGCCCTGCCAATACAGGTAATGATAATAATAATAACTGCAGTAATAAAACGACCAAAACAAATACTTA
CTTTTTCTATAGATATCCCAACCAACGATATTCATAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCCCTATAATAGAAGAAGCTCCTGCT
AAATGTAAAGAAAAAATTGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGACCATCTAATCTTGATAAAGGAGGATAAATAGTTCACCCCTG
ATCCCACTCCAACCTCTTCTAAAGAAGAAATAACAATAAAATTAAGAAGAAGGCAATAATCAAAATCTTAAATTTATATACGA
GGAAAAGCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGAGGAACATAATTTCAAAAATCCTCC

ตัวอย่างที่ 3 CNT0101

GAGCTCTGATATAGCTTTTCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTGCCTTCTTCTTAATTTTATTGTTTATTTCTTCTTT
AGAAGAAGTTGGAGTGGGATCAGGGTGAACATTTATCTCTTTTATCAAGATTAGAGGGTCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTT
GCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGCTTCTTCTATTATAGGGGCTATTAATTTTATTTCTACTATTATGAATATACGTTTGGT
TGGGATATCTATAGAAAAAGTAAGATTATTTGTTTGGTCAGTTTAAATTAATGAGGAGGATAAATAGTTCACCCCTG
CAGGGGCAATTACAATATTATTAAGTATGATCGTAATTTAATACTTCATTTTTGATCCTGCAGGAGGGGTGATCCTATCTTGT
CAACATTTGTTTTGATTTTTGGCCATCTGAAGTTTATTTTTATTTTTACCGGGA

ตัวอย่างที่ 4 PKN0101

AGGATCCCCTCCCCTGCAGGGTCAAAAAAGATGTATTAATTTTCGATCCGTCAATAATATAGTAATAGCTCCTGCTAATACA
GGTAATGATAATAAAAGTAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAAACAAATAATCTAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACG
TATATTCAAAAATAGTAGAAATAAAATTAATAGTCTCTATAATTGAAGATGCCCCAGCTAAGTGAAGAAAAAATAGCAAAATCT
ACTGATCTCCCTCTATGGCTTCTAATCCGGATAAAGGGGATAAATCGTTCATCCTGCCCTACCCCTATCTCTTCTATAGAAG
AAATAAATAATAATAATAGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTTAAATTTTATTTCGAGGGAATGCTATATCCGGTGACCCAA
CATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAAAAAAATTTATTACAAAAGCATGACCGGTT
ACAATTACATTATACAACCTGATCATCCCCTAATATTTCTCCAGGTTGACCTAATTCGAATAAGAAGCTCTTATGGCAGTTCC
TACTATAGCAGCCCAAGCTCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATGTTT

ตัวอย่างที่ 5 CBI010

AATAATATAGNAATAGCTCCTGCTAATACAGGTAATGATAATAAAAGTAAACAGCTGTAATTAACACTGATCAAAACAAATAATC
TAACCTTCTCCATTCTCATTCCATATAAACGTATATTCAAAATAGTAGAAATAAAATTAATAGCTCCTATAATTGAAGATGCCCA
GCTAAGTGAAGAAAAAATAGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGGCCTTCTAATCCGGATAAAGGGGATAAATCGTTCATC
CTGCCCTACCCCTATCTTCTATAGAAGAAATAAATAATAATAAATAGAGGGAGGTAATAATCAAAATCTTAAATTTTATT
CGAGGGAAATGCTATATCCGGTGACCCCAACATTAGCGGAACCAACCAATTTCCAAATCCCCCAATTAATACTGGTATTACTATAA
AAAAAATTATTACAAAAGCATGACCGGTTACAATTACATTATACAACCTGATCATCCCCTAATATTCTTCCAGGTTGACCTAATTC
ATTGAATAAGAAGCTTATGGCAGTTCTACTATAGCAGCCCAAGCTCCAAATACTAAATACAAAGTCCCAATATCTTTATG

ตัวอย่างที่ 6 PKN0102

TTTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAACTGCCATAAGAGTCTTATTTCGAATTGAATTAGGTCAACCTGGAAGAATATTAGGGG
ATGATCAGTTGTATAATGTAATTGTAACCGTCTGCTTTTGTAAATTTTTTTTATAGTAATACCAGTATTAATTGGGGGATTT
GGAAATTGGTTGGTCCGCTAATGTTGGGTGACCCGGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTATTATTACCTC
CCTCATTATTATTATTATTATTCTTCTATAGAAGAGATAGGGGTAGGGGCAGGATGAACGATTTATCCCCCTTTATCCGGATTA
GAAGGCCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGTATTTTTCTTTACACTTAGCTGGGCATCTTCAATTATAGGAGCTATTAATT
TTATTTCTACTATTTTGAATATACGTTTATATGGAATGAGAATGGAGAAGGTTAGATTATTTGTTTGGATCAGTGTTAATTACAGCT
GTTTTACTTTTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTGACGGATCGAAATTTAATACATCTTTTTTGA
CCCTGCAGGGGGAGGGGATCCTATTTGTTTCAACATTTGTTTGGTACCCT

ตัวอย่างที่ 7 CNT0102

TTGGNCCTGAATTAGAGCAGGAATACATAAGAACATCTGTGTAAGACTTTTAATTCGAGCTGAATTAGGAAATCCCGGATCTTT
 AATTGGAGATGACCAATTTATAACTATTGTAAACAGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTATAGTTATACCTATTATAAATTG
 GAGGATTTGGTAATTGATTAGTTCCCTGATATTAGGAGCCCTGATATAGCCTTCCACGAATAAATAATATAAGTTTTTGATT
 CTTACCCCTCTCTCACCCTTTTAAATTTCAAGAAGAATCGTAGAAAATGGAGCAGGTAAGTTGAACTGTCTATCCCCCTA
 TCTTCTAATATTGCTCATGGAGGTAGTTCAGTAGATTTAGCTATTTTTCTTTACATTTAGCTGGTATTTTCATCGATTTTAGGAGC
 TATTAATTTTATTACCACTATTATTAATATACGAGTTAATGGACTTTTCAATTTGATCAAATACCTTTATTTGTTGAGCTGTTGGTA
 TTACTGCTTTACTCCTTCTTTTATCATTGCCAGTTTTAGCTGGAGCTATCACAATATTATAACGGATCGTAATTTAAATACATCA
 TTCTTTGATCCTGCAGGTGGAGGAGACCCAATTTTATATCAACATTTATTTTGATTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA

ตัวอย่างที่ 8 KKN0201

GAGCTCTGATATAGCTTTTCTCGTATAAAATAATTTAAGATTTTGATTATTGCCTTCTTCTTAATTTTATTGTTTATTCTTCTTT
 AGAAGAAGTTGGAGTGGGATCAGGGTGAATTTATCCTCCTTTATCAAGATTAGAGGGTATAGAGGGAGATCAGTAGATTTT
 GCAATTTTTCTTTACATTTAGCAGGAGCTTCTTCTATTATAGGGCTATTAATTTTATTCTACTATTATGAATATACGTTTGGT
 TGGGATATCTATAGAAAAAGTAAAGATTATTTGTTGGTCAGTTTTAATTACTGCAGTATTGTTATTATTATCATTACCTGTATTGG
 CAGGGGCAATTACAATATTATTAAGTATCGTAATTTAACACTTCATTTTTGATCCTGCAGGAGGGGTGATCCTATTTTGT
 CAACATTTATTTGATTTTTGGCCATCCTGAAGTTTATATTTAATTTACCGGA

ตัวอย่างที่ 9 KKN0202

CAAATAAATGTTGAACAAAATAGGATCACCCCTCCTGCAGGATCAAAAAATGAAGTGTTAAAATTACGATCAGTTAATAATATT
 GTAATTGCCCTGCCAATACAGGTAATGATAATAAACAATACTGCAGTAATTAAGTACCAAAACAATAATCTTACTTTTTCT
 TATAGATATCCCAACCAACGTATATTACATAATAGTAGAAAATAAATAATAGCCCTATAATAGAAGAAGCTCCTGCTAAATGTA
 AAGAAAAAATTGCAAAATCTACTGATCTCCCTCTATGACCTCTAATCTTGATAAAGGAGGATAAATAGTTACCCTGATCCAC
 TCCAATCTTCTAAAGAAGAAATAACAATAAAATTAAGAAGAAGGCAATAATCAAATCTAAATTATTATACGAGGAAAA
 GCTATATCAGGAGCTCCTAATATTAGAGGAATAATCAATTTCAAATCCTCCA

ตัวอย่างที่ 10 CBI0202

TATTGGAGCTTGGGCTGCTATAGTAGGAAGTCCATAAGAGTTCTTATTGGAATTGAATTAGGTCAACCTGGAAGAATATTAGGG
 GATGATCAGTTGTATAATGTAATTGTAACCGGTCATGCTTTTGTAAATAATTTTTTTATAGTAATACCAGTATTAATTGGGGGATT
 TGGAAATTGGTTGGTCCGCTAATGTTGGGTGCACCGGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCT
 CCTCATTATTATTATTATTATTCTTCTATAGAAGAGATAGGGTAGGGCAGGATGAACGATTTATCCCCCTTATCCGGATT
 AGAAGGCCATAGAGGGAGATCAGTAGATTTTGTATTTTTCTTTACACTAGCTGGGCATCTTCAATTATAGGAGCTATTAAT
 TTTATTTCTACTATTTTGAATATACGTTTATATGGAATGAGAATGGAGAAGGTTAGATTATTTGTTGATCAGTGTAAATTACAGC
 TGTTTTACTTTTTATTATCATTACCTGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTGACGGATCGAAATTTTAAATACATCTTTTTTG
 ACCCTGCAGGGGGAGGGGATCCTATTTGTTTCAACATTTGTTTGGATTTTTGGTCACCCTGGAAGTTTAAA

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา *Trichoderma asperellum*
T. harzianum และ *T. viride*
 DNA barcoding for *Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*
 and *T. viride* identification

ชนินทร์ ดวงสะอาด^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} สุณิรัตน์ สีมะเต็อ^{1/}
 อมรรักษ์ คัดใจเดียว^{1/} มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{3/}

^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/} กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

รายงานความก้าวหน้า

รวบรวมข้อมูลและตัวอย่างของเชื้อรา *Trichoderma* ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 ได้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* จากการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 20 ไอโซเลท ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) RNA polymerase II gene (rpb2) และ Internal Transcribed Spacer (ITS) พบว่าเป็นเชื้อรา *T. asperellum* และ *T. harzianum*

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

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 รวมถึงยังสามารถใช้สารอาหารและเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (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

ในการจัดจำแนกเชื้อรา *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 ลักษณะความแตกต่างที่มีการรายงานหรือบันทึกไว้ดังกล่าวสามารถใช้แยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนสำหรับบางสปีชีส์ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ หรือมีความคลุมเครือระหว่าง strain ของบางสปีชีส์ (Singh *et al.*, 2014) เช่น ในเชื้อรา *T. harzianum* ซึ่งมีหลายการศึกษาพบว่า เชื้อราที่ถูกจัดจำแนกว่าเป็น *T. harzianum* มีมากกว่า 1 ชนิด ซึ่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมถึงลักษณะของ cultures นั้นมีความแตกต่าง แต่เป็นความแตกต่างที่คลุมเครือ และไม่เพียงพอหรือสามารถจัดจำแนก (Muthumeenakshi *et al.*, 1994; Fujimori and Okuda, 1994; Zimand *et al.*, 1994)

ปัจจุบันมีศึกษาการจัดจำแนกและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* โดยใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) กันมากขึ้น โดยส่วนใหญ่ ใช้ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) (Dodd *et al.*, 2000; Kindermann *et al.*, 1998) แต่พบว่า การจำแนกด้วย ITS เพียงหนึ่งตำแหน่งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างรา *Trichoderma* บางสปีชีส์ได้ เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma*

เหล่านั้นมีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน มักจะมีความคล้ายคลึงหรือมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก เช่น มีรายงานว่า *T. asperellum* เป็น complex species (มีมากกว่า 1 สปีชีส์ภายใต้ชื่อ *T. asperellum*) และลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของ conidia ไม่สามารถใช้อ้างอิงหรือเปรียบเทียบเพื่อจำแนกชนิดได้ แต่เมื่อใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS) translation elongation factor 1 (*tef1*) RNA polymerase subunit 2 (*rpb2*) and actin (ACT) ในการจัดจำแนก (Samuels and Ismaiel, 2009) พบว่า เชื้อราชนิดนี้ประกอบไปด้วย *T. asperellum* และ *T. asperelloides* ซึ่งได้รับการบันทึกเป็นอีกสปีชีส์ของเชื้อรา *Trichoderma* (Samuels et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้งสอง สปีชีส์นี้ มีความใกล้เคียงอย่างมากกับเชื้อรา *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* ที่พบในประเทศไทยอินเดียจำนวนมากหลายไอโซเลทที่จัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่าเป็น *T. viride* แต่เมื่อใช้ข้อมูลของดีเอ็นเอจากตำแหน่ง ITS และ elongation factor พบว่าเชื้อราเหล่านี้คือเชื้อรา *T. asperellum* หรือ *T. asperelloides* (Siram et al., 2013) จากการศึกษาลักษณะของ conidia ของ เชื้อรา *T. harzianum* พบว่ามีความใกล้เคียงกับ conidia ของเชื้อรา *T. viride* โดยมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของลักษณะ ความหนาแน่น และเฉดสีของ conidia อีกทั้ง เชื้อรา *T. viride* ยังมีความใกล้เคียงกับ *T. asperellum* ดังนั้น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ไม่สามารถใช้อ้างอิงเพื่อจัดจำแนกอย่างชัดเจนได้ (Singh et al., 2014)

ในปัจจุบันการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถบ่งชี้ชนิดของเชื้อราได้ในระดับ genus แต่ในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ต้องมีการพิจารณาลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) มาร่วมวิเคราะห์ เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและการจัดจำแนกที่ถูกต้อง กลุ่มวิจัยโรคพืชเป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบในการตรวจสอบความถูกต้องของสายพันธุ์ที่ขอขึ้นทะเบียน ดังนั้น การศึกษาการจัดจำแนกเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* โดยใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) จึงมีความสำคัญ โดยข้อมูลและผลที่ได้จากการวิจัยจะนำมาซึ่งวิธีการในการตรวจสอบชนิดเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* ในการขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร ที่มีความแม่นยำ และถูกต้อง ทั้งนี้การตรวจสอบเพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *Trichoderma* จะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร รวมถึงประสิทธิภาพและความยั่งยืนในการใช้เชื้อรา *Trichoderma* ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช อีกทั้งข้อมูลของลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากการศึกษา สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้เปรียบเทียบหรือศึกษาความหลากหลายและการวิวัฒนาการของ เชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride*

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

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทาบตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ของกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง
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 ไขมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง 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
 - ไพร์เมอร์ ได้แก่ ITS1/ITS4 (White, 1990) EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999) / TEF1_R (Samuels *et al.*, 2002) fRPB2-5F/fRPB2-7cR (Liu *et al.*, 1999) CAL-228F/CAL-737R (Carbone and Kohn, 1999) Triact1/Triact2 (Samuels *et al.*, 2006) และ LROR/LR6 (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*

ตัวอย่างเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* ที่นำมาใช้ในการวิจัย นำมาจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ จากสารชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* ที่มีขายในท้องตลาดในปัจจุบัน รวมถึงไอโซเลทที่มีการส่งเสริมโดยหน่วยงานของภาครัฐ โดยตัวอย่างของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* ทั้งหมดจากการเก็บตัวอย่าง จะนำมาแยกเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการสกัด DNA ต่อไป เชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* ที่ใช้ในการศึกษาจะจัดเก็บใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ สำหรับเป็นข้อมูลหรือตัวอย่างอ้างอิงต่อไป

3. ศึกษา และจำแนกชนิดของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

ศึกษาลักษณะของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride*

นำราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) ศึกษา และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆของราที่วัดขนาดไว้

จำแนกชนิดเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride*

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Trichoderma* ที่ศึกษากับคู่มือของ Rifai (1969) Bissett (1984) Bissett (1991a-c) และ Bissett (1992)

4. จำแนกชนิดของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตัดหรือเขี่ยเส้นใยรวมถึง conidia ของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับการสกัด ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, et al. (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของ *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* ตำแหน่ง ITS TEF1- α cal1 acl1 LSU และ rpb2

กำหนด annealing temperature ของแต่ละตำแหน่งที่ 56 องศาเซลเซียส และ 60 สำหรับตำแหน่ง LSU ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามและผู้ผลิตแนะนำ

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 เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (<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) มาจัดเรียง (align) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Kato and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar *et al.*, 2008) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำการรวมชุดข้อมูลของดีเอ็นเอตำแหน่ง LSU และ EF1 เป็น combined dataset บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ .nexus หรือ .nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สองเกณฑ์มาตรฐานคือ Maximum Likelihood และ Bayesian Inference เตรียมชุดของข้อมูลที่จะใช้ในการวิเคราะห์ในแต่ละวิธี ดังนี้ Maximum Likelihood (ML) เตรียมไฟล์ .phy ใช้โปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) ในการวิเคราะห์ กำหนดค่า model of evolution แบบ GTRGAMMA วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command -f a) เริ่มวิเคราะห์จาก random starting tree และ กำหนดค่า 1000 ซ้ำ สำหรับ maximum likelihood bootstrap

Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ .nexus ใช้โปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้ “Mcmc startingtree=user ngen=10 000 000 temp=0.25 nruns=4 samplefreq=1000 pintfreq=1000 nchains=4 savebrlens=yes stoprules=yes stopval=0.01;” ปรับค่า generation temperature substitution model parameters จำนวน generation และ burnin เพื่อให้ได้ consensus topology ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย 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

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

รวบรวมข้อมูลและตัวอย่างของเชื้อรา *Trichoderma* ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 (Figure 1) ได้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Trichoderma* ดังนี้ *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	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Sordariomycetes
Subclass	Hypocreomycetidae
Order	Hypocreales
Family	Hypocreaceae
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) \times (2.2-2.7-3.5(-4.2) μm ผนังสปอร์ผนังเรียบ

Enzyme Production protease chitinase β -1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

Trichoderma asperellum Samuels, Lieckf. & Nirenberg, Sydowia 51: 81 (1999)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Sordariomycetes
Subclass	Hypocreomycetidae
Order	Hypocreales
Family	Hypocreaceae
Genus	<i>Trichoderma</i>
Species	<i>asperellum</i>

Optimum Growth Temperature 30-35 °C

ลักษณะของเชื้อ บนอาหาร PDA เชื้อราสร้างสปอร์สีเขียว (Figure 3) เป็นวงชั้น ๆ บริเวณวงแต่ละชั้นจะไม่พบการสร้างสปอร์ ไม่มีกิลิน 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 สปอร์มีลักษณะกลมแบน หรือกลมรี 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)

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	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Sordariomycetes
Subclass	Hypocreomycetidae
Order	Hypocreales
Family	Hypocreaceae
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) \times (3.0-)3.5-4.5(-5.5) μm สีเขียว ผนังสปอร์ลักษณะแบบ warty

Enzyme Production protease chitinase β -1,3-glucanase (Kamala *et al.*, 2015)

จากการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* จำนวน 20 ไอโซเลท ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และซีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) RNA polymerase II gene (rpb2) และ Internal Transcribed Spacer (ITS) พบว่าเป็น เชื้อรา *T. asperellum* และ *T. harzianum* (Figure 5)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* จากการจำแนกเชื้อรา *Trichoderma* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและซีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) RNA polymerase II gene (rpb2) และ Internal Transcribed Spacer (ITS) พบว่าเป็น เชื้อรา *T. asperellum* และ *T. harzianum* อย่างไรก็ตามพบว่ามีหลากหลายในระดับโมเลกุลของเชื้อรา *T. asperellum* หลายไอโซเลท (Figure 5) จึงต้องวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบไอโซเลทของเชื้อรา *Trichoderma* เพิ่มเติมต่อไป

เมื่อสิ้นสุดงานวิจัย ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง จะใช้เป็นฐานข้อมูล และองค์ความรู้เพื่อใช้ในการต่อยอดงานวิจัยวิจัย โดยข้อมูลและผลที่ได้จากการวิจัย จะทำให้ได้วิธีการจัดจำแนก และชนิดที่ถูกต้อง รวมทั้งข้อมูลลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA Barcode) ของเชื้อรา *T. asperellum* *T. harzianum* และ *T. viride* เพื่อใช้เปรียบเทียบความเหมือนหรือแตกต่างของเชื้อรา เมื่อมีการขอขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร โดยการตรวจสอบเพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิด ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์เชื้อรา *Trichoderma* โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร อีกทั้งข้อมูลลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากการศึกษา สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านพันธุศาสตร์ เพื่อศึกษาความหลากหลาย และวิวัฒนาการของเชื้อรา *Trichoderma* ในประเทศไทย และข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ทางการศึกษาในหน่วยงานราชการ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สถาบันการศึกษา และหน่วยงานเอกชน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ 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., 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.
- 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.
- 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. *Uromykladium 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.

- 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.
- 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.
- Katoh, K. and H. Toh. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9: 286-298.
- 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 and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- 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.

- 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.
- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-116.
- 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. Respinis, and O. Petrini. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia* 102: 944-966.
- 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.
- 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. pages 315- 322. In " *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*" (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.), Academic Press.

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.

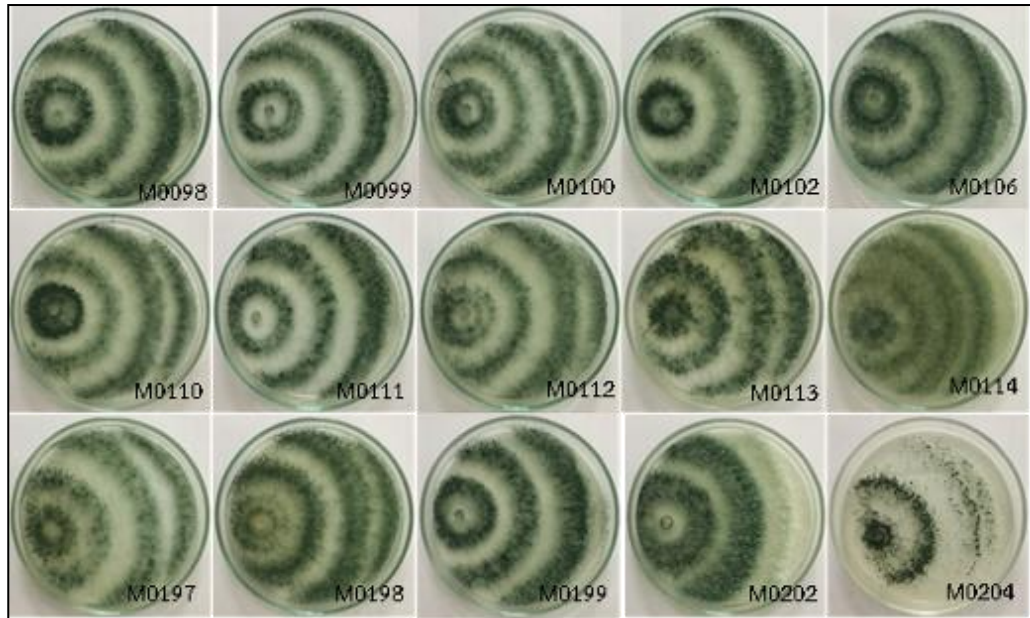


Figure 1 *Trichoderma* used in this study

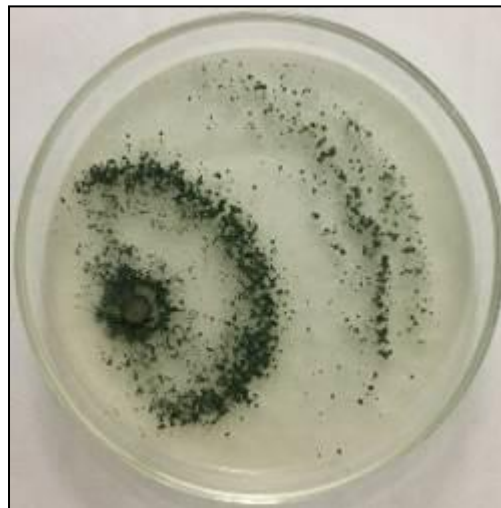


Figure 2 *Trichoderma harzianum* on PDA

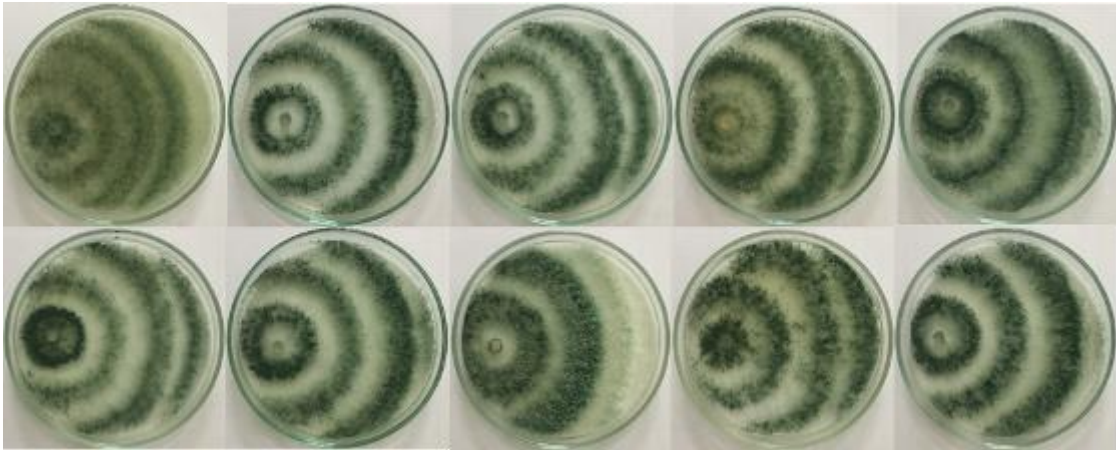


Figure 3 *Trichoderma harzianum* on PDA

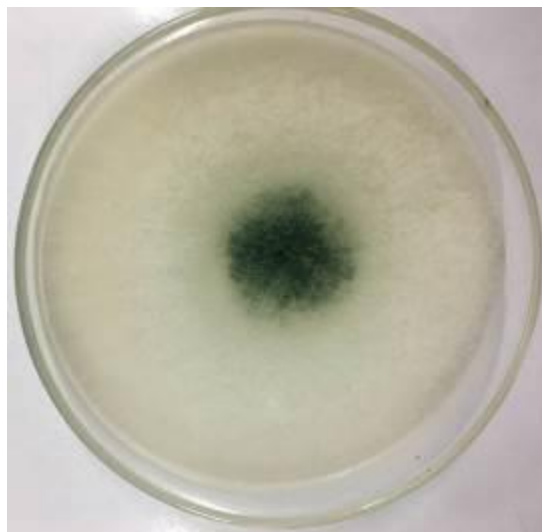


Figure 4 *Trichoderma viride* on PDA

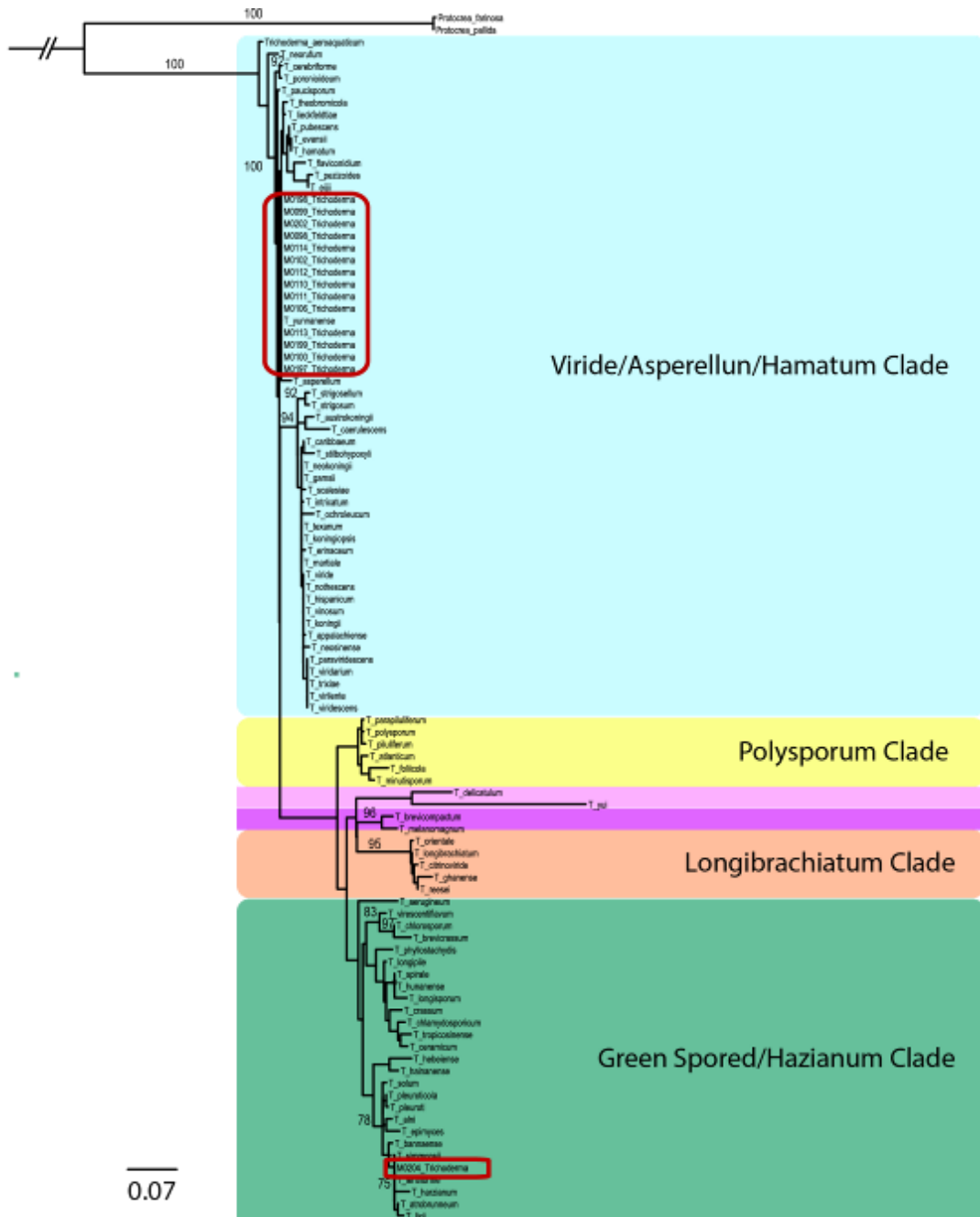


Figure 5 Phylogram of species of *Trichoderma* obtained from maximum likelihood analysis using RAxML with combined dataset of the ITS TEF and rpb2 gene regions. Bootstrap support values ($\geq 70\%$) from 1,000 replicates are shown above nodes

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera
(Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทย
DNA Barcoding for Identification of Thrips in Suborder Tubulifera
(Thysanoptera: Tubulifera) in Thailand

อิทธิพล บรรณาการ เกศสุดา สนศิริ สิทธิศิโรตม์ แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกพืช เช่น ปอเทือง มะละกอ แตงกวา ส้มโอ ถั่วฝักยาว หน่อไม้ฝรั่ง แก้วมังกร ตีปาลี เป็นต้น ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้ เช่น พืชอาหาร สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บลงในขวดดองเพลี้ยไฟที่บรรจุน้ำยา AGA และแอลกอฮอล์ 95% นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษา ลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด ดำเนินการทำสไลด์ถาวร ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 133 ตัวอย่างและสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 2 ชนิดคือ เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera อันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae 131 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ โดยพบที่จังหวัดสุโขทัย กำแพงเพชร เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี กาญจนบุรี เป็นต้น ทำให้ทราบถึงชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ที่สำคัญ พืชอาหารที่สำรวจพบเพลี้ยไฟ เขตการแพร่กระจายของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ในประเทศไทย และได้ตัวอย่างเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ที่ถูกต้องสำหรับดำเนินการทดลองหาดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI (Cytochrome Oxidase subunit I) ของเพลี้ยไฟท่อ และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. อยู่ในกลุ่มเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-11-61

คำนำ

เพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera เป็นเพลี้ยไฟอีกอันดับย่อยหนึ่งที่มีความสำคัญทางการเกษตร โดยเพลี้ยไฟในอันดับย่อยนี้มักพบเป็นศัตรูสำคัญของชนิดพืชที่มีโครงสร้างของใบค่อนข้างหยาบและหนา เช่น มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ ขนุน มังคุด กระท้อน ไทร และพืชพลังงานที่สำคัญ เช่น สับปะรด มันสำปะหลัง และปาล์มน้ำมัน โดยเพลี้ยไฟในอันดับย่อย Tubulifera ระยะที่เป็นตัวอ่อนของแต่ละชนิดนั้นจะไม่มี ความแตกต่างกันมากเหมือนกับอันดับย่อย Terebrantia ที่สามารถวิเคราะห์ชนิดได้บ้างในเบื้องต้นจากขนาด สีของลำตัว และลวดลายบนลำตัว จึงทำให้การศึกษาและวิเคราะห์เพลี้ยไฟในอันดับย่อยนี้ได้ค่อนข้างยาก ในประเทศไทยมีรายงานถึงชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อยนี้ค่อนข้างน้อย เช่น *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) และ *Haplothrips* sp. เป็นศัตรูสำคัญของมะม่วง ถั่วฝักยาว ส้มเขียวหวาน มะม่วงหิมพานต์ ส้มโอ เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ กลั้ว ชนิด *Gynaikothrips ficorum* และ *Gynaikothrips* sp. ชนิด *Ernothrips* sp. และ ชนิด *Liothrips* sp. ซึ่งเป็นศัตรูสำคัญของไทร (ศิริณี, 2544) นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างเพลี้ยไฟอันดับย่อยนี้ที่เก็บ-รักษาในพิพิธภัณฑ์แมลง ซึ่งยังไม่ได้ดำเนินการศึกษาต่อถึงระดับชนิด จึงจำเป็นต้องดำเนินการศึกษาสัณฐานวิทยา และลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ซึ่งจะทำให้ทราบถึงชนิดที่แน่นอนของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ทั้งนี้จะทำให้ชนิดที่ถูกต้องและเหมาะแก่การป้องกันกำจัด อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์ชนิดของเพลี้ยไฟศัตรูพืชในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การศึกษาลำดับพันธุกรรมจะทำให้ทราบถึงความแปรปรวนของยีนเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ในพื้นที่ทุกภูมิภาคของประเทศไทยว่ามีความแตกต่างหรือใกล้เคียงกันอย่างไร การศึกษานี้จะได้ข้อมูลซึ่งไม่มีหน่วยงานอื่นในประเทศไทยทำวิจัยเชิงลึกเช่นนี้ อีกทั้งยังเป็นการวิเคราะห์ชนิดศัตรูพืชโดยวิธีใหม่ที่ทันสมัย สามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับนักวิชาการทั่วไป บริษัทเอกชน และผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร ทั้งนี้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ที่วิเคราะห์ได้นี้สามารถนำมาศึกษา phylogeny กับเพลี้ยไฟที่ทำลายพืชอื่นๆ ได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืช อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ปากคีบ พู่กัน ขวดดอง กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ถังรักษาความเย็น อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ 50-100% AGA โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% โคลฟอย แคนาดาบัลซัม เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร และ ตู้อบสไลด์ถาวร อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ PCR ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ 99% กรดอะซิติก DNeasy Kit, dNTP mixtures, 10X PCR buffer, Automatic pipette ปีกเกอร์ หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ 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 เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera

วิธีการ

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกพืช เช่น ปอเทือง มะละกอ แตงกวา ส้มโอ ถั่วฝักยาว หน่อไม้ฝรั่ง แก้วมังกร ตีปัส เป็นต้น ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อศึกษาจำนวนชนิดของเพลี้ยไฟ โดยใช้วิธีการตีหรือเขย่าส่วนของพืช เช่น ใบ และดอก ให้เพลี้ยไฟตกลงบนกระดาษขาวที่รองรับ และใช้ฟู่กันเขี่ยเพลี้ยไฟแต่ละตัวลงในขวดที่บรรจุน้ำยา AGA (Alcohol 60%: Glycerine: Acetic acid อัตราส่วน 10:1:1) สำหรับศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและ แอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษาลำดับเบสของยีน Cytochrome oxidase subunit I (COI) รวมทั้งเก็บตัวอย่างที่มีชีวิตด้วย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่เก็บได้ เช่น พืชที่เก็บ ส่วนของพืชที่เก็บ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) วันที่เก็บ และชื่อผู้เก็บ ลงในขวดดองเพลี้ยไฟ นำตัวอย่างทั้งหมดที่รวบรวมได้กลับไปยังห้องปฏิบัติการ และนำตัวเต็มวัยที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมดมาจำแนกชนิดเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำตัวเต็มวัยในน้ำยา AGA ไปทำสไลด์ถาวร และนำตัวเต็มวัยที่บรรจุในแอลกอฮอล์ 95% เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองทางอนุกรมวิธาน ดำเนินการทำสไลด์ถาวรของเพลี้ยไฟ ตามวิธีการของ ศิริณี (2544) บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมถึงให้รายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของขวดดองตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่เก็บตัวอย่าง และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง จัดทำแนวทางวินิจฉัยชนิด (key) ของเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้ จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล

เวลาและสถานที่

เวลา	เดือนตุลาคม 2561 ถึง เดือนกันยายน 2562
สถานที่	1. แปลงปลูกพืชในทุกภูมิภาคของประเทศไทย 2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง ห้องปฏิบัติการกลาง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกพืช เช่น ปอเทือง มะละกอ แตงกวา ส้มโอ ถั่วฝักยาว หน่อไม้ฝรั่ง แก้วมังกร ตีปัส เป็นต้น บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้ เช่น พืชอาหาร สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บลงในขวดดองเพลี้ยไฟที่บรรจุน้ำยา AGA และแอลกอฮอล์ 95% นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยซึ่งปรับปรุงมาจาก (Palmer *et al.*, 1989) และ (ศิริณี, 2544) ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 2 ชนิดคือ เพลี้ยไฟต่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera อันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae จำนวน 131 และ 2 ตัวอย่าง โดยมีลักษณะทางอนุกรมวิธานดังนี้

Haplothrips gowdeyi (Franklin, 1908)

ลำตัวขนาดเฉลี่ย 1.2-1.5 มิลลิเมตร ลำตัวและขาไม่มีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนปลายขาไม่มีสีน้ำตาลอ่อน เพศผู้มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมีย เพศเมียมีปีกขนาดใหญ่ ส่วนหัวมีความยาวมากกว่าความกว้าง เส้น

ขนด้านหลังตาเดี่ยวอยู่บริเวณขอบของตารวมและมีความยาวเท่าขนาดความกว้างของตารวม ส่วนปากอยู่ในระนาบเดียวกันกับเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยว มีหนวด 8 ปล้อง หนวดปล้องที่ 3-4 สีเหลือง หนวดปล้องที่ 5-6 มีสีเหลืองที่บริเวณโคนและมีสีน้ำตาลอ่อนที่ส่วนปลาย หนวดปล้องที่ 3 และ 4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึก 2 และ 4 เส้นตามลำดับ ออกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ มีเส้นขนขนาดใหญ่และยาว 5 คู่ ฐานออกปล้องแรกเจริญดี แผ่นแข็งด้านล่างของออกปล้องที่สองมีรูปร่างคล้ายเรือ และมีร่องแคบลึกบริเวณตรงกลางของส่วนนอก ด้านล่างของออกปล้องสุดท้ายไม่มีเส้นเชื่อมระหว่างออกปล้องกับออกปล้องสุดท้าย ปลายขาคู่หน้ามีฟันแหลมที่บริเวณส่วนปลาย ปีกคู่หน้ามีสีซีดแต่มีสีเข้มที่บริเวณฐานปีก ปีกคู่หน้าประกอบด้วยเส้นขนที่ตั้งเป็นคู่กัน 8 เส้น แผ่นแข็งด้านล่างโคนปีกเป็นรูปสามเหลี่ยม ส่วนท้องมีเส้นขนขนาดใหญ่ที่บริเวณแผ่นแข็งด้านหลังปล้องท้องยกเว้นปล้องท้องปล้องที่ 9 แผ่นแข็งปล้องท้องปล้องที่ 2-7 มีเส้นขนรูปโค้งปล้องละ 2 คู่ ในขณะที่ปล้องท้องปล้องที่ 9 มีเส้นขนตรงยาวเท่ากับ ความยาวของปล้องท้องปล้องที่ 10 ปลายส่วนท้องแคบกว่าส่วนหัว (ภาพที่ 1)

Podothrips sp.

ลำตัวขนาดใหญ่เฉลี่ย 1.5-1.8 มิลลิเมตร ลำตัวสีน้ำตาลปลายขามีสีเหลือง เพศผู้มีขนาดลำตัว เล็กกว่าเพศเมีย มีปีกขนาดใหญ่ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ส่วนหัวมีความยาวมากกว่าความกว้าง ส่วนแก้มบนและแคบลงทางด้านล่าง มีเส้นจางๆ ด้านหลังของตารวม ปลายเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยวมีลักษณะคล้ายลูกตุ้ม และยาวไม่ถึงขอบด้านหลังของตารวม ส่วนปากไม่ได้อยู่ในระนาบเดียวกันกับเส้นขนด้านหลังตาเดี่ยว มีหนวด 8 ปล้อง ปล้องหนวดปล้องที่ 3-4 มีขนาดใหญ่ สีเหลือง ปล้องหนวดปล้องที่ 6-8 สีน้ำตาลอ่อน หนวดปล้องที่ 3-4 เป็นที่ตั้งของอวัยวะรับความรู้สึก 1 และ 2 เส้น ตามลำดับ ออกปล้องแรกมีขนาดใหญ่ ฐานออกปล้องยาวเป็นสองเท่าของขอบอกด้านบน มีเส้นขนขนาดใหญ่ที่บริเวณมุมบนและมุมล่างของส่วนนอกรวม 4 เส้นและมีขนาดใหญ่กว่าเส้นขนบนบริเวณขอบปล้องออก สันหลังออกปล้องกลางมีเส้นแบ่งกึ่งกลางอย่างชัดเจน สันหลังออกปล้องสุดท้ายไม่มีลวดลายแบบร่างแห เส้นขนบนสันหลังออกปล้องสุดท้ายมีขนาดเล็ก ปลายขาคู่หน้ามีตะขอโค้งและยาวยื่นออกมาจากปลายขา ปีกคู่หน้ามีเส้นขนเรียงบริเวณขอบปีก 1 แถว แผ่นแข็งด้านล่างโคนปีกเป็นรูปประฆัง ปล้องท้องปล้องที่ 9 มีเส้นขนแหลมความยาวเท่ากับปล้องท้องปล้องที่ 10 และความยาวของปล้องท้องปล้องที่ 10 สั้นกว่าส่วนหัว เส้นขนด้านข้างปล้องท้องปล้องที่ 10 ยาวกว่าเส้นขนที่บริเวณปลายส่วนท้อง (ภาพที่ 2)



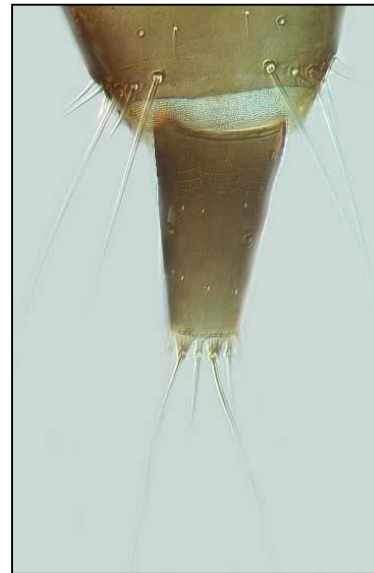
ตัวอย่างสไลด์ถาวร



ส่วนหัวและอกปล้องแรก



แผ่นแข็งด้านล่างของส่วนอก



ปล้องท้องปล้องที่ 9-10

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของเพลี้ยไฟชื่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin)



ตัวอย่างสไลด์ถาวร



ส่วนหัวและอกปล้องแรก



สันหลังอกปล้องสุดท้าย



แผ่นแข็งด้านล่างของส่วนอก

ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเพร็ลีย์ไฟ *Podothrips* sp.

ดำเนินการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของเพร็ลีย์ไฟทั้ง 2 ชนิด โดยการศึกษาความสัมพันธ์กับประวัติการวิวัฒนาการทางชีวโมเลกุลของเพร็ลีย์ไฟ (Molecular phylogenetics of Thysanoptera) และใช้โปรแกรม neighbor joining/UPGMA แสดงค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (sequence divergence) พบว่า เพร็ลีย์ไฟท่อ และเพร็ลีย์ไฟ *Podothrips* sp. อยู่ในกลุ่มเพร็ลีย์ไฟอันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae การศึกษานี้ทำให้ทราบถึงชนิดของเพร็ลีย์ไฟอันดับย่อย Tubulifera ในประเทศไทยทั้งด้านสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา ซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อน สามารถใช้เป็นข้อมูลศัตรูพืชที่สำคัญของไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับ และพืชไร่ นอกจากนี้การศึกษานี้ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีการจำแนกชนิดเพร็ลีย์ไฟหรือแมลงชนิดอื่นๆ โดยมีข้อได้เปรียบที่

สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างแมลงได้ทุกระยะทั้งระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ให้ผลที่ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วโดยไม่ต้องอาศัยเวลาในการเลี้ยงตัวอย่างแมลงนั้นๆ ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ตัวเต็มวัยในการจำแนกชนิด อีกทั้งยังสามารถเผยแพร่วิธีการและผลการศึกษาให้กับเจ้าหน้าที่ด้านตรวจพืชสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงทั้งในระยะไข่และตัวอ่อนได้อย่างทันต่อเหตุการณ์ ช่วยลดระยะเวลาการกักเก็บสินค้าเพื่อตรวจสอบ และสามารถป้องกันชนิดแมลงศัตรูพืชสำคัญที่ติดมากับสินค้านำเข้าได้ทันต่อเหตุการณ์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera (Thysanoptera: Tubulifera) ในประเทศไทย โดยสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไฟในแปลงปลูกพืช เช่น ปอเทือง มะละกอ แตงกวา ส้มโอ ถั่วฝักยาว หน่อไม้ฝรั่ง แก้วมังกร ดีปลี เป็นต้น ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้ เช่น พืชอาหาร สถานที่เก็บค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บลงในขวดตองเพลี้ยไฟที่บรรจุน้ำยา AGA และแอลกอฮอล์ 95% นำตัวอย่างเพลี้ยไฟที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อตรวจจำแนกชนิด ดำเนินการทำสไลด์ถาวร ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถเก็บรวบรวมเพลี้ยไฟได้ 133 ตัวอย่างและสามารถจำแนกชนิดเพลี้ยไฟได้ 2 ชนิดคือ เพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. ซึ่งอยู่ในอันดับ Thysanoptera อันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae 131 และ 2 ตัวอย่างตามลำดับ โดยพบที่จังหวัดสุโขทัย กำแพงเพชร เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี กาญจนบุรี เป็นต้น ทำให้ทราบถึงชนิดของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ที่สำคัญ พืชอาหารที่สำรวจพบเพลี้ยไฟเขตการแพร่กระจายของเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ในประเทศไทย และได้ตัวอย่างเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera ที่ถูกต้องสำหรับดำเนินการทดลองหาดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับการหาลำดับพันธุกรรมของยีน COI (Cytochrome Oxidase subunit I) ของเพลี้ยไฟท่อ และเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp. อยู่ในกลุ่มเพลี้ยไฟอันดับย่อย Tubulifera วงศ์ Phlaeothripidae

เอกสารอ้างอิง

ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ *Terebrantia*. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 75 หน้า.
Palmer, J. M., L. A. Mound and G. J. du Heume. 1989. (ed.). CIE Guides to Insects of Importance to Man: 2 . Thysanoptera. C. A. B International Institute of Entomology. 69 p.

ภาคผนวก

สถานที่พบ จำนวนตัวอย่างและพืชอาหารของเพลี้ยไฟท่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin)

สถานที่พบ	จำนวน ตัวอย่าง	พืชอาหาร	พิกัดทางภูมิศาสตร์
ต.กระจาย อ.ป่าดิว จ.ยโสธร	9	ทานตะวัน	N 15° 87' 8" E 104° 19' 38"
ต.บ่ง อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ	9	ปอเทือง	N 15° 52' 26" E 104° 39' 24"
ต.บุงหวาย อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี	6	ดาวเรือง	N 15° 9' 5" E 104° 45' 50"
ต.หนองโสน อ.นางรอง จ.บุรีรัมย์	10	ดาวเรือง	N 14° 44' 7" E 102° 55' 6"
ต.ศรีนาวา อ.เมือง จ.นครนายก	8	กระท้อน	N 14° 15' 5" E 101° 16' 41"
ต.ศรีนาวา อ.เมือง จ.นครนายก	6	มะยงชิด	N 14° 13' 35" E 101° 16' 9"
ต.สาริกา อ.เมือง จ.นครนายก	7	มังคุด	N 14° 17' 16" E 101° 13' 48"
ต.หนองโพรง อ.ศรีมหาโพธิ์ จ.ปราจีนบุรี	5	ข้าวโพด	N 13° 57' 2" E 101° 30' 11"
ต.โรงช้าง อ.เมือง จ.พิจิตร	2	บัว	N 16° 27' 45" E 100° 17' 1"
ต.โรงช้าง อ.เมือง จ.พิจิตร	5	พุด	N 16° 29' 6" E 100° 17' 1"
ต.ท่าดินดำ อ.ชัยบาดาล จ.ลพบุรี	6	หน่อไม้ฝรั่ง	N 15° 7' 20" E 101° 8' 20"
ต.น้ำซุน อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์	2	โหระพา	N 16° 42' 54" E 101° 10' 51"
ต.น้ำซุน อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์	2	ถั่วฝักยาว	N 16° 42' 50" E 101° 10' 51"
ต.ท่าชัย อ.ศรีสังขาลย์ จ.สุโขทัย	5	มะม่วง	N 17° 24' 35" E 99° 48' 14"

สถานที่พบ จำนวนตัวอย่างและพืชอาหารของเพลี้ยไฟต่อ *Haplothrips gowdeyi* (Franklin) (ต่อ)

สถานที่พบ	จำนวนตัวอย่าง	พืชอาหาร	พิกัดทางภูมิศาสตร์
ต.ท่าชัย อ.ศรีสัชชนาลัย จ.สุโขทัย	5	ดาวเรือง	N 16° 28' 55" E 99° 44' 14"
ต.มหาชัย อ.ไทรंगาม จ.กำแพงเพชร	3	บัว	N 17° 24' 41" E 99° 48' 21"
ต.หนองศาลา อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี	6	ดาวเรือง	N 12° 53' 50.4" E 99° 59' 20.7"
ต.หนองจอก อ.ท่ายาง จ.เพชรบุรี	9	ปอเทือง	N 12° 58' 00.5" E 99° 58' 52.5"
ต.อ่าวน้อย อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์	3	มะละกอ	N 11° 55' 00.5" E 99° 47' 59.6"
ต.ทับใต้ อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์	4	แก้วมังกร	N 12° 32' 26.0" E 99° 49' 38.8"
ต.รางบัว อ.เมือง จ.ราชบุรี	3	มะละกอ	N 13° 32' 01.1" E 99° 33' 35.5"
ต.ช่องสะเดา อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	2	แก้วมังกร	N 14° 12' 26.3" E 99° 12' 13.9"
ต.ด่านมะขามเตี้ย อ.ด่าน มะขามเตี้ย จ.กาญจนบุรี	8	ข้าวโพด	N 13° 50' 08.1" E 99° 19' 09.7"
ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี	3	กระเจี๊ยบ	N 13° 53' 53.2" E 99° 38' 50.2"
รวม	131		

สถานที่พบ จำนวนตัวอย่างและพืชอาหารของเพลี้ยไฟ *Podothrips* sp.

สถานที่พบ	จำนวน ตัวอย่าง	พืชอาหาร	พิกัดทางภูมิศาสตร์
ต.โรงช้าง อ.เมือง จ.พิจิตร	1	ไผ่ไก่	N 16° 26' 7" E 100° 17' 1"
ต.โรงช้าง อ.เมือง จ.พิจิตร	1	บานไม่รู้โรย	N 16° 26' 7" E 100° 17' 1"
รวม	2		

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อจำแนกเชื้อรา
Chaetomium cupreum และ *C. globosum* DNA barcoding for
 identification of *Chaetomium cupreum* and *C. globosum*

ชนินทร์ ดวงสอาด^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/} สุณีรัตน์ สิมะเต็อ^{1/}
 อมรรักษ์ คัดใจเดียว^{1/} มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง^{3/}
^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/} กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

รายงานความก้าวหน้า

รวบรวมข้อมูลและตัวอย่างของเชื้อรา *Chaetomium* ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 – เดือนกันยายน 2562 ได้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* จากการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ได้ไอโซเลทที่พ้องกับเชื้อรา *Chaetomium* จำนวน 4 ไอโซเลท และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตำแหน่ง translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) Internal Transcribed Spacer (ITS) RNA polymerase II subunit (rpb2) the large subunit (LSU) และ β -tubulin 2 gene (tub2) ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence เพื่อจำแนกชนิดต่อไป

คำหลัก : *Chaetomium cupreum*, *C. globosum*, DNA barcoding

คำนำ

ปัจจุบันการนำจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นปฏิปักษ์ (antagonist) มาใช้ประโยชน์และเริ่มมีบทบาทและความสำคัญทางเศรษฐกิจด้านการเกษตร เชื้อราหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อราปฏิปักษ์และนำมาใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ (biocontrol agent) เนื่องมาจากคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น เชื้อรา *Trichoderma* (Ascomycetes, Hypocreales) (de los Santos-Villalobos *et al.*, 2013; Kindermann *et al.*, 1998; Mbarga *et al.*, 2012) และเชื้อรา *Chaetomium* (Sordariomycetes, Sordariales) (Soytong, 1990; Soytong, 2001) ลักษณะของเชื้อราปฏิปักษ์จะมีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราสาเหตุโรคพืช จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการแย่งใช้สารอาหารและพื้นที่ในการเจริญ สามารถใช้สารอาหารและเจริญในเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (mycoparasite) บางชนิดสร้างสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น *C. globosum* สร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium ultimum* สาเหตุโรค damping-off ของ sugar beet (Di-Pietro *et al.*, 1991) เชื้อรา *C. cupreum* สร้างสารปฏิชีวนะและยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium sp.*, *Macrophomina phaseolina*, *Phomopsis sp.*, *Cercospora kikuchii*, *Colletotrichum dematium var. truncate*, *Phomopsis sp.* และ *Rhizoctonia solani* (Yeh and Sinclair, 1980) และพบว่าสารที่เชื้อราปฏิปักษ์บางชนิดสร้างขึ้นมีผลดีต่อพืชโดยช่วยในการเจริญเติบโต (plant growth) รวมถึงกระตุ้นให้พืชมีความแข็งแรงต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช (plant defence responses) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคพืชโดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียแก่พืช เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยช่วยลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช

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 Soyong, 1991; Somrithipol, 2004; Somrithipol *et al.*, 2004; Soyong, 1991; Udagawa, 1973) การจัดจำแนกเชื้อรา *Chaetomium* สามารถทำได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Doveri, 2013) เช่น ลักษณะและตำแหน่งของ ascomata setae รูปร่างลักษณะและขนาดของ ascospores (von Arx *et al.*, 1986; Doveri, 2013)

การจัดจำแนกและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Chaetomium* ใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) กันมากขึ้น (Lee and Hanlin, 1999; Untereiner *et al.*, 2001; Greif *et al.*, 2009; Asgari and Zare, 2011; Pornsuriya *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014) แต่เนื่องการศึกษาส่วนใหญ่ใช้จำนวนตัวอย่างที่จำกัด ทำให้ผลการศึกษาความแตกต่างรวมถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อรา *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 elongation factor (TEF1- α) และ the large subunit of RNA polymerase II (RPB1) เพื่อแยกความแตกต่างของ *C. indicum* พบว่ามีเชื้อรา *Chaetomium* จำนวน 6 ชนิด ภายใต้ชื่อ *C. indicum* (Wang *et al.*, 2014)

Pornsuriya et al. (2008) แยกเชื้อรา *Chaetomium* หลายชนิด จากดินในพื้นที่เพาะปลูก สลับปะรดในจังหวัดพัทลุง ได้แก่ *C. aureum*, *C. bostrychodes*, *C. carinthiacum*, *C. cochliodes*, *C. cupreum*, *C. flavigenum*, *C. gracile*, *C. perlucidum* และ *C. succineum* ซึ่งเชื้อราเหล่านี้มีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน ต่อมา มีรายงานว่า เชื้อรา *C. siamense* ซึ่งมีลักษณะทาง สัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับเชื้อรา *C. cupreum* มาก แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบด้วยลักษณะทาง พันธุกรรม (DNA) กลับพบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกัน (Pornsuriya et al., 2011) และพบข้อบ่งชี้ว่าเชื้อรา *C. cupreum* ที่รายงานพบในประเทศไทยมีความหลากหลาย แต่ความ หลากหลายนี้ไม่สามารถจำแนกได้ด้วยการวิเคราะห์ ITS เพียงตำแหน่งเดียว และมีแนวโน้มเป็น complex species ที่อาจมีมากกว่า 1 ชนิดภายใต้ชื่อ *C. cupreum* เช่นเดียวกับ *C. globosum* (Pornsuriya et al., 2011)

Chaetomium cupreum และ *C. globosum* ถูกเลือกจากจำนวนหลายชนิดของเชื้อรา *Chaetomium* ที่มีการใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี และมีการส่งเสริมให้ใช้ในการป้องกันกำจัด โรคพืชโดยทั้งทางรัฐและเอกชน รวมถึงมีการผลิตเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* ในเชิงพาณิชย์ ปัจจุบันหลายบริษัทได้แสดงความประสงค์ขอขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ของเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* เป็นสารชีวภัณฑ์ในเชิงพาณิชย์ การตรวจสอบความถูกต้องของ ชนิดของเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* ที่นำไปใช้ในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากส่งผลต่อประสิทธิภาพในการป้องกันและกำจัดเชื้อสาเหตุโรคพืช แต่เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา genus *Chaetomium* ชนิด มีความคล้ายคลึงกัน มากและลักษณะความแตกต่างที่พบไม่เพียงพอทำให้เกิดข้อจำกัดต่อการจัดจำแนก อีกทั้งการจัด จำแนกนั้นต้องอาศัยความเชี่ยวชาญและชำนาญเป็นอย่างยิ่ง จึงต้องมีการพิจารณาลักษณะทางด้าน พันธุกรรม (DNA) มาร่วมวิเคราะห์ เพื่อป้องกันความแตกต่างและการจัดจำแนกที่ถูกต้อง

เนื่องจากกลุ่มวิจัยโรคพืช เป็นหน่วยงานที่รับผิดชอบในการตรวจสอบความถูกต้องของสาย พันธุ์ที่ขอขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์ ดังนั้นการศึกษาเพื่อจำแนกเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* โดยใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม จึงมีความสำคัญ ข้อมูลและผลที่ได้จากการวิจัยจะ ได้มาซึ่งวิธีการที่มีความแม่นยำและถูกต้อง ในการตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่ระบุในสารชีวภัณฑ์ที่ นำมาขึ้นทะเบียนกับกรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้การตรวจสอบเพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา ในสารชีวภัณฑ์ จะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร อีกทั้ง ข้อมูลของลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากการศึกษาสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้ เปรียบเทียบ หรือศึกษาความหลากหลายและการวิวัฒนาการของ เชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* ในประเทศไทยต่อไป

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อให้ได้เชื้อรา *Chaetomium cupreum* และ *C. globosum* มาตรฐานที่ได้รับการจำแนกชนิดอย่างถูกต้อง และเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานของ เชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องของชนิดเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. 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 ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ปิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง 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 ITS1/ITS4 (White, 1990) EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999) / TEF1_R (Samuels *et al.*, 2002) fRPB2-5F/fRPB2-7cR (Liu *et al.*, 1999) และ LROR/LR6 (Vilgalys and Hester, 1990)
6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012)

วิธีการ

1. ศึกษาข้อมูลของเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum*

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

2. เก็บและรวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum*

ตัวอย่างเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* ที่นำมาใช้ในการวิจัย นำมาจาก culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ จากสารชีวภัณฑ์ของเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* ที่มีขายในท้องตลาดในปัจจุบัน รวมถึงไอโซเลตที่มีการส่งเสริมโดยหน่วยงานของภาครัฐ โดยตัวอย่างของเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* ทั้งหมดจากการเก็บตัวอย่าง จะนำมาแยกเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการสกัด DNA ต่อไป เชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* ที่ใช้ในการศึกษาจะจัดเก็บใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการ-เกษตร กรุงเทพฯ สำหรับเป็นข้อมูลหรือตัวอย่างอ้างอิงต่อไป

3. ศึกษา และจำแนกชนิดของเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

ศึกษาลักษณะของเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum*

นำราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของรา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) ศึกษา และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆของราที่วัดขนาดไว้

จำแนกชนิดเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum*

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Chaetomium* ที่ศึกษากับคู่มือของ von Arx *et al.* (1986) และ Doveri (2013)

4. จำแนกชนิดของเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตัดหรือเขี่ยเส้นใยรวมถึง conidia ของเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับการสกัด ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่ง EF1- α ITS rpb2 LSU และ tub2 ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature ของแต่ละตำแหน่งที่ 56 องศาเซลเซียส และ 60 สำหรับตำแหน่ง LSU

การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี 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) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (<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) มาจัดเรียง (align) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Kato and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar *et al.*, 2008) โดยทำแยกแต่ละชุดของ gene จากนั้นเอาตำแหน่งที่มีความน่าเชื่อถือต่ำออกจาก alignment โดยการโดยใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทั้งนี้ก่อนการใช้โปรแกรม Gblock ควรพิจารณา alignment ก่อนว่าช่วงของข้อมูลที่มีความแปรผันนั้นเป็นความแปรผันที่โดยธรรมชาติหรือไม่ บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ .nexus หรือ .nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สองเกณฑ์มาตรฐานคือ Maximum Likelihood และ Bayesian Inference เตรียมชุดของข้อมูลที่จะใช้ในการวิเคราะห์ในแต่ละวิธี ดังนี้

Maximum Likelihood (ML) รูปแบบไฟล์คือ .phy โปรแกรมที่ใช้คือ RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) โดยกำหนดค่า model of evolution แบบ GTRGAMMA ทำการวิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command -f a) กำหนดให้เริ่มวิเคราะห์จาก random starting tree และ 1000 ซ้ำ สำหรับ maximum likelihood bootstrap

Bayesian inference (BI) รูปแบบไฟล์คือ .nexus โปรแกรมที่ใช้คือ MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังนี้ “Mcmc startingtree= user ngen= 10 000 000 temp= 0.25 nruns= 4 samplefreq= 1000 pintfreq= 1000 nchains= 4 savebrlens= yes stoprules= yes stopval= 0.01;” ปรับค่า generation temperature substitution model parameters จำนวน generation และ burnin เพื่อให้ได้ consensus topology ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย 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 จัดเก็บดีเอ็นเอต้นแบบไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

รวบรวมข้อมูลและตัวอย่างของเชื้อรา *Chaetomium* ระหว่างเดือนตุลาคม 2560 – เดือนกันยายน 2562 ได้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. cupreum* และ *C. globosum* ดังนี้

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)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Sordariomycetes
Subclass	Sordariomycetidae
Order	Sordariales
Family	Chaetomiaceae
Genus	<i>Chaetomium</i>
Species	<i>cupreum</i>

ลักษณะของเชื้อ โคลนีสของเชื้อราและ ascomata มีชมพูถึงแดง ascomata รูปร่างคล้ายไขขนาด 79.7-142.7 × 94.7-151.5 µm เส้นของ ascomatal ลักษณะ arcuate ปลายแบบ circinate หรือขด มีผนังกั้น asci รูปร่างแบบกระบองมีสปอร์อยู่ภายในจำนวน 8 ascospores ต่อ ascus สปอร์มีรูปร่างแบบ reniform ขนาด 4.7-6.7 × 6.7-10.0 µm มี apical germ pore 1 รูอยู่ด้านบนสปอร์ (Figure 1) (Pornsuriya *et al.*, 2008)

หมายเหตุ ชื่อวิทยาศาสตร์ปัจจุบันของ *C. cupreum* คือ *Arcopilus cupreus* (L.M. Ames) X. Wei Wang & Samson, Studies in Mycology 84: 217 (2016)

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 fibrilium* 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	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Sordariomycetes
Subclass	Sordariomycetidae
Order	Sordariales
Family	Chaetomiaceae
Genus	<i>Chaetomium</i>
Species	<i>globosum</i>

ลักษณะของเชื้อ โคลนินของเชื้อราไม่มีสีเหลืองถึงเหลืองอ่อน *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 2) *asci* อาจพบได้ไม่บ่อยเนื่องจากลักษณะนี้จะปรากฏและคงอยู่ไม่นาน สปอร์มีสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างแบบ biapiculate ขนาด 9.5-11(-11.5) x 7.5-8.5(-9) μm มี apical germ pore 1 รูอยู่ด้านบนสปอร์ (Wang *et al.*, 2016)

หมายเหตุ *C. globosum* เป็น species complex ประกิบไปด้วยอย่างน้อย 12 ชนิด (Wang *et al.*, 2016)

จากการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ได้ไอโซเลทที่พ้องกับเชื้อรา *Chaetomium* จำนวน 4 ไอโซเลท และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตำแหน่ง translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) Internal Transcribed Spacer (ITS) RNA polymerase II subunit (rpb2) the large subunit (LSU) และ β -tubulin 2 gene (tub2) ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence เพื่อจำแนกชนิดต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *C. globosum* และ *C. cupreum* และได้ ไอโซเลทที่พ้องกับเชื้อรา *Chaetomium* จำนวน 4 ไอโซเลท และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตำแหน่ง translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) Internal Transcribed Spacer (ITS) RNA polymerase II subunit (rpb2) the large subunit (LSU) และ β -tubulin 2 gene (tub2) ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence เพื่อจำแนกชนิดต่อไป

เมื่อสิ้นสุดงานวิจัยข้อมูลที่ได้จากการทดลอง จะใช้เป็นฐานข้อมูลและองค์ความรู้เพื่อใช้ในการต่อยอดงานวิจัยวิจัย และได้วิธีการและข้อมูลลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA barcode) ของเชื้อรา *Chaetomium* เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของเชื้อรา *Chaetomium* ที่มีการขอขึ้นทะเบียนสารชีวภัณฑ์กับกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อผู้ใช้สารชีวภัณฑ์เชื้อรา *Chaetomium* โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเกษตรกร อีกทั้งข้อมูลลักษณะทางด้านพันธุกรรม (DNA) ที่ได้จากการศึกษาเป็นประโยชน์ทางการศึกษาในหน่วยงานราชการ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สถาบันการศึกษา และหน่วยงานเอกชน โดยสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อศึกษาความหลากหลายและวิวัฒนาการของเชื้อรา *Chaetomium* ในประเทศไทย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ 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.
- 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-Cabrales. 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.
- 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. *Uromykladium 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.
- 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.
- Katoh, K. and H. Toh. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9: 286-298.
- 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 and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. In: Thai fungal diversity (eds. E.B.G Jones, M. Tanticharoen and K.D. Hyde). *BIOTEC, Thailand*, 119-128.

- Somrithipol, S., N.L. Hywel-Jones and E.B.G. Jones. 2004. Seed fungi. In: Thai fungal diversity (eds. E.B.G Jones, M. Tanticharoen and K.D. Hyde). *BIOTEC, Thailand*, 129-140.
- Soytong, K. 1990. A taxonomic study of *Chaetomium* spp. in Thailand. Abstract, 4th International Mycological Congress, Regensburg, Germany, August 28-September 3, 1990.
- 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.
- 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., L. Lombard, J.Z. Groenewald, J. Li, S.I.R. Videira, R.A. Samson, X.Z. Liu and P.W. Crous. 2016. 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 ampulliforme* 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. Pages 315-322. In : M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press.
- Yeh, C.C. and J.B. Sinclair. 1980. Effect of *Chaetomium cupreum* on seed germination and antagonism to other seedborne fungi of soybean. *Plant Disease* 64: 468-470.

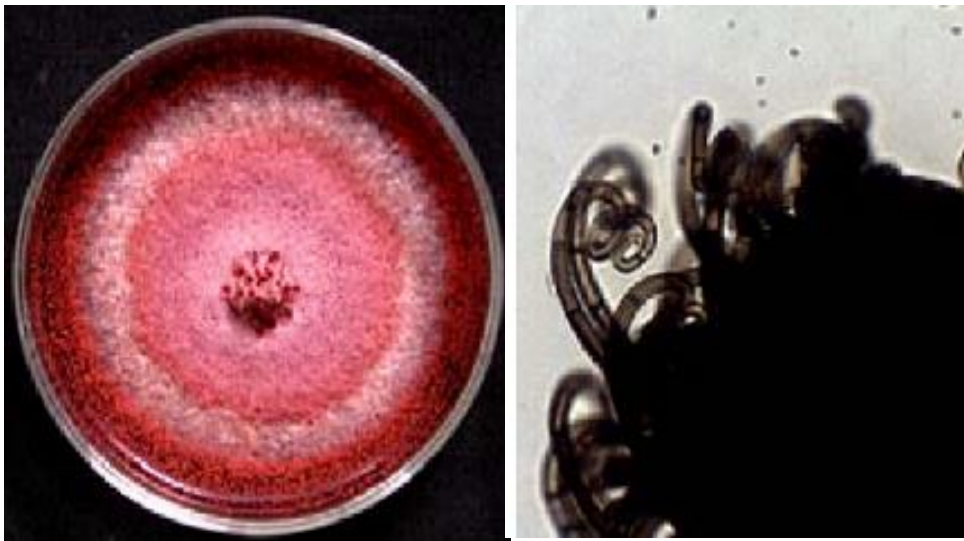


Figure 1 ลักษณะของเชื้อรา *Chaetomium cupreum* (Pornsuriya et al., 2008)



Figure 2 ลักษณะของเชื้อรา *Chaetomium globosum*

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกแมงมุมวงศ์ Salticidae DNA Barcoding to Identify Spider Family Salticidae

วิมลวรรณ โชติวงศ์^{1/} กาญจนา วาระวิชนี^{2/} พิเชฐ เขาวนัฒนวงศ์^{3/}
 พลอยชมพู กรวิภาสเรือง^{1/} อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล^{1/} อติติยา แก้วประดิษฐ์^{1/}
^{1/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{3/}รักษาการผู้เชี่ยวชาญด้านศัตรูพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างแมงมุมกระโดดในพื้นที่ 11 จังหวัดได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร เพชรบุรี ขอนแก่น ระยอง จันทบุรี ตราด พิษณุโลกแพร่ และน่าน สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมกระโดดได้ 40 ตัวอย่าง ได้ข้อมูลรายละเอียดของแมงมุมกระโดดที่รวบรวมได้จากหญ้าข้างทาง พื้นที่การเกษตร และพื้นที่ป่าธรรมชาติ สถานที่เก็บ ค่าพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) นำตัวอย่างแมงมุมกระโดดที่รวบรวมได้มาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพื่อจำแนกชนิด และเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75% เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์ เพื่อจำแนกและวิเคราะห์ชนิดตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างบางส่วนเก็บรักษาในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 90% (เพื่อใช้นำไปศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ด) และนำไปเก็บที่ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอ และวางแผนขั้นตอนการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในลำดับต่อไป

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-13-61



คำนำ

แมงมุมกระโดด (jumping spider) เป็นแมงมุมที่อยู่ในวงศ์ Salticidae มีความหลากหลายมากที่สุดกว่าแมงมุมในวงศ์อื่น ปัจจุบันทั่วโลกจำแนกได้ 510 สกุล และ 4,600 ชนิด ซึ่งคิดเป็นปริมาณร้อยละ 13 ของแมงมุมทั้งหมด (Platnick, 1998) แมงมุมกระโดดเป็นแมงมุมที่มีขนาดเล็กและมีระบบสายตาดีที่สุดในบรรดาแมงมุมทั้งหมด ลักษณะเด่นคือตากกลางคู่หน้ามีขนาดใหญ่มากและมีตาข้างขนาดเล็ก 3 คู่ ทำให้สามารถมองเห็นได้รอบทิศ เป็นตัวห้ำที่ออกหากินในเวลากลางวันโดยการสะกดรอยตามและตะครุบเหยื่อ (Foelix, 1996) แมงมุมกระโดดสามารถพบได้ทั่วไปในพืชเศรษฐกิจต่างๆ อยู่ทั่วไปตามต้นไม้ บนหญ้า และพื้นดิน และมีบทบาทสำคัญในการช่วยควบคุมประชากรแมลงศัตรูพืชหลายๆ ชนิด เช่น *Zeuxippus* sp. นิสัยว่องไว จับเหยื่อกินโดยตรง ได้แก่ แมลงวัน ดั้ว และผีเสื้อ หนอนกอข้าว ซึ่งพบทั่วไปในนาข้าว นอกจากนี้วิภาดา (2539) รายงานว่า *Lyssomanes* sp. พบจับเหยื่อที่บริเวณใบกล้วยไม้ *Myrmarachne plataleoides* จากการศึกษพบว่าสามารถกินแมลงวัน มวน และตัวอ่อนของมด *Heliophanus* sp. หากินในเวลากลางวันบริเวณใบกล้วยไม้ พบว่าสามารถกินผีเสื้อ และเพลี้ยจักจั่น *Evarcha flavocincta* หากินบริเวณใบกล้วยไม้ในเวลากลางวัน พบว่าสามารถกินผีเสื้อ และแมลงวันผลไม้ *Evarcha* sp. พบว่าสามารถกินผีเสื้อ และแมลงวันผลไม้

ปัจจุบัน วิภาดาและคณะ (2533, 2543, 2548) ได้ศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมกระโดดในประเทศไทยและจำแนกได้เพียง 11 ชนิด และยังมีแมงมุมกระโดดอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานรวมถึงการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช นอกจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อนำมาจำแนกชนิดของแมงมุมแล้วการศึกษาลำดับพันธุกรรมของแมงมุมนี้มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากงานวิจัยทางด้าน DNA Barcoding ถือว่าเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่สำคัญและเป็นที่ยอมรับกันทั่วโลกที่มีความถูกต้องและแม่นยำ ดังนั้น การศึกษาทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับลำดับพันธุกรรม จะทำให้ได้การวินิจฉัยที่ถูกต้องและแม่นยำ นอกจากนี้ยังเป็นการรวบรวมและเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุมของกรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้เป็นแหล่งอ้างอิง สืบค้น ตามหลักมาตรฐานสากล

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง หลอดแก้วทดลอง ขวดดองตัวอย่างแมงมุมขนาดต่างๆ กัน กล่องพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กัน กระดาษทิชชู ปากคีบ พู่กัน ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กัน สารเคมี ได้แก่ alcohol 95% ethyl acetate
2. อุปกรณ์ในการจำแนกชนิด ได้แก่ กรดแล็กติก จานแก้ว petridish ทรายละเอียด กล้องจุลทรรศน์ (stereomicroscope) tube ขนาดเล็ก ดินสอ ปากกา rotring เบอร์ 1, 2, 3 เอกสารด้านอนุกรมวิธานแมงมุมที่เกี่ยวข้อง
3. สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาดีเอ็นเอ ได้แก่ ชุดสกัดสารดีเอ็นเอ (DNA extraction kit: Isolate Genomic DNA Kit), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas), Agarose gel (SeaKem) และ TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), NaCl, NaOH, EDTA, Proteinase K, dNTP mixture, 10X PCR buffer, สารเคมีและ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ,

Automatic pipette, ปีกเกอร์, หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์, DNA Thermal Cycle, เครื่อง Electrophoresis, Gel Documentary, Gene Amp PCR

4. อุปกรณ์ในการเขียนผลงานวิจัยและเผยแพร่ ได้แก่ อุปกรณ์ในการถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์ ติดตั้งด้วยกล้องถ่ายภาพ อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ วัสดุสำนักงาน

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมงมุม

การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมงมุมวงศ์ Salticidae จากพื้นที่การเกษตร และพื้นที่ป่าธรรมชาติ โดยจะเก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) จับแมงมุมโดยใช้มือหรือหลอดทดลองช่วยในการจับ เก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 90% (เพื่อใช้นำไปศึกษาตีเอ็นเอบาร์โค้ด) บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างแมงมุม เช่น ชื่อแมงมุม วันที่จับ สถานที่จับ ชื่อผู้จำแนกชนิด ลงในป้ายกระดาษขาวแผ่นเล็ก ๆ แล้วใส่ลงในหลอดแก้วที่ตอมแมงมุมและนำไปเก็บที่ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอและนำไปใช้ในการศึกษาตีเอ็นเอบาร์โค้ด ตัวเต็มวัยบางส่วนนำมาเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75% เพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

แมงมุมที่เก็บรักษาไว้ นำมาจำแนกเป็นวงศ์ สกุล ชนิด การจำแนกศึกษาจากตำราต่าง ๆ จากเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุม ถ่ายรูปและบรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน ทำ key เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจำแนก เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

3. การสกัด ดีเอ็นเอ

การสกัด ดีเอ็นเอ สามารถใช้ตัวอย่างสดที่เก็บได้จากแปลงโดยเก็บรักษาตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 95% หรือในกรณีที่ตัวอย่างสดไม่สามารถสกัดได้เราสามารถใส่ตัวอย่างแมงมุมในพิพิธภัณฑ์ที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 75% ได้ แต่ทั้งนี้การสกัดจะสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์ด้วยการสกัดดีเอ็นเอใช้ Qiagen DNeasy Tissue Kits โดยในกรณีที่ตัวอย่างที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 95% สามารถใช้ขาแมงมุม 1-2 ขา แต่ถ้าเป็นตัวอย่างที่เก็บรักษาในแอลกอฮอล์ 75% ต้องใช้ขา 4 ขารวมทั้งแผ่นแข็งส่วนนอกด้านบน ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ ATL 180 µl และ เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteinase K) 20 µl จากนั้นนำไป incubated ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 15 นาที เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AL 200 µl เข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วใส่ เอทานอล 99% 200 ไมโครลิตร ดูดสารละลายส่วนที่ใส 2 µl ไปที่ DNeasy Mini spin column จากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 8,000 รอบ/นาที 1 นาที ทำการล้าง ดีเอ็นเอ โดยการดูดสารละลายส่วนที่ใส 2 µl ไปที่ DNeasy Mini spin column เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW1 500 µl จากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 8,000 รอบ/นาที 1 นาที จากนั้นล้าง ดีเอ็นเอ ครั้งที่ 2 โดยดูดสารละลายส่วนที่ใส 2 µl ไปที่ DNeasy Mini spin column เติมสารละลายบัฟเฟอร์ AW2 500 µl จากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 14,000 รอบ/นาที 3 นาที ทำการย้าย ดีเอ็นเอจาก silica membrane ลงในtube อันใหม่โดยดูดสารละลายส่วนที่ใส 2 ไมโครลิตรไปที่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ AE 200 µl จากนั้นนำไปเข้าเครื่องปั่นแรงเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 8,000 รอบ/นาที 1 นาที ที่ 15 องศาเซลเซียส

4. การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี PCR เพื่อตรวจวินิจฉัยชนิดแมงมุมวงศ์ Salticidae ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับทดลองได้แก่ C1-J-1751 และ C1-N-2776 (Hedin and Maddison, 2001) อ้างอิงจากการทดลองเรื่อง Revision of Australian jumping spider genus *Servaea* (Aranea: Salticidae) including use of DNA sequence data and predicted distributions ของ Richardson and Gunter, 2012

C1-J-1751 : (5'-GAGCTCCTGATATAGCTTTTCC-3')

C1-N-2776 : (5'-GGATAATCAGAA TATCGTCGAGG-3')

ดำเนินการโดยใช้ชุดเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ สำเร็จรูป Qiagen DNeasy Tissue Kits โดยใช้ ดีเอ็นเอ ตั้งต้น 1 µl (10-20 ng), dNTPs 0.2 mM, 0.6U Perkin-Elmer AmpliTaq DNA polymerase 1.25µl of forward primer, 1.25µl of reverse primer, 17.3 µl of Millipore water ซึ่งรวมสารละลายตั้งต้นปฏิกิริยาที่ใช้ทั้งสิ้น 25 µl ดำเนินปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิรอบ (PCR thermocycler step: Initial denaturation, Denaturation, Annealing and Extension) ตาม ขั้นตอนดังนี้ 94°C นาน 2 นาที 94°C นาน 25 วินาที รอบแรก 50°C รอบที่ 2 44.5°C นาน 25 วินาที และ 65°C นาน 2 นาที และทำ final Extension อีกรอบ 72°C นาน 10 นาที ใช้ระยะเวลา 40 รอบ หลังจากขั้นตอน PCR นำสารที่ได้ 4 ไมโครลิตร ทดสอบใน 1% w/v agarose gel และ วิเคราะห์ลำดับเบสโดยนำไปเทียบเคียงกับDatabaseแมงมุม

เวลาสถานที่ทำการทดลอง

ทำการศึกษาระหว่างเดือน ตุลาคม 2560-กันยายน 2563 โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างบน พื้นที่ 11 จังหวัดได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร เพชรบุรี ขอนแก่น ระยอง จันทบุรี ตราด พิษณุโลก แพร่ และน่าน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างแมงมุมกระโดดในพื้นที่ 11 จังหวัดได้แก่ จังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร เพชรบุรี ขอนแก่น ระยอง จันทบุรี ตราด พิษณุโลก แพร่ และน่าน สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างแมงมุมกระโดดได้ 50 ตัวอย่าง นำไปศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานและจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ โดยการใช้ลักษณะทางอนุกรมวิธานที่สำคัญในการจำแนกชนิด เช่น การจัดเรียงตัวของตา ระยะห่างระหว่างตา เส้นขนที่ตา ลักษณะรูปร่าง และลวดลายบนส่วนหลัง ความยาวของขา ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ผลจากการจำแนกพบแมงมุมกระโดด 4 ชนิด ได้แก่ *Hyllus diardi* (Walckenaer, 1837) จำนวน 5 ตัวอย่าง แมงมุมคล้ายมด *Myrmarchne plataleoides* (O. Pickard-Cambridge, 1869) จำนวน 15 ตัวอย่าง แมงมุมกระโดด *Phintella vittata* (C. L. Koch, 1846) จำนวน 20 ตัวอย่าง และ *Plexippus paykulli* จำนวน 10 ตัวอย่าง ดำเนินการศึกษาและวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของแมงมุมทั้ง 4 ชนิด จากนั้นเตรียมตัวอย่างเพื่อจำแนกและวิเคราะห์ชนิด และนำไปสกัด DNA พร้อมทั้งทำ PCR ด้วยยีน COI

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุมที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- วิภาดา วังศิลาบัตร. 2533. การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมวงศ์ Salticidae ในสัมพันธ์หวน. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2533. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 47.
- วิภาดา วังศิลาบัตร. 2539. การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในกล้วยไม้. รายงานผลการวิจัย กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ หน้า 1-76.
- วิภาดา วังศิลาบัตร. 2543. การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในสวนส้มโอ. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยประจำปี 2543. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 14-152.
- วิภาดา วังศิลาบัตร มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยวัฒน์ และพิเชฐ เซาว์นวัฒนวงศ์. 2548. การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในมะม่วง. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548 เล่มที่ 1. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 418-470.
- Foelix, R.F. 1996. Biology of spiders, 2nd ed. New York: Oxford Thieme. 330 pp.
- 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, 386-403p.
- Platnick N.I. 1998. Advances in spider taxonomy 1992-1995, with redescriptions 1940-1980. New York: Entomol. Soc. Am. Mus. Nat. Hist. 976 pp.

*Hyllus diardi**Myrmaplata plataleoides**Phintella vittata**Plexippus paykulli*

ตัวอย่างรายละเอียดข้อมูลสารพันธุกรรมที่ได้จากการทำ PCR ด้วยยีน COI

>SNI0102

ANTCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCATTAATATTA
 TTATTCATTTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTAGGAGCTGGATGAACTGTTTATCCTCCATTAGCAT
 CTATTGTTGGACATAATGGAGTATCTGTAGATTTTGCAATTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTC
 ATCTATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACTGTTATTAATATACGTTCTATTGGAATGAGATTAG
 ATAAGGTTCTTTATTTGTGTGATCAGTTTTAATTACAGCTGTATTATTGCTTTTATCTTTACCTGT
 ATTAGCAGGTGCTATTACTATATTATTAAGTATCGAAATTTTAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTG
 GTGGAGGAGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGGCACCCTGAAGTATATATTTT
 GATTTTACCTGGATTTGGAATTATTTCTCATATTATTAGATCTTCTGTAGGAAAAAAGGAGACTTTT
 GGTTCTTTAGGTATAATTTATGCTATAGTGGGAATTGGAGGAATAGGATTTGTTGTATGGGCACATC
 ATATATTTTCTGTAGGAATGGATGTAGATACTCGGGCTTATTTTACAGCTGCTACTATAAATTATTGC
 TGTACCTACTGGTATTAGGATTTTATAGATGAATAGCTACTTTATATGGTTCTTATTTTAAAATTGATA
 CTCCTTTATTATGGAGAATTGGATTTGTATTTTTATTTACTCTGGGTGGGATTACTGGAGTAATTTT
 ATCTAATTCATCATTAGATATTGTATTACATGATACTTATTATGTTGTAGCTCATTTTCATTATGTATT
 AAGAATAGGGGCTGTATTTGCTATTATGGCTGGAATTACTTATTGATTTCTTTATTTTTTTGGA

>SNI0103

GNCTGATATAGCTTTTCCTCGTATAAATAATTTAAGATTTTGATTACTACCTCCTTCATTAATATTAC
 TATTCATTTCTTCTATAGCTGAGATAGGAGTAGGAGCTGGATGAACTGTTTATCCTCCATTAGCATC
 TATTGTTGGACATAATGGAGTATCTGTAGATTTTGCAATTTTTCTTTACATTTAGCTGGAGCTTCA
 TCTATTATAGGTGCTATTAATTTTATTTCTACTGTTATTAATATACGTTCTATTGGAATGAGATTAGA
 TAAGGTTCTTTATTTGTGTGATCAGTTTTAATTACAGCTGTATTATTGCTTTTATCTTTACCTGTAT
 TAGCAGGTGCTATTACTATATTATTAAGTATCGAAATTTTAATACATCTTTTTTTGATCCTGCTGG
 TGGAGGAGATCCTATTTTATTTCAACATTTATTTTGATTTTTTGGGCACCCTGAAGTATATATTTTG
 ATTTTACCTGGATTTGGAATTATTTCTCATATTATTAGATCTTCTGTAGGAAAAAAGGAGACTTTTG
 GTTCTTTAGGTATAATTTATGCTATAGTGGGAATTGGAGGAATAGGATTTGTTGTATGGGCACATCA
 TATATTTTCTGTAGGAATGGATGTAGATACTCGGGCTTATTTTACAGCTGCTACTATAAATTATTGCT
 GTACCTACTGGTATTAGGATTTTATAGATGAATAGCTACTTTATATGGTTCTTATTTTAAAGATTGATAC
 TCCTTTATTATGGAGAATTGGATTTGTATTTTTATTTACTCTAGGTGGGATTACTGGAGTAATTTTA
 TCTAATTCATCATTAGATATTGTATTACATGATACTTATTATGTTGTAGCTCATTTTCATTATGTATTA
 AGAATAGGGGCTGTATTTGCTATTATGGCTGGAATTACTTATTGATTTCTTTATTTTTTTGGAAC
 TTTAAGAGAAAAAACTAATCTTTCAATTCATNNTCATATTTATTGGTGTGAATTTAACTTTTTT
 TCCTCAACATTTTTT

>SNI0104

TGAGGAAAAAGTTAAATTCACACCAATAAATATGATTATGAATTGAAGATTAGTTTTTTTTCTCT
TAAAATAGTTCCAAAAATAAAGGAAATCAATAAGTAATTCCAGCCATAATAGCAAATACAGCCC
CTATTCTTAATACATAATGAAAATGAGCTACAACATAATAAGTATCATGTAATACAATATCTAAT
GATGAATTAGATAAAATTAAGTACTCCAGTAATCCCACCTAGAGTAAATAAAAAATACAAATCCAATTCT
CCATAATAAAGGAGTATCAATTTTAAATAAGAACCATATAAAGTAGCTATTCGTCTAAAAATCC
TAATACCAGTAGGTACGGCAATAATTATAGTAGCAGCTGTAAAATAAGCCCGAGTATCTACATCC
ATTCTACAGAAAATATATGATGTGCCCATACAACAAATCCTATTCTCCAATCCCCTACTATAGC
ATAAATTATACCTAAGAACCAAAAAGTCTCCTTTTTTCTACAGAAGATCTAATAATATGAGAAA
TAATCCGAATCCAGGTAAAATCAAAATATATACTTCAGGGTGCCCAAAAATCAAAAATAAATGT
TGAAATAAAATAGGATCTCCTCCACCAGCAGGATCAAAAGAAGATGTATTAATAATTCGATCAGT
TAATAATATAGTAATAGCACCGGCTAATACAGGGAAAGATAAAAAGCAATAATACAGCTGTAATTA
AACTGATCACACAAATAAAGGAGCCTTATCTAATCTCATTCCAATAGAACGTATATTAATAACA
GTAGAAATAAAATTAATAGCGCCTATAATAGATGAAGCTCCAGCTAAATGTAAAGAAAAAATTGC
AAAATCTACAGATACTCCATTATGTCCAACAATAGATGCTAATGGAGGATGAACAGTTCATCCAG
CTCCGACTTCTATCTCAGCTATCGATGAANGATGAGTA

>SNI0201

GAGCTCTGATATGGCTTTTCTCGAATGATAATTTAAGATTTTGATTATTACCTCCTTCTTAATGT
TATTGTTTTATTTTCAATAGCTGAAATAGGAGTGGGAGCAGGATGAACAGTTTATCCACCTTAG
CTTCAATTATTGGACATAATGGAAGATCTGTAGATTTTGCTATTTTTTCTTTACATTTGGCTGGAGC
TTCTTCTATTATAGGGGCCATTAATTTTACTACTCGGTAATTAATATACGGGTTAGGGGAATATCTT
TAGATAAACTCCTTTATTTGTATGATCAGTAGTAATTAAGTCTGTTCTATTATTATTGTCATTACCA
GTTCTAGCTGGTGCTATTACTATATTATTGACTGATCGAAATTTAATACTTCTTTTTTTGATCCTG
CTGGAGGAGGAGATCCTATTTTATTTTTCAGCATTATTTTGGTTTTTTGGTCATCCGGAGGTATATAT
TTTAATTTTACCAGGATTTGGTATTGTTTCTCATATTATTAGATCTTCTGTAGGAAAGCGAGAACCG
TTTGGTTCTTTAGGAATAATTTATGCAATAGTAGGAATTGGAGGAATGGGATTTGTAGTATGAGCT
CATCATATATTTTCTGTAGGAATGGATGTAGATACTCGTGCTTATTTTACTGCGGCTACTATAATTAT
TGCAGTTCCAACGGGAATTAAGGTATTTAGATGAATAGCTACTTTATATGGATCTTATTTTAAAATT
GATTCACCTTTATTGTGATGCATTGGGTTTTTTTTTTTACTTTTAGGAGGAATTACGGGAGTG
GTATTATCTAATTTCTCATTAGATATTGTTTTACATGATACTTATTATGTGGTTGCTCATTTTCATTA
TGATTAAGAATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGCTGGGATTACTTATTGGTTTCTTTATTTTTT
GGATCAGTATTAAGAGAAAAAAAATAAGTTACAATTTATAGTAATTTTTTAGGAGTAAATATAA
CTTTTTTTCTCAACATTTTTTTGGGTTAAATGGTATGCCTCGACGA

>SNI0202

ACCCAAATGTTGAGGAAAAAGTTATATTTACTCCTAAAAATATTACTATAAATTGTAACCTTAGT
 TTTTTTTTCTCTTAATACTGATCCAAAAAATAAAGGAAACCAATAAGTAATCCCAGCTATAATAG
 CAAATACAGCTCCTATTCTTAATACATAATGAAAATGAGCAACCACATAATAAGTATCATGTAAA
 ACAATATCTAATGAAGAATTAGATAATACCACTCCCCTAATTCCCTCCTAAAGTAAATAAAAAAAC
 AAACCAATGCATCACAATAAAGGTGAATCAATTTTAAAAATAAGATCCATATAAAGTAGCTATTC
 ATCTAAATACCTTAATTCCTGTTGGAAGTGAATAATTATAGTAGCCGCAGTAAAATAAGCACGA
 GTATCTACATCCATTCCCTACAGAAAATATATGATGAGCTCATACTACAAATCCCATTCCCTCAAT
 TCCTACTATTGCATAAATTATTCCTAAAGAACCAAACGGTTCTCGCTTTCCTACAGAAGATCTAA
 TAATATGAGAAACAATACCAAATCCTGGTAAAATTAATATATACCTCCGGATGACCAAAAAAC
 CAAAATAAATGCTGAAATAAAATAGGATCTCCTCCTCCAGCAGGATCAAAAAAGAAGTATTTAA
 ATTCGATCAGTCAATAATATAGTAATAGCACCAGCTAGAAGTGGTAATGACAATAATAATAGAA
 CAGCAGTAATTACTACTGATCATACAAATAAAGGAGTTTTATCTAAAGATATTCCTAACCCTG
 ATATTAATTACCGTAGTAATAAAATTAATGGCCCCTATAATAGAAGAGCTCCAGCCAAATGTAAA
 GAAAAAATAGCAAATCTACAGATCTTCCATTATGTCCAATAATTGAAGCTAAAGGTGGATAAAC
 TGTTTCCTGCTCCCCTCCTATTTTCAGCTATTGATGAAATAAACATACATTAAGAAGGAGGT
 AATAATCAAATCTTAATTATTCATTTCGAGGAAAAGCCATATC

การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Curvularia* สาเหตุโรคพืช
DNA Barcoding of Plant Pathogenic *Curvularia*

มะโนรัตน์ สุดสงวน^{1/} พรพิมล อธิปัญญาคม^{2/}
ชนิทร ดวงสอาด^{1/} สุณิรัตน์ สีมะเต็อ^{1/} อมรรักษ์ าคใจเดียว^{1/}
^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

เก็บตัวอย่างโรคพืชเพิ่มเติม จำนวน 11 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อรา *Curvularia* ได้จำนวน 10 ไอโซเลท สกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Curvularia* จากงานทดลองที่เกี่ยวข้อง จำนวน 30 ไอโซเลท และได้ DNA template จำนวน 30 ไอโซเลท จำแนกชนิดของเชื้อราในเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกได้ดังนี้ *C. eragrostidis* และ *C. oryzae* ขณะนี้รอผลทางชีวโมเลกุลเพื่อเป็นข้อมูลยืนยันควบคู่กับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาต่อไป และตัวอย่างโรคพืชที่ได้จากการศึกษาจำนวน 11 ตัวอย่างจัดทำเป็นตัวอย่างแห้งโรคพืชเข้าพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

คำหลัก : โรคใบจุด โรคใบไหม้ *Curvularia*

คำนำ

รา *Curvularia* Boedijn (1933) เป็นระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของรา *Cochliobolus* Drechsler (1934) ราชนิดนี้จัดอยู่ใน Kingdom fungi Phylum Ascomycota Class Dothideomycetes Order Pleosporales Family Pleosporaceae (Mycobank, 2019) พบแพร่กระจายทั่วไปและเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคพืชที่สำคัญของพืชหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน กล้วยไม้ และข้าว เป็นต้น (จิตรรา และคณะ, 2557; วรธนิภา และคณะ, 2555; กลุ่มอารักขาพืช สำนักงานเกษตรจังหวัดกาญจนบุรี, 2558; เลขา และคณะ, 2544) ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบทั้งหมด 145 ชนิด (Indexfungorum, 2019)

Cui and Sun (2012) รายงานพบเชื้อรา *Curvularia lunata* เป็นสาเหตุของโรคใบจุดของข้าวเป็นครั้งแรก ในเมือง Pingxiang ประเทศจีน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ข้าวแห้งตายถึง 60 เปอร์เซ็นต์และส่งผลกระทบต่อผลผลิตทำให้ผลผลิตลดลงถึง 10-15 เปอร์เซ็นต์ ข้าวที่เกิดโรคจะมีลักษณะเป็นจุดสีม่วงแกมน้ำตาลเกิดบนใบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-3 เซนติเมตร ต่อมาบริเวณตรงกลางแผลจะเปลี่ยนเป็นสีเทาถึงขาวและขอบแผลจะเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ นอกจากนี้ มีรายงานพบหญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum* cv. Alamo) มีลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลและอาการ necrotic root ซึ่งพบเป็นครั้งแรกใน Knoxville รัฐ Tennessee ประเทศสหรัฐอเมริกาแยกราสาเหตุโรคพืชที่

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-14-62

แสดงลักษณะอาการของโรค เชื้อที่แยกได้มีลักษณะโคโคโลนีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ สร้าง stromata สีดำ conidiophores มีสีน้ำตาลดำ ไม่แตกกิ่งก้าน มีผนังกัน polytretic sympodial และ geniculate สร้างโคนิเดียที่บริเวณปลาย โคนิเดียมีลักษณะสีน้ำตาลดำ รูปร่าง cymbiform มีผนังกัน 3-4 septate เซลล์บริเวณส่วนกลางของโคนิเดียประมาณ 1-2 เซลล์ มีขนาดใหญ่กว่าบริเวณปลาย ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับรา *C. lunata* var. *aeria* (*Cochliobolus lunatus*) (Fajolu et al., 2012)

ในประเทศไทย Kittimorakul et al. (2013) ทำการสำรวจโรคใบไหม้และใบจุดของต้นกล้า ปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างโรค 277 ตัวอย่าง จาก 11 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคได้ 197 ไอโซเลท สามารถจัดจำแนกเป็น *Curvularia* 149 ไอโซเลท และ *Colletotrichum* 48 ไอโซเลท แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของปัญหาโรคใบจุดในระยะต้นกล้าของปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้ Sunpapoa and Kittimorakul (2014) รายงานรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยแยกเชื้อราสาเหตุของโรคจากต้นกล้าปาล์มที่มีอายุ 3-4 เดือนที่แสดงลักษณะอาการของโรคใบจุด และนำเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้มาศึกษา ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา และวิธีทางอนุชีวโมเลกุลร่วมด้วย

สมศิริ และ ศศิวิมล. 2011. รายงานการสำรวจโรคที่สำคัญของดอกกล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวายเยี่ยสกุลที่ผลิตเป็นการค้า (*Dendrobium* 'Earsakul') พบโรคสำคัญที่ดอก คือ โรคเกสรดำและโรคดอกสนิม โดยพบเชื้อราที่แยกได้จากโรคเกสรดำ ได้แก่ *Alternaria alternata*, *C. lunata*, *Drechslera* sp., *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp. และ *Cladosporium* sp. และเชื้อราแยกได้จากโรคดอกสนิม ได้แก่ เชื้อรา *A. alternata*, *C. eragostidis*, *C. lunata*, *Nigrospora* sp. และ *Drechslera* sp. นำเชื้อราที่แยกได้ไปทดสอบการเกิดโรคกับดอกกล้วยไม้ พบว่า เชื้อสาเหตุของโรคเกสรดำ คือ *C. lunata* และเชื้อราสาเหตุของโรคดอกสนิม คือ *A. alternata* และ *C. eragostidis* ในปี (2559) วรรณฤ และ นิตม ได้รายงานโรคของกล้าไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre ex Laness) พบว่ามีเชื้อรา *Curvularia* sp. มีความเกี่ยวข้องต่อการเกิดโรคใบจุดของกล้าไม้พะยูน และมีรายงานการศึกษาเชื้อราโรคพืชและเชื้อราอื่นๆ บนข้าวโพด ข้าว และหญ้าโดยวิธี tissue transplanting พบเชื้อราจำนวน 19 ชนิด ซึ่ง 1 ใน 19 ชนิดนี้พบทั้งเชื้อราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris* และแยกรา *C. pallescens* ได้จากเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (เลขา และคณะ, 2544; Manoch et al., 2002) นอกจากรายงานการพบรา *Curvularia* สาเหตุโรคพืชแล้วยังมีรายงานรา *Curvularia* จากวัชพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ หญ้าแห้วหมู หญ้าปากควาย หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนกา หญ้าตีนนก หญ้าตีนติด หญ้าไชย่ง หญ้าขจรจบดอกเล็ก น้านมราชสีห์ ผักขม ผักเบี้ยหิน และผักยาง (จิตรรา, 2547)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาในข้างต้นแสดงให้เห็นว่ารา *Curvularia* เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด และการจัดจำแนกชนิดของราในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา อาจมีบ้างบางงานวิจัยที่นำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลร่วมด้วย การจัดจำแนกรา *Curvularia* ยังมีความสับสนและมีปัญหาเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนกนั้นมีความคล้ายคลึงกันกับรา *Bipolaris* และรา 2 ชนิดนี้มีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นรา *Cochliobolus* Drechsler (1934) เหมือนกัน Jeon et al., (2015) ได้นำข้อมูลทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาทำการจัดจำแนกชนิดของรา *Curvularia* โดยเลือกใช้ multi loci sequences (rDNA internal transcribed spacer (ITS), large ribosomal subunit (28S) และ glyceraldehyde 3-phosphate

dehydrogenase gene (GAPDH)) เพื่อจำแนกและจัดกลุ่มของรา *Curvularia spicifera* นอกจากนี้ Sun *et al.*, (2003) ได้ทำการแยกแกร *C. geniculata* group โดยใช้ *Brn1* gene sequences จำแนกชนิดและเพื่อยืนยันความแตกต่างของราในกลุ่มนี้ ซึ่งรา *C. geniculata* group ประกอบไปด้วย *C. affinis* *C. fallax* และ *C. senegalensis* ซึ่งราทั้ง 3 ชนิดนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับรา *C. geniculata* มาก หากใช้ข้อมูลด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวคงไม่เพียงพอต่อการยืนยันผลความแตกต่างจึงต้องมีข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลมาช่วยยืนยันผลความแตกต่างเพื่อความถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น ดังนั้น การศึกษารา *Curvularia* จึงจำเป็นต้องใช้ทั้งข้อมูลด้านลักษณะสัณฐานควบคู่กับข้อมูลด้านชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันผลการจัดจำแนกที่ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น และข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่ได้สามารถนำไปศึกษาต่อทางด้านวิวัฒนาการของราชนิดนี้ เพื่อเป็นข้อมูลในการสืบค้นและเป็นแหล่งอ้างอิงในการทำงานวิจัยต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ มีด กรรไกร กรรไกรตัดกิ่ง ถุงพลาสติก กระดาษบันทึก ปากกาเคมี เครื่องระบุพิกัด
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้แช่แข็ง หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ Microcentrifuge Thermal cyclers, Vortex, Tissue Lyser, Gel electrophoresis เครื่องถ่ายภาพเจล microwave micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร และ Dry heat block
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน ปีกเกอร์ กระจบอกลง แ่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ สไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์
4. เข็มเขี่ยปลายแหลม หัวง่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด ต้มมีด
5. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อมกล้องถ่ายภาพ
6. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), ½Potato Dextrose Agar (½PDA) และ Potato Dextrose Agar (PDA)
7. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรต์ และเอธิลแอลกอฮอล์ 75%
8. 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) และ the Large Subunit (LSU)
9. อุปกรณ์ทำตัวอย่างแห้ง ได้แก่ กระดาษหนังสือพิมพ์ ไม้ทาบตัวอย่าง กระดาษฟาง และซองกระดาษสำหรับใส่ตัวอย่าง

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Curvularia* และดีเอ็นเอต้นแบบ

ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Curvularia* ที่จะนำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ ใช้ตัวอย่างที่ได้จากการสำรวจโรคพืชที่เกิดจากรา *Curvularia* และจากงานทดลองที่เกี่ยวข้อง รวมถึงตัวอย่างแห้งที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หากดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้มีน้อยอาจมีการเก็บรวบรวมเชื้อเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มความหลากหลายในการวิเคราะห์

2. ศึกษาและจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 5-10 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจสอบดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมามาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แخذในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซบบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส นาน 7-21 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี เส้นใย ขนาด และสี ลักษณะของสปอร์ และ ลักษณะของ conidiophore สี และขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และจำแนกชนิดของราตามเอกสารของ Ellis (1971, 1976) โดยสามารถใช้ข้อมูลบางส่วนจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องซึ่งได้มีการศึกษาและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Curvularia* เพื่อประกอบการวิเคราะห์ต่อไป

3. การจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยและโคนีเดียของรา *Curvularia* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของคูไพรเมอร์ของตำแหน่ง Large Subunit (LSU) Internal Transcribed Spacer (ITS) และ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่ง LSU, ITS และ GAPDH ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 μ l 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) ทำการรวมชุดข้อมูลของดีเอ็นเอตำแหน่ง LSU ITS และ GAPDH เป็น combined dataset บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ .nexus หรือ .nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite

การเก็บรักษา

การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

แยกราจากตัวอย่างโรคพืชจากดอกกล้วยไม้ ปาล์มน้ำมัน และมะพร้าว จำนวน 11 ตัวอย่าง (Figure 1) สามารถแยกได้รา *Curvularia* จำนวน 10 ไอโซเลท เก็บสายพันธุ์บริสุทธิ์เพื่อศึกษาทางลักษณะสัณฐานวิทยาและสักดีเอ็นเอต่อไป

แยกมาจากตัวอย่างที่มีเพิ่มเติมและเลี้ยงเชื้อรา *Curvularia* (Figure 2) เพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 35 ไอโซเลท พร้อมทั้งสกัดดีเอ็นเอของรา *Curvularia* จำนวน 30 ไอโซเลท และได้ DNA template ของรา *Curvularia* จำนวน 30 ไอโซเลท ตัวอย่างโรคพืชที่ได้จากการศึกษาจัดทำเป็นตัวอย่างแห่งโรคพืชเข้าพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 11 ตัวอย่าง จำแนกชนิดของเชื้อราในเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกได้ดังนี้ *C. eragrostidis* และ *C. oryzae* ขณะนี้รอผลทางชีวโมเลกุลเพื่อเป็นข้อมูลยืนยันควบคู่กับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างโรคพืชเพิ่มเติม จำนวน 11 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อรา *Curvularia* ได้จำนวน 10 ไอโซเลท สกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Curvularia* จากงานทดลองที่เกี่ยวข้อง จำนวน 30 ไอโซเลท และได้ DNA template จำนวน 30 ไอโซเลท จำแนกชนิดของเชื้อราในเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกได้ดังนี้ *C. eragrostidis* และ *C. oryzae* ขณะนี้รอผลทางชีวโมเลกุลเพื่อเป็นข้อมูลยืนยันควบคู่กับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาต่อไป และตัวอย่างโรคพืชที่ได้จากการศึกษา จำนวน 11 ตัวอย่างจัดทำเป็นตัวอย่างแห่งโรคพืชเข้าพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูลในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- จิตรา เกาะแก้ว. 2547. ความหลากหลายของเชื้อราบนวัชพืชที่เป็นโรคในแปลงผักและแนวทางการนำมาใช้ควบคุมวัชพืชทางชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 150 หน้า
- เลขา มาโนช กัญญา เจริญไทย คะนิงนิจ บุศราคำ พรพิมล อธิปัญญาคม อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และ อรุมา เจียมจิตต์. 2544. เชื้อราโรคพืช รา endophyte และราดินในประเทศไทย. น. 502-510. ใน : การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. 5-7 กุมภาพันธ์ 2544. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- วรัญญู ชัยรพ และ นิวัฒน์ เสนาะเมือง. 2559. โรคของกล้าไม้พะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre ex Laness) และเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับโรคใบจุดกลมสีน้ำตาล. *แก่นเกษตร* 44 ฉบับที่ 1. สมศิริ แสงโชติ และศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์. 2011. โรคที่สำคัญของดอกกล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวายเอียสกุลที่ผลิตเป็นการค้า. *วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร*. 42:1(พิเศษ): 315-318.
- Cui, R. Q. and X. T. Sun. 2012. First report of *Curvularia lunata* causing leaf spot on lotus in China. *Plant Disease*. 96: 1968-1069.

- 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.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 608 p.
- Ellis, M. B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 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: 1372-1373.
- Indexfungorum, 2019. *Names record*. (Online). Available. <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp> (February 19, 2019).
- 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
- Kittimorakul, J., C. Pornsuriya, A. Sunpapao and V. Petcharat. 2013. Survey and identification of leaf blight and leaf spot diseases of oil palm seedling in Southern Thailand. *Plant Pathology*. 12(3): 149-153.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*. doi:10.1093/molbev/msw054.
- 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 1st International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease*. Nov. 5-8, 2002. Chiang Mai, Thailand.
- Mycobank, 2019. *Curvularia*. (Online). Available. <https://www.mycobank.org> (February 19, 2019)
- 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.
- Sunpapao, 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.

Talavera, G. and J. Castresana. 2007. Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments. *Systematic Biology*. 56(4): 564–577.



Figure 1 Plant disease samples caused by *Curvularia*

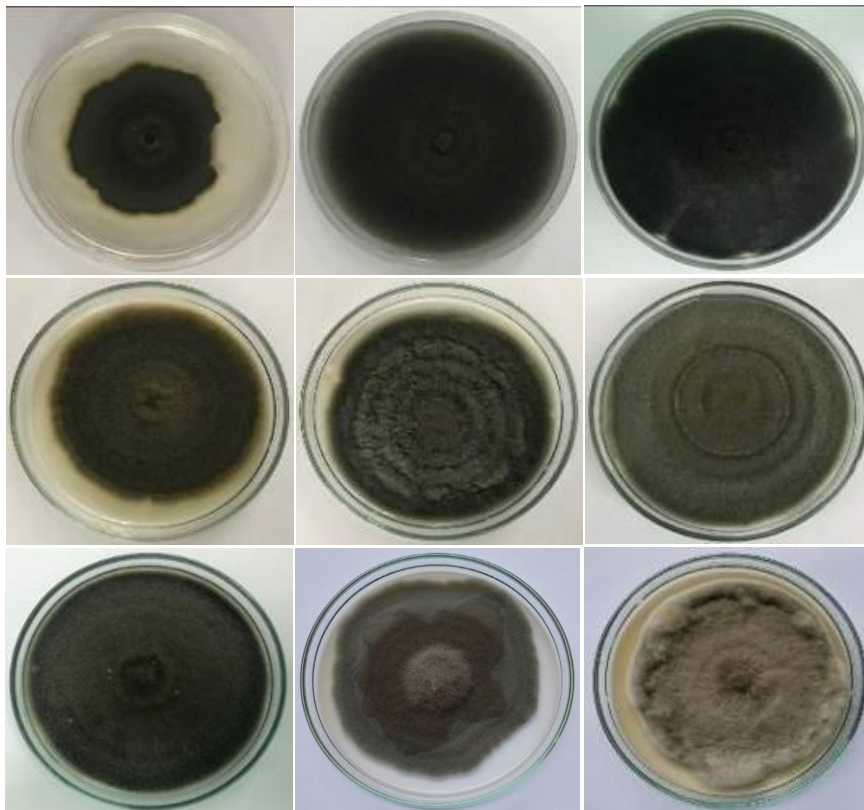


Figure 2 Colonies of *Curvularia* spp. from various plant disease samples

การศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้เผ่า (Tribe) Dacini (Diptera: Tephritidae)
ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

Molecular Identification of Fruit Fly in Tribe Dacini
(Diptera: Tephritidae) Using DNA Barcode

ยุวรินทร์ บุญทบ จารุวัฒน์ แท้กุล ชมัยพร บัวมาศ เกศสุดา สนสิริ สุนัดดา เขาวลิต
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จำแนกแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ออกจากแมลงวันผลไม้ Tribe อื่น ๆ โดยพบว่าแมลงวันผลไม้ใน Tribe Dacini มีลักษณะพิเศษที่แตกต่างจากแมลงวันผลไม้ Tribe อื่น ๆ คือ ไม่มีตาเดี่ยว (oceli) มี CuPical (CuP) cell ยาวกว่าแมลงวันผลไม้ Tribe อื่น ๆ และมักพบจุดเงาสีดำ มีลักษณะเป็นรูปไข่ (ceromata) บริเวณท้องปล้องที่ 5 และจำแนกแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ที่เก็บรวบรวมได้จากบริเวณภาคกลางและภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี สุราษฎร์ธานี ชุมพร เพชรบุรี และกรุงเทพมหานคร พบแมลงวันผลไม้ 3 สกุล คือ *Bactrocera*, *Zeugodacus* และ *Dacus* ทำการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยยีน *cox1* จากตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ได้ DNA barcode จำนวน 10 ตัวอย่าง และแมลงวันผลไม้ *Z. caudatus* จำนวน 10 ตัวอย่าง รวมเป็นได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้ใน Tribe Dacini จากภาคใต้และภาคกลาง 2 ชนิด 20 ตัวอย่าง และสกัด DNA แมลงวันผลไม้ Tribe Dacini เพิ่มเติมจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Z. isolata* และ *Z. tau* จำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง และเก็บรักษาไว้ที่ตู้เก็บความเย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพิ่มเติมในปีถัดไป

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 และด้วยความสามารถในการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้นี้เอง 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 (ยุวรินทร์ และคณะ, 2551) โดยเฉพาะแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Zeugodacus tau* และ *Bactrocera dorsalis* complex นั้นก่อให้เกิดความสับสนแก่นักอนุกรมวิธานเป็นอย่างมาก 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 อีกทั้งสามารถนำข้อมูลด้าน DNA Barcode ที่ได้เป็นฐานข้อมูลในการศึกษาชนิดของแมลงวันผลไม้ที่มีในประเทศไทยให้มีมาตรฐานทัดเทียมสากล และใช้ข้อมูลเหล่านี้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำเข้าสู่ส่งออกพืช ผักของไทยอีกด้วย

วิธีดำเนินการ

1. วิธีการดำเนินการวิจัยสำหรับการศึกษาลำดับพันธุกรรม

1.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตาม Boontop *et al.*, 2017 ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bionline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้านขวาจำนวนสามข้างของแมลงวันผลไม้ (25 mg) มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (ตัวอย่างแมลงที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen)) จากนั้นเติม Lysis BufferGL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Proteinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตรปิดหลอดให้สนิท 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 เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยง) เติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer GW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน 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* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังนี้

Primer Name	Sequence	Base
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	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) โดยหยด 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 ของแมลงวันผลไม้ที่ได้ไป ทำให้ผลิตภัณฑ์ 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 ทางพันธุกรรมจากทั่วโลกอีกครั้งเพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการศึกษาจะถูกเก็บบันทึก 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 Arleguin 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 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้
- 2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จำแนกแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ออกจากแมลงวันผลไม้ Tribe อื่น ๆ โดยพบว่าแมลงวันผลไม้ใน Tribe Dacini มีลักษณะพิเศษที่แตกต่างจากแมลงวันผลไม้ Tribe อื่น ๆ คือ ไม่มีตาเดี่ยว (oceli) มี CuPical (CuP) cell ยาวกว่าแมลงวันผลไม้ Tribe อื่น ๆ และมักพบจุดเงาสีดำ มีลักษณะ

เป็นรูปไข่ (ceromata) บริเวณท้องปล้องที่ 5 และจำแนกแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ที่เก็บรวบรวมได้จากบริเวณภาคกลางและภาคใต้ ได้แก่จังหวัดนครปฐม สุพรรณบุรี สุราษฎร์ธานี ชุมพร เพชรบุรี และกรุงเทพมหานคร พบแมลงวันผลไม้ 3 สกุล คือ *Bactrocera*, *Zeugodacus* และ *Dacus* (Figure 1) ทำการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยยีน *cox1* จากตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ได้ DNA barcode จำนวน 10 ตัวอย่าง (Table 1) และแมลงวันผลไม้ *Z. caudatus* จำนวน 10 ตัวอย่าง (Table 2) รวมเป็นได้ข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของแมลงวันผลไม้ใน Tribe Dacini จากภาคใต้และภาคกลางจำนวน 2 ชนิด 20 ตัวอย่างและได้สกัด DNA แมลงวันผลไม้ Tribe Dacini เพิ่มเติมจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Z. isolata* และ *Z. tau* (Figure 2) จำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง และเก็บรักษาไว้ที่ตู้เก็บความเย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพิ่มเติมในปีถัดไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บรวบรวมตัวจากแมลงวันผลไม้จากกับดัก budget trap พร้อมด้วยสารล่อคือฟีโรโมน 2 ประเภทได้แก่ Methyl eugenol และ Cue lure รวมทั้งเก็บผัก ผลไม้ที่ถูกทำลายโดยตัวอ่อนมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจากบริเวณภาคกลางและภาคใต้นั้น สามารถแยกแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ออกจากแมลงวันผลไม้ Tribe อื่น ๆ และจำแนกแมลงวันผลไม้ Tribe Dacini ที่พบได้แมลงวันผลไม้ 3 สกุล คือ *Bactrocera*, *Zeugodacus* และ *Dacus* จากนั้นทำการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยยีน *cox1* จากตัวอย่างแมลงวันผลไม้สกุล *Zeugodacus* จำนวน 2 ชนิดได้แก่แมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และแมลงวันผลไม้ *Z. caudatus* ได้ DNA barcode ชนิดละ 10 ตัวอย่าง รวมเป็นได้ข้อมูล DNA barcode ของแมลงวันผลไม้ใน Tribe Dacini จากภาคใต้และภาคกลาง 2 ชนิด 20 ตัวอย่าง และสกัด DNA แมลงวันผลไม้ใน Tribe Dacini เพิ่มเติมจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Z. isolata* และ *Z. tau* จำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง

คำขอบคุณ

ข้าราชการ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมาบริการ ของกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงในการช่วยเหลือเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ จึงทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จ และลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ยุวรินทร์ บุญทาบ ศิริณี พูนไชยศรี ชลิตา อุณหุทธิ ลักขณา บำรุงศรี และสิทธิศิริโรดม แก้วสวัสดิ์. การศึกษาอนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* ในประเทศไทย. รายงานการประชุมประจำปี 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.

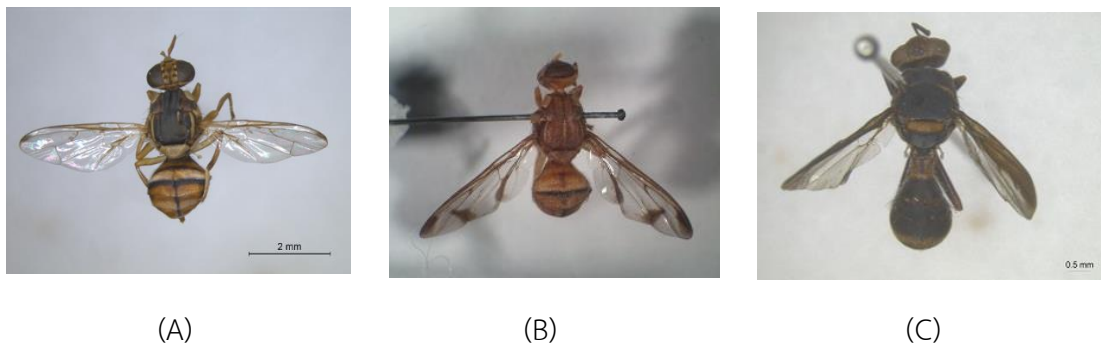


Figure 1 Fruit fly in Tribe Dacini
 (A) Fruit fly Genus *Bactrocera*
 (B) Fruit fly Genus *Zeugodacus*
 (C) Fruit fly Genus *Dacus*



Figure 2 Fruit fly in Tribe Dacini for DNA extraction
 (A) *Zeugodacus isolate*
 (B) *Zeugodacus tau*

Table 1 DNA barcode of *Zeugodacus cucurbitae*

No.	CODE	DNA barcode
1	DC0101	AGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGTGGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGATG ATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAAATGGAGGATTTG GAAATTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATAAGATTTTGATTATTACCTC CCTCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAAGCTGTTATCTCCCTTTTCATCAA TTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTCATCAATTTAGGGGCCGTAA ATTTCACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGA CAGCTCTTCTTTACTTCTATCTACCTGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGCCGAAATTTAAACACCTCTTT CTTCGACCCGGCTGGTGGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCCAC
2	DC0102	AGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGTGGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGATG ATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAAATGGAGGATTTG GAAATTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATAAGATTTTGATTATTACCTC CCTCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAAGCTGTTATCTCCCTTTTCATCAA TTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTCATCAATTTAGGGGCCGTAA ATTTCACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGA CAGCTCTTCTTTACTTCTATCTACCTGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGCCGAAATTTAAACACCTCTTT CTTCGACCCGGCTGGTGGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCCAC
3	DC0103	AGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGTGGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGATG ATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAAATGGAGGATTTG GAAATTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATAAGATTTTGATTATTACCTC CCTCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAAGCTGTTATCTCCCTTTTCATCAA TTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTCATCAATTTAGGGGCCGTAA ATTTCACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGA CAGCTCTTCTTTACTTCTATCTACCTGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGCCGAAATTTAAACACCTCTTT CTTCGACCCGGCTGGTGGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCCAC
4	DC0104	AGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGTGGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGATG ATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAAATGGAGGATTTG GAAATTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATAAGATTTTGATTATTACCTC CCTCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAAGCTGTTATCTCCCTTTTCATCAA TTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTCATCAATTTAGGGGCCGTAA ATTTCACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGA CAGCTCTTCTTTACTTCTATCTACCTGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGCCGAAATTTAAACACCTCTTT CTTCGACCCGGCTGGTGGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCCAC
5	DC0105	TATAGTGGGAACATCTCTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGTGGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATA ATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAAATGGAGGATTTGAAATGGACTAG TACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATAAGATTTTGATTATTACCTCCTCTCTTACAT TACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAAGCTGTTATCTCCCTTTTCATCAATTTAGCTCATG GTGGAGCCTCAGTTGATTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTCATCAATTTAGGGGCCGTAAATTTACTACTA CAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTCTTT TACTTCTATCTACCTGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGCCGAAATTTAAACACCTCTTTCTTCGACCCGG CTGGTGGTGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCCAC
6	DC0106	AGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGTGGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGATG ATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAAATGGAGGATTTG GAAATTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATAAGATTTTGATTATTACCTC CCTCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAAGCTGTTATCTCCCTTTTCATCAA TTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTCATCAATTTAGGGGCCGTAA ATTTCACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGA CAGCTCTTCTTTACTTCTATCTACCTGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGCCGAAATTTAAACACCTCTTT CTTCGACCCGGCTGGTGGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCCAC
7	DC0107	AGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGTGGGTCACCCAGGAGCTTTAATCGGAGATG ATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAAATGGAGGATTTG GAAATTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATAAGATTTTGATTATTACCTC CCTCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGTTGAAGCTGTTATCTCCCTTTTCATCAA TTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTCATCAATTTAGGGGCCGTAA ATTTCACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCCGGATACCTTTATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGA CAGCTCTTCTTTACTTCTATCTACCTGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGCCGAAATTTAAACACCTCTTT CTTCGACCCGGCTGGTGGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTTTTTGGTCCAC

Table 1 DNA barcode of *Zeugodacus cucurbitae* (continue)

No.	CODE	DNA barcode
8	DC0108	AGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGCTGGGTCAACCAGGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAAATGGAGGATTTGGAAATGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACGTGTTTACTCCCTCCCTTTCATCAATTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCATCAATTTTAGGGGCCGTAAATTTTACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCGGATACCTTTATTCTGTTGAGCTGTAGTATGACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTCTACCTGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACCTTTTAAACAGACCGAAATTTAAACACCTCTTTCTTCGACCCGGCTGGTGGTGGAGACCTATTTTATACCAACATTTATTGATTTTTTGGTCCAC
9	DC0109	AGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGCTGGGTCAACCAGGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAAATGGAGGATTTGGAAATGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACGTGTTTACTCCCTCCCTTTCATCAATTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCATCAATTTTAGGGGCCGTAAATTTTACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCGGATACCTTTATTCTGTTGAGCTGTAGTATGACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTCTACCTGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACCTTTTAAACAGACCGAAATTTAAACACCTCTTTCTTCGACCCGGCTGGTGGTGGAGACCTATTTTATACCAACATTTATTGATTTTTTGGTCCAC
10	DC0110	AGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAAGCTGGGTCAACCAGGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAAATGGAGGATTTGGAAATGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTGATTATTACCTCCCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGGTACAGGTTGAACGTGTTTACTCCCTCCCTTTCATCAATTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGTTGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCATCAATTTTAGGGGCCGTAAATTTTACTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCGGATACCTTTATTCTGTTGAGCTGTAGTATGACAGCTCTCTTTTACTTCTATCTCTACCTGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACCTTTTAAACAGACCGAAATTTAAACACCTCTTTCTTCGACCCGGCTGGTGGTGGAGACCTATTTTATACCAACATTTATTGATTTTTTGGTCCAC

Table 2 DNA barcode of *Zeugodacus caudatus*

No.	CODE	DNA barcode
1	DC0201	TTGAGCAGGTATAGTAGGAACATCTTTGAGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTTGAGATGATCAAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCACGAATAAATAATATAAGATTTCTGATTACTGCCTCTCTCACTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACGTGTTTACCCTCCCTCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTCTGTGATCTAGCTATTTTTCTTACATCTAGCTGGAATTTCCCTCTATTTTAGGAGCCGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTTATTGTTGAGCAGTGTCTAACAGCCTTATTACTACTTTTACTTCTGTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAACTTAAATACCTCTTTCTTCGACCCAGCCGAGGTGGAGACCTATTTTATACCAACATTTATTCTGATTTTTTGGTCCAC
2	DC0202	TTGAGCAGGTATAGTAGGAACATCTTTGAGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTTGAGATGATCAAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCACGAATAAATAATATAAGATTTCTGATTACTGCCTCTCTCACTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACGTGTTTACCCTCCCTCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTCTGTGATCTAGCTATTTTTCTTACATCTAGCTGGAATTTCCCTCTATTTTAGGAGCCGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTTATTGTTGAGCAGTGTCTAACAGCCTTATTACTACTTTTACTTCTGTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAACTTAAATACCTCTTTCTTCGACCCAGCCGAGGTGGAGACCTATTTTATACCAACATTTATTCTGATTTTTTGGTCCAC
3	DC0203	AGAGCAGGTATAGTAGGAACATCTTTGAGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTTGAGATGATCAAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCACGAATAAATAATATAAGATTTCTGATTACTGCCTCTCTCACTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACGTGTTTACCCTCCCTCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTCTGTGATCTAGCTATTTTTCTTACATCTAGCTGGAATTTCCCTCTATTTTAGGAGCCGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTTATTGTTGAGCAGTGTCTAACAGCCTTATTACTACTTTTACTTCTGTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAACTTAAATACCTCTTTCTTCGACCCAGCCGAGGTGGAGACCTATTTTATACCAACATTTATTCTGATTTTTTGGTCCAC
4	DC0204	TGAGCAGGTATAGTAGGAACATCTTTGAGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTTGAGATGATCAAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCACGAATAAATAATATAAGATTTCTGATTACTGCCTCTCTCACTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACGTGTTTACCCTCCCTCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTCTGTGATCTAGCTATTTTTCTTACATCTAGCTGGAATTTCCCTCTATTTTAGGAGCCGTAAATTTTATTACTACAGTAATTAACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTTATTGTTGAGCAGTGTCTAACAGCCTTATTACTACTTTTACTTCTGTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAACTTAAATACCTCTTTCTTCGACCCAGCCGAGGTGGAGACCTATTTTATACCAACATTTATTCTGATTTTTTGGTCCAC

Table 2 DNA barcode of *Zeugodacus caudatus* (continue)

No.	CODE	DNA barcode
5	DC0205	AGCAGGTATAGTAGGAACATCTTTGAGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTACCCTTAATACTAGGAGCCCGAGATATAGCATTTCACGAATAAATAAATAAGATTCTGATTACTGCCTCCTTACACTTACACTCTATCTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCCCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTTCTGTTGATCTAGCTATTTTTCTTTACATCTAGCTGGAATTCCTCTATTTAGGAGCCGTAATTTTATTACTACAGTAAATACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTATTTGTTGAGCAGTAGTGCTAACAGCCTTATTATTACTACTTTACCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAACTTAAATACCTCTTTCTCGACCCAGCCGGAGGTGGAGACCCCTATTTTATACCAACATTTATTCTG
6	DC0206	TAGGAACATCTTTGAGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTACCCTTAATACTAGGAGCCCGAGATATAGCATTTCACGAATAAATAAATAAGATTCTGATTACTGCCTCCTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCCCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTTCTGTTGATCTAGCTATTTTTCTTTACATCTAGCTGGAATTCCTCTATTTAGGAGCCGTAATTTTATTACTACAGTAAATACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTATTTGTTGAGCAGTAGTGCTAACAGCCTTATTATTACTACTTTACCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAACTTAAATACCTCTTTCTCGACCCAGCCGGAGGTGGAGACCCCTATTTTATACCAACATTTATTCTG
7	DC0207	GCAGGTATAGTAGGAACATCTTTGAGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTACCCTTAATACTAGGAGCCCGAGATATAGCATTTCACGAATAAATAAATAAGATTCTGATTACTGCCTCCTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCCCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTTCTGTTGATCTAGCTATTTTTCTTTACATCTAGCTGGAATTCCTCTATTTAGGAGCCGTAATTTTATTACTACAGTAAATACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTATTTGTTGAGCAGTAGTGCTAACAGCCTTATTATTACTACTCTTTACCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAACTTAAATACCTCTTTCTCGACCCAGCCGGAGGTGGAGACCCCTATTTTATACCAACATTTATTCTG
8	DC0208	GCAGGTATAGTAGGAACATCTTTGAGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTACCCTTAATACTAGGAGCCCGAGATATAGCATTTCACGAATAAATAAATAAGATTCTGATTACTGCCTCCTTACACTACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCCCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTTCTGTTGATCTAGCTATTTTTCTTTACATCTAGCTGGAATTCCTCTATTTAGGAGCCGTAATTTTATTACTACAGTAAATACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTATTTGTTGAGCAGTAGTGCTAACAGCCTTATTATTACTACTCTTTACCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAACTTAAATACCTCTTTCTCGACCCAG
9	DC0209	GTATAGTAGGAACATCTTTGAGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTACCCTTAATACTAGGAGCCCGAGATATAGCATTTCACGAATAAATAAATAAGATTCTGATTACTGCCTCCTTACACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCCCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTTCTGTTGATCTAGCTATTTTTCTTTACATCTAGCTGGAATTCCTCTATTTAGGAGCCGTAATTTTATTACTACAGTAAATACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTATTTGTTGAGCAGTAGTGCTAACAGCCTTATTATTACTACTTTTACCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAACTTAAATACCTCTTTCTCGACCCAG
10	DC0210	AGGTATAGTAGGAACATCTTTGAGAATTTTAGTTCGAGCAGAATTAGGTCACCCAGGAGCCCTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATCGTAACAGCTCACGCATTTGTAATAATTTTTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAACTGACTAGTACCCTTAATACTAGGAGCCCGAGATATAGCATTTCACGAATAAATAAATAAGATTCTGATTACTGCCTCCTTACACTACTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAAATGGAGCCGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCCCTCATCAATCATCGCTCATGGAGGAGCTTCTGTTGATCTAGCTATTTTTCTTTACATCTAGCTGGAATTCCTCTATTTAGGAGCCGTAATTTTATTACTACAGTAAATACATACGATCTACAGGAATTACATTCGACCGAATACCATTATTTGTTGAGCAGTAGTGCTAACAGCCTTATTATTACTACTTTTACCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAACTTAAATACCTCTTTCTCGACCCAGCCGGAGGTGGAGACCCCTATTTTATACCAACATTTATTCTG

ชีววิทยา และการแพร่กระจายของหญ้ายอดหนอน (*Spigelia anthelmia* L.)
Biology and Distributions of *Spigelia anthelmia* L.

ธัญชนก จงรักไทย อัญศยา พรพมา เอกรัตน์ ธนุทอง
กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Survey and collect specimens of *S. anthelmia* L. by detection a survey method in agricultural and environmental areas in the north region, 3 provinces, in the central region, 10 provinces, in the eastern region, 5 province, in the western region, 5 provinces, in northeast region, 1 province and southern region, 5 provinces, a total of 25 provinces, It was found *S. anthelmia* L. in 2 provinces, Rayong and Chanthaburi province, in agricultural areas such as para-rubber and road side. The seed of *S. anthelmia* L. was an ovate, rough skin, brown-dark brown. The seeds were good to spread. Because seeds of *S. anthelmia* L. can fly to a distance in various direction by blasted mature fruit. Seeds had an average germination percentage of 86 percent. And had a high percentage of germination. *S. anthelmia* L. in treatment 1 (1 tree/plot) was tree height. and the canopy highest but not significant from another treatments. *S. anthelmia* L. had an average life cycle of 74 days after germination. There are 2 seeds per fruit. The number of fruits per plant in a life cycle was the maximum 312 fruits per plant, 624 seeds per plant. The leaf has allelopathic potential. It can inhibit the growth of *Mimosa pigra* L.

Keywords : biology distributions *Spigelia anthelmia* L.)

บทคัดย่อ

สำรวจ และเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดหญ้ายอดหนอน โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ 3 จังหวัด ภาคกลาง 10 จังหวัด ภาคตะวันออก 5 จังหวัด และภาคตะวันตก 1 จังหวัด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 1 จังหวัด และภาคใต้ 5 จังหวัด รวม 25 จังหวัด พบหญ้ายอดหนอน 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดระยอง และจันทบุรี ในพื้นที่ทำการเกษตร ได้แก่ สวนยางพารา และกรุงเทพฯ บริเวณข้างทาง หญ้ายอดหนอน มีลักษณะเมล็ดคล้ายรูปไข่ ผิวขรุขระ สีน้ำตาล-น้ำตาลเข้ม การแพร่กระจายของเมล็ดทำได้ดีเนื่องจากเมล็ดแก่แล้วแตกสามารถติดออกไปได้ระยะไกล หรือสามารถติดไปกับภาชนะ หรือวัตถุที่อยู่ใกล้เคียงได้ดี เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย 86 เปอร์เซ็นต์ โดยหญ้ายอดหนอนมีความสูง และทรงพุ่มในสภาพไม่มีการแข่งขันสูงกว่าต้นที่มีการแข่งขัน แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ซึ่งหญ้ายอดหนอนมีวงจรชีวิตโดยเฉลี่ย 74 วัน หลังงอก การออกดอก ติดผล และเมล็ดแก่ เป็นแบบทยอย 1 ผล มีเมล็ดจำนวน 2 เมล็ด ใน 1 วงจรชีวิต มีจำนวนผลสูงสุด 312 ผลต่อต้น คิดเป็น 624 เมล็ดต่อต้น และมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในสภาพการแข่งขัน โดยเฉลี่ย 48 เปอร์เซ็นต์ และหญ้ายอดหนอนมีคุณสมบัติทางอัลลีโลพาตีเบื้องต้น โดยใบแห้งสามารถยับยั้งความยาวรากไมยราบยักษ์ได้

คำหลัก : ชีววิทยา การแพร่กระจาย หญ้ายอดหนอน

คำนำ

Mohamad and Kostermans. (1987) รายงานว่า หญ้ายอดหนอน (*Spigelia anthelmia* L.) มีถิ่นกำเนิดในประเทศอเมริกา เป็นพืชฤดูเดียว ลำต้นตั้ง ไม่แตกแขนง สูง 10-90 เซนติเมตร ลำต้นรูปทรงกระบอก กลวง ใบรูปขอบขนานแกมรูปไข่ หรือ รูปไข่หอกแกมรูปไข่ ออกแบบตรงข้าม ผิวใบเรียบ หรือเป็นคลื่นเล็กน้อย ดอกเป็นแบบไม่แยกเพศ ออกที่ปลายยอด พบมีการกระจายเขตร้อน ของประเทศแอฟริกา มาเลเซีย และมีการนำเข้าไปยังประเทศ จาवाในปี 1845 และ แพร่กระจายไปยังเกาะสุมาตรา จาवा และเกาะซุนดา เป็นวัชพืชที่รุกรานชนิดหนึ่ง รีมแม่น้ำ พื้นที่การเกษตร ริมทาง พื้นที่ทำนาในพื้นที่สูง ออกดอกตลอดปี Dunham (2014) รายงานว่า หญ้ายอดหนอน พบเป็นพืชพื้นเมืองของหมู่เกาะอินเดียนตะวันตกและของทวีปอเมริกาใต้ พบโดยทั่วไป มีคุณสมบัติทางยา จึงถูกนำมาทำการทดลองเพื่อใช้ทำผลิตภัณฑ์ทางเภสัชวิทยา Jegede *et al.* (2006), Olorunfemi *et al.* (2009). รายงานว่ามีการใช้ หญ้ายอดหนอน เป็นสมุนไพร และเป็นวัชพืชปีเดียวที่พบโดยทั่วไปในพื้นที่เพาะปลูก และยังพบบริเวณพื้นที่นอกการเกษตร เช่น ข้างถนน โดยสามารถเจริญเติบโตได้สูงถึง 30 เซนติเมตร การศึกษาสารสกัดของ หญ้ายอดหนอน เพื่อฆ่าพยาธิ โดยทดลองในหนู หญ้ายอดหนอน เป็นวัชพืชที่ยังไม่พบรายงานในประเทศไทย พบแพร่กระจายในพื้นที่ทำการเกษตร ในภาคใต้ และภาคตะวันออก โดยพบขึ้นหนาแน่น คาดว่าน่าจะมีการขยายพันธุ์ และแข่งขันกับพืชอื่น ๆ ได้ดี เนื่องจากบริเวณที่พบหญ้ายอดหนอนจะเจริญกันอย่างหนาแน่น และไม่พบวัชพืชอื่นปะปน ดังนั้น การศึกษาชีววิทยาและการแพร่กระจายของวัชพืชนี้ จะทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานเพื่อการทำนายการระบาด และการจัดการพืชตัวนี้ได้มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงทำการทดลองนี้เพื่อศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยา ของหญ้ายอดหนอน หาแนวทางการจัดการ และป้องกันการแพร่ระบาดให้เขียนความสำคัญ หลักการและเหตุผลที่ทำการทดลองปัญหาที่ต้องแก้ไข วัตถุประสงค์และเป้าหมายของการวิจัย การตรวจเอกสาร อ้างถึงรายงานหรือผลงานที่ทำมาแล้วที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับงานที่ทำอย่างไร เพื่อสนับสนุนและเน้นให้เห็นความสำคัญของงานที่ทำ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) กล้องถ่ายรูปแบบดิจิทัล
- 2) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- 3) เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
- 4) กรรไกร มีด เลียม หรือพัว สำหรับตัด/ขูด ตัวอย่างพืช
- 5) แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำ และหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกใส่ ตะเกียงและป้ายชื่อติดตัวอย่างพืช
- 6) กระดาษติดตัวอย่างพืช
- 7) กล้องใส่เมล็ดพืช
- 8) ขวดแก้ว และน้ำยาสำหรับดองตัวอย่างพืช (หากจำเป็น)
- 9) น้ำยาชุบตัวอย่างพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริกคลอไรด์
- 10) การบูร
- 11) อุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น เช่น ถุงพลาสติกขนาดต่าง ๆ กระจกขนาดต่าง ๆ พร้อมดินและ ป้ายปัก
- 12) สมุดบันทึก

วิธีการ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่าง

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ด โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) โดยมี หลัวยอดหนอนเป็นพืชเป้าหมาย สุ่มเดินแบบซิกแซก รูปตัว W โดยมีพื้นที่ในการสุ่มไม่น้อยกว่า 10% ของพื้นที่สำรวจในนิเวศเกษตรภาคเหนือ (ตาก สุโขทัย ลำพูน พะเยา แพร่ น่าน เชียงราย แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย) ภาคกลาง (กรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี ตราด) และภาคใต้ (ชุมพร สุราษฎร์ธานี ระนอง ภูเก็ต) จังหวัดละ 10 แปลง (หลังฤดูฝน 5 แปลง และในฤดูร้อน 5 แปลง) โดยการสุ่มเดินแบบซิกแซก รูปตัว W เมื่อพบพืชเป้าหมาย จะทำการสำรวจพื้นที่ใกล้เคียง เพื่อทราบขอบเขตการระบาดในแหล่งนั้น พร้อมเก็บตัวอย่างและ ถ่ายภาพเป็นหลักฐาน นำตัวอย่างต้นมาจัดทำตัวอย่างแห้ง ส่วนเมล็ดนำไปทำความสะอาด ผึ่งในที่ร่ม ให้แห้ง นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการทดลองต่อไป บันทึก ข้อมูล สถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ ร่องรอยการ ถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติในพื้นที่สำรวจ

2. ศึกษาลักษณะเมล็ด และการงอกในห้องปฏิบัติการ และสภาพเรือนทดลอง

- ลักษณะเมล็ด

สุ่มเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด ศึกษาลักษณะ รูปร่าง ขนาด ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ การบันทึกข้อมูล รูปร่าง ลักษณะ ลวดลายและสีของผิวเมล็ด ความกว้าง ความยาวของ เมล็ด น้ำหนักต่อ 100 เมล็ด

- การงอกในห้องปฏิบัติการ

สุ่มเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ จำนวน 50 เมล็ด ใส่ในจานแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร ที่บรรจุกระดาษกรอง 1 แผ่น และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วปิดฝา จำนวน 10 จาน

นำไปวางในห้องปฏิบัติการ สภาพอุณหภูมิห้อง บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน นาน 30 วัน หรือจนกว่าเมล็ดงอกหมด

- การงอกในห้องสภาพเรือนทดลอง

นำเมล็ดที่เก็บจากที่ต่าง ๆ มาเลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด โรยในกระถาง เส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ที่บรรจุดินจนถึงขอบล่างของกระถาง จำนวน 10 กระถาง รดน้ำให้ ความชื้นทุกวัน บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน นาน 30 วัน หรือจนกว่าเมล็ดงอกหมด

3. ศึกษาการเจริญเติบโต การสร้างเมล็ด วงจรชีวิต

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ประกอบด้วย

- กรรมวิธีที่ 1 หนุ่ยยอดหนอน จำนวน 1 ต้นต่อกระบะ
- กรรมวิธีที่ 2 หนุ่ยยอดหนอน จำนวน 3 ต้นต่อกระบะ
- กรรมวิธีที่ 3 หนุ่ยยอดหนอน จำนวน 5 ต้นต่อกระบะ
- กรรมวิธีที่ 4 หนุ่ยยอดหนอน ทั้งหมดที่งอก

หว่านเมล็ด จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร เมื่อเมล็ดงอก 1 สัปดาห์ ถอนให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง จำนวนต้นตาม กรรมวิธีต่าง ๆ ที่กำหนด สังเกตการณ์เจริญเติบโต และบันทึกข้อมูล วันที่ยก หลังจากหว่าน ความสูง และขนาดทรงพุ่ม ทุก 7 วัน วันที่ออกดอก และวันที่ติดเมล็ด (นับจากวันที่ยก) จำนวนเมล็ดต่อผล จำนวนผลต่อต้น เมื่อพืชทดลองมีใบยอดเหลือง (พืชเริ่มตาย) ถอน ล้างทำความสะอาด บันทึกน้ำหนักสด จำนวนช่อดอก จำนวนผลต่อช่อ จำนวนเมล็ดต่อผล และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนักแห้ง นำข้อมูลที่ได้คำนวณหาค่าเฉลี่ยระยะเวลาการงอก การเจริญเติบโต การออกดอก การแก่ของเมล็ด เพื่อหาระยะเวลาที่พืชเริ่มงอกจนถึงสร้างเมล็ดแก่ ที่จะใช้ขยายพันธุ์ต่อไป (ครบวงจรชีวิต 1 รอบ) คำนวณความสามารถในการผลิตเมล็ดพันธุ์ต่อต้น ความสามารถในการผลิตเมล็ดต่อพื้นที่

4. ความสามารถในการขยายพันธุ์ด้วยกิ่ง

หว่านเมล็ด จำนวน 100 เมล็ด ในกระบะปูนขนาด 1.5 ตารางเมตร หลังงอก 1 สัปดาห์ ถอนออกให้เหลือเฉพาะต้นที่มีขนาดเท่ากัน (งอกวันเดียวกัน) ลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง เมื่อมีอายุ 1 เดือน ถอนออกจากแปลง ทำการตัดแขนงบริเวณโคนต้น ให้แต่ละกิ่งมีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร นำไปปักชำ (วางแนวนอน แล้วกลบด้วยดิน) ในกระบะปูน จำนวน 10 กระถาง ๆ ละ 10 กิ่ง บันทึกข้อมูล จำนวนหน่อที่เกิดขึ้นต่อกิ่ง ทุก 7 วัน

5. ศึกษาคุณสมบัติทางอัลลีโลพาธีเบื้องต้น ในห้องปฏิบัติการ

ทดสอบฤทธิ์ทางอัลลีโลพาธีในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method (Fujii *et al.*, 2004) ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ

วางแผนการทดลอง แบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ประกอบด้วย

- กรรมวิธีที่ 1 ใบแห้งหนุ่ยยอดหนอน หนัก 0.01 กรัม
- กรรมวิธีที่ 2 ใบแห้งหนุ่ยยอดหนอน หนัก 0.05 กรัม
- กรรมวิธีที่ 3 ใบแห้งหนุ่ยยอดหนอน หนัก 0.1 กรัม
- กรรมวิธีที่ 4 ใบแห้งหนุ่ยยอดหนอน หนัก 0.5 กรัม
- กรรมวิธีที่ 5 ใบแห้งหนุ่ยยอดหนอน หนัก 0 กรัม (ชุดควบคุม)

นำใบแห้งหญ้ายอดหนอนที่ผ่านการอบแห้งที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ซึ่งใบแห้งหญ้ายอดหนอนตามกรรมวิธีที่กำหนด ใส่ลงในหลอดแก้วกันดัด เส้นผ่านศูนย์กลาง 29 มิลลิเมตร ความสูง 130 มิลลิเมตร ที่บรรจุสารละลายวุ้น 0.3% ปริมาตร 10 มิลลิตร เมื่อวุ้นชั้นล่างเย็น เติมลงไปอีก 10 มิลลิตร ให้ใบแห้งหญ้ายอดหนอนอยู่กึ่งกลางระหว่างชั้นของวุ้น เมื่อวุ้นชั้นบนเย็น นำต้นอ่อนไมยราบยักษ์ที่เริ่มงอก (มีรากยาวประมาณ 1-2 มิลลิเมตร) วางบนวุ้นหลอดละ 6 เมล็ด ปิดปากหลอดด้วยพลาสติกใส นำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลา นาน 7 วัน บันทึกข้อมูล ความยาวราก และต้นของไมยราบยักษ์ ซึ่งน้ำหนักสดโดยรวมของไมยราบยักษ์ในแต่ละหลอด

เวลาและสถานที่

ระหว่าง ตุลาคม 2560-กันยายน 2562 ณ นิเวศเกษตรภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ และห้องปฏิบัติการ และเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช

ผลและวิจารณ์การทดลอง

1) สํารวจ และเก็บตัวอย่าง

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดหญ้ายอดหนอน โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ 3 ได้แก่ เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน และน่าน จังหวัด ภาคกลาง 10 จังหวัด ได้แก่ พิจิตร ลพบุรี สระบุรี สุพรรณบุรี สิงห์บุรี เพชรบูรณ์ เพชรบุรี ราชบุรี นครปฐม และกรุงเทพฯ ภาคตะวันออก 5 จังหวัด ได้แก่ ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด และสระแก้ว ภาคตะวันตก 1 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 1 จังหวัด ได้แก่ นครราชสีมา ภาคใต้ 5 จังหวัด ได้แก่ ชุมพร นครศรีธรรมราช ภูเก็ต พังงา และระนอง รวม 25 จังหวัด พบหญ้ายอดหนอน 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดระยอง และจันทบุรี ในพื้นที่ทำการเกษตร ได้แก่ สวนยางพารา และกรุงเทพฯ บริเวณข้างทาง โดยสำรวจพื้นที่เดิมซ้ำในฤดูฝน ได้ตัวอย่างหญ้ายอดหนอน 40 ตัวอย่าง โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช และพิพิธภัณฑ์กรุงเทพฯ กรมวิชาการเกษตร (Table 1) (Figure 1)

2) ศึกษาลักษณะเมล็ด และการงอกในห้องปฏิบัติการ และสภาพเรือนทดลอง

ลักษณะเมล็ด หญ้ายอดหนอน มีลักษณะเมล็ดคล้ายรูปไข่ ผิวขรุขระ สีน้ำตาล-น้ำตาลเข้ม (Figure 2) การแพร่กระจายของเมล็ดทำได้ดีเนื่องจากเมล็ดแก่แล้วแตกสามารถดีดออกไปได้ระยะไกล จึงทำให้สามารถแพร่กระจายไปได้ไกลจากต้นเดิม หรือสามารถติดไปกับภาชนะ หรือวัตถุที่อยู่ใกล้เคียงได้ดี

การงอกในห้องปฏิบัติการ ในสภาพอุณหภูมิห้อง พบว่า เมล็ดที่เก็บจากต้นที่เรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย 86 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุด 99.5 เปอร์เซ็นต์ และต่ำสุด 70.0 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3) แสดงให้เห็นว่าเมล็ดไม่มีการพักตัว และมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง จึงมีโอกาสนำไปเป็นวัชพืชได้ในอนาคต โดยเมล็ดจะงอกโดยการแทงทะลุผ่านส่วนหัวของเมล็ดออกมา (Figure 4)

การงอกในห้องสภาพเรือนทดลอง พบว่า เมล็ดเริ่มงอกที่ระยะ 7 วันหลังเพาะเมล็ด และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลา 15-20 วัน (Figure 5)

3. การศึกษาการเจริญเติบโต การสร้างเมล็ด วงจรชีวิต

เริ่มวัดการเจริญเติบโตคือความสูงและขนาดทรงพุ่ม ที่ระยะ 7 วันหลังงอก พบว่าการเจริญเติบโตของหญ้ายอดหนอนในกรรมวิธีที่ 1 ซึ่งมีหญ้ายอดหนอน 1 ต้น มีการเจริญเติบโตทั้งความสูง และความกว้างทรงพุ่มมากกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ในส่วนจำนวนใบต่อต้น แขนงต่อต้น ช่อดอกต่อต้น ช่อดอต่อแขนง น้ำหนักแห้งต่อต้น ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่การสร้างเมล็ด จำนวนผล และจำนวนเมล็ดต่อต้น ในกรรมวิธีที่ปลูก 1, 3 และ 5 ต้นต่อกระบะ มีจำนวนไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนระหว่าง 110.1-112.9 ผลต่อต้น คิดเป็น 220.2-224 เมล็ดต่อต้น มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มีจำนวนต้นทั้งหมดที่งอก (47.6 ต้นต่อกระบะ) ในขณะที่หญ้ายอดหนอนสามารถสร้างผลได้สูงสุด 312 ผลต่อต้น คิดเป็น 624 เมล็ดต่อต้น ใน 1 วงจรชีวิต จากการทดลอง แสดงให้เห็นว่าภายใต้สภาวะที่มีการแข่งขันสูงการเจริญเติบโตอาจไม่แตกต่างกัน แต่มีผลต่อผลผลิต โดยต้นที่มีการเจริญเติบโตโดยไม่ถูกแก่งแย่งปัจจัยต่าง ๆ มีผลผลิตมากกว่าสภาพที่มีการแข่งขันสูง (Figure 6-7) (Table 2)

วงจรชีวิต โดยเฉลี่ย 74 วันหลังงอก โดยหญ้ายอดหนอนงอกที่ระยะ 7 วันหลังปลูก ออกดอกที่ระยะ 23 วันหลังงอก ติดผลที่ระยะ 7 วันหลังออกดอก ผลแก่ที่ระยะ 7 วันหลังติดผล ทั้งนี้ การออกดอก ติดผล และเมล็ดแก่ เป็นแบบทยอย ไม่เกิดขึ้นพร้อมกันทั้งหมด ซึ่งวงจรชีวิตทั้งหมดของหญ้ายอดหนอนจากเริ่มงอกจนกระทั่งต้นเริ่มแห้งตาย ใช้เวลาเฉลี่ย 75 วัน (Figure 9) ซึ่งมีเมล็ดจำนวน 2 เมล็ดต่อผล และจำนวนผลต่อต้นใน 1 วงจรชีวิต สูงสุด 312 ผลต่อต้น คิดเป็น 624 เมล็ดต่อต้น/1 วงจรชีวิต โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในสภาวะการแข่งขันเฉลี่ย 48 เปอร์เซ็นต์

4. ความสามารถในการขยายพันธุ์ด้วยกิ่ง

จากการปักชำแขนงบริเวณโคนต้น พบว่า มีความงอกเพียง 5.8 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศได้ไม่ดีเท่าการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด

5. การศึกษาคุณสมบัติทางอัลลีโลพาธีเบื้องต้น ในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบฤทธิ์ทางอัลลีโลพาธีในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method (Fujii *et al.*, 2004 โดยใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ พบว่า ใบแห้งหญ้ายอดหนอนหนัก 0.5 กรัม สามารถยับยั้งความยาวรากของไมยราบยักษ์ได้สูงที่สุด 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใช้ ใบแห้งหญ้ายอดหนอนหนัก 0.05 และ 0.1 กรัม ที่มีความยาวรากไมยราบยักษ์ 65.56 และ 83.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้ใบแห้งหญ้ายอดหนอนหนัก 0.01 กรัม แสดงให้เห็นว่าใบแห้งหญ้ายอดหนอนมีผลทางอัลลีโลพาธีเบื้องต้น โดยสามารถยับยั้งความยาวของรากไมยราบยักษ์ได้ โดยในส่วนของความยาวต้น พบว่า ใบแห้งหญ้ายอดหนอนหนัก 0.5 กรัม มีผลในการยับยั้งความยาวต้นไมยราบยักษ์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเพียง 13.15-15.17 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในส่วนของน้ำหนักสดของเมล็ดไมยราบยักษ์ พบว่า กรรมวิธีใช้ใบแห้งหญ้ายอดหนอนหนัก 0.5 กรัม ไม่พบน้ำหนักแห้งของไมยราบยักษ์เนื่องจากเมล็ดฝ่อ และเน่าตายไป น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 3) จากการทดลองทำให้ทราบว่าใบแห้งหญ้ายอดหนอนมีผลยับยั้งการเกิดรากของเมล็ดที่กำลังงอก

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ :

จากการสำรวจ และเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดหญ้ายอดหนอน ในพื้นที่ 25 จังหวัด พบหญ้ายอดหนอน 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดระยอง และจันทบุรี ในพื้นที่ทำการเกษตร ได้แก่ สวนยางพารา และกรุงเทพฯ บริเวณข้างทาง โดยสำรวจพื้นที่เดิมซ้ำในฤดูฝน และเมล็ดหญ้ายอดหนอนยังไม่มีการงอกในสภาพเรือนทดลอง หญ้ายอดหนอน มีลักษณะเมล็ดคล้ายรูปไข่ ผิวขรุขระ สีน้ำตาล-น้ำตาลเข้ม การแพร่กระจายของเมล็ดทำได้ดีเนื่องจากเมล็ดแก่แล้วแตกสามารถติดออกไปได้ระยะไกล จึงทำให้สามารถแพร่กระจายไปได้ไกลจากต้นเดิม หรือสามารถติดไปกับภาชนะ หรือวัตถุที่อยู่ใกล้เคียงได้ดี เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย 86 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด 99.5 เปอร์เซ็นต์ และต่ำสุด 70.0 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเมล็ดไม่มีการพักตัว และมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง โดยเมล็ดจะงอกโดยการแทงทะลุผ่านส่วนหัวของเมล็ด ทั้งนี้หญ้ายอดหนอนมีความสูง และทรงพุ่มในสภาพไม่มีการแข่งขันสูงกว่าต้นที่มีการแข่งขัน แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ซึ่งหญ้ายอดหนอนมีวงจรชีวิตโดยเฉลี่ย 74 วันหลังงอก โดยหญ้ายอดหนอนงอกที่ระยะ 7 วันหลังปลูก ออกดอกที่ระยะ 23 วันหลังงอก ติดผลที่ระยะ 7 วันหลังออกดอก ผลแก่ที่ระยะ 7 วันหลังติดผล โดยการออกดอก ติดผล และเมล็ดแก่ เป็นแบบทยอย ไม่เกิดขึ้นพร้อมกันทั้งหมด 1 ผล มีเมล็ดจำนวน 2 เมล็ด และจำนวนผลต่อต้นใน 1 วงจรชีวิต สูงสุด 312 ผลต่อต้น คิดเป็น 624 เมล็ดต่อต้น/1 วงจรชีวิต โดยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในสภาวะการแข่งขันเฉลี่ย 48 เปอร์เซ็นต์ และหญ้ายอดหนอนมีคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื่องต้น โดยใบแห้งหญ้า สามารถยับยั้งความยาวรากไมยราบยักษ์ได้ ทั้งนี้ควรนำข้อมูลชีววิทยาเบื้องต้นนี้ ไปศึกษาการป้องกันกำจัดต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมา ของกลุ่มวิจัยวัชพืช ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Dunham. 2014. Homeopathic Materia Medica by Dunham *Spigelia anthelmia* L. International Academy of Classical homeopathy. (Online). Available. <http://www.vithoulkas.com/en/books-study/online-materia-medica/3106-spigelia-anthelmia.html>. (20 June 2014).
- Mohamad S. A.J.G.H. and Kostermans G. T. 1987. *Weeds of rice in Indonesia*. BALAI PUSTAKA. Jakarta Pusat, Indonesia. 716p.
- Muenschler, W. C. 1980. *Weeds*. 2nd edition. Cornell University Press, Ithaca and London.

Table 1 Survey location of *Spigelia anthelmia*

Region	Province	Present	Absent	Location
Northern	Chiang Mai		✓	
	Mae Hong Son		✓	
	Nan		✓	
Central	Phichit		✓	
	Lop Buri		✓	
	Saraburi		✓	
	Suphan Buri		✓	
	Sing Buri		✓	
	Phetchabun		✓	
	Phetchaburi		✓	
	Ratchaburi		✓	
	Nakhon Pathom		✓	
	Bangkok	✓		ข้างทางรถไฟ
Eastern	Chon Buri		✓	
	Rayong	✓		แปลงยางพารา
	Chanthaburi	✓		แปลงยางพารา
	Trad			
	Sa Kaeo		✓	
Western	Prachuap Khiri Khan		✓	
Northeastern	Nakhon Ratchasima		✓	
Southern	Chumphon		✓	
	Nakhon Sri Thammarat		✓	
	Phuket		✓	
	Phang Nga		✓	
	Ranong		✓	

Table 2 The growth of *Spigelia anthelmia* L.

Treatments	Height	canopy	Leaves/tree	Branch/tree	Inflorescence /tree	Inflorescence /branch	Fruits/tree	Seed/tree	Dry weight /tree
1 tree/plot	14.02 a ^{1/}	16.6 a	40.8 a	7.2 a	16.4 a	2.4 a	110.8 a	221.6 a	4.6 a
3 tree/plot	11.8 a	14.7 a	26.1 a	4.8 a	13.6 a	2.8 a	112.9 a	225.9 a	3.5 a
5 tree/plot	12.7 a	15.3 a	37.0 a	6.6 a	20.2 a	3.1 a	110.1 a	220.2 a	4.8 a
All germinate	13.3 a	14.4 a	24.4 a	4.5 a	11.6 a	2.6 a	45.7 b	91.5 b	3.3 a
C.V. (%)	10.9	12.1	41.3	29.2	31.7	21.1	38.9	38.9	39.5

^{1/}Means within the same column followed by the same letters are not significantly different at 95% level by DMRT

Table 3 Effect of dry leaves for root and shoot growth. (percent of inhibitions)

Treatments	percent of inhibitions		Fresh weight (gram)
	Root	Shoot	
1. Dry leaves of <i>S. anthelmia</i> L. 0.01 gram	44.30 b ^{1/}	15.17 b	0.26 b
2. Dry leaves of <i>S. anthelmia</i> L. 0.05 gram	65.56 ab	14.86 b	0.31 b
3. Dry leaves of <i>S. anthelmia</i> L. 0.1 gram	83.20 ab	13.15 b	0.30 b
4. Dry leaves of <i>S. anthelmia</i> L. 0.5 gram	100.00 a	100.00 a	0.00 a
5. Dry leaves of <i>S. anthelmia</i> L. 0 gram (control)	0.00 c	0.00 c	0.35 b
CV	34.90	33.20	26.70

^{1/} Means within the same column followed by the same letters are not significantly different at 95% level by DMRT



Figure 1 *Spigelia anthelmia* (1) and Inflorescence (2)

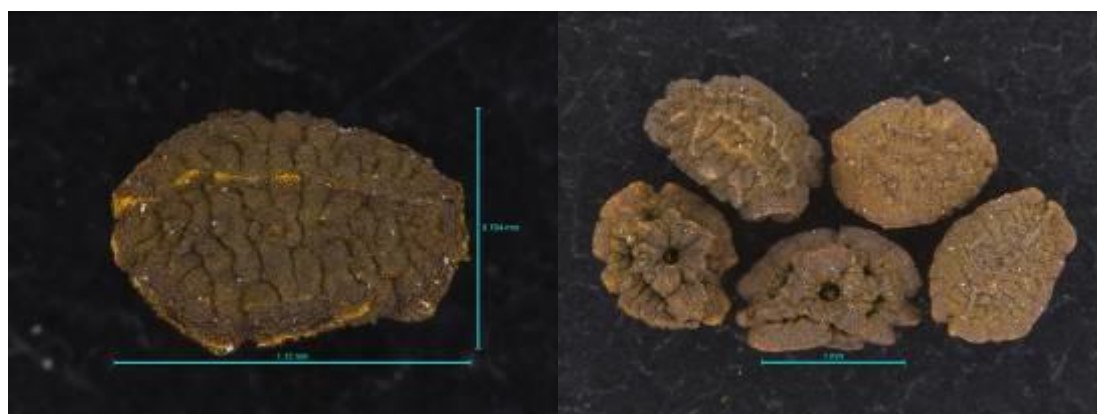


Figure 2 Seed of *Spigelia anthelmia* L.

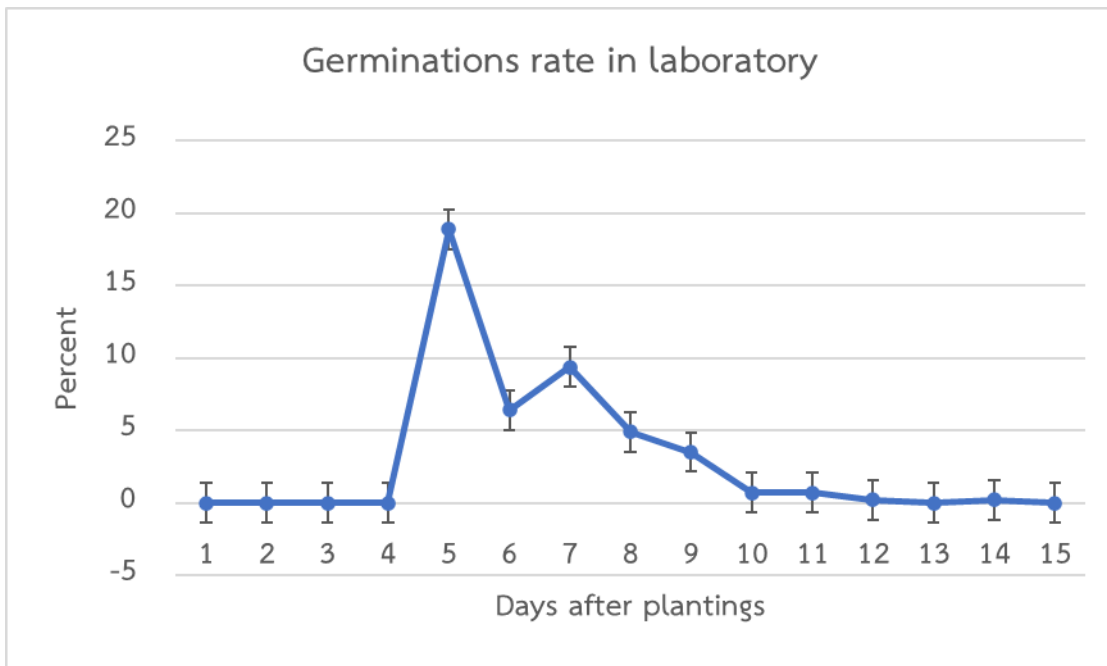


Figure 3 Germinations rate of *Spigelia anthelmia* L. in laboratory



Figure 4 Germination of *Spigelia anthelmia* L.

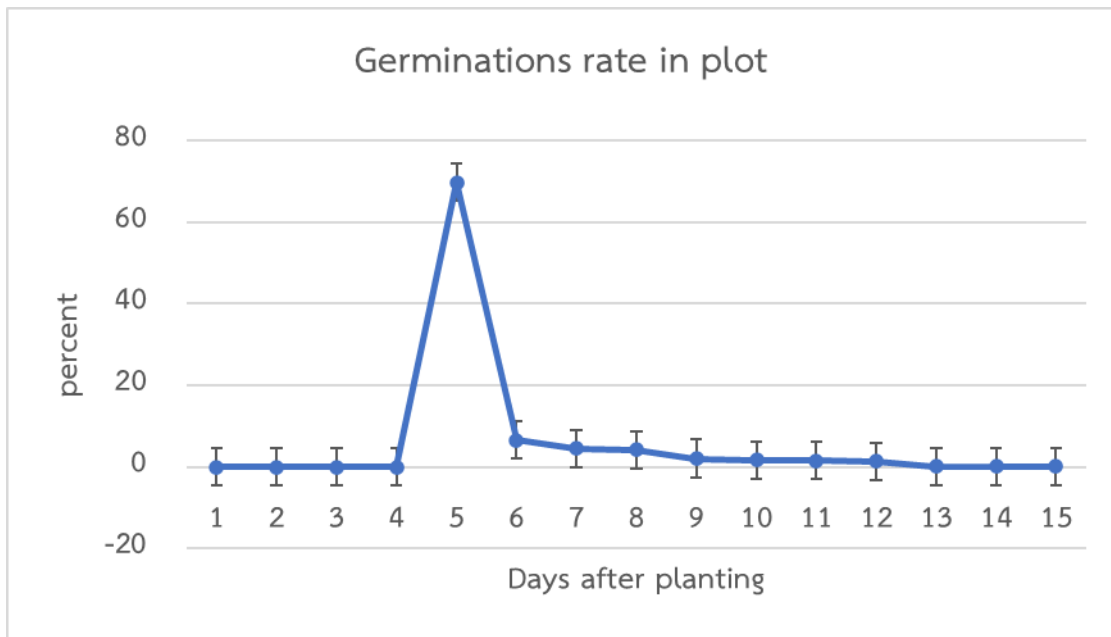


Figure 5 Germination rate of *Spigelia anthelmia* L. in plot

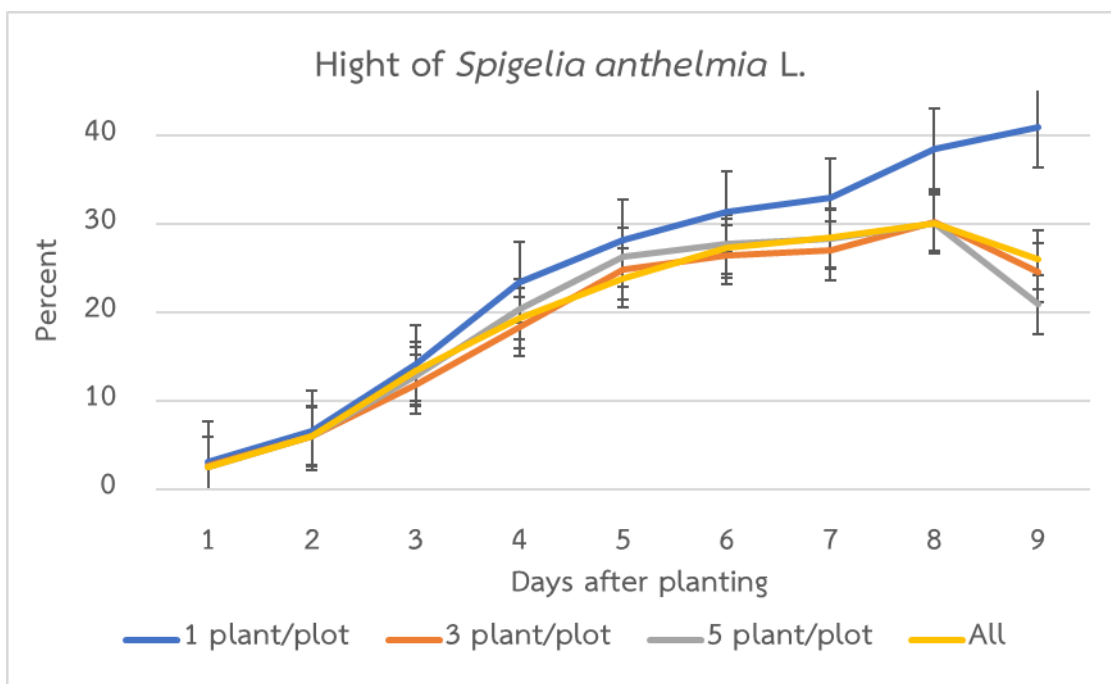


Figure 6 Height of *Spigelia anthelmia* L.

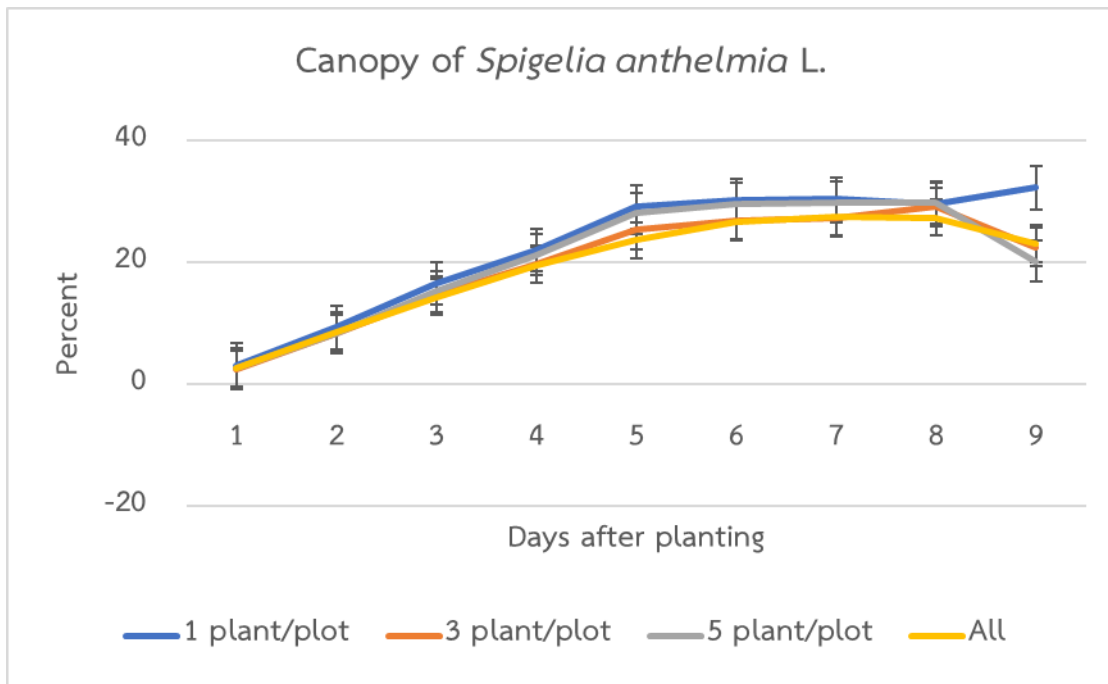


Figure 7 Canopy of *Spigelia anthelmia L.*



Figure 8 *Spigelia anthelmia L.* in plot

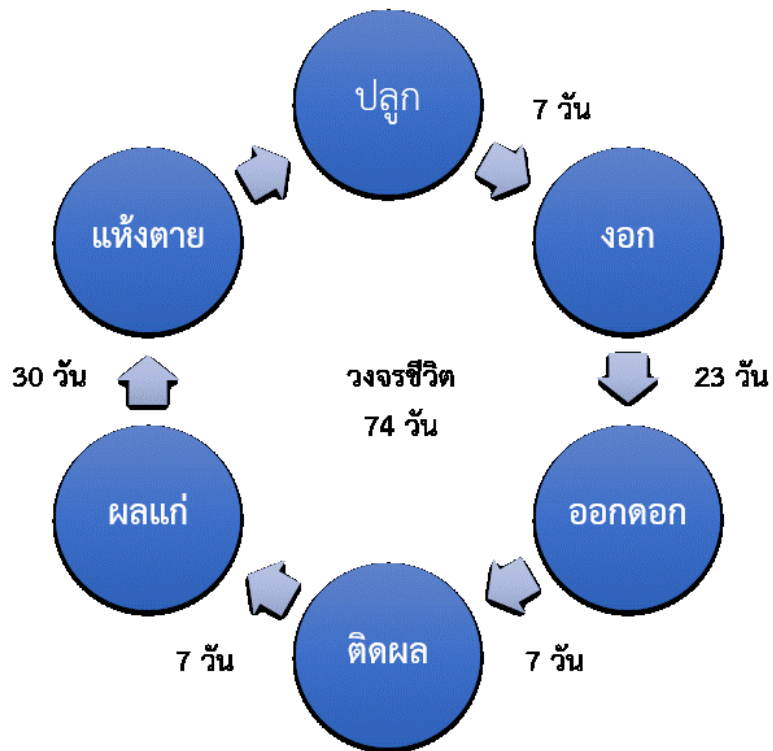


Figure 9 Life cycle of *S. anthelmia* L.

ชีววิทยาและการแพร่กระจายของพืชต่างถิ่น 3 ชนิด : เอื้องชมพู (*Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross ; Dandelion (*Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg.) และ False Dandelion (*Hypochaeris radicata* L.)
ในพื้นที่เกษตรที่สูง

(Biology and Distribution of 3 Alien Plants Species : Pink-head knotweed (*Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross ; Dandelion (*Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg.) and False Dandelion (*Hypochaeris radicata* L.) in Highland agriculture)

เอกรัตน์ ธนทอง^{1/} ธัญชนก จงรักไทย^{1/} อัญศยา พรหมมา^{1/} ฉัตรนภา ช่มอาวุธ^{2/}

^{1/} กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชสวน

Abstract

Study biology and distribution of 3 alien plants species namely Pink-head knotweed (*Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross), Dandelion (*Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg.) and False Dandelion (*Hypochaeris radicata* L.) was conducted during October 2017 – September 2019. Survey in highland agriculture areas and another ecosystem found Pink-head knotweed, Dandelion and False Dandelion in Khun Wang Royal Project Development Center Chiang Mai province. and only found Dandelion in Khun Sathan National Park and Khun Sathan Watershed Research Station Nan province. The results showed that seed of Pink-head knotweed are brown to dark brown, achene, narrow ovoid shape triangular, surface smooth and glossy. The germination test in net house has 44 %. The plant can fast grow. The first flowering and seed setting was seen 2 months after cutting, and develop from flower bud to blooming 9-10 days, and seed maturing begins 3-5 days after flowering. The plant can produce 4,911-13,991 seed/plant. Effect of allelopathy from Pink-head knotweed on *Mimosa pigra* L. grown in the laboratory test. The allelopathy from stem and leaves were affected seedling growth. The leaves 0.5 g had inhibited root and shoot 90.4 % and 46.2 %. Seed of Dandelion are brownish, oblong, at apex awn. Pappus bristle, white, length 0.4-0.5 cm fused apex of seed. Pappus help to float along the wind. The germination test in net house has 53 %. The first flowering and seed setting was seen 3 months after planting, and develop from flower bud to blooming for 7-9 days, and seed maturing begins 5 days after flowering. The plant can produce 3,819-6,488 seed/plant. Effect of allelopathy from Dandelion on *Mimosa pigra* L. grown in the laboratory test. The allelopathy from root stem leaves and inflorescence were affected seedling growth.

รหัสการทดลอง 03-27-60-01-00-00-05-61

The leaves 0.5 g had inhibited root and shoot 100 %. and Seed of False Dandelion are brown to dark brown, narrow oblong, surface with as a network-like pattern. Pappus bristle, white, length 0.8-1.0 cm fused apex of seed. Pappus help to float along the wind. The germination test in nethouse has 86 %. The first inflorescence was seen 4 months after planting, flowering and seed setting was seen 5 months after planting, and develop from flower bud to blooming for 8-10 days. , and seed maturing begins 7 days after flowering. The plant can produce 10,688-15,787 seed/plant. Effect of allelopathy from False Dandelion on *Mimosa pigra* L. grown in the laboratory test. The allelopathy from root stem leaves and inflorescence were affected seedling growth. The leaves 0.5 g had inhibited root and shoot 100 %.

Keywords : *Persicaria capitata*, *Taraxacum officinale*, *Hypochaeris radicata*, biology and distribution, allelopathy

บทคัดย่อ

การศึกษาชีววิทยาและการแพร่กระจายของพืชต่างถิ่น 3 ชนิด ได้แก่ เอื้องชมพู (*Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross) Dandelion (*Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg.) และ False dandelion (*Hypochaeris radicata* L.) ในพื้นที่เกษตรที่สูงของประเทศไทย ทำการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2560 – กันยายน 2562 การสำรวจพบเอื้องชมพู Dandelion และ False dandelion บริเวณพื้นที่ทำการศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง จังหวัดเชียงใหม่ และพบเฉพาะ Dandelion บริเวณพื้นที่ทำการอุทยานแห่งชาติขุนสถาน และสถานีวิจัยต้นน้ำขุนสถาน จังหวัดน่าน การศึกษาชีววิทยา พบว่า เอื้องชมพูมีเมล็ดสีน้ำตาลถึงน้ำตาลดำ ทรงรูปไข่แคบ (narrow ovoid) ด้านข้างเป็นสันสามเหลี่ยม ผิวเรียบเป็นมันเงาวาวเล็กน้อย มีเปอร์เซ็นต์ความงอกในเรือนทดลอง 44 เปอร์เซ็นต์ หลังจากตัดชำมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เริ่มออกดอก และสร้างเมล็ดที่ระยะ 2 เดือนหลังตัดชำ ใช้เวลาพัฒนาจากดอกตูมถึงดอกบาน 9-10 วัน และหลังจากดอกบาน 3-5 วัน เมล็ดสุกแก่ สามารถผลิตเมล็ดได้ 4,911-13,991 เมล็ดต่อต้น การศึกษาคุณสมบัติทางอัลลีโลพาธิเบื้องต้น พบว่า ลำต้นและใบของเอื้องชมพู สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไมยราบยักษ์ได้ โดยใบแห้ง 0.5 กรัม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและลำต้นได้ 90.4 และ 46.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Dandelion มีเมล็ดสีน้ำตาลอ่อน รูปขอบขนาน (oblong) บริเวณปลายมีรยางค์เป็นหนามสั้นๆ และมีแพปพัส (pappus) สีขาว ยาว 0.4-0.5 เซนติเมตร ติดอยู่ที่ปลายสุดของเมล็ด มีเปอร์เซ็นต์ความงอกในเรือนทดลอง 53 เปอร์เซ็นต์ เริ่มออกดอกและสร้างเมล็ดที่ระยะ 3 เดือนหลังย้ายปลูก ใช้เวลาพัฒนาจากดอกตูมถึงดอกบาน 7-9 วัน และหลังจากดอกบานประมาณ 5 วัน เมล็ดสุกแก่ สามารถผลิตเมล็ดได้ 3,819-6,488 เมล็ดต่อต้น การศึกษาคุณสมบัติทางอัลลีโลพาธิเบื้องต้น พบว่า ราก ลำต้น ใบ และช่อดอกของ Dandelion สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไมยราบยักษ์ได้ โดยใบแห้ง 0.5 กรัม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและลำต้นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และ False Dandelion มีเมล็ดสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม รูปขอบขนานแคบ (narrow oblong) ผิวเป็นร่องคล้ายตาข่ายขนาดเล็กตามยาว และมีแพปพัส (pappus) คล้ายขนนก สีขาว ยาว 0.8-1.0 เซนติเมตร ติดอยู่ที่ปลายสุดของเมล็ด มีเปอร์เซ็นต์ความงอกในเรือนทดลอง 86 เปอร์เซ็นต์ เริ่มแทงช่อดอกที่ระยะ 4 เดือนหลังย้ายปลูก ออกดอกและสร้างเมล็ดที่ระยะ 5 เดือนหลังย้ายปลูก ใช้เวลาพัฒนาจากดอกตูมถึงดอกบาน 8-10 วัน และหลังจากดอกบานประมาณ 7 วัน เมล็ดสุกแก่ สามารถผลิตเมล็ดได้ 10,688-15,787 เมล็ดต่อต้น การศึกษาคุณสมบัติทางอัลลีโลพาธิ

เบื้องต้น พบว่า ราก ลำต้น ใบ และช่อดอกของ False Dandelion สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไมยราบยักษ์ได้ โดยใบแห้ง 0.5 กรัม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและลำต้นได้ 100 เปอร์เซ็นต์

คำหลัก : เอื้องชมพู Dandelion False dandelion ชีววิทยาและการแพร่กระจาย อัลลีโลพาตี

คำนำ

วัชพืชร้ายแรงในแต่ละประเทศ มักเป็นพืชที่ไม่ได้มีถิ่นกำเนิดในประเทศนั้นๆ และมักเป็นพืชต่างถิ่นที่ถูกชักนำเข้าไปในถิ่นใหม่ การนำเข้าหรือชักนำพืชต่างถิ่นเหล่านี้มักมีมนุษย์เข้าไปเกี่ยวข้องด้วยเสมอ อาจเป็นการนำเข้าโดยความตั้งใจหรือไม่ตั้งใจก็ตาม เช่น การนำเข้าเพื่อใช้เป็นไม้ประดับ ปลูกเพื่อความสวยงามตามสวนหย่อม แปลงไม้ดอก ไม้ประดับ ไม้ประดับ เนื่องจากลักษณะของต้น ใบ หรือ ดอก ของพืชเหล่านี้มักมีความสวยงาม แปลกตา อัญชยาและคณะ (2557) ได้สำรวจวัชพืชในพื้นที่เกษตรที่สูงทางภาคเหนือของประเทศไทย พบพืชต่างถิ่นหลายชนิด บางชนิดมีรายงานการเป็นวัชพืชหรือเป็นพืชต่างถิ่นที่รุกรานในต่างประเทศ เช่น เอื้องชมพู (*Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross) มีรายงานเป็นวัชพืชในประเทศจีน และญี่ปุ่น โดยในจีนพบเป็นวัชพืชในสวนชา Dandelion (*Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg.) มีรายงานการเป็นวัชพืชในต่างประเทศ ในพืชปลูกหลายชนิด ทั้งพืชผัก พืชไร่ และไม้ผล (Villaseñor and Espinosa, 1998; Hourdajian, 2006) False Dandelion (*Hypochaeris radicata* L.) เป็นวัชพืชที่ระบาดในสหรัฐอเมริกาถึง 42 รัฐ และถูกจัดเป็นวัชพืชร้ายแรง Class B (Plant Database, 2014) ซึ่งการตรวจพบพืชรุกราน วิเคราะห์ความเสี่ยงหรือโอกาสที่จะเป็นวัชพืชร้ายแรงได้โดยเร็ว จะทำให้ประหยัดเวลาและงบประมาณในการจัดการ โดยการศึกษาแนวทางการป้องกันกำจัดวัชพืชต่างถิ่น เป็นการหาแนวทางในการจัดการ ควบคุม เพื่อลดการเกิดวัชพืชชนิดใหม่ในพื้นที่การเกษตร และป้องกันไม่ให้แพร่ระบาดไปยังพื้นที่อนุรักษ์ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยา ได้แก่ การงอกของเมล็ด การเจริญเติบโต ศักยภาพการผลิตเมล็ด และการแพร่ระบาดของเอื้องชมพู Dandelion และ False Dandelion

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องถ่ายรูปแบบดิจิทัล
- กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope)
- แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำ หนังสือพิมพ์ และป้ายชื่อติดตัวอย่างพืช
- เวอร์เนียคาลิเปอร์แบบดิจิทัล
- เครื่องชั่งน้ำหนักแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- วัสดุและอุปกรณ์อื่นๆ เช่น กระจกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว กระจกบานขนาด 1x1 เมตร ดินปลูก ไม้บรรทัด ถุงกระดาษ และป้ายแสดงกรรมวิธี

วิธีการ

1. การสำรวจเพื่อศึกษาการแพร่กระจาย

สำรวจการแพร่กระจายของเอื้องชมพู Dandelion และ False Dandelion ในพื้นที่เกษตรที่สูงของประเทศไทย ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยใช้วิธีการสำรวจแบบสืบพบ

(detection survey) โดยการสุ่มเดินแบบซิกแซก รูปตัว W มีพื้นที่สำรวจไม่น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ เมื่อพบพืชเป้าหมาย ทำการสำรวจพื้นที่ใกล้เคียง เพื่อทราบขอบเขตการระบาดในแหล่งนั้น บันทึกสถานที่หรือพิกัดที่พบ สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก และแมลงศัตรูธรรมชาติ ที่พบในพื้นที่ที่สำรวจ

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการงอกของเมล็ด

2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา นำเมล็ดเอื้องชมพู Dandelion และ False Dandelion ที่เก็บจากที่ต่างๆ มารวมกัน แล้วสุ่มเมล็ดจำนวนชนิดละ 100 เมล็ด วัดขนาด และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกข้อมูล 1) ความกว้าง ความยาวของเมล็ด 2) น้ำหนักต่อ 100 เมล็ด 3) รูปร่างลักษณะ และสีของผิวเมล็ด

2.2 การงอกของเมล็ดในสภาพเรือนทดลอง นำเมล็ดเอื้องชมพู Dandelion และ False Dandelion ที่เก็บจากที่ต่างๆ มาเลือกเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวนชนิดละ 50 เมล็ด โรยในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ที่บรรจุดินจนถึงขอบล่างของกระถาง จำนวน 10 ซ้ำ รดน้ำให้ความชื้นทุกวัน บันทึกข้อมูล จำนวนเมล็ดงอกทุกวัน นาน 30 วัน หรือจนกว่าเมล็ดงอกหมด และนำไปคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความงอก

3. ศึกษาวงจรการเจริญเติบโต ความสามารถในการแข่งขัน และศักยภาพการผลิตเมล็ด

3.1 ศึกษาวงจรการเจริญเติบโต ทำการคัดเลือกต้นเอื้องชมพูในสภาพธรรมชาติ แล้วตัดให้แต่ละกิ่งมีจำนวน 3 ข้อ สำหรับ Dandelion และ False Dandelion คัดเลือกต้นกล้า ในสภาพธรรมชาติที่มีขนาดใกล้เคียงกัน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงลงในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว เป็นเวลา 1 เดือน แล้วจึงย้ายปลูกลงกระบะปูนขนาด 1x1 เมตร ชนิดละ 1 ต้นต่อกระบะ จำนวน 15 กระบะ บันทึกการเจริญเติบโต ดังนี้ 1) ความยาวกิ่ง ขนาดทรงพุ่ม และจำนวนใบ ทุก 30 วัน 2) วันที่เริ่มออกดอก ระยะดอกแรกบาน และวันที่เมล็ดสุกแก่ (นับจากวันที่ย้ายปลูก) 3) จำนวนช่อดอกต่อต้น 4) จำนวนเมล็ดต่อช่อดอก 5) จำนวนเมล็ดต่อต้น จนกระทั่งต้นออกดอกและติดเมล็ดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หรือต้นตาย

3.2 ความสามารถในการแข่งขัน

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 7 ซ้ำ 3 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พืชทดลอง จำนวน 1 ต้นต่อตารางเมตร

กรรมวิธีที่ 2 พืชทดลอง จำนวน 3 ต้นต่อตารางเมตร

กรรมวิธีที่ 3 พืชทดลอง จำนวน 5 ต้นต่อตารางเมตร

ย้ายปลูกต้นเอื้องชมพู Dandelion และ False Dandelion ในพื้นที่ขนาด 1 ตารางเมตร ตามกรรมวิธีที่กำหนด เพื่อศึกษาความสามารถในการแข่งขันของพืชดังกล่าวในอัตราที่แตกต่างกัน โดยบันทึกความยาวกิ่ง ขนาดทรงพุ่ม และจำนวนใบ ทุก 30 วัน

3.3 ศักยภาพการผลิตเมล็ด

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 7 ซ้ำ 3 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พืชทดลอง จำนวน 1 ต้นต่อตารางเมตร

กรรมวิธีที่ 2 พืชทดลอง จำนวน 3 ต้นต่อตารางเมตร

กรรมวิธีที่ 3 พืชทดลอง จำนวน 5 ต้นต่อตารางเมตร

ย้ายปลูกต้นเอื้องชมพู Dandelion และ False Dandelion ในพื้นที่ขนาด 1 ตารางเมตร ตามกรรมวิธีที่กำหนด เพื่อศึกษาศักยภาพในการผลิตเมล็ดของพืชดังกล่าวในอัตราที่แตกต่างกัน โดยบันทึกจำนวนเมล็ดของแต่ละต้นในแต่ละกรรมวิธี

4. ศึกษาคุณสมบัติทางอัลลีโลพาธีเบื้องต้น

ทดสอบคุณสมบัติทางอัลลีโลพาธีในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Sandwich method โดยใช้ไมยราบยักษ์ (*Mimosa pigra* L.) เป็นพืชทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ไมใส่ใบพืชทดลอง (ชุดควบคุม) 0 กรัม

กรรมวิธีที่ 2 ใบพืชทดลองแห้ง จำนวน 0.01 กรัม

กรรมวิธีที่ 3 ใบพืชทดลองแห้ง จำนวน 0.05 กรัม

กรรมวิธีที่ 4 ใบพืชทดลองแห้ง จำนวน 0.1 กรัม

กรรมวิธีที่ 5 ใบพืชทดลองแห้ง จำนวน 0.5 กรัม

นำใบพืชทดลองแห้งที่ได้จากการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน มาชั่งน้ำหนัก ตามกรรมวิธีที่กำหนด ใส่ลงในหลอดแก้วกันตัด เส้นผ่านศูนย์กลาง 29 มิลลิเมตร ความสูง 130 มิลลิเมตร ที่บรรจุสารละลายวุ้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิตร เมื่อวุ้นชั้นล่างเย็น เติมลงไปอีก 10 มิลลิตร ให้ใบพืชทดลองอยู่กึ่งกลางระหว่างชั้นของวุ้น เมื่อวุ้นชั้นบนเย็น นำต้นอ่อนไมยราบยักษ์ ที่เพิ่งเริ่มงอก (มีรากโผล่ออกมา 1-2 มิลลิเมตร) วางบนวุ้นหลอดละ 6 เมล็ด ปิดปากหลอดด้วยพลาสติกใส นำไปวางในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 30 องศาเซลเซียส ให้แสงตลอดเวลา เมื่อครบ 7 วัน ล้างต้นอ่อนไมยราบยักษ์ นำไปวัดความยาวรากและต้น และนำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ การยับยั้งการเจริญดังนี้

$$\text{การยับยั้งการเจริญ (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A = ค่าเฉลี่ย (จาก 5 ซ้ำ) ความยาวรากหรือลำต้น/ต้นไมยราบยักษ์ในชุดควบคุม

B = ค่าเฉลี่ย (จาก 5 ซ้ำ) ความยาวรากหรือลำต้น/ต้นไมยราบยักษ์ในชุดที่ได้รับสารสกัด

สำหรับส่วนของราก ลำต้น และช่อดอก ของ Dandelion และ False Dandelion ทำการทดลองและบันทึกข้อมูลเช่นเดียวกับใบ

เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่างเดือน ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562 ในพื้นที่เกษตรที่สูงของประเทศไทย ภาคเหนือ ทดลองในห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ และเรือนทดลองศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (ขุนวาง) ตำบลแม่วิน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การแพร่กระจาย

สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดเอื้องชมพู (*Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross) Dandelion (*Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg.) และ False dandelion (*Hypochaeris radicata* L.) ในพื้นที่เกษตรที่สูงของประเทศไทย ภาคเหนือ จำนวน 9 จังหวัด ได้แก่ เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน ลำปาง ตาก ลำพูน น่าน และอุดรดิตถ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 2 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น และเลย พบเอื้องชมพู Dandelion และ

False dandelion บริเวณพื้นที่ทำการศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง ตำบลแม่วีน อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ และพบเฉพาะ Dandelion บริเวณพื้นที่ทำการอุทยานแห่งชาติขุนสถานและสถานีวิจัยต้นน้ำขุนสถาน ตำบลสันทะ อำเภอนาน้อย จังหวัดน่าน (Table 1) สอดคล้องกับที่ อัญศยาและคณะ (2557) ได้สำรวจพบเอื้องชมพู Dandelion และ False dandelion ในบริเวณพื้นที่เกษตรที่สูง อำเภอแม่วาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยพบขึ้นกระจัดกระจายในพื้นที่ว่าง ช้างอาคาร และบริเวณสนามหญ้า

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการงอกของเมล็ด

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ด

เอื้องชมพูมีเมล็ดสีน้ำตาลถึงน้ำตาลดำ ทรงรูปไข่แคบ (narrow ovoid) ด้านข้างเป็นสันสามเหลี่ยม ตรงกลางโค้งมนนูนขึ้น ผิวเรียบเป็นมันเงาวาวเล็กน้อย (Figure 1) เมล็ดกว้างประมาณ 0.95 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 1.84 มิลลิเมตร และมีน้ำหนัก 100 เมล็ด เฉลี่ย 0.0476 กรัม (Table 2) สอดคล้องกับที่ Kantachot and Chantaranothai (2011) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลในพืชวงศ์เอื้องเพ็ดม้า (Polygonaceae) ในประเทศไทย พบว่า *Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D. Don) H. Gross มีลักษณะรูปทรงของผลเป็นสันสามเหลี่ยม (triangular) และมีผิวของผลเรียบถึงเป็นคลื่น

Dandelion มีเมล็ดสีน้ำตาลอ่อน รูปขอบขนาน (oblong) มีขนสั้นนุ่มปกคลุมผิวเมล็ด บริเวณปลาย มีรยางค์เป็นหนามสั้นๆ และมีแพปพัส (pappus) สีขาว ยาว 0.4-0.5 เซนติเมตร ติดอยู่ที่ปลายสุดด้านหนึ่งของเมล็ด ช่วยพยุงให้เมล็ดปลิวไปตามลมได้ไกล (Figure 2) เมล็ดกว้างประมาณ 0.71 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 3.60 มิลลิเมตร และมีน้ำหนัก 100 เมล็ด เฉลี่ย 0.0348 กรัม (Table 2) สอดคล้องกับที่ Hourdajian (2006) รายงานว่า Dandelion เป็นวัชพืชที่ควบคุมได้ยากมากที่สุดชนิดหนึ่ง เนื่องจากเมล็ดสามารถแพร่กระจายได้ง่ายและเร็วด้วยกระแสลม

False Dandelion มีเมล็ดสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม รูปขอบขนานแคบ (narrow oblong) ผิวเป็นร่องคล้ายตาข่ายขนาดเล็กตามยาว และมีแพปพัส (pappus) คล้ายขนนก สีขาว ยาว 0.8-1.0 เซนติเมตร ติดอยู่ที่ปลายสุดด้านหนึ่งของเมล็ด ช่วยพยุงให้เมล็ดปลิวไปตามลมได้ไกล (Figure 3) เมล็ดกว้างประมาณ 0.66 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 5.65 มิลลิเมตร และมีน้ำหนัก 100 เมล็ด เฉลี่ย 0.0847 กรัม (Table 2)

การงอกของเมล็ด

ศึกษาการงอกของเมล็ดเอื้องชมพู Dandelion และ False dandelion ในเรือนทดลอง พบว่า เอื้องชมพูเริ่มงอกที่ 9 วันหลังเพาะเมล็ด งอกสูงสุดที่ 41 วันหลังเพาะเมล็ด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย 44 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการงอกเพิ่มขึ้นตั้งแต่ที่ระยะ 42 วันหลังเพาะเมล็ด (Figure 4) สำหรับ Dandelion เริ่มงอกที่ 7 วันหลังเพาะเมล็ด งอกสูงสุดที่ 23 วันหลังเพาะเมล็ด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย 53 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการงอกเพิ่มขึ้นตั้งแต่ที่ระยะ 24 วันหลังเพาะเมล็ด (Figure 5) ในขณะที่ False Dandelion เริ่มงอกที่ 5 วันหลังเพาะเมล็ด งอกสูงสุดที่ 23 วันหลังเพาะเมล็ด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ย 86 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการงอกเพิ่มขึ้นตั้งแต่ที่ระยะ 24 วันหลังเพาะเมล็ด (Figure 6)

ศึกษาวงจรการเจริญเติบโต ความสามารถในการแข่งขัน และศักยภาพการผลิตเมล็ด

วงจรการเจริญเติบโต

เอื้องชมพูมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเดือนที่ 2 หลังการตัดชำ มีความยาวกิ่งและจำนวนใบเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับเดือนแรก พร้อมทั้งเริ่มออกดอกและสร้างเมล็ดที่ระยะ 2 เดือนหลังตัดชำ ใช้เวลาพัฒนาจากดอกตูมถึงดอกบาน 9-10 วัน และเมล็ดสุกแก่ (เมล็ดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล) ที่ระยะ 3-5 วันหลังจากดอกบาน (Figure 7) จากนั้นการเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ และดอก เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ลำต้นและกิ่งมีลักษณะทอดเลื้อยไปตามพื้นดิน สามารถสร้างรากงอกติดกับผิวดิน ตามข้อมีการเจริญเติบโตสร้างยอดและใบใหม่ ปลายยอดตั้งขึ้น สามารถพาดไปตามพืชอื่นได้ เช่นเดียวกับลักษณะการเจริญเติบโตของผักขมหินเลื้อย (*Boerhavia repens* L.) และผักขมหินใบแหลม (*Boerhavia diandra* L.) (ศิริพรและคณะ, 2558) และสอดคล้องกับที่ ศิริพร (2558) รายงานว่า เอื้องชมพูเป็นวัชพืชในแปลงชาในมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน สามารถยกตัวสูงขึ้นอยู่ในพุ่มของชาได้ ดังนั้นเอื้องชมพูจึงจัดเป็นวัชพืชอายุข้ามปี (perennial weed) เช่นเดียวกับที่ Zhang and Hirota (2000) ระบุว่าเอื้องชมพูเป็นพืชอายุหลายปี พบทั้งในที่เพาะปลูกและริมทางหลวงของประเทศจีน

Dandelion มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกับเอื้องชมพู โดยเดือนที่ 2 หลังย้ายปลูก มีความกว้างทรงพุ่มและจำนวนใบเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับเดือนแรก เริ่มออกดอกและสร้างเมล็ดที่ระยะ 3 เดือนหลังย้ายปลูก ใช้เวลาพัฒนาจากดอกตูมถึงดอกบาน 7-9 วัน และเมล็ดสุกแก่ที่ระยะประมาณ 5 วันหลังจากดอกบาน (Figure 8) จากนั้นการเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ และดอก เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนถึงที่ระยะ 5 เดือนหลังย้ายปลูก ความกว้างทรงพุ่มเริ่มคงที่ แต่จำนวนใบและช่อดอกยังคงเพิ่มขึ้น เนื่องจากตาที่อยู่บริเวณโคนต้นสามารถพัฒนาเป็นยอดและใบใหม่ได้ ประกอบกับรากแก้วมีลักษณะเป็นรากสะสมอาหาร Dandelion จึงจัดเป็นวัชพืชอายุข้ามปี (perennial weed) เช่นเดียวกับที่ Anderson (1999); Hourdajian (2006) รายงานว่า Dandelion เป็นพืชเนื้ออ่อน อายุหลายปี มีรากแก้วหนาและแข็งแรง สามารถเจริญลงไปใต้ดินได้ถึง 3 เมตร บริเวณด้านบนของรากแก้วมีตาที่สามารถสร้างต้นอ่อนได้ และมีชีวิตรอดอยู่ได้แตกต่างกันไปตามสภาพนิเวศน์ ตั้งแต่ 2-3 ปี จนถึง 10 ปี

False Dandelion มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเดือนที่ 2 หลังย้ายปลูก มีความกว้างทรงพุ่มและจำนวนใบเพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 4 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเดือนแรก และเริ่มแทงช่อดอกที่ระยะ 4 เดือนหลังย้ายปลูก ออกดอกและสร้างเมล็ดที่ระยะ 5 เดือนหลังย้ายปลูก ใช้เวลาพัฒนาจากดอกตูมถึงดอกบาน 8-10 วัน และเมล็ดสุกแก่ที่ระยะประมาณ 7 วันหลังจากดอกบาน (Figure 9) จากนั้นการเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ และดอก เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนถึงที่ระยะ 6 เดือนหลังย้ายปลูก ความกว้างทรงพุ่มเริ่มคงที่ แต่จำนวนใบและช่อดอกยังคงเพิ่มขึ้น เนื่องจากตาที่อยู่บริเวณโคนต้นสามารถพัฒนาเป็นยอดและใบใหม่ได้ อีกทั้งก้านช่อดอกย่อยแตกออกเป็นคู่ (dichotomous) ประกอบกับรากแก้วมีลักษณะเป็นรากสะสมอาหาร False Dandelion จึงจัดเป็นวัชพืชอายุข้ามปี (perennial weed) เช่นเดียวกับ Dandelion ซึ่งสอดคล้องกับที่ Washington State Noxious Weed Control Board (2010) ระบุว่า False Dandelion มีลักษณะคล้าย Dandelion สามารถขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด หน่อ และส่วนของรากได้

ความสามารถในการแข่งขัน

ศึกษาศักยภาพการเจริญเติบโตของเอื้องชมพู Dandelion และ False dandelion ในสภาพที่มีการแข่งขันของพืชดังกล่าวในอัตราที่แตกต่างกัน ดังนี้ 1, 3 และ 5 ต้นต่อตารางเมตร ผลการศึกษาพบว่า เอื้องชมพูมีความยาวกิ่งในเดือนที่ 1-5 ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่เดือนที่ 6 กรรมวิธีที่มี 1 ต้นต่อตารางเมตร มีความยาวกิ่งสูงสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ กรรมวิธี 3 และ 5 ต้นต่อตารางเมตร ที่มีความยาวกิ่งน้อยที่สุด (Table 3) จำนวนใบในเดือนที่ 1-4 ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่เดือนที่ 5 และ 6 กรรมวิธีที่มี 1 ต้นต่อตารางเมตร มีจำนวนใบสูงสุด ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธี 3 ต้นต่อตารางเมตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธี 5 ต้นต่อตารางเมตร ที่มีจำนวนใบน้อยที่สุด (Table 4) จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า เอื้องชมพูมีการเจริญเติบโตอย่างอิสระในระหว่างเดือนที่ 1-5 เมื่อเข้าสู่เดือนที่ 6 จึงเริ่มเกิดการแข่งขันแข่งขันขึ้น

Dandelion มีความกว้างทรงพุ่มในเดือนที่ 1-5 ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 5) จำนวนใบ เดือนที่ 1 และ 4 ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่เดือนที่ 2, 3 และ 5 กรรมวิธีที่มี 1 ต้นต่อตารางเมตร มีจำนวนใบสูงสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธี 5 ต้นต่อตารางเมตร ที่มีจำนวนใบน้อยที่สุด (Table 6) อาจเนื่องมาจากการเจริญเติบโตของต้น Dandelion มีลักษณะเป็นพุ่มแบบกระจุกซ้อน และมีการเรียงตัวของใบแบบกระจุกซ้อน (rosette) โดยใบมีลักษณะเรียงเวียนถี่คล้ายกุหลาบซ้อนและแผ่อกทุกทิศทางเป็นรัศมีจากแกนกลางของลำต้น (พูนพิภพ, 2549) ทำให้สามารถเจริญเติบโตได้อย่างอิสระ ไม่เกิดการแข่งขันทันอื่น ๆ

False Dandelion มีความกว้างทรงพุ่มในเดือนที่ 1 และ 2 ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่เดือนที่ 3 กรรมวิธีที่มี 1 ต้นต่อตารางเมตร มีความกว้างทรงพุ่มสูงสุด ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่มี 5 ต้นต่อตารางเมตร แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธี 3 ต้นต่อตารางเมตร ที่มีความกว้างทรงพุ่มน้อยที่สุด และในเดือนที่ 4-6 กรรมวิธีที่มี 1 ต้นต่อตารางเมตร มีความกว้างทรงพุ่มสูงสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ กรรมวิธี 3 และ 5 ต้นต่อตารางเมตร ที่มีความกว้างทรงพุ่มน้อยที่สุด (Table 7) จำนวนใบในเดือนที่ 1-6 ทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 8) อาจเนื่องมาจากการเจริญเติบโตของต้น False Dandelion มีลักษณะเช่นเดียวกับต้น Dandelion

ศักยภาพการผลิตเมล็ด

ศึกษาศักยภาพในการผลิตเมล็ดของต้นเอื้องชมพู Dandelion และ False dandelion ในสภาพที่มีการแข่งขันของพืชดังกล่าวในอัตราที่แตกต่างกัน ดังนี้ 1, 3 และ 5 ต้นต่อตารางเมตร ผลการศึกษาพบว่า เอื้องชมพูมีศักยภาพในการผลิตเมล็ดลดลงตามจำนวนต้นที่เพิ่มขึ้นในพื้นที่ปลูกที่เท่ากัน โดย กรรมวิธีที่มี 1 ต้นต่อตารางเมตร มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยสูงสุด ไม่แตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีที่มี 3 ต้นต่อตารางเมตร ซึ่งมีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 9,860-13,991 เมล็ดต่อต้น แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่มี 5 ต้นต่อตารางเมตร ที่มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 4,911 เมล็ดต่อต้น (Table 9) สำหรับศักยภาพในการผลิตเมล็ดของต้น Dandelion และ False dandelion นั้นมีแนวโน้มลดลงตามจำนวนต้นที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่ในทุกกรรมวิธีมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 3,819-6,488 เมล็ดต่อต้น และ 10,688-15,787 เมล็ดต่อต้น ตามลำดับ (Table 10 and 11) อย่างไรก็ตามเอื้องชมพู Dandelion และ False dandelion ในกรรมวิธีที่มี 1 ต้นต่อตารางเมตร มีจำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อต้นมากกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ ดังนั้นหากพบต้นของพืชดังกล่าวในพื้นที่เพียง 1 ต้นต่อตารางเมตร ควรกำจัดออกเนื่องจากพืช

ดังกล่าวสามารถผลิตเมล็ดได้มากกว่า 5,000 เมล็ดต่อต้น เช่นเดียวกับที่ จริญญาและคณะ (2561) รายงานว่า หากพบต้นบาหยานในพื้นที่เพียง 1 หรือ 2 ต้น ควรกำจัดออกจากพื้นที่ เนื่องจากต้นบาหยานสามารถผลิตเมล็ดได้มากกว่า 1,000 เมล็ดต่อต้น และมีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

ศึกษาคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื่องต้น

การศึกษาคูณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื่องต้นในส่วนต่างๆ ของเอื้องชมพู Dandelion และ False dandelion โดยใช้ไมยราบยักษ์เป็นพืชทดสอบ พบว่า ลำต้นและใบแห้งของเอื้องชมพูสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนไมยราบยักษ์ได้ โดยลำต้นและใบแห้ง 0.5 กรัม มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและลำต้นไมยราบยักษ์ได้ดีที่สุด เท่ากับ 86.9 90.4 30.6 และ 46.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงตามน้ำหนักของลำต้นและใบแห้งที่ลดลง ยกเว้นในส่วนของใบแห้งที่ 0.01-0.1 กรัม กลับส่งเสริมการเจริญเติบโตของลำต้นไมยราบยักษ์ (Table 12) สำหรับราก ลำต้น ใบ และช่อดอกของ Dandelion สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนไมยราบยักษ์ได้เช่นเดียวกัน โดยราก ลำต้น ใบ และช่อดอก 0.5 กรัม มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากไมยราบยักษ์ได้ดีที่สุด เท่ากับ 88.3 85.2 100 และ 84.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยับยั้งการเจริญเติบโตของลำต้นไมยราบยักษ์ได้ดีที่สุด เท่ากับ 71.3 52.7 100 และ 39.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงตามน้ำหนักของส่วนดังกล่าวที่ลดลง ยกเว้นในส่วนของใบ และช่อดอกแห้งที่ 0.01 กรัม กลับส่งเสริมการเจริญเติบโตของลำต้นไมยราบยักษ์ (Table 13) เช่นเดียวกับราก ลำต้น ใบ และช่อดอกของ False Dandelion ก็สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนไมยราบยักษ์ได้ โดยราก ลำต้น ใบ และช่อดอก 0.5 กรัม มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของรากไมยราบยักษ์ได้ดีที่สุด เท่ากับ 87.3 87.3 100 และ 84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ ยับยั้งการเจริญเติบโตของลำต้นไมยราบยักษ์ได้ดีที่สุด เท่ากับ 49.7 52.5 100 และ 46.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งลดลงตามน้ำหนักของส่วนดังกล่าวที่ลดลง ยกเว้นในส่วนของใบแห้งที่ 0.01 กรัม กลับส่งเสริมการเจริญเติบโตของลำต้นไมยราบยักษ์ (Table 14)

จะเห็นได้ว่าทุกส่วนของพืชทดลองมีคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิ โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของไมยราบยักษ์ได้ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักของส่วนต่างๆ ที่เพิ่มขึ้น ยกเว้นบางส่วนของพืชทดลองที่มีน้ำหนักต่ำสุด กลับส่งเสริมการเจริญเติบโตของลำต้นไมยราบยักษ์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในส่วนของพืชดังกล่าวมีกลุ่มสารที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืช (Hormone-like Herbicides) โดยจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชในกรณีที่ใช้ปริมาณน้อย แต่หากใช้ปริมาณมากจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช เช่นเดียวกับ สาร 2, 4-D ที่ใช้เพิ่มจำนวนเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในทางกลับกันก็สามารถใช้เป็นสารกำจัดวัชพืชได้หากใช้ในปริมาณมาก โดยจะทำให้พืชมีการเจริญเติบโตผิดปกติ ใบและลำต้นบิดเป็นเกลียวหรือแตก ต้นแคระแกรน หรืออาจถึงตายได้ (กลุ่มวิจัยวัชพืช, 2560; พัชรียา, 2560) อีกทั้งสอดคล้องกับที่ อาทิตยาและคณะ (2552) รายงานว่าสารสกัดน้ำจากใบแห้งของลำตวน กระดังงาจีน และน้อยหน่า ในอัตราส่วนต่างๆ มีผลยับยั้งการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าหญ้าจรจบดอกเล็กและหญ้ารังนก ที่ระดับแตกต่างกัน เมื่ออัตราส่วนของใบแห้งต่อน้ำกลั่นสูงขึ้นการยับยั้งก็เพิ่มขึ้นด้วย แต่สารสกัดที่อัตราส่วนในระดับต่ำจะมีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นกล้า

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การแพร่กระจายของเอื้องชมพู (*Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross) Dandelion (*Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg.) และ False dandelion (*Hypochaeris radicata* L.) ในพื้นที่เกษตรที่สูงภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบการแพร่กระจายของพืชดังกล่าวบริเวณพื้นที่ทำการศูนย์พัฒนาโครงการหลวงขุนวาง จังหวัดเชียงใหม่ และพบเฉพาะ Dandelion บริเวณพื้นที่ทำการอุทยานแห่งชาติขุนสถาน และสถานีวิจัยต้นน้ำขุนสถาน จังหวัดน่าน

เอื้องชมพูมีเมล็ดสีน้ำตาลถึงน้ำตาลดำ ทรงรูปไข่แคบ (narrow ovoid) ด้านข้างเป็นสันสามเหลี่ยม เป็นวัชพืชอายุข้ามปี เมล็ดสุกแก่ที่ระยะ 3-5 วันหลังจากดอกบาน สามารถผลิตเมล็ดได้ถึง 13,991 เมล็ดต่อต้น เมล็ดสามารถงอกในดินได้ 44 เปอร์เซ็นต์ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้นพบว่า ลำต้นและใบ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนไมยราบยักษ์ได้ โดยใบแห้ง 0.5 กรัม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและลำต้นได้ดีที่สุดอยู่ 90.4 และ 46.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Dandelion มีเมล็ดสีน้ำตาลอ่อน รูปขอบขนาน (oblong) มีขนสั้นนุ่มปกคลุมผิวเมล็ด และมีแพปพิสสีขาว ยาว 0.4-0.5 เซนติเมตร ติดอยู่ที่ปลายสุดของเมล็ด ช่วยพองให้เมล็ดปลิวไปตามลมได้ไกล จัดเป็นวัชพืชอายุข้ามปี เมล็ดสุกแก่ที่ระยะประมาณ 5 วันหลังจากดอกบาน สามารถผลิตเมล็ดได้ถึง 6,488 เมล็ดต่อต้น เมล็ดสามารถงอกในดินได้ 53 เปอร์เซ็นต์ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้นพบว่า ราก ลำต้น ใบ และช่อดอก สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนไมยราบยักษ์ได้ โดยใบแห้ง 0.5 กรัม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและลำต้นได้ดีที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์

False Dandelion มีเมล็ดสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม รูปขอบขนานแคบ (narrow oblong) ผิวเป็นร่องคล้ายตาข่ายขนาดเล็กตามยาว และมีแพปพิสคล้ายขนนก สีขาว ยาว 0.8-1.0 เซนติเมตร ติดอยู่ที่ปลายสุดของเมล็ด ช่วยพองให้เมล็ดปลิวไปตามลมได้ไกล จัดเป็นวัชพืชอายุข้ามปี เมล็ดสุกแก่ที่ระยะประมาณ 7 วันหลังจากดอกบาน สามารถผลิตเมล็ดได้ถึง 15,787 เมล็ดต่อต้น เมล็ดสามารถงอกในดินได้ 86 เปอร์เซ็นต์ คุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้น พบว่า ราก ลำต้น ใบ และช่อดอก สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นอ่อนไมยราบยักษ์ได้ โดยใบแห้ง 0.5 กรัม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและลำต้นได้ดีที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์

การกำจัดเอื้องชมพู Dandelion และ False dandelion ควรกำจัดก่อนที่พืชจะออกดอกหรือสร้างเมล็ด เพื่อไม่ให้มีการเพิ่มเมล็ดลงไปบนดิน หากกำจัดด้วยวิธีตัด ถาก หรือขุด ควรที่จะทำลายส่วนที่อยู่ใต้ดิน เนื่องจากวัชพืชดังกล่าวเป็นวัชพืชอายุข้ามปี สามารถขยายพันธุ์โดยใช้ลำต้นที่อยู่ใต้ดิน หรือการใช้สารกำจัดวัชพืชควรเป็นสารประเภทดูดซึม เพื่อที่จะเคลื่อนย้ายไปทำลายส่วนที่อยู่ใต้ดินได้

เอื้องชมพู Dandelion และ False dandelion จัดเป็นวัชพืชอายุข้ามปี สามารถสร้างหน่วยขยายพันธุ์ได้ทั้งจากเมล็ดและส่วนของลำต้น ดังนั้นควรศึกษาการเจริญเติบโต การออกดอกและสร้างเมล็ด ในระยะเวลาเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 1 – 2 ปี เพื่อให้ทราบถึงการเจริญเติบโตในแต่ละฤดูกาลและความสามารถในการผลิตเมล็ดที่แท้จริง

การศึกษาคุณสมบัติทางอัลลิโลพาธิเบื้องต้น พบว่าทุกส่วนของเอื้องชมพู Dandelion และ False dandelion ที่ใช้ทดลองสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและลำต้นของไมยราบยักษ์ได้ ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิดและปริมาณของสารยับยั้งการเจริญเติบโตที่มีอยู่ภายในพืชดังกล่าว รวมทั้งศึกษาแนวทางที่จะนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมา ของกลุ่มวิจัยวัชพืช ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยวัชพืช 2560. “การจำแนก และการจัดการวัชพืชในพืชเศรษฐกิจ”. เอกสารประกอบการฝึกอบรม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ
- จรรย์ญา ปิ่นสุภา วิไล อินทรเจริญสุข อุษณีย์ จินตาทกุล เทอดพงษ์ มหาวงศ์ ธัญชนก จงรักไทย และ เอกรัตน์ ธนุทอง. 2561. ชีววิทยาของวัชพืช *Asystasia gangetica* (L.) T. Anderson. หน้า 487-498 ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2561 เล่มที่ 1. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- พูนพิภพ เกษมทรัพย์. 2549. *ชีววิทยา 2*. พิมพ์ครั้งที่ 2. โครงการตำราวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ มูลนิธิ สอวน. บริษัทด้านสุทธนาการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ.
- พัชรียา บุญกอบแก้ว. 2560. *สารควบคุมการเจริญเติบโตในพืชสวน*. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัทสหมิตรพรินต์ติ้งแอนด์พับลิชซิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.
- ศิริพร ซึ่งสนธิพร. 2558. นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ กรมวิชาการเกษตร. *สัมภาษณ์*. 18 พฤษภาคม 2558.
- ศิริพร ซึ่งสนธิพร ปิยนันท์ พวงจันทร์ อ้นศยา สุริยะวงศ์ตระการ และธัญชนก จงรักไทย. 2558. *ชีววิทยา นิเวศวิทยา และการแพร่กระจายของวัชพืชสกุล Boerhavia L.* หน้า 2,485-2,506. ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2558 เล่มที่ 4. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- อาทิตยา นุราฤทธิ์ กรองแก้ว พุทธิยาสถาพร และ เฉลิมชัย วงศ์วัฒน์. 2552. ผลของสารสกัดจากใบพืชในวงศ์ Annonaceae 3 ชนิด ต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าหญ้าขจรจบดอกเล็กและหญ้าร้างนก. *ว. ศรีนครินทร์วิโรฒ*. 25: 115-131.
- อ้นศยา สุริยะวงศ์ตระการ ศิริพร ซึ่งสนธิพร ธัญชนก จงรักไทย และกาญจนา พฤษพันธ์. 2557. ศึกษาชนิดวัชพืชต่างถิ่นในพื้นที่เกษตรที่สูงภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ. ใน *รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2557 เล่ม 3*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 2103-2112.
- Anderson, W.P. 1999. *Perennial Weeds: Characteristics and Identification of Selected Herbaceous Species*. Iowa State University Press. 228 p.
- Hourdajian, D. 2006. *Introduced Species Summary Project Dandelion (Taraxacum officinale)*. Invasion Biology Introduced Species Summary Project – Columbia University. (Online). Available. http://www.columbia.edu/itc/cerc/danoff-urg/invasion_bio/inv_spp_summ/Taraxum_officinale.htm (February 03, 2020).
- Kantachot, C. and P. Chantaranonthai. 2011. Achene morphology of *Polygonum s.l.* (Polygonaceae) in Thailand. *Tropical Natural History* 11(1) : 21-28.

- Plant Database. 2014. *Hypochoeris radicata* L. hairy cat's ear. United States Department of Agriculture, Natural Resources Conservation Service. (Online). Available. <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=HYRA3#>. (February 03, 2020).
- Villaseñor R., JL and G. Espinosa FJ, 1998. *Catalog weeds Mexico*. National Autonomous University of Mexico. National Advisory Council on Plant Health. Fondo de Cultura Economica. Mexico, D.F.
- Washington State Noxious Weed Control Board. 2010. *Weed Detail Page: Common Catsear Hypochoeris radicata*. (Online). Available. <http://www.nwcb.wa.gov/detail.asp?weed=76>. (April 6, 2020).
- Zhang, Z.P. and Hirota, S. (Eds). 2000. *Chinese Colored Weed Illustrated Book*. Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, P.R. China, and the Japan Association for Advancement of Phyto-Regulators.

Table 1 Survey location of 3 Alien Plants Species (Pink-head knotweed, Dandelion and False Dandelion) in Highland agriculture

Region	Province	Present	Absent	Location
North	Phetchabun		✓	Outside the Agricultural Area
	Chiang Mai	✓		
	Chiang Rai		✓	
	Mae Hong Son		✓	
	Lampang		✓	
	Tak		✓	
	Lamphun		✓	
	Nan	✓		
	Uttaradit		✓	
Northeastern	Loei		✓	
	Khon Kaen		✓	

Table 2 Size and Weight of Pink-head knotweed Dandelion and False Dandelion

Plants	Width (mm)*	Length (mm)*	Weight 100 seeds (g)
Pink-head knotweed (<i>Persicaria capitata</i> (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross)			
minimum	0.76	0.91	0.0417
maximum	1.12	2.00	0.0509
mean	0.95 ±0.08	1.84 ±0.14	0.0476 ±0.0031
mode	0.91	1.91	-
Dandelion (<i>Taraxacum officinale</i> G. H. Weber ex Wigg.)			
minimum	0.62	3.19	0.0278
maximum	0.86	4.03	0.0411
mean	0.71 ±0.05	3.60 ±0.21	0.0348 ±0.0050
mode	0.73	3.67	-
False Dandelion (<i>Hypochaeris radicata</i> L.)			
minimum	0.53	4.62	0.0799
maximum	0.79	6.65	0.0875
mean	0.66 ±0.05	5.65 ±0.48	0.0847 ±0.0041
mode	0.68	5.79	-

* Width and Length average from 100 seeds

Table 3 The branch length of *Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross (centimeter)

Treatments	Number of months					
	1	2	3	4	5	6
1 plant/plot	3.1 a ^{1/}	6.5 a	8.7 a	15.5 a	18.7 a	22.0 a
3 plant/plot	2.1 a	4.1 a	6.0 a	11.3 a	15.6 a	16.2 b
5 plant/plot	2.3 a	4.4 a	5.8 a	9.9 a	14.2 a	14.9 b
C.V. (%)	35.7	39.3	27.8	37.3	21.1	19.0

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 4 Number of leaves of *Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross (leaves per tree)

Treatments	Number of months					
	1	2	3	4	5	6
1 plant/plot	5.0 a	8.4 a	19.4 a	68.7 a	127.1 a	148.5 a
3 plant/plot	4.3 a	6.7 a	16.1 a	59.4 a	106.8 ab	125.6 ab
5 plant/plot	4.4 a	6.3 a	16.1 a	36.0 a	82.8 b	89.0 b
C.V. (%)	18.2	40.4	38.7	38.5	26.2	23.3

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 5 The canopy of *Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg. (centimeter)

Treatments	Number of months				
	1	2	3	4	5
1 plant/plot	2.3 a ^{1/}	7.3 a	11.2 a	29.4 a	36.0 a
3 plant/plot	3.5 a	6.9 a	13.4 a	27.4 a	29.6 a
5 plant/plot	4.0 a	6.7 a	13.1 a	26.4 a	29.3 a
C.V. (%)	58.5	31.1	33.2	16.7	28.0

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 6 Number of leaves of *Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg. (leaves per tree)

Treatments	Number of months				
	1	2	3	4	5
1 plant/plot	4.6 a ^{1/}	9.8 a	21.3 a	44.8 a	54.0 a
3 plant/plot	3.8 a	7.2 ab	19.2 a	35.1 a	45.9 ab
5 plant/plot	3.5 a	5.4 b	15.5 b	31.8 a	41.4 b
C.V. (%)	32.2	25.3	12.7	26.5	28.4

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 7 the canopy of *Hypochaeris radicata* L. (centimeter)

Treatments	Number of months					
	1	2	3	4	5	6
1 plant/plot	10.6 a ^{1/}	24.2 a	29.5 a	74.5 a	78.1 a	82.3 a
3 plant/plot	10.9 a	21.4 a	24.4 b	58.1 b	62.2 b	66.4 b
5 plant/plot	10.2 a	20.7 a	25.3 ab	58.6 b	61.3 b	66.2 b
C.V. (%)	40.7	13.2	13.1	10.5	9.2	10.9

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 8 Number of leaves of *Hypochaeris radicata* L. (leaves per tree)

Treatments	Number of months					
	1	2	3	4	5	6
1 plant/plot	3.0 a ^{1/}	14.4 a	23.4 a	55.0 a	68.4 a	83.0 a
3 plant/plot	1.9 a	9.4 a	20.5 a	46.8 a	66.8 a	74.8 a
5 plant/plot	3.2 a	10.3 a	20.4 a	52.9 a	67.4 a	74.4 a
C.V. (%)	62.3	32.8	14.8	23.6	10.6	11.5

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 9 Number of inflorescences and seeds of *Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross

Treatments	Inflorescences	Seeds (seed/tree)	
	(inflorescence/tree)	Developed seeds	Undeveloped seeds
1 plant/plot	131 a ^{1/}	13,991 a	2,822 a
3 plant/plot	117 a	9,860 ab	1,797 a
5 plant/plot	76 a	4,911 b	1,733 a
C.V. (%)	44.4	62.3	51.2

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 10 Number of inflorescences and seeds of *Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg

Treatments	Inflorescences	Seeds (seed/tree)	
	(inflorescence/tree)	Developed seeds	Undeveloped seeds
1 plant/plot	27 a ^{1/}	6,488 a	272 a
3 plant/plot	19 ab	4,088 a	411 a
5 plant/plot	18 b	3,819 a	319 a
C.V. (%)	25.7	41.4	56.4

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 11 Number of inflorescences and seeds of *Hypochaeris radicata* L.

Treatments	Inflorescences	Seeds (seed/tree)	
	(inflorescence/tree)	Developed seeds	Undeveloped seeds
1 plant/plot	228 a ^{1/}	15,787 a	2,420 a
3 plant/plot	189 a	11,341 a	1,658 a
5 plant/plot	168 a	10,688 a	1,623 a
C.V. (%)	46.5	18.2	37.0

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 12 Inhibitory effect of *Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross on *M. Pigra* growth

<i>P. capitata</i> (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross	Concentration (g)	Inhibition (%)	
		Root length	Shoot height
Stem	0	0.0 d ^{1/}	0.0 c
	0.01	28.5 c	14.8 b
	0.05	62.1 b	16.2 b
	0.1	77.6 ab	19.8 ab
	0.5	86.9 a	30.6 a
	C.V. (%)	15.2	10.0
Leaves	0	0.0 d	0.0 b
	0.01	38.4 c	-10.9 c
	0.05	79.3 b	-8.6 bc
	0.1	82.9 b	-5.3 bc
	0.5	90.4 a	46.2 a
	C.V. (%)	6.68	181.6

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 13 Inhibitory effect of *Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg. on *M. Pigra* growth

<i>T. officinale</i> G. H. Weber ex Wigg.	Concentration (g)	Inhibition (%)	
		Root length	Shoot height
Root	0	0.0 d ^{1/}	0.0 c
	0.01	33.6 c	10.3 c
	0.05	65.7 b	27.4 b
	0.1	82.4 ab	48.0 a
	0.5	88.3 a	71.3 a
	C.V. (%)	19.3	17.0
Stem	0	0.0 d	0.0 b
	0.01	23.8 c	4.8 b
	0.05	57.8 b	18.9 b
	0.1	76.7 ab	26.7 ab
	0.5	85.2 a	52.7 a
	C.V. (%)	23.1	63.6
Leaves	0	0.0 e	0.0 d
	0.01	31.0 d	-11.3 e
	0.05	74.8 c	18.8 c
	0.1	86.4 b	46.4 b
	0.5	100.0 a	100.0 a
	C.V. (%)	8.11	25.4
Inflorescence	0	0.0 b	0.0 c
	0.01	18.8 b	-20.9 c
	0.05	62.2 a	6.6 b
	0.1	80.8 a	17.4 ab
	0.5	84.2 a	39.7 a
	C.V. (%)	23.8	156.8

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 14 Inhibitory effect of *Hypochoeris radicata* L. on *M. Pigra* growth

<i>H. radicata</i> L.	Concentration (g)	Inhibition (%)	
		Root length	Shoot height
Root	0	0.0 b ^{1/}	0.0 c
	0.01	15.1 b	15.8 b
	0.05	70.3 a	22.6 ab
	0.1	83.0 a	34.5 ab
	0.5	87.3 a	49.7 a
	C.V. (%)	21.0	54.9
Stem	0	0.0 d	0.0 b
	0.01	48.0 c	17.8 b
	0.05	66.8 b	19.8 b
	0.1	81.0 a	33.7 b
	0.5	87.3 a	52.5 a
	C.V. (%)	8.5	36.1
Leaves	0	0.0 d	0.0 d
	0.01	37.3 c	0.1 d
	0.05	76.9 b	12.5 c
	0.1	83.4 b	34.9 b
	0.5	100.0 a	100.0 a
	C.V. (%)	16.0	28.4
Inflorescence	0	0.0 b	0.0 b
	0.01	36.9 b	-1.0 b
	0.05	61.5 a	7.8 b
	0.1	80.2 a	22.6 ab
	0.5	84.0 a	46.5 a
	C.V. (%)	22.7	88.6

^{1/}Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

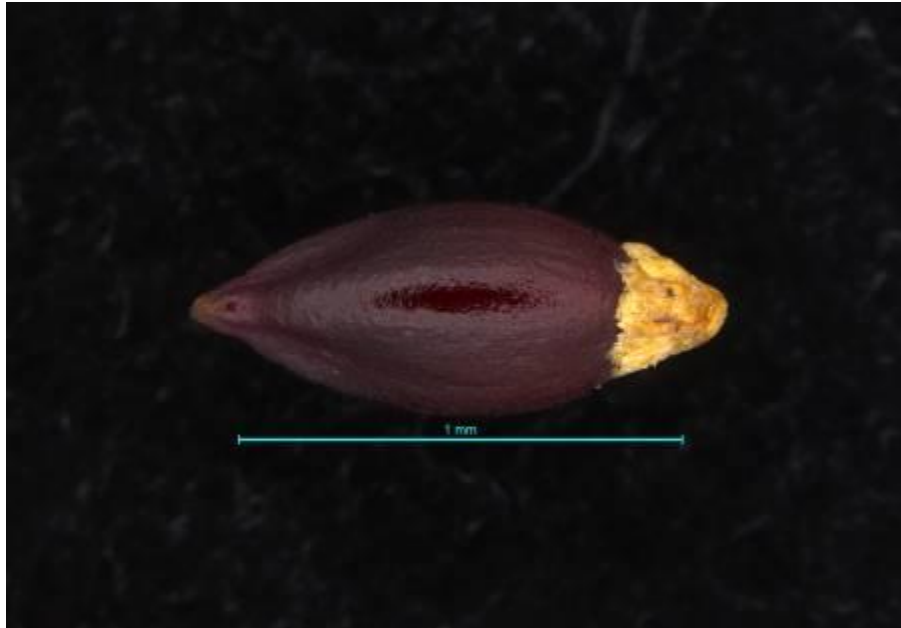


Figure 1 Seed of *Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross

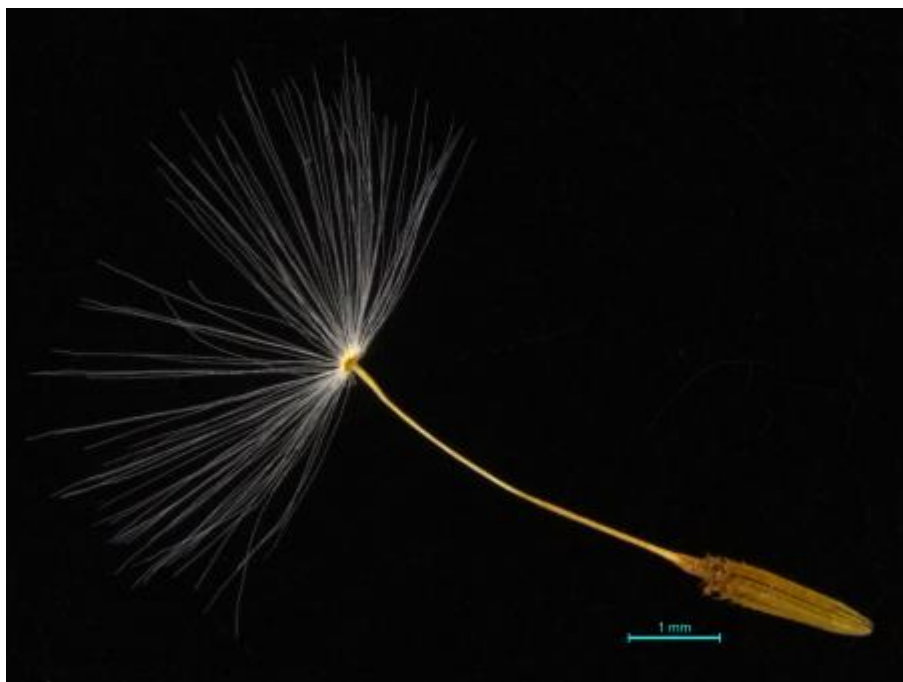


Figure 2 Seed of *Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg.

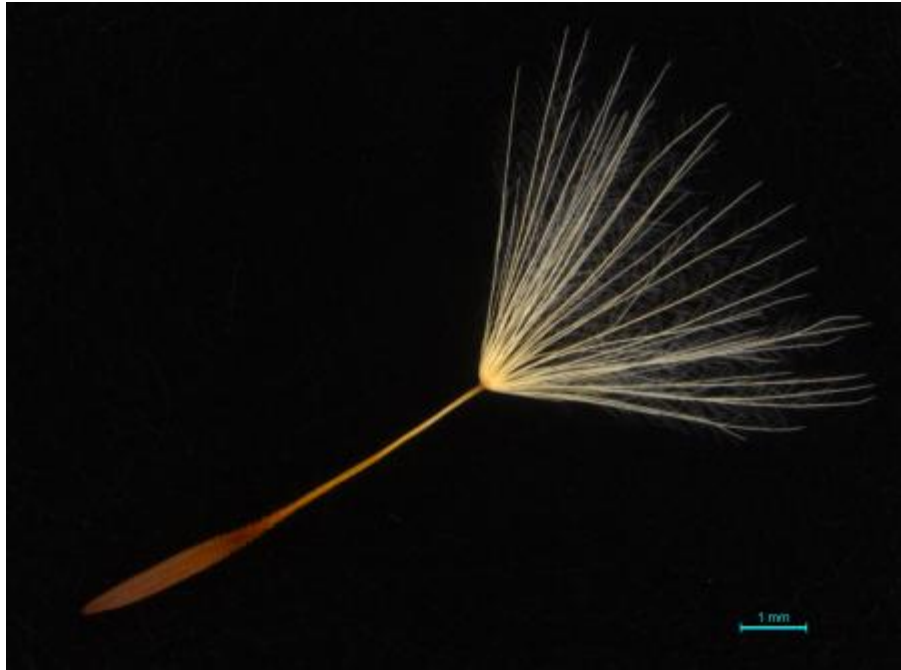


Figure 3 Seed of *Hypochaeris radicata* L.

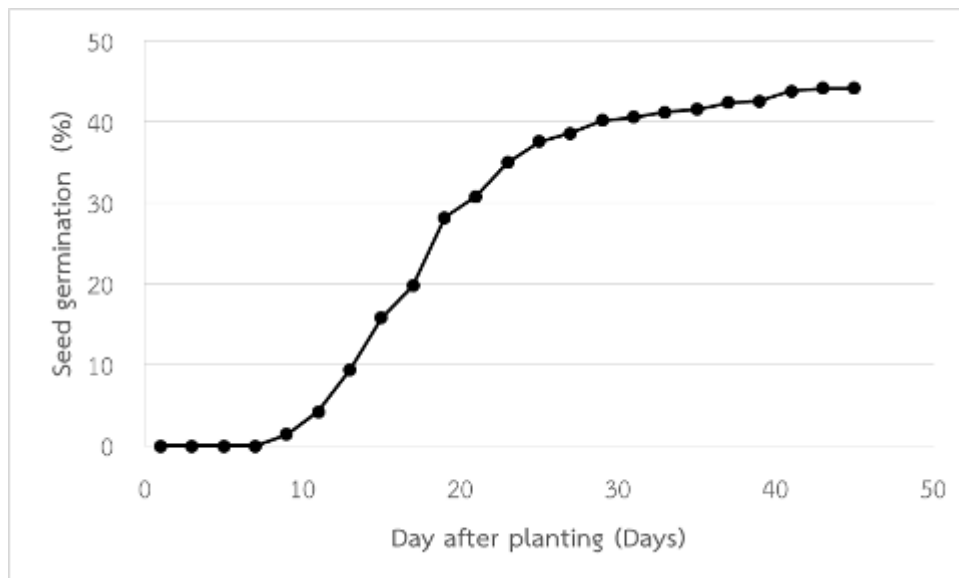


Figure 4 Seed germination of *Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross in net house

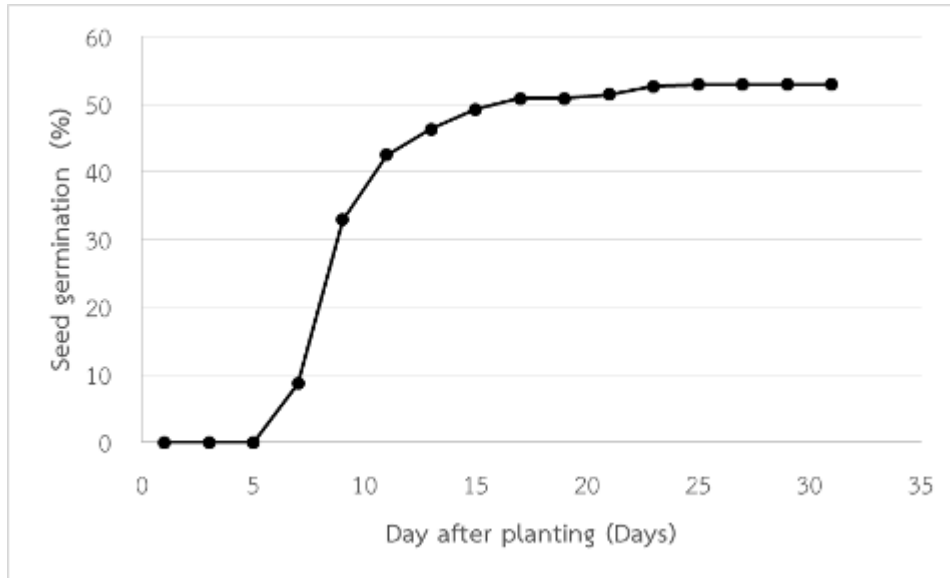


Figure 5 Seed germination of *Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg. in net house

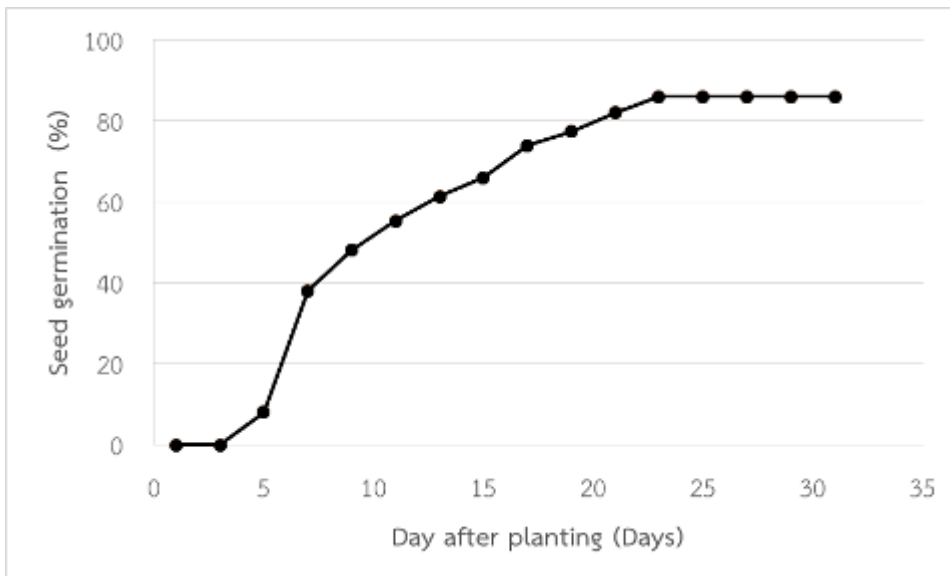


Figure 6 Seed germination of *Hypochaeris radicata* L. in net house

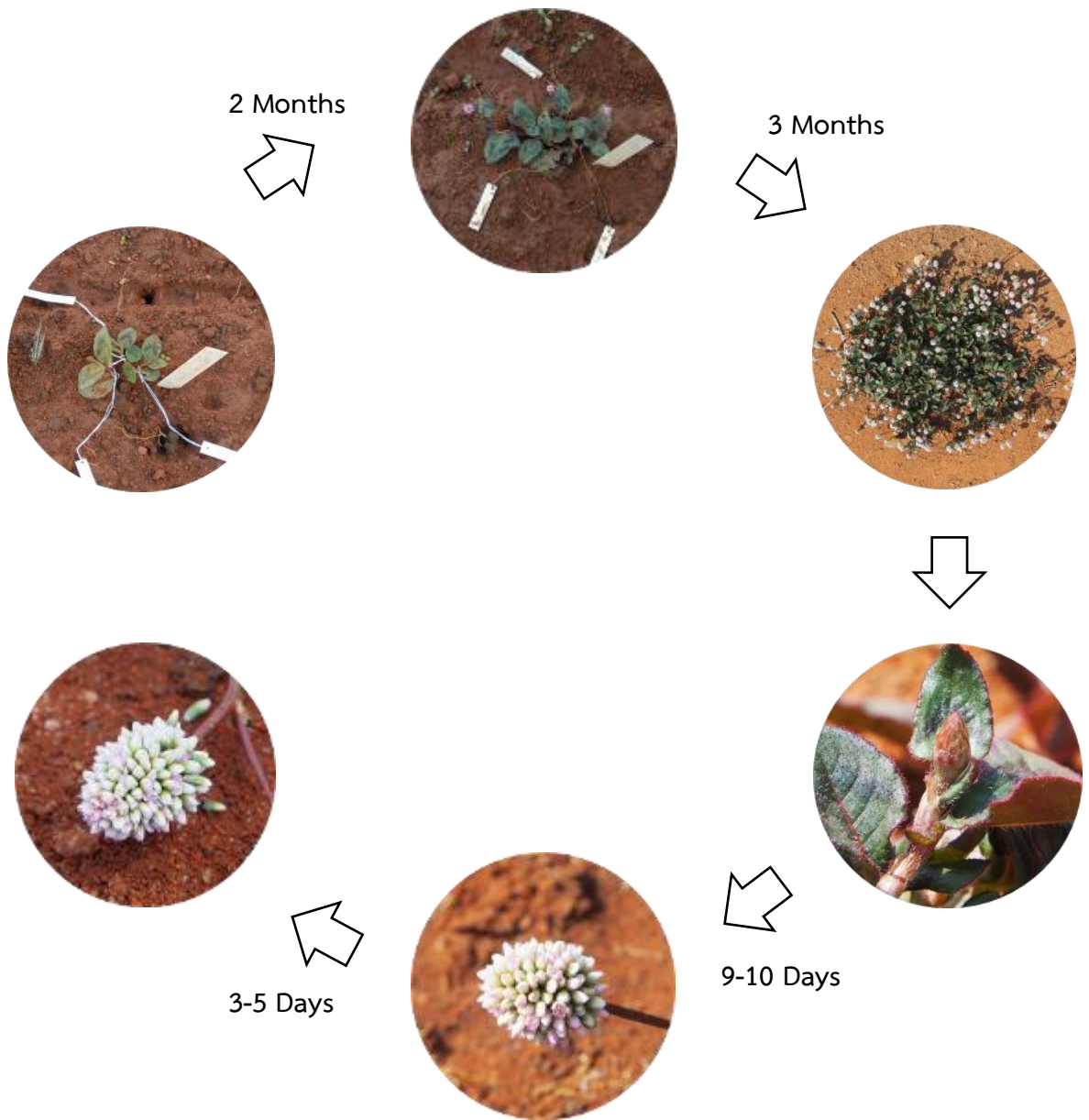


Figure 7 Growth cycle of *Persicaria capitata* (Buch.-Ham. ex D.Don) H.Gross



Figure 8 Growth cycle of *Taraxacum officinale* G. H. Weber ex Wigg.



Figure 9 Growth cycle of *Hypochaeris radicata* L.

การจัดการวัชพืชประเภทใบกว้าง : หญ้ายางนงนุช (*Euphorbia graminea* Jacq.)
 หญ้ายอดหนอน (*Spigelia anthelmia* L.) และเอื้องชมพู (*Persicaria capitata*
 (Buch.- Ham. ex D.Don)

Broadleaf Weed Management: *Euphorbia graminea* Jacq., *Spigelia anthelmia* L. and *Persicaria capitata* (Buch.- Ham. ex D.Don)

ธัญชนก จงรักไทย
 กลุ่มวิจัยวัชพืช

อัญศยา พรพมา
 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เอกรัตน์ ธนุทอง

รายงานความก้าวหน้า

การจัดการหญ้ายอดหนอน หญ้ายางนงนุช และเอื้องชมพู โดยใช้วัสดุคลุมดิน และอุณหภูมิตำการทดลองระหว่าง ตุลาคม 2551 - กันยายน 2562 โดยการใช้วัสดุคลุมดิน ได้แก่ พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤาษี เปรียบเทียบกับการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน พบการงอกของหญ้ายอดหนอนทุกกรรมวิธี โดยการใช้พลาสติกคลุมแปลง และใบและต้นธูปฤาษี สามารถควบคุมการงอกของหญ้ายอดหนอนได้ดีที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 2.3 - 25.8 เปอร์เซ็นต์ หญ้ายางนงนุช การใช้พลาสติกคลุมแปลง สามารถควบคุมการงอกได้ดีที่สุด โดยไม่พบการงอกของหญ้ายางนงนุช แตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ และเอื้องชมพู การใช้พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤาษี พบการงอกน้อยที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 0.0-3.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการอบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชทั้งสามชนิด โดยใช้อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช หญ้ายอดหนอน และหญ้ายางนงนุช ทุกกรรมวิธีที่อบวัสดุปลูกและเมล็ด 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

คำหลัก : การงอกของเมล็ด วัสดุคลุมดิน หญ้ายางนงนุช หญ้ายอดหนอน อุณหภูมิ เอื้องชมพู

รหัสการทดลอง 03-27-60-01-00-06-61

คำนำ

หญ้ายางนงนุช (*Euphorbia graminea* Jacq.) หญ้ายอดหนอน (*Spigelia antheimia* L.) และเอื้องชมพู (*Persicaria capitata* (Buch.- Ham. ex D.Don) เป็นพืชต่างถิ่นที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย และสามารถสร้างหน่วยขยายพันธุ์ได้ โดยหญ้ายางนงนุชสามารถออกดอกได้ตลอดปี ทำให้สามารถสร้างเมล็ดและงอกเป็นต้นใหม่ได้เป็นจำนวนมากในแต่ละปี (ศิริพร, 2557) หญ้ายอดหนอน เป็นพืชฤดูเดียว แต่สามารถงอก และออกดอกได้ตลอดทั้งปี เช่นเดียวกับหญ้ายางนงนุช ส่วนเอื้องชมพู เจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศเย็น โดยเฉพาะทางเหนือของประเทศไทย (อัญญา และคณะ, 2558) ทั้งนี้ หญ้ายอดหนอน และเอื้องชมพู พบมีรายงานเป็นวัชพืชแล้วในต่างประเทศ (Mohamad *et al.*, 1987; CABI, 2012) และพบว่าเอื้องชมพูต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชหลายชนิด (Foo *et al.*, 2010)

การป้องกันกำจัดวัชพืชนั้นมีหลายวิธี โดยกลุ่มวิจัยวัชพืช (2555) รายงานว่า การควบคุมวัชพืชในการปลูกพืชอาจทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีอาจให้ผลการกำจัดวัชพืชได้มากน้อยต่างกันแล้วแต่ความเหมาะสมของสภาพพื้นที่และความพร้อมของผู้ปฏิบัติที่จะใช้วิธีการไหน หรืออาจนำเอาหลาย ๆ วิธีมาประยุกต์ใช้ร่วมกันตามความเหมาะสม วิธีการควบคุมวัชพืชอาจแยกได้เป็น 2 วิธี ดังนี้ วิธีการแรกคือ การควบคุมวัชพืชโดยไม่ใช้สารกำจัดวัชพืช เช่น การใช้วัสดุคลุมดินเพื่อสร้างสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการงอก และการเจริญเติบโตของวัชพืช ทำให้ลดปัญหาวัชพืชได้ เช่น เพ็ญศรี และจรัญ (2553) ได้ศึกษาวัสดุคลุมดินเพื่อกำจัดวัชพืชในกวางเครือขาวพบว่า น้ำหนักแห้งของวัชพืชแปลงที่กำจัดวัชพืชด้วยแรงงาน มีน้อยที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้พลาสติกสีดำเทา และแผ่นซีเมนต์ วิธีการที่สองคือ การควบคุมวัชพืชโดยใช้สารเคมี ซึ่งประกอบด้วย 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) กระบะสี่เหลี่ยมขนาด 30 x 30 นิ้ว
- 3) กระบะสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 30 นิ้ว
- 4) พลาสติกคลุมแปลง
- 5) ฟางข้าว
- 6) แกลบดิบ
- 7) แกลบเผา
- 8) ไบและต้นธูปฤาษี

9) ตู้อบ

10) 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 ใบและต้นรูปฤาษี

กรรมวิธีที่ 6 ไม่ใช้วัสดุคลุมดิน

เตรียมกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 30×30 นิ้ว ใส่ดินร่วนเป็นวัสดุปลูก จากนั้นหยอดเมล็ดหญ้ายางนางนุช 100 เมล็ดต่อกระบะแล้วทำการคลุมด้วยวัสดุต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 1 เดือน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความงอก (\%)} = (\text{จำนวนเมล็ดที่งอก} / \text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่หว่าน}) \times 100$$

สำหรับหญ้ายอดหนอน และเอื้องชมพู ทำการทดลองเช่นเดียวกับหญ้ายางนางนุช

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)

นำเมล็ดหญ้ายางนางนุชที่แก่ และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด ผสมในวัสดุปลูก 1 กิโลกรัม นำไปอบที่อุณหภูมิต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชที่อบเรียบร้อยแล้ว ใส่ในกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 10×30 นิ้ว รดน้ำเพื่อให้ความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 30 วัน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความงอก (\%)} = (\text{จำนวนเมล็ดที่งอก} / \text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่หว่าน}) \times 100$$

สำหรับหญ้ายอดหนอน และเอื้องชมพู ทำการทดลองเช่นเดียวกับหญ้ายางนางนุช

เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่าง ตุลาคม 2561 - กันยายน 2562 (ระยะเวลา 1 ปี) ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ด

หญ้ายอดหนอน บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่าการไม่ใช้วัสดุคลุมดินหญ้ายอดหนอนงอกในวันที่ 4 หลังหว่านเมล็ด ในขณะที่การใช้พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤาษี เมล็ดงอกในวันที่ 5 หลังหว่านเมล็ด และตลอดระยะเวลาที่บันทึกข้อมูล พบว่าการใช้แกลบดิบ และไม่ใช้วัสดุคลุมดิน มีการงอกของเมล็ดใกล้เคียงกัน และเมื่อครบ 30 วันหลังหว่านเมล็ด พบว่าการใช้พลาสติกคลุมแปลง และใบและต้นธูปฤาษี สามารถควบคุมการงอกได้ดีที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 2.3 - 25.8 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่า และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ฟางข้าว แกลบดิบ และไม่ใช้วัสดุคลุมดิน ในขณะที่การใช้ฟางข้าว และแกลบดิบ ควบคุมการงอกได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติจากการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 63.1 - 89.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

หญ้ายางนงนุช บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่าการใช้พลาสติกคลุมแปลง ไม่พบเมล็ดหญ้ายางนงนุชงอกตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง ส่วนการใช้ฟางข้าว พบเมล็ดงอกในวันที่ 7 หลังหว่านเมล็ด และการใช้แกลบดิบ แกลบเผา ใบและต้นธูปฤาษี และไม่ใช้วัสดุคลุมดิน พบเมล็ดงอกในวันที่ 5 หลังหว่านเมล็ด และตลอดระยะเวลาที่ทดลอง พบว่าการใช้แกลบดิบ และไม่ใช้วัสดุคลุมดิน มีการงอกของเมล็ดใกล้เคียงกัน และเมื่อครบ 30 วันหลังหว่านเมล็ด พบว่าการใช้พลาสติกคลุมแปลง สามารถควบคุมการงอกได้ดีที่สุด โดยไม่พบการงอกของหญ้ายางนงนุช แตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ ในขณะการใช้ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา ใบและต้นธูปฤาษี ควบคุมการงอกได้ไม่แตกต่างจากการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 31.4 - 52.7 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2)

เอื้องชมพู เนื่องจากเอื้องชมพูงอกและเจริญเติบโตค่อนข้างช้า จึงบันทึกข้อมูลเป็นเวลา 60 วัน พบว่าการใช้พลาสติกคลุมแปลง และฟางข้าว ไม่พบการงอกตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง ส่วนการใช้แกลบดิบ แกลบเผา ใบและต้นธูปฤาษี และการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน พบเมล็ดงอกในวันที่ 20, 23, 21 และ 7 หลังหว่านเมล็ด และการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน พบการงอกมากกว่าสองเมล็ดในวันที่ 8, 9, 10, 13 และ 15 วันหลังหว่านเมล็ด และหลังวันที่ 15 หลังหว่านเมล็ด พบว่าเมล็ดงอกน้อยกว่าสองเมล็ดเช่นเดียวกับการใช้พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤาษี และเมื่อครบ 60 วันหลังหว่านเมล็ด พบว่า การใช้พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤาษี พบการงอกน้อยที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 0.0-3.5 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน ที่มีความงอก 34.8 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 3)

จากผลการทดลอง พบว่า การใช้พลาสติกคลุมแปลงสามารถควบคุมการงอกของเมล็ดวัชพืชทั้งสามชนิดได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับ เพ็ญศรี และจรรย์ (2553) ที่รายงานว่า การศึกษาวัสดุคลุมดินเพื่อกำจัดวัชพืชในกวาวเครือขาว พบว่า น้ำหนักแห้งของวัชพืชแปลงที่กำจัดวัชพืชด้วยแรงงาน มีน้อยที่สุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้พลาสติกสีดำเทา และแผ่นซีวมวล

ผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดในวัสดุปลูก

หญ้ายอดหนอน บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน เป็นเวลา 30 วัน พบว่าทุกกรรมวิธีเมล็ดหญ้ายอดหนอนงอกในวันที่ 7 หลังหว่านเมล็ด และงอกใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง และเมื่อครบ 30 วันหลังหว่านเมล็ด พบว่าการอบวัสดุปลูก และเมล็ดหญ้ายอดหนอน ที่อุณหภูมิ 40,

50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีความงอกไม่แตกต่างกับการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดหญ้ายอดหนอน โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 32.0 - 49.3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 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 (ตารางที่ 2 และภาพที่ 5)

เอื้องชมพู เนื่องจากเอื้องชมพูงอก และเจริญเติบโตค่อนข้างช้า 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 (ตารางที่ 2 และภาพที่ 6)

จากผลการทดลอง การอบวัสดุปลูกและเมล็ดนาน 24 โมง พบว่าหญ้ายอดหนอน และหญ้ายางนงนุช ทุกกรรมวิธีไม่มีผลต่อการงอกของเมล็ด ในขณะที่ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส สามารถควบคุมการงอกของเมล็ดเอื้องชมพูได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมล็ดวัชพืชแต่ละชนิดทนต่อความร้อนได้แตกต่างกัน และระยะเวลาที่ใช้อบวัสดุปลูกและเมล็ดอาจยังไม่เพียงพอต่อการฆ่าเมล็ดวัชพืช อาจต้องใช้เวลาในการอบนานขึ้น เช่น Egley (1990) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอกและรอดชีวิตของเมล็ดวัชพืช 8 ชนิด พบว่าในดินแห้ง (ความชื้น 2%) เมล็ดมีความทนทานอุณหภูมิสูงได้ถึง 60 องศาเซลเซียส แต่ไม่เกิน 7 วัน ในขณะที่เมล็ดส่วนใหญ่ถูกฆ่าตายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส หลังจาก 7 วัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การใช้วัสดุคลุมดิน ได้แก่ พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤาษี เปรียบเทียบกับการไม่ใช้วัสดุคลุมดิน พบการงอกของหญ้ายอดหนอนทุกกรรมวิธี โดยการใช้พลาสติกคลุมแปลง และใบและต้นธูปฤาษี สามารถควบคุมการงอกของหญ้ายอดหนอนได้ดีที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 2.3 - 25.8 เปอร์เซ็นต์หญ้ายางนงนุช การใช้พลาสติกคลุมแปลง สามารถควบคุมการงอกได้ดีที่สุด โดยไม่พบการงอกของหญ้ายางนงนุช แตกต่างจากกรรมวิธีอื่นๆ และเอื้องชมพู การใช้พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา และใบและต้นธูปฤาษี พบการงอกน้อยที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 0.0-3.5 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองการใช้พลาสติกคลุมแปลงสามารถควบคุมการงอกของเมล็ดวัชพืชทั้งสามชนิดได้ดี นอกจากนี้ยังมีวัสดุคลุมดินอื่นๆ ที่สามารถใช้เป็นวัสดุคลุมดินได้ โดยเฉพาะใบและต้นธูปฤาษี แต่การใช้ต้องตัดในช่วงที่ยังไม่ออกดอก เพื่อป้องกันธูปฤาษีแพร่กระจายไปยังพื้นที่อื่น

การอบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชทั้งสามชนิด โดยใช้อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชหญ้ายอดหนอน และหญ้ายางนงนุช การ

อบวัสดุปลูกและเมล็ดที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีความงอกไม่แตกต่างกับการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ด โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 32.0 - 49.3 และ 7.6 - 18.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเอื้องชมพู การอบวัสดุปลูกและเมล็ดที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีความงอกน้อยสุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอกอยู่ระหว่าง 1.1 - 9.8 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองทุกกรรมวิธีที่อบวัสดุปลูกและเมล็ดหญ้ายอดหนอน และหญ้ายางนงนุช ไม่แตกต่างกับการไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช แสดงว่าอุณหภูมิและระยะเวลาที่อบดังกล่าวไม่ได้ผล ดังนั้นจึงควรใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น หรือใช้ระยะเวลาอบนานขึ้น ซึ่งจำเป็นต้องมีการทดลองต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมา ของกลุ่มวิจัยวัชพืช ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยวัชพืช. 2555. *คำแนะนำการควบคุมวัชพืช และการใช้สารกำจัดวัชพืชปี 2554*. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. 144 หน้า.
- เพ็ญศรี นันทสมสรายุ และจรัญ ดิษฐไชยวงศ์. 2553. *ศึกษาวัชตุดคลุมดินที่มีผลต่อการควบคุมวัชพืชในกวางเครือขาว*. ผลงานวิจัยและพัฒนา ปี 2553. คลังผลงานวิจัย กรมวิชาการเกษตร.
- ศิริพร ชิงสนธิพร. 2557. *เฝ้าระวังพืชต่างถิ่นที่รุกราน: กกกระจุกและหญ้ายางนงนุช*. เอกสารแจก (แผ่นพับ) เปิดบ้านงานวิจัยวิชาการเกษตร ระหว่างวันที่ 29 - 31 พฤษภาคม 2557. กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- อัญศยา สุริยะวงศ์ตระการ 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*. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/116446> (10 July 2014).
- Egley, G. H. 1990. High-Temperature Effects on Germination and Survival of Weed Seeds in Soil. *Weed Science*. Vol. 38, No. 4/5. 429-435p.
- 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 Gembong Tjitrosoepomo. 1987. *Weeds of rice in Indonesia*. BALAI PUSTAKA. Jakarta Pusat, Indonesia. 716p.

Table 1 Effect of mulching materials on seed germination in *Spigelia anthermia*, *Euphorbia gramineae* and *Persicaria 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

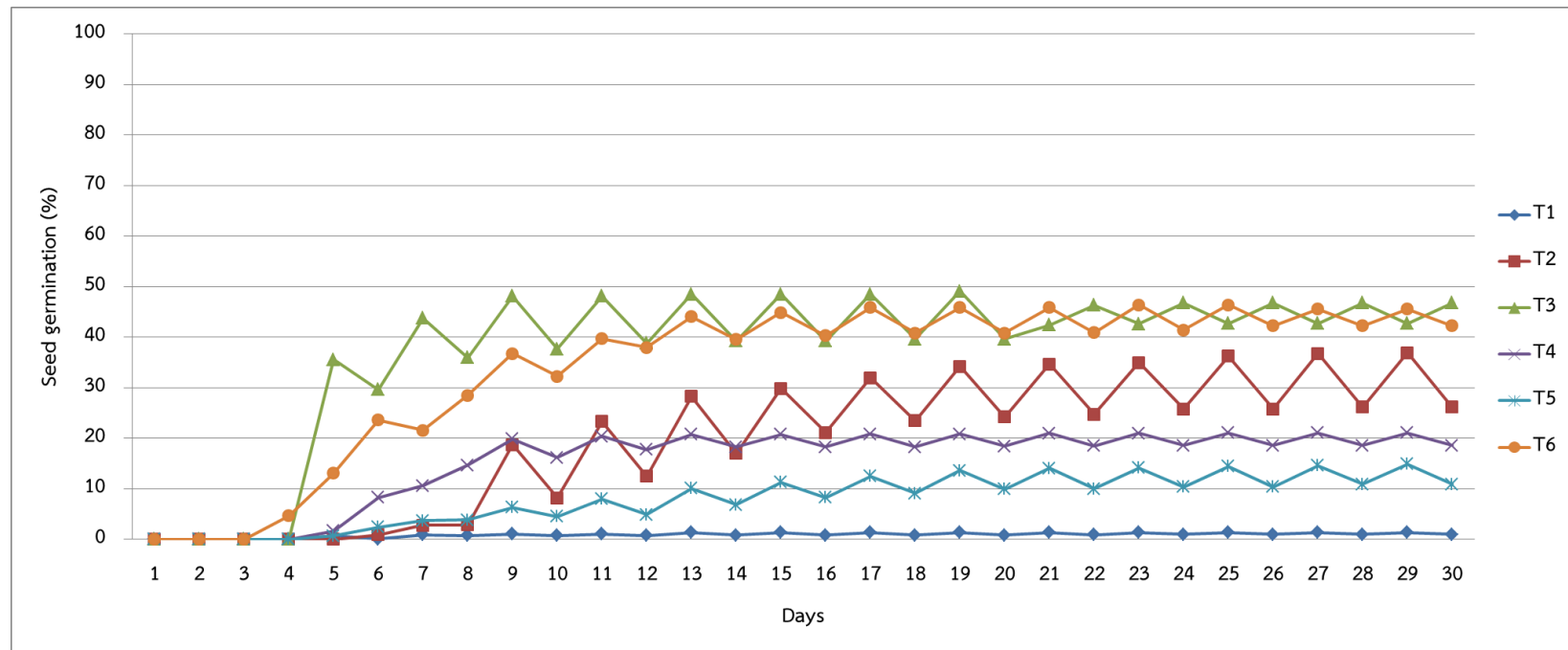
^{1/}Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by HSD

Table 2 Effect of temperature on seed germination in *Spigelia anthermia*, *Euphorbia gramineae* and *Persicaria 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

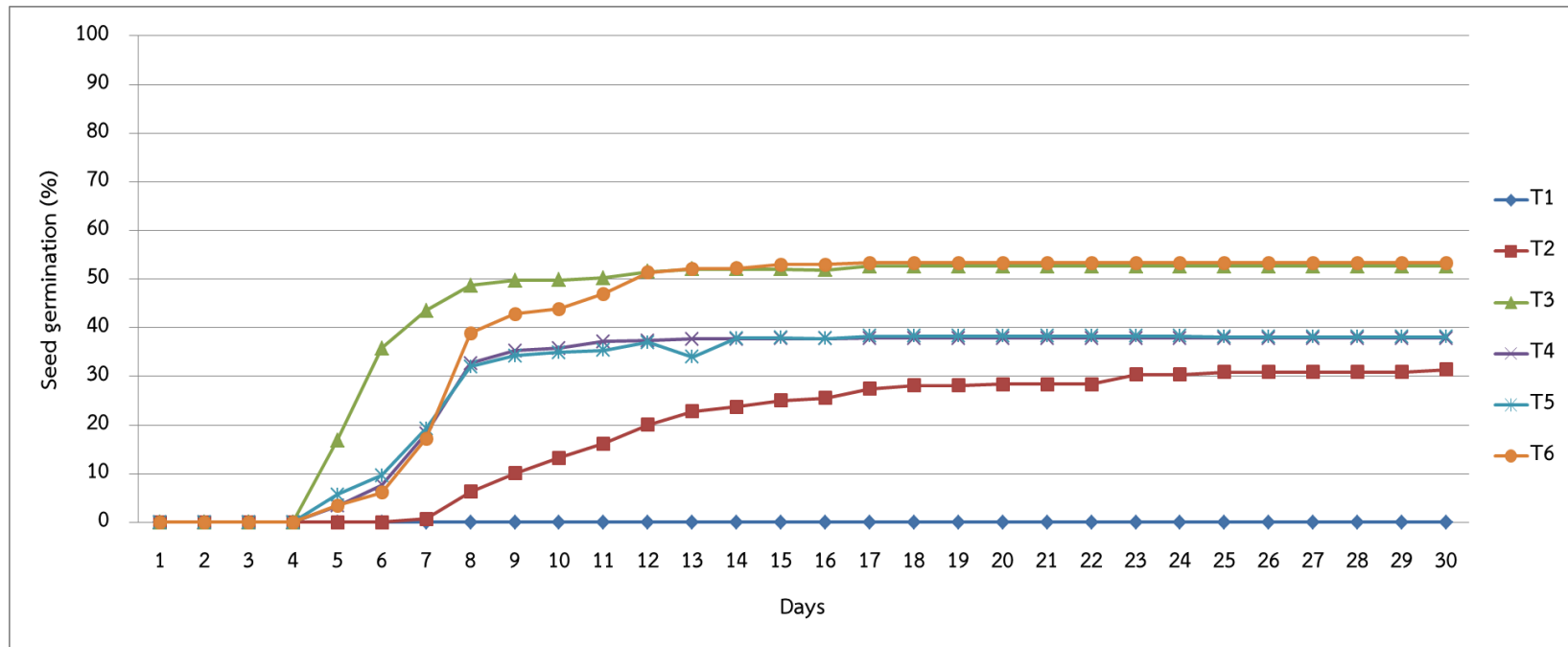
^{1/}Means followed by a different letter are significantly different at 5% level by HSD

^{ns}Average are not significantly different at 5% level by ANOVA



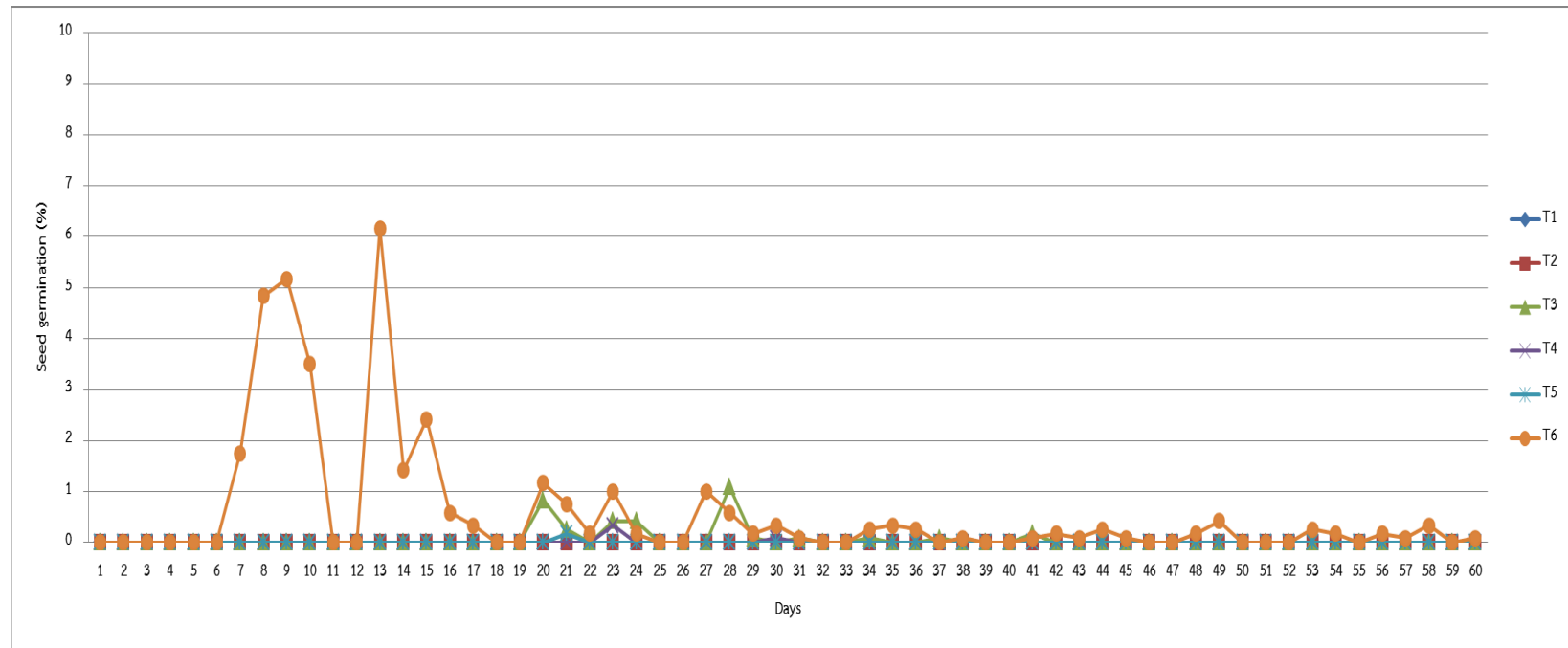
Note T1 = Mulching Film, T2 = Straw, T3 = Rice Husk, T4 = Rice Husk Ash, T5 = Cat-tail, T6 = Control

Figure 1 Effect of mulching materials on seed germination in *Spigelia antheimia*



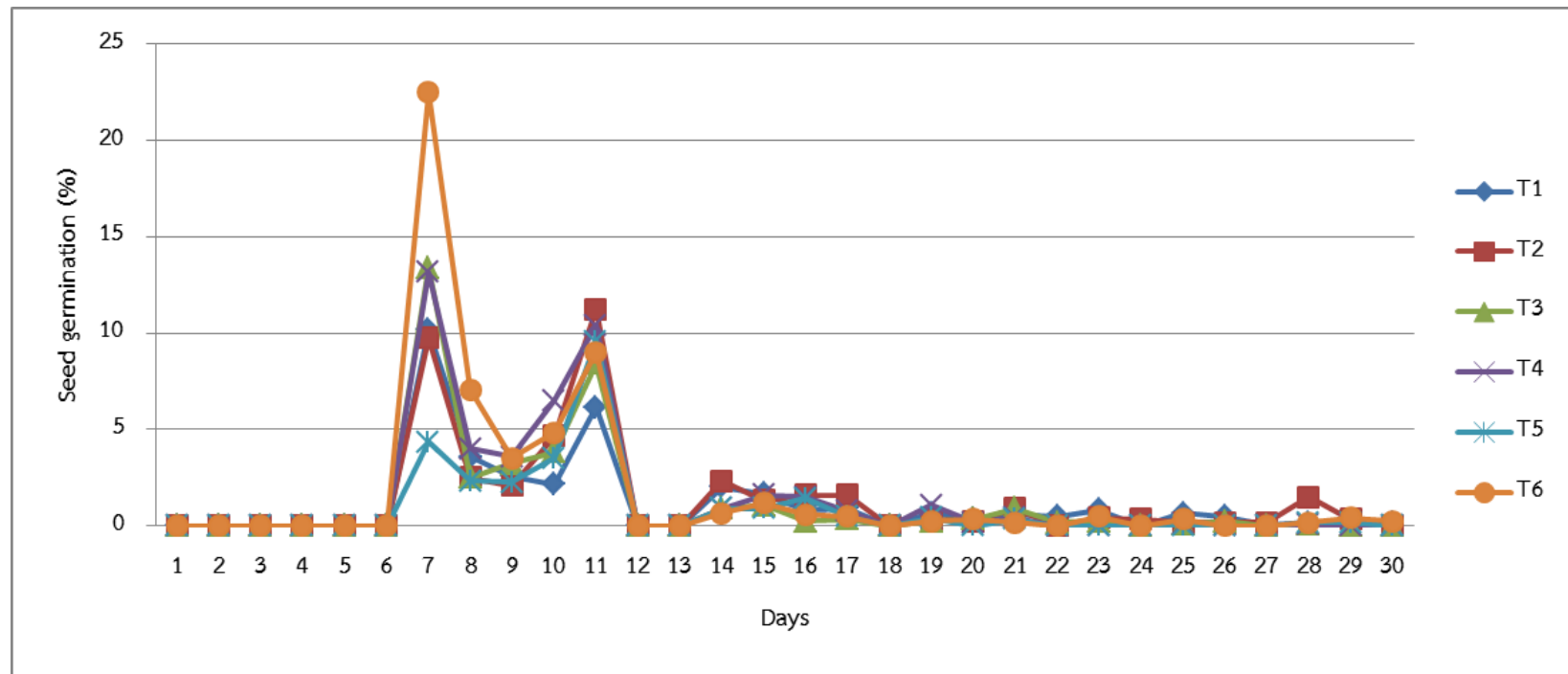
Note T1 = Mulching Film, T2 = Straw, T3 = Rice Husk, T4 = Rice Husk Ash, T5 = Cat-tail, T6 = Control

Figure 2 Effect of mulching materials on seed germination in *Euphorbia gramineae*



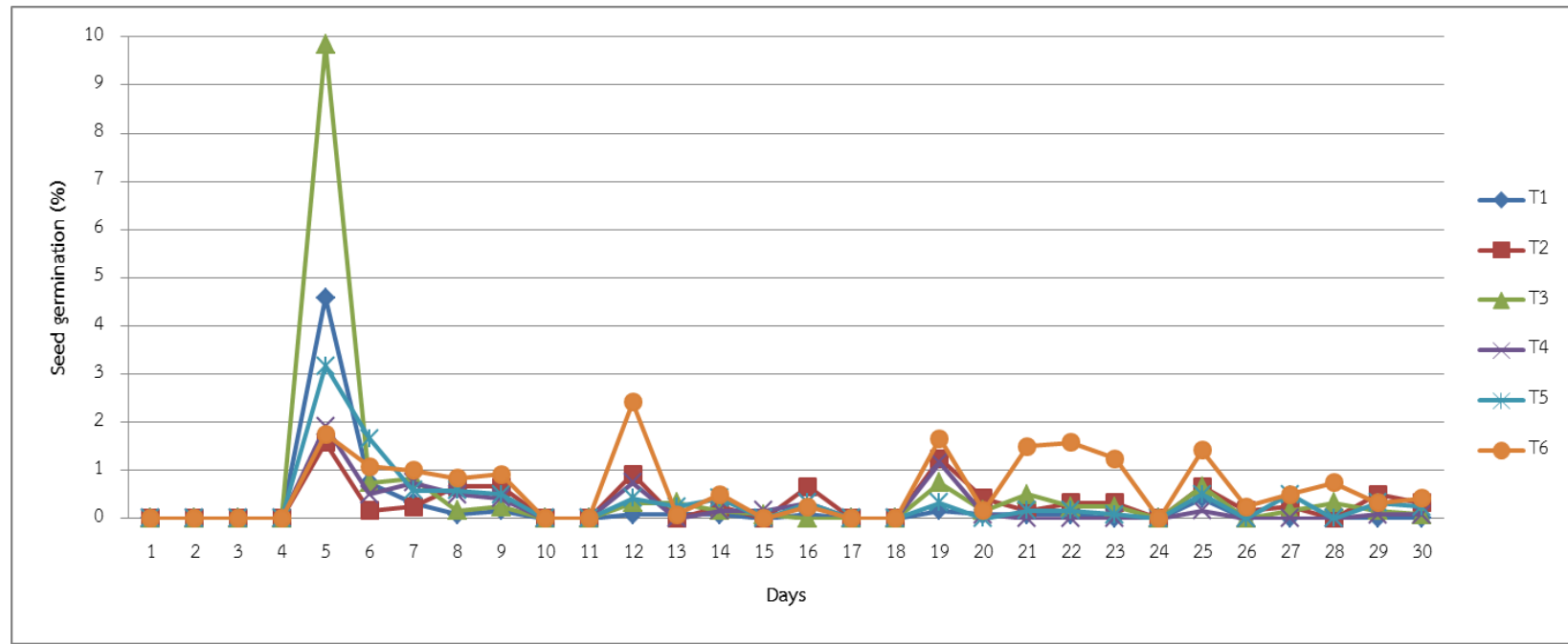
Note T1 = Mulching Film, T2 = Straw, T3 = Rice Husk, T4 = Rice Husk Ash, T5 = Cat-tail, T6 = Control

Figure 3 Effect of mulching materials on seed germination in *Persicaria capitata*



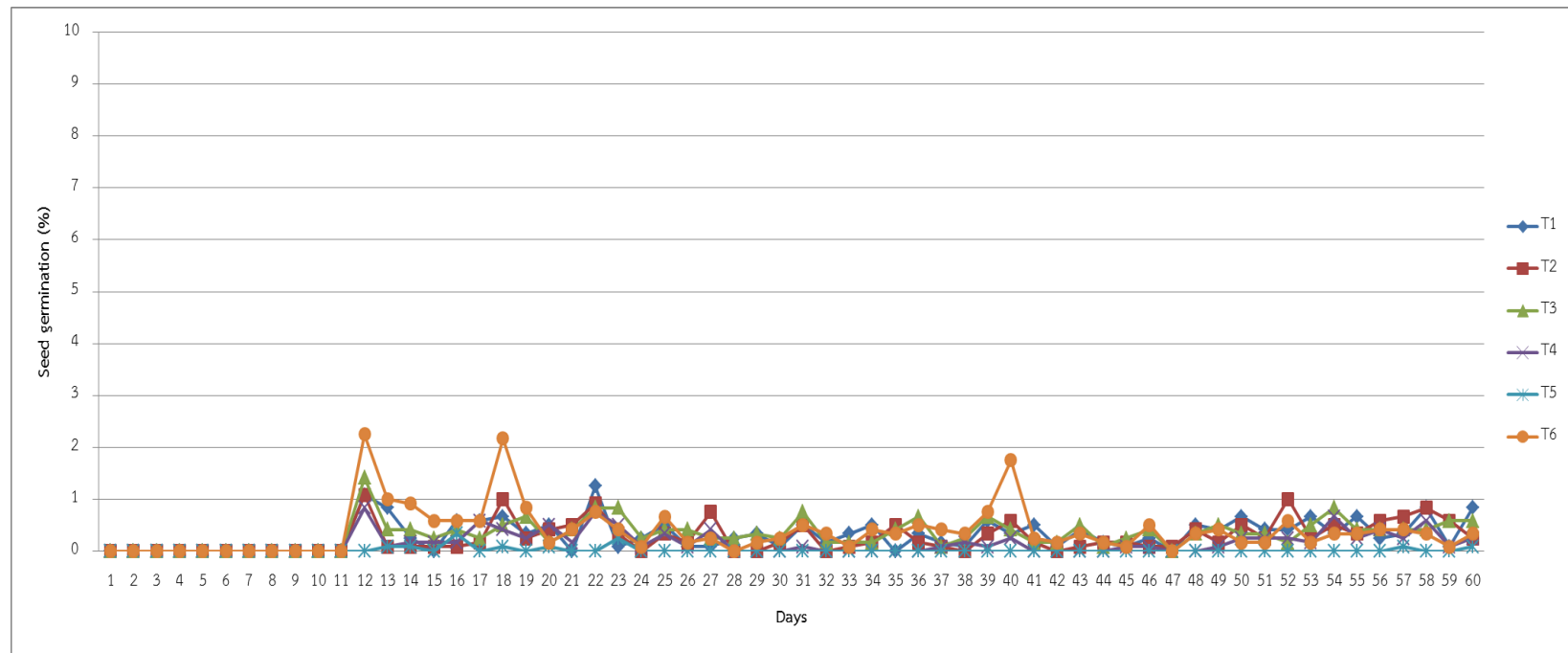
Note T1 = 40 °C, T2 = 50 °C, T3 = 60 °C, T4 = 70 °C, T5 = 80 °C, T6 = 0 °C

Figure 4 Effect of temperature on seed germination in *Spigelia 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 *Euphorbia graminea*



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 *Persicaria capitata*

การจัดการกกกระจุก (*Cyperus entriarianus* Boeckl.)
Deep-Rooted Sedge (*Cyperus entriarianus* Boeckl.) Management

เอกรัตน์ รัตนทอง รัชชนก จงรักไทย อัญศยา พรพมา จริญญา ปิ่นสุภา
กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การจัดการกกกระจุก (*Cyperus entriarianus* Boeckl.) โดยทำการศึกษามลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ดกกกระจุก พบว่า การใช้ฟางข้าว แกลบดิบ พลาสติกคลุมแปลง ใบและต้นธูปฤาษีสามารถควบคุมการงอกได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกกกระจุกสามารถงอกได้เพียง 0.05 0.05 0.00 และ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การใช้แกลบเผา กกกระจุกสามารถงอกได้ 0.94 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการไม่ใช้วัสดุคลุมดินที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 32.41 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษามลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดกกกระจุก พบว่ากรรมวิธีอบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 60 องศาเซลเซียส กกกระจุกสามารถงอกได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 3.70 3.95 5.00 6.95 6.42 และ 5.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำหลัก: พืชต่างถิ่น กกกระจุก การจัดการ

รหัสการทดลอง 03-27-60-01-00-00-07-62

คำนำ

วัชพืชร้ายแรงในแต่ละประเทศ มักเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศนั้นๆ และมักเป็นพืชต่างถิ่นที่ถูกชักนำเข้าไปในถิ่นใหม่ สามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ได้ดี เจริญเติบโตได้รวดเร็ว ขยายพันธุ์ได้ดี สร้างหน่วยขยายพันธุ์ได้มากในเวลารวดเร็ว และมักมีการพักตัวเมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม (Muenscher, 1980) ศิริพร และคณะ (2558) ได้ทำการสำรวจพบกที่ซึ่งไม่มีรายงานในประเทศไทย คือ กกกระจุก (*Cyperus entrianus* Boeckeler) ในพื้นที่ก่อสร้างในกรุงเทพมหานคร จากการสืบค้นมีรายงานว่า กกกระจุกเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้ พบในแถบตะวันออกเฉียงใต้ของสหรัฐอเมริกา รัฐ Texas, Louisiana, Florida, Georgia และจัดเป็นพืชที่รุกรานใน South Carolina (Invasive Plant Atlas of the United State, 2014) และ Texas (Gonzalez and DallaRosa, 2007) King *et al.* (2012) รายงานว่าในพื้นที่ที่มีกกกระจุกขึ้นปกคลุม โดยไม่มีพืชอื่นขึ้นร่วมด้วย พบว่าสามารถสร้างเมล็ดได้ถึง 1,300-3,100 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ หรือ 208-496 กิโลกรัมต่อไร่ และสามารถงอกได้ถึง 63-97 เปอร์เซ็นต์ Bryson and Carter (2012) รายงานว่ากกกระจุกแต่ละกอสามารถสร้างเมล็ดได้ 1,000,000-2,000,000 เมล็ดต่อปี หรือผลิตเมล็ดลงในดิน ได้ถึง 100,000-350,000 เมล็ดต่อตารางเมตร (Leck and Schutz, 2005) และจากการศึกษาชีววิทยาและการแพร่กระจายของกกกระจุก พบว่าในประเทศไทยพบการแพร่กระจายในพื้นที่ 2 จังหวัด คือ จังหวัดสมุทรปราการ และ นนทบุรี โดยกกกระจุกไม่สามารถงอกได้ในห้องปฏิบัติการ แต่งอกได้ในสภาพเรือนทดลองมีการงอก 32 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาการเจริญเติบโต และการสร้างเมล็ด พบว่ามีความสูงอยู่ระหว่าง 26.2 - 30.7 เซนติเมตร จำนวนหน่ออยู่ระหว่าง 9 - 14 หน่อต่อต้น ช่อดอกอ่อนอยู่ระหว่าง 1 - 2 ช่อต่อต้น ช่อดอกแก่อยู่ระหว่าง 1 - 4 ช่อต่อต้น จำนวนเมล็ดอยู่ระหว่าง 35,333 - 115,977 เมล็ดต่อต้น และมีวงจรชีวิต 72 วัน และการศึกษาคุณสมบัติทางอัลลีโลพาธิเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ พบว่า ราก ใบ ก้านช่อดอก และช่อดอกของกก กระจุก สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและลำต้นของไมยราบยักษ์ได้ โดยใบของกกกระจุก 0.5 กรัม สามารถยับยั้งการเจริญของลำต้นไมยราบยักษ์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (อัญญาและคณะ, 2561) จากการศึกษาชีววิทยาและการแพร่กระจายของกกกระจุกดังกล่าว ทำให้ทราบถึงการเจริญเติบโต ความสามารถในการขยายพันธุ์ การงอกของเมล็ด และคุณสมบัติการเป็นพืชที่รุกรานในประเทศไทย และการแพร่ระบาดของกกกระจุก หากแต่ยังขาดแนวทางการป้องกันและการจัดการกกกระจุก เพื่อให้ทราบถึงวิธีการจัดการต่างๆ ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการจัดการกกกระจุกในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ การใช้วัสดุคลุมดิน การใช้อุณหภูมิจากหมุ่ และการใช้สารกำจัดวัชพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กล้องถ่ายรูปแบบดิจิทัล
2. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)
3. กระบะสี่เหลี่ยมขนาด 30 x 30 นิ้ว และขนาด 10 x 30 นิ้ว
4. พลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา ใบและต้นธูปฤาษี
5. เมล็ดกกกระจุก
6. อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ดินปลูกและป้ายปัก สมุดบันทึก

วิธีการ

1. การเตรียมเมล็ดวัชพืช

เก็บตัวอย่างเมล็ดตกกระจุก นำไปทำความสะอาด เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ทดลอง

2. ผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ด

วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระบะ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พลาสติกคลุมแปลง

กรรมวิธีที่ 2 ฟางข้าว

กรรมวิธีที่ 3 แกลบดิบ

กรรมวิธีที่ 4 แกลบเผา

กรรมวิธีที่ 5 ใบและต้นธูปฤาษี

กรรมวิธีที่ 6 ไม่ใช้วัสดุคลุมดิน

เตรียมกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 30 x 30 นิ้ว ใส่ดินร่วนเป็นวัสดุปลูก จากนั้นหยอดเมล็ด 100 เมล็ดต่อกระบะ แล้วทำการคลุมด้วยวัสดุต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 1 เดือน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความงอก (\%)} = (\text{จำนวนเมล็ดที่งอก} / \text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่หว่าน}) \times 100$$

3. ผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดในวัสดุปลูก

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอกโดยอ้างอิงจากกรรมวิธีของ Ruth M.D. *et al*, 2007 โดยวางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCB) จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 3 กระบะ 6 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 3 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 4 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 5 อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 6 ไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช

นำเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์ จำนวน 100 เมล็ด ผสมในวัสดุปลูก 1 กิโลกรัม และนำไปอบที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ จากนั้นนำวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชที่อบเรียบร้อยแล้ว ใส่ในกระบะสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 30 นิ้ว กระบะละ 1 กิโลกรัม และรดน้ำเพื่อให้ความชื้น บันทึกจำนวนเมล็ดที่งอกทุกวัน จนเมล็ดงอกหมด แต่ไม่เกิน 30 วัน นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ความงอก โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{ความงอก (\%)} = (\text{จำนวนเมล็ดที่งอก} / \text{จำนวนเมล็ดทั้งหมดที่หว่าน}) \times 100$$

เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 – กันยายน 2562 (ระยะเวลา 1 ปี) ณ เรือนทดลอง กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเมล็ดวัชพืช

เก็บเมล็ดกกระจุกมาทำความสะอาด และคัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์ แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส เตรียมสำหรับนำไปใช้ในการทดลอง (Figure 1)

2. ผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ด

จากศึกษาผลของวัสดุคลุมดินต่อการงอกของเมล็ดกกระจุกตามกรรมวิธีที่กำหนด โดยคลุมด้วยพลาสติกคลุมแปลง ฟางข้าว แกลบดิบ แกลบเผา ใบ-ต้นธูปฤาษี และไม้ใช้วัสดุคลุมดิน (ชุดควบคุม) พบว่า การใช้ฟางข้าว แกลบดิบ พลาสติกคลุมแปลง ใบและต้นธูปฤาษี สามารถควบคุมการงอกได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกกระจุกสามารถงอกได้เพียง 0.05 0.05 0.00 และ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่การใช้แกลบเผา กกระจุกสามารถงอกได้ 0.94 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับการไม่ใช้วัสดุคลุมดินที่มีเปอร์เซ็นต์ความงอก 32.41 เปอร์เซ็นต์ (Table 1 and Figure 2)

3. ผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดในวัสดุปลูก

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการงอกของเมล็ดกกระจุกตามกรรมวิธีที่กำหนด โดยอบวัสดุปลูกและเมล็ดกกระจุก ที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 60 องศาเซลเซียส และไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช (ชุดควบคุม) พบว่ากรรมวิธีอบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืชที่อุณหภูมิต่างๆ กกระจุกสามารถงอกได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีไม่อบวัสดุปลูกและเมล็ดวัชพืช (ชุดควบคุม) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความงอก 3.70 3.95 5.00 6.95 6.42 และ 5.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความงอกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น (Table 2 and Figure 3)

เอกสารอ้างอิง

- ศิริพร ซึ่งสนธิพร ธัญชนก จงรักไทย อ้นศยา สุริยะวงศ์ตระกูล และกาญจนา พฤษพันธ์. 2558.ศึกษา ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และการจำแนกเมล็ดวัชพืชสกุลกก (*Cyperus* L.). ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2557 เล่ม 4. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- อ้นศยา พรมา ศิริพร ซึ่งสนธิพร ธัญชนก จงรักไทย เอกรัตน์ ธนทอง และกาญจนา พฤษพันธ์. 2558. ชีววิทยาและการแพร่กระจายของกกระจุก (*Cyperus entriarianus* Boeckl.). ใน : ผลงานวิจัยประจำปี 2561 เล่ม 1. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- Bryson, C.T. and R. Carter. 2012. Growth, Reproductive Potential, and Control Strategies for Deeproot Sedge (*Cyperus entriarianus*). *Weed Technology*. 26(1) : 122-129.
- Gonzalez L. and J. DallaRosa. 2007. *Cyperus entriarianus* Boeckl. (Deep-rooted sedge). (Online). Available. http://www.texasinvasives.org/plant_database/.php?symbol=CYEN2. (January 2, 2015).
- Invasive Plant Atlas of the United State. 2014. *Deeprooted sedge: Cyperus entriarianus*. Boeckl. (Online). Available. <http://www.invasiveplantatlas.org/subject.html?sub=10954#maps>. (January 2, 2015).

- King J.R., W.C. Conway, D.J.Rosen and B.P.Oswald. 2012. Seed biomass production and germination reates of *Cyperus entrerianus*. *Journal of the Torrey Botanical Seociety* 139(1) : 76-85.
- Leck, M. A. and W. Schutz. 2005. Regeneration of Cyperaceae, with particular reference to seed ecology and seed banks. *Plant Ecology and Evolutionary Systematics* 7:95–133.
- Muenschler, W. C. 1980. *Weeds*. 2nd edition. Cornell University Press, Ithaca and London.

Table 1 Effect of mulch on Deep-Rooted Sedge seed germination

Treatments	Seed germination (%)
Mulching Film	0.00 a ^{1/}
Rice Straw	0.05 a
Rice Husk	0.05 a
Rice Huck Charcoal	0.94 b
Leave and Leaf sheath of Bulrush	0.00 a
control	32.41 c
C.V. (%)	27.1

^{1/} Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 2 Effect of temperature on Deep-Rooted Sedge seed germination

Treatments	Seed germination (%)
Baking substrate media and seeds in temperature 40 °C	3.70 a ^{1/}
Baking substrate media and seeds in temperature 45 °C	3.95 a
Baking substrate media and seeds in temperature 50 °C	5.00 a
Baking substrate media and seeds in temperature 55 °C	6.95 a
Baking substrate media and seeds in temperature 60 °C	6.42 a
control	5.78 a
C.V. (%)	37.5

^{1/} Within a column means followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT



Figure 1 Seeds of Deep-Rooted Sedge



Figure 2 Effect of mulch on Deep-Rooted Sedge seed germination

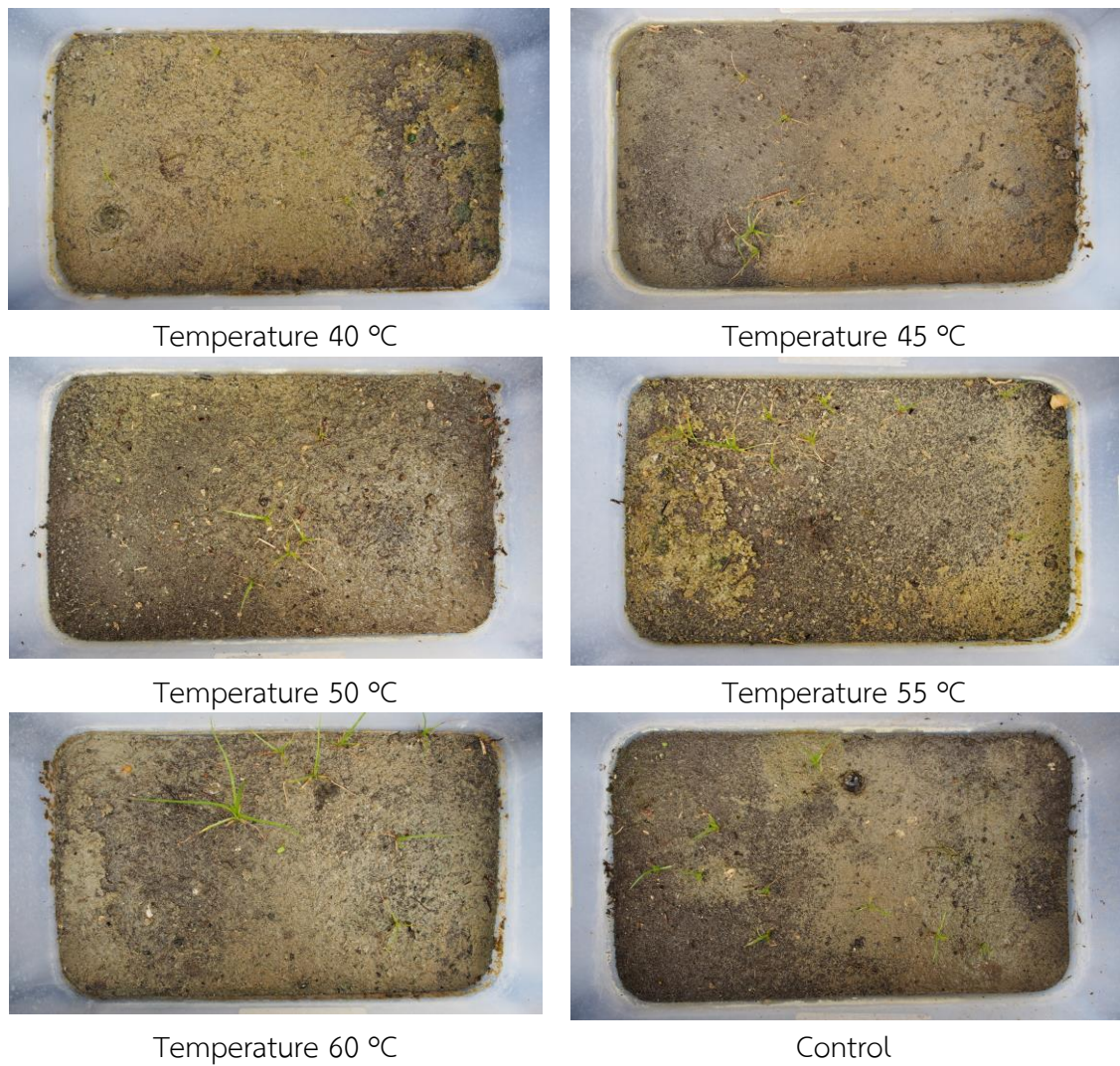


Figure 3 Effect of temperature on Deep-Rooted Sedge seed germination

ชีววิทยา และการจัดการมะเขือหนาม (*Solanum sisymbriifolium* Lam.)
Biology and Management of *Solanum sisymbriifolium* Lam.

อัญศยา พรพมา รัญชนก จงรักไทย เอกรัตน์ ธนุทอง
กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การสำรวจการแพร่กระจายของมะเขือหนาม (*Solanum sisymbriifolium*) ทำการทดลองระหว่าง ตุลาคม 2551 - กันยายน 2562 โดยสำรวจในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ทั้งหมด 32 แหล่ง ในพื้นที่ 13 จังหวัด ครอบคลุมพื้นที่ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก พบมะเขือหนามแพร่กระจายในภาคกลางเพียงจังหวัดเดียวคือ ตำบลชะอำ สามพระยา และไร่ใหม่พัฒนา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี โดยพบการแพร่กระจายเป็นระยะทางประมาณ 14 กิโลเมตร พื้นที่ประมาณ 65 ตารางกิโลเมตร

คำหลัก : การแพร่กระจาย ชีววิทยาและการจัดการ มะเขือหนาม วัชพืช

คำนำ

จากการสำรวจในจังหวัดเพชรบุรีพบพืชในวงศ์มะเขือหนึ่งชนิดที่แพร่กระจายในพื้นที่ว่างเปล่า และข้างถนน พื้นที่ประมาณ 2 ไร่ และพบต้นขนาดเล็ก ซึ่งคาดว่ามาจากเมล็ด 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 พบในประเทศ จีน 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 ยากต่อการตรวจสอบหรือมีขนาดใกล้เคียงกับเมล็ดพืชปลูก ทำให้แยกออกจากเมล็ดพันธุ์พืชปลูกได้ยาก (Muenscher, 1980) นอกจากนี้การแพร่กระจายของวัชพืชนั้น เมล็ดเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญแล้ว วัชพืชยังสามารถขยายพันธุ์จากส่วนอื่นๆ ได้ โดย พรชัย (2540) รายงานว่าในกรณีที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือส่วนของลำต้น และใบถูกกำจัดออกไป ไม่สามารถผลิตเมล็ดได้ วัชพืชสามารถพัฒนาส่วนของลำต้นให้ขยายพันธุ์ต่อไปได้ เช่น ไทล (stolon และ runner) เหง้า (rhizome) หัว (tuber) และ Bulb เนื่องจากมะเขือหนามสามารถสร้างเมล็ดได้เป็นจำนวนมาก รูปร่างและขนาดใกล้เคียงกับพืชวงศ์มะเขือ ดังนั้นโอกาสในการแพร่กระจายโดยเมล็ดจึงสูง นอกจากนี้จากการสังเกตเบื้องต้นพบว่ามะเขือหนามเป็นพืชอายุหลายปี ลำต้นมีเนื้อไม้ อาจจะขยายพันธุ์โดยลำต้นได้เช่นกัน ดังนั้นการศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของหญ้ามะเขือหนาม รวมถึงวิธีการจัดการ จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสนับสนุนการแจ้งเตือนเกษตรกร และเป็นข้อมูลประกอบการวางแผนป้องกันและกำจัดที่เหมาะสมต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องถ่ายรูปแบบดิจิทัล
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- เลนส์ขยาย 10 เท่า สำหรับการตรวจสอบเบื้องต้นในภาคสนาม
- กรรไกร มีด เสียม หรือพลั่ว สำหรับตัด/ขุด ตัวอย่างพืช
- ดินและกระถาง สำหรับปลูกพืชทดสอบในเรือนทดลอง
- แผงอัดตัวอย่างพรรณไม้พร้อมกระดาษฟูก ฟองน้ำและหนังสือพิมพ์ พร้อมเชือกใส่ตะเกียงและป้ายชื่อสำหรับผูกตัวอย่างพืช
- กระดาษติดตัวอย่างพืช พร้อมแฟ้มปก
- น้ำยาชุบตัวอย่างวัชพืช ประกอบด้วย ฟีนอล เมอคิวริกคลอไรด์ เอทิลแอลกอฮอล์
- การบูร

- เครื่องรับสัญญาณดาวเทียม เพื่อระบุพิกัด
- อุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น เช่น ถังพลาสติกขนาดต่างๆ กระจกพลาสติก กระดาษปูน และป้ายแสดงกรรมวิธี
- สมุดบันทึก

วิธีการ

ศึกษานิเวศวิทยา

1) สำรวจและเก็บตัวอย่างต้นและเมล็ดมะเขือหนาม โดยใช้วิธีแบบการสืบพบ (detection survey) ในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลพบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ สมุทรสงคราม สระบุรี สุพรรณบุรี ชลบุรี ระยอง ตรัง กาญจนบุรี และราชบุรี บันทึกสถานที่หรือพิกัดที่เก็บตัวอย่าง สภาพนิเวศ ชนิดพืชปลูกหลัก ลักษณะพืชเป้าหมาย การถูกทำลายโดยศัตรูธรรมชาติ วัน/เดือน/ปี ที่เก็บ แผลง และศัตรูธรรมชาติ ที่พบในพื้นที่ที่สำรวจ

2) การจัดทำตัวอย่างแห้ง นำตัวอย่างมะเขือหนามมาอัดในแผงพรรณไม้ ขนาดประมาณ 50 X 30 เซนติเมตร เมื่อแห้งแล้วติดลงบนกระดาษขาว ขนาด 45 x 30 เซนติเมตร พร้อมติดป้าย ระบุชื่อวัชพืช 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 พร้อมติดป้าย ระบุชื่อวัชพืช สถานที่เก็บตัวอย่าง นิเวศวิทยา พืชอาศัย วันและเวลา ชื่อผู้เก็บ โดยเก็บรักษาไว้ ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช

เวลาและสถานที่

ทำการทดลอง ระหว่าง ตุลาคม 2561 - กันยายน 2562 (ระยะเวลา 1 ปี) ณ กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ และพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

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 และตรัง และภาคตะวันตก 2 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี และราชบุรี พบมะเขือหนามแพร่กระจายในตำบลชะอำ สามพระยา และไร่ใหม่พัฒนา อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี โดยพบการแพร่กระจายเป็นระยะทางประมาณ 14 กิโลเมตร พื้นที่ประมาณ 65 ตารางกิโลเมตร (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจในพื้นที่การเกษตรและสิ่งแวดล้อม ทั้งหมด 32 แหล่ง ในพื้นที่ 13 จังหวัด ครอบคลุมพื้นที่ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก และภาคตะวันออก พบมะเขือหนามแพร่กระจายใน ภาคกลางเพียงจังหวัดเดียวคือ ตำบลชะอำ สามพระยา และไร่ใหม่พัฒนา อำเภอชะอำ จังหวัด เพชรบุรี โดยพบการแพร่กระจายเป็นระยะทางประมาณ 14 กิโลเมตร พื้นที่ประมาณ 65 ตาราง กิโลเมตร เนื่องจากแหล่งที่พบยังอยู่ในพื้นที่จังหวัดเดียว ดังนั้นหากมีวิธีการป้องกันกำจัดที่มี ประสิทธิภาพ จะช่วยป้องกันการแพร่กระจายไปยังพื้นที่อื่นๆ ได้ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ พนักงานราชการ และจ้างเหมาบริการ ของกลุ่มวิจัยวัชพืช ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- พรชัย เหลืองอากาศ. 2540. *วัชพืชศาสตร์*. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ริ้วเขียว. 585 หน้า.
- 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).
- 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://plant.s.usda.gov/core/profile?symbol=SOSI>. (June 22, 2015).

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	15.002323	101.322916	
	*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*.



Figure 1 *Solanum sisymbriifolium*; a) flower b) fruit and c) the *S. sisymbriifolium* tree

ชนิดของเพลี้ยอ่อน (Hemiptera: Aphididae) ที่เป็นพาหะของเชื้อ *Polerovirus*
 สาเหตุโรคเส้นใบเหลืองในพริกและใบเหลืองแตงกวา
 Species of Aphid (Hemiptera: Aphididae) Insect Vectors of the
Polerovirus causing agent of Pepper Vein Yellowing Disease and
 Cucumber Yellowing Disease

เกศสุตา สนศิริ^{1/} ภูวนารถ มณีโชติ^{2/} จารุวัฒน์ แต่กุล^{1/} ยิวรินทร์ บุญทบ^{1/}

^{1/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

พริก (*Capsicum* sp.) และแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ เนื่องจากคนนิยมบริโภคและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ แต่ในการผลิตพืชดังกล่าวมักประสบปัญหาและอุปสรรคเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูเข้าทำลาย ทำให้ผลผลิตและคุณภาพลดลง เพลี้ยอ่อน (Aphid) (Hemiptera: Aphididae) เป็นแมลงศัตรูสำคัญสามารถทำลายใบพืชโดยทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชบริเวณใต้ใบ หรือส่วนอ่อนๆทำให้ใบหงิกงอ ร่วงหล่น ต้นแคระแกรน นอกจากดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชแล้วเพลี้ยอ่อนยังเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช เนื่องจากมีปากแบบแทงดูด (piercing sucking) สามารถถ่ายทอดอนุภาคไวรัสไปยังเซลล์พืช โดยที่ไม่ทำให้เซลล์พืชเสียหายมากนัก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อทราบชนิดเพลี้ยอ่อนพาหะและชนิดของโรคพืช ความสัมพันธ์ของการถ่ายทอดโรคระหว่างชนิดของเพลี้ยอ่อนกับโรคพืชและพืชอาศัย โดยทำการศึกษาระหว่างเดือน ต.ค.60 – ก.ย. 62 โดยทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนศัตรูพริกและแตงกวา ลักษณะของใบพริก และแตงกวาที่แสดงอาการโรคเส้นใบเหลือง และโรคใบเหลืองในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดละ 5 แปลงรวม 150 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่ได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและ DNA Barcode เพื่อจัดจำแนกชนิด และนำใบพืชที่แสดงอาการโรคมาตรวจสอบเชื้อ *Polerovirus* (PeVYV) จากการจัดจำแนกชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและวิเคราะห์ DNA Barcode พบว่าเพลี้ยอ่อนที่สำรวจพบในพริกและแตงกวา ในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา นครราชสีมา และตาก เป็นเพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover และทำการตรวจสอบเชื้อ PeVYV ด้วยเทคนิค One Step RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสในกลุ่ม PeVYV ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ PeVYV แต่ละไอโซเลตหรือแต่ละสายพันธุ์ (strain) ที่พบมีรายงานในฐานข้อมูล GenBank อยู่ระหว่าง 6,125 – 6,244 นิวคลีโอ จากการศึกษาครั้งนี้ได้

คำหลัก : เพลี้ยอ่อน Aphididae โรค *Polerovirus*

รหัสสารทดลอง 03-47-61-01-00-00-02-61

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 5' (Untranslated region: UTR) ยีน P0 และบางส่วนของยีน P3 (coat protein: CP) ของเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต กรุงเทพมหานคร (BK) ไอโซเลตกาญจนบุรี (KR) และไอโซเลตสุพรรณบุรี (SB)

คำนำ

พริก (*Capsicum* sp.) และแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ เนื่องจากเป็นพืชอาหารที่คนนิยมบริโภคและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ สามารถสร้างอาชีพและรายได้จำนวนมากให้แก่เกษตรกร แต่ในการผลิตพืชดังกล่าวมักประสบปัญหาและอุปสรรคเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูเข้าทำลาย ทำให้ผลผลิตและคุณภาพลดลง ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด เป็นต้นทุนในการผลิต เพลี้ยอ่อน (Aphid) (Hemiptera: Aphididae) เป็นแมลงศัตรูสำคัญของทั้งพืชไร่และพืชผักหลายชนิด เช่น พริก พืชตระกูลแตง มันฝรั่ง และยาสูบ เป็นต้น ซึ่งสามารถทำลายใบพืชโดยทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชบริเวณใต้ใบ หรือส่วนอ่อนๆ เช่น ยอดอ่อน ตาอ่อน ใบ ดอก หลังการเข้าทำลายจะทำให้ใบหงิกงอ ร่วงหล่น ต้นแคระแกรน และขับถ่ายของเสียที่มีส่วนผสมของน้ำตาลที่เหลือใช้เรียกว่า มูลน้ำหวาน (honeydew) ซึ่งเป็นอาหารของมดและราดำ ราดำจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วปกคลุมใบ ใบจึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้อย่างเต็มที่ นอกจากนี้จะดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์พืชแล้วเพลี้ยอ่อนยังเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช เพลี้ยอ่อนที่พบในเขตร้อนและเขตอบอุ่นมีมากกว่า 200 ชนิด ที่เป็นพาหะนำเชื้อไวรัส (Brunt *et al.*, 1996; Nault 1997; พชรินทร์ 2555) เพลี้ยอ่อนจัดเป็นแมลงพาหะที่สำคัญเนื่องจากมีลักษณะเด่นคือ มีปากแบบแทงดูด (piercing sucking) สามารถถ่ายทอดอนุภาคไวรัสไปยังเซลล์พืช โดยที่ไม่ทำให้เซลล์พืชเสียหายมากนัก นอกจากนี้เพลี้ยอ่อนยังมีลักษณะเด่นที่ทำให้ประสิทธิภาพในการถ่ายทอดโรคไวรัสดีกว่าแมลงอื่น ๆ คือ เป็นแมลงที่สืบพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ ทำให้ประชากรเพลี้ยอ่อนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดการระบาดของเชื้อไวรัสเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาอันสั้น (พชรินทร์, 2555)

เชื้อไวรัสในกลุ่ม *Potyvirus* จะทำให้พืชอาการม้วนขึ้นเข้าหากันของขอบด้านข้าง สีซีดจาง โดยเฉพาะใบล่าง และกิ่งก้านใบมีการตั้งชูขึ้น ส่วนของแคระแกรน และอาจมีแผลเนื้อเยื่อตายแห้งตาย (necrosis) ในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารในส่วนของลำต้นและก้านใบ (Ryazantsev and Zavriev, 2009) การถ่ายทอดและการแพร่ระบาดของไวรัสชนิดนี้สามารถติดไปกับหัวพันธุ์ได้ ดังนั้นเมื่อนำหัวพันธุ์ที่เป็นโรคไปปลูกจะมีส่วนอย่างมากที่ทำให้ผลผลิตลดลง ซึ่งเชื้อนี้ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีสัมผัส แต่สามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงพาหะจำพวกเพลี้ยอ่อน แบบ persistent manner (Mayo *et al.* 2000) ซึ่งโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ไม่มีทางแก้ไขนอกจากการป้องกัน และวิธีการป้องกันกำจัดที่ได้ผลและมีประสิทธิภาพก็คือการป้องกันกำจัดแมลงพาหะที่จะนำเชื้อไวรัสมาปล่อยสู่พืช

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบชนิดของเพลี้ยอ่อนที่ระบาดในพื้นที่ปลูกพริกและแตงกวาของประเทศไทย และสามารถใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาชนิดของเพลี้ยอ่อนที่มีศักยภาพในการเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสมาสู่พริกและแตงกวา เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการพิจารณาหาแนวทางการ

ป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ รวมถึงการเฝ้าระวัง การพยากรณ์การระบาด ตลอดจนการวางแผนในการจัดการกรณีที่มีการตรวจพบการระบาดของเชื้อไวรัสในพริกและแตงกวาต่อไป

วิธีดำเนินการ

ปี 2561

1) ศึกษา DNA Barcode ของเพลี้ยอ่อนที่เป็นศัตรูในพริกและแตงกวา

เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อน แตงกวา พริก และพืชอาศัยอื่นๆ จากแปลงปลูกที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Polerovirus* ในแหล่งปลูกพริกและแตงกวา ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา และนครราชสีมา โดยทำการสำรวจ จำนวน 5 แปลงต่อจังหวัด ตัวอย่างที่ได้จากการสำรวจแบ่งตัวอย่างเป็น 3 ส่วน คือ

- ส่วนที่ 1 นำไปตรวจหาเชื้อ *Polerovirus*
- ส่วนที่ 2 นำไปศึกษาชนิดและ DNA barcode ของเพลี้ยอ่อน
- ส่วนที่ 3 นำไปศึกษาการถ่ายทอดโรคระหว่างเพลี้ยอ่อนกับเชื้อ *Polerovirus* และพืชอาศัยอื่น

พืชอาศัยอื่น

การบันทึกข้อมูล

- พืชอาหาร พันธุ์พืช อายุของพืช พิกัดภูมิศาสตร์ สถานที่ วันที่ ปริมาณการพบ ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง และปัจจัยแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น พืชปลูกข้างเคียง สภาพแวดล้อมทั้งในและนอกแปลง ฯลฯ

1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก

1) นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยที่สำรวจได้ บางส่วนมาทำสไลด์ถาวร โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Blackman and Eastop (2000)

2) นำสไลด์ที่ผ่านการอบจนแห้งมาตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะสำคัญต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกชนิดกับเอกสารแนวทางการวินิจฉัยเพลี้ยอ่อน ลักษณะสำคัญของเพลี้ยอ่อนที่ใช้ในการจำแนกชนิด ได้แก่ ส่วนหัว; ร่องหนวดและร่องบริเวณหน้าผาก ความสั้นยาวของหนวด จำนวนปล้องและความยาวส่วนปลายของปล้องสุดท้าย ความยาวของปาก ส่วนอก; ความยาวของปลายขาคู่หลังและหนามบนน่องขา ส่วนท้อง; จะมีตุ่มขนาดเล็กปรากฏบริเวณปล้องท้องปล้องที่ 1 และ 7 โดยเฉพาะปล้องที่ 7 ตำแหน่งของตุ่มขนาดเล็กที่ปรากฏอยู่ด้านบนหรือด้านล่างรูหายใจใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกระดับสกุล แต่ในเพลี้ยอ่อนบางชนิดไม่ปรากฏตุ่มดังกล่าว วาดรูปแสดงลักษณะต่างๆที่สำคัญ

3) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษา เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑน์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากล เพื่อตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

4) การบันทึกข้อมูล

- บันทึกรายละเอียดต่างๆ ของเพลี้ยอ่อนที่สำรวจพบ เช่น ลักษณะ รูปร่าง ขนาด สี ฯลฯ พร้อมทั้งถ่ายภาพเพลี้ยอ่อนในแต่ละระยะ รวมถึงบันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายที่ต้องติดไว้กับสไลด์เพลี้ยอ่อนแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ วัน/เดือน/ปี สถานที่จับ และ วัน/เดือน/ปีที่ทำสไลด์ถาวร ชื่อน้ำยาที่ใช้เมาท์ (mount) สไลด์

1.2 การศึกษาลำดับพันธุกรรมของเพ็ลี่ยอ่อน

1) นำตัวอย่างตัวเต็มวัยเพ็ลี่ยอ่อน ที่ได้จากการสำรวจ ดองไว้ในแอลกอฮอล์ 70-95% และเก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2) ทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) จำนวน 3 ตัวอย่าง/แปลง ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Cat No. BIO-52067) ดังวิธีการต่อไปนี้

- การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation): นำตัวเต็มวัยที่ไม่มีปีก 1 ตัว มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml

- เตรียมการสลายผนังเซลล์ (pre-lysis): โดยการเติม Lysis Buffer GL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Protinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ปิดหลอดให้สนิทพร้อมทั้งพันด้วยพาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 - 20 ชั่วโมง

- ทำการย่อยตัวอย่าง (Lyse sample): เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม Lysis Buffer G3 ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที และเขย่าให้สม่ำเสมอ

- เตรียมพร้อมในการจับสารพันธุกรรม (Adjust DNA binding conditions): เขย่าอย่างรวดเร็ว และเติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาณ 210 ไมโครลิตร และเขย่าให้สม่ำเสมอ

- ทำการจับสารพันธุกรรม (Bind DNA): ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน ISOLATE II Genomic DNA tube และตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน)

- ล้างตะกอน (Wash silica membrane): เติม Wash Buffer GW1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer GW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน

- ตกตะกอนสารพันธุกรรมให้แห้ง (Dry silica membrane): ตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ใน

หลอดทดลองขนาดเล็ก 1.5 ไมโครลิตร

- ละลายสารพันธุกรรม (Elute DNA): เติม Elution Buffer G ปริมาณ 50 ไมโครลิตร จากนั้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้ในวิธีการต่อไป

3) ทำการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน mtCOI ของเพ็ลี่ยอ่อน (Hebert *et al.*, 2003)

Primer	Sequence	Base
LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	25
HCO2198	5'-TAAACTTCAGGGTGCCAAAAAATCA-3'	25

โดยเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เป้าหมาย โดยใช้ส่วนผสมของ MyTag HS Red DNA Polymerase (Bioline, Australia) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Nuclease-free water	14.5	ไมโครลิตร
5x MyTaq Red Reaction Buffer	5	ไมโครลิตร
10 pmole LCO1490	1	ไมโครลิตร
10 pmole HCO2198	1	ไมโครลิตร
MyTaq HS Red DNA Polymerase	0.5	ไมโครลิตร
DNA template	3	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมของ MyTag HS Red DNA Polymerase ใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม (PCR machine) โดยใช้อุณหภูมิ และระยะเวลาดังนี้ Predenaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ, ตามด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 20 วินาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 วินาที, extension 72 °C เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที 4) ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) โดยหยอด PCR product ลงใน 2 % agarose gel ใน 0.5 X TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 45 นาที

5) ทำให้ PCR product มีความบริสุทธิ์ด้วย Isolate II PCR and Gel kit; Cat No. BIO-52060 ด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

- การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation): โดยการนำ PCR product มาเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ปริมาณ 30 ไมโครลิตร และเติม Binding Buffer CB

- ทำการจับสารพันธุกรรม (Bind DNA): ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน ISOLATE II PCR and GELColumn และตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่เร็ว 11,000x g เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งของเหลวที่เหลือ

จากการตกตะกอน

- ล้างตะกอน (Wash silica membrane): โดยการเติม Wash Buffer CW ปริมาณ 700 ไมโครลิตร และตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน (ทำซ้ำสองครั้ง)

- ตกตะกอนสารพันธุกรรมให้แห้ง (Dry silica membrane): ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก 1.5 ไมโครลิตร

- ละลายสารพันธุกรรม (Elute DNA): โดยการเติม Elution Buffer G ปริมาณ 15 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

11,000x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำ DNA ที่บริสุทธิ์ (Purified DNA) ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

6) ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) เพื่อตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยส่งตัวอย่างดีเอ็นเอเป้าหมายที่บริสุทธิ์ของเพลี้ยอ่อนไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ประเทศเกาหลีใต้

7) นำข้อมูลของดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับเบสเพลี้ยอ่อนที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) เพื่อให้ได้ DNA barcoding ที่มีความถูกต้อง โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดทาร์หัสดีเอ็นเอ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999).

8) บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ หรือที่เราเรียกว่า Barcode นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเพลี้ยอ่อนที่อยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้อง

ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) ในการศึกษาจะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช นอกจากนี้ยังสามารถนำ ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ ที่ได้มาศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมต่อได้อีก

2) ศึกษาวงจรชีวิตเพลี้ยอ่อนในพริกและแตงกวา

นำตัวเต็มวัยเพลี้ยอ่อนที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง มาเลี้ยงในกล่องเลี้ยงแมลงที่มีพืชอาหารบรรจุอยู่ ทำการแยกเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยชนิดไม่มีปีก ใส่ในกล่องพลาสติกกล่องละ 1 ตัว พร้อมพืชอาหาร ทำการตรวจสอบทุก 2 ชั่วโมง ทำการทดลอง 15 ซ้ำ สังเกตพฤติกรรมและระยะเวลาลอกคราบในแต้ว

การบันทึกข้อมูล

- ระยะตัวอ่อน
- ระยะตัวเต็มวัย
- พฤติกรรมในแต่ละระยะ

3) ศึกษาชนิดเชื้อ *Polerovirus* ในพริกและแตงกวาด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

สกัด DNA จากต้นพริกและแตงกวาที่ได้รับการถ่ายเชื้อ *Polerovirus* ด้วยปฏิกิริยา One step RT-PCR สังเคราะห์ชิ้น CP บางส่วนของเชื้อ *Polerovirus* จากอาร์เอ็นเอรวมที่เตรียมได้ โดยไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ชิ้น CP บางส่วนของเชื้อไวรัสในจีนัส *Polerovirus* ประกอบด้วยไพรเมอร์ Pol3870F (5'-YTVGGTTTYAAAGTCGAGG-3') (Sharman *et al.*, 2015) และไพรเมอร์ AS3 (5'CACGCGTGIACC TATTIGGRTTITG-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)

โดยทำปฏิกิริยา

ในการสังเคราะห์ดังนี้

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 Polerovirus ชนิดต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 6 (Tamura et al., 2013)

4) การบันทึกข้อมูล

บันทึกรายละเอียดของเพลี้ยอ่อน ส่วนของพืชที่พบตัวอย่าง ลักษณะการทำลาย ลักษณะอาการของพืชที่เป็นโรค วัน /เดือน /ปี สถานที่ พิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง รวมทั้งบันทึกโดยการถ่ายภาพ

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2560 - กันยายน 2562

สถานที่ - แหล่งปลูกพริกและแตงกวา ในจังหวัด สุพรรณบุรี กาญจนบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และนครราชสีมา

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยอ่อนศัตรูพริกและแตงกวา ลักษณะของใบพริกและแตงกวาที่แสดงอาการโรคเส้นใบเหลือง และโรคใบเหลือง ในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา ตาก และจังหวัดนครราชสีมา จังหวัดละ 5 แปลง รวม 150 ตัวอย่าง (Figure 1, 2) นำตัวอย่างเพลี้ยอ่อนที่ได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและจัดทำสไลด์ถาวรเพื่อจัดจำแนกชนิด และนำเพลี้ยอ่อนอีกส่วนเก็บไว้ในแอลกอฮอล์ 95% สำหรับศึกษา DNA Barcode และนำไปพืชที่แสดงอาการโรคมาตรวจสอบเชื้อ PeVYV (Figure 3) จากการวินิจฉัยชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและวิเคราะห์ DNA Barcode พบว่าเพลี้ยอ่อนที่สำรวจพบในพริกและแตงกวา ในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี พระนครศรีอยุธยา นครราชสีมา และตาก เป็นเพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover พร้อมทั้งได้เตรียมต้นพริกและแตงกวาที่ปลอดโรค และที่เป็นโรค สำหรับการถ่ายทอดโรค เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเพลี้ยอ่อน จำนวนวันที่รับเชื้อ จำนวนตัว และจำนวนวันที่ถ่ายทอดเชื้อ ของเพลี้ยอ่อนกับเชื้อในพริก และได้ทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและวงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* ในห้องปฏิบัติการพบว่า เพลี้ยอ่อนฝ้ายเป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็ก ลำตัวยาว 1.30 - 1.58 มิลลิเมตร ตัวอ่อนออกมาใหม่ๆมีขนาดเล็กมากสีเหลืองจางจนเกือบขาว เมื่อโตขึ้นมีสีเหลืองอมเขียว จนถึงเขียวเข้ม หนวดปล้องที่ 1, 2 และส่วนปลายหนวดของหนวดปล้องสุดท้ายสีน้ำตาลอ่อน หนวดยาวแต่สั้นกว่าลำตัวมีจำนวน 6 ปล้อง ปากยาวถึงโคนขาคู่หลัง ไซฟิงคูลีสีดำขมยาวกว่าส่วนหาง ส่วนหางรูปร่างคล้ายลิ้น สีส่อนกว่าไซฟิงคูลี มีขน 4-7 เส้น เพลี้ยอ่อนฝ้าย *A. gossypii* มีตัวอ่อน 4 ระยะ ใช้เวลา 6-7 วัน ระยะตัวเต็มวัย 12-30 วัน (Figure 4) และทำการตรวจสอบเชื้อ PeVYV ที่พบในต้นพริกที่ทำการสำรวจพบในจังหวัด กาญจนบุรี และสุพรรณบุรี ด้วยเทคนิค One Step RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสในกลุ่ม PeVYV ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของเชื้อ PeVYV แต่ละไอโซเลตหรือแต่ละสายพันธุ์ (strain)

ที่พบมีรายงานในฐานข้อมูล GenBank อยู่ระหว่าง 6,125 – 6,244 นิวคลีโอไทด์ (Figure 6) จากการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 5' (Untranslated region: UTR) ยีน P0 และบางส่วนของยีน P3 (coat protein: CP) ของเชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต กรุงเทพมหานคร (BK) ไอโซเลตกาญจนบุรี(KR) และไอโซเลตสุพรรณบุรี (SB) ดังนี้

1. บริเวณที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 5

เชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลต มีขนาด 50 นิวคลีโอไทด์ (Figure 7) มีความคล้ายคลึงกันที่ 98% - 100%

2. ยีน P0

เชื้อ PeVYV ทั้ง 3 ไอโซเลต มีขนาด 750 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 249 เรซิดิวส์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 28.35-28.59 กิโลดาลตัน จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Figure 8) และกรดอะมิโน (Figure 9) ของโปรตีน P0 พบว่ามีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 86.5% - 91.6% และ 87.7% - 86.4% ตามลำดับ

3. ยีน P3 บางส่วน

ยีน P3 ของเชื้อ PeVYV มีขนาด 621 นิวคลีโอไทด์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ครั้งนี้ได้มาเพียงบางส่วนจำนวน 366 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องวิเคราะห์ให้ครบจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งยีนก่อนจึงจะสามารถวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้ และแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ไว้ในตู้เย็นสำหรับในแช่แข็งจากการสำรวจไม่พบไวรัสในกลุ่ม PeVYV

ศึกษาความสัมพันธ์ของเพื่อย่อนในการถ่ายทอดเชื้อ PeVYV ในพริก โดยศึกษาจำนวนวันที่รับเชื้อ จำนวนตัว และจำนวนวันที่ถ่ายทอดเชื้อ ซึ่งอยู่ระหว่างการตรวจสอบเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- พัชรินทร์ คุรุทเมือง. 2555. เพื่อย่อนแมลงพาหะนำโรคพืช. 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/videl/>. Accessed 21 Mar. 2011.
- 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.

Ryazantsev, D.Yu. and S.K., Zavriev. 2009. An efficient diagnostic method for the identification of potato viral pathogens. *Mol. Biol.* 43: 558 – 567



Figure 1 Surveying aphids and diseases in cucumber plantations



Figure 2 Surveying aphids and diseases in chilli plantations

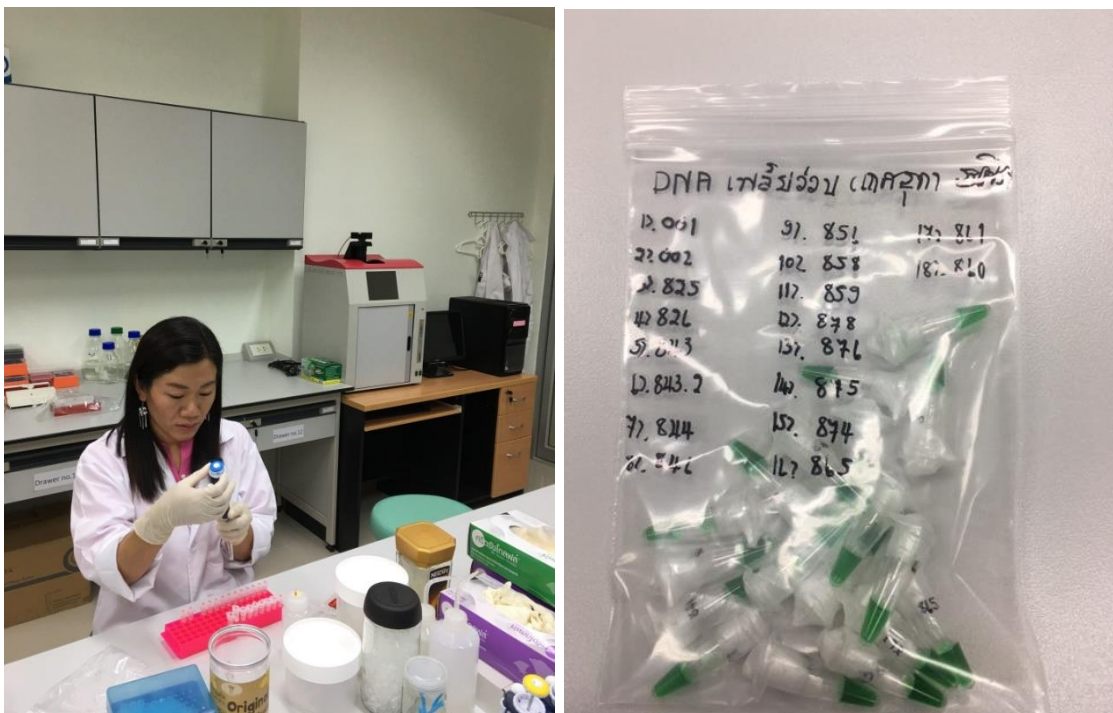


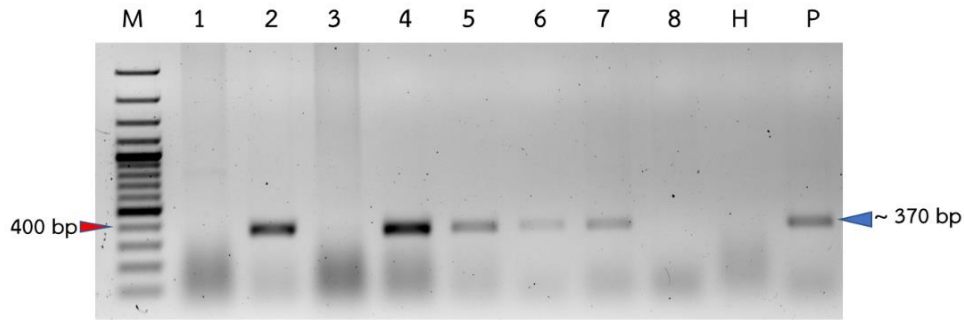
Figure 3 Extraction of DNA, aphids in the laboratory



Figure 4 Study the biology of *Aphis gossypii* Glover in the laboratory



Figure 5 Symptoms of chilli that show yellow leaves, broken leaves, shape and curled leaves



M : 100 bp DNA ladder

1-3 : ตัวอย่างพริกในแปลงจังหวัดกาญจนบุรี

4 และ 8 : ตัวอย่างพริกในแปลงจังหวัดสุพรรณบุรี

5-7 : ตัวอย่างพริกที่พบในกรุงเทพมหานคร

H : พริกปกติ

P : ตัวควบคุมเชิงบวก

Figure 6 Showing the DNA band of 357 nucleotide viruses examined with One Step RT- PCR using a specific pair of primers

PBK-P0	ACAAAATATACGAAGAGAGAGAGGCCCTTGCCAGTGACTTCTTCAAGTTTT	50
PKR-P0	ACAAAATATACGAAGAGAGAGAGGCCCTTGCCAGTGATTCTTCAAGTTTT	50
PSB-P0	ACAAAATATACGAAGAGAGAGAGGCCCTTGCCAGTGACTTCTTCAAGTTTT	50

Figure 7 Multiple alignment of nucleotide of 5' UTR of Pepper vein yellows virus by ClustalW

PBK: Isolate Bangkok

PKR: Isolate Kanchanaburi

PSB: Isolate Salaburi

(*) refers the nucleotides are identical in all sequence

PBK-P0	ATGAACTTCGAACTGATTAACGGAAGCCATCTTAAAGTTTCCCTCACTCGCAAGCTCGGT	60
PKR-P0	ATGAACTTCGAACTGATCAACGGAAGCCATCTTAAAGTTTCCCTCACTCGCAAGCTCGGT	60
PSB-P0	ATGAACTTCGAACTAATCAACGGAAGCCATCTTAAAGTTTCCCTCACTCGCAAGCTCGGT	60
	***** * *	
PBK-P0	TACAGAGAAAGAAATCCTAAATTTAGCAGTATTCTAAGTCAATATCTCGTAACCGTTTCAAG	120
PKR-P0	TACAGAGAGAGAATCCTAAACTTAGCAGTATTCTTAACTCAATACCTCATAACCGTCCAA	120
PSB-P0	TATAGAGAAAGAAATCCTAAATTTAGCAGTATTCTTAAAGTCAATACCTCGTAACCGTCCAA	120
	** ***** * *	
PBK-P0	GAAAATGCAACTACAAATCATTTTCTCCGCTCTATTTGTGCTCTCCTCCCTTTCCTTCTC	180
PKR-P0	GAAAATGCAACTACAAACCATTTCCTCGCTCTATTTGTGCTCTCCTCCCTTTCCTTCTC	180
PSB-P0	GAAAATGCAACTACAAACCATTTCCTCGCTCTATTTGTGCTCTCCTCCCTTTCCTTCTC	180
	***** * *	
PBK-P0	AGCACCAGATGCCCTTTTGTGGCAGGAAATGCTCCGCACAGGAACACCAAACGGGAATAT	240
PKR-P0	AGCAGCCAATGTCCCTTTTATCAGGGAATACACCCGACCGGAACGGCAAGCGGGAACAG	240
PSB-P0	AGCAGCCAATGTCCCTTTTATCAGGGAATACACCCGACCGGAACGGCAAGCGGGAACAG	240
	**** * * * * *	
PBK-P0	AAGCGAATTTCCCGGCTGGCCCTTTTCTGCGGAGTTAACATTACTTCCAGCTGTGAAGGA	300
PKR-P0	AAACGAGTCTATAGACTCGCTCTTTACTGTGGAGTTAACATCAATCCTTGTGGAAAGGA	300
PSB-P0	AAGCGAGTCTCTAAGCTCGCTCTTTACTGTGGAGTTAACATCGCTCCTTGTGGAAAGGA	300
	** * * * * * * * * * *	
PBK-P0	GAGGTTACAACCTCCGCTTGGCTCCAACCGGATAAATAACCTCGGAGCCCCACGAACCCAC	360
PKR-P0	GAGGCCTTTTCCCGGTTGGCTCCAACCGGATAAATAACCTCGGAGCCCCACGAGCCAC	360
PSB-P0	AAGGCCTCATCTCCGCTTGGCTCCAACCGGATAAATAACCTCGGAGCCCCACGAGCCAC	360
	*** * * * *	
PBK-P0	CTTAAGAGACGCGCTGGATCTGCTATGGCAAGTTATATCCAGAGATTCCAGACGCTCTC	420
PKR-P0	TTTGAAGAGGCGCTGGATCTGCTTTGGCAAGTTATCTCCAGAGATTCCAAACGCTCTA	420
PSB-P0	CTTAAGAGACGCGCTGGATCTGCTATGGCAAGTTATATCCAGAGATTCCAGACGCTCTC	420
	** * * * * * * * * * *	
PBK-P0	TTCCAAGGCGCAGAAGAATTTCAAGATTCTTGGCGGTATGGACTCACCCTGCGAAGGC	480
PKR-P0	TTCCACGGCGCAGGCGAATTTACAAAGTTCTTGGCGATCTGGACTCGCCACTGCGAAACA	480
PSB-P0	TTCCAGGGCGCAGAAGATTTCAAGATTCTTGGCGGTATGGACTCACCCTGCGAAGGC	480
	***** * * * * * * * * * *	
PBK-P0	GTGGTTGAAAGGAGCCTTCCAAGCTTTCTGTGGACCGTGGTCTCATTGTGGAGCTTTGG	540
PKR-P0	GTGGTTGAGAGGAGCTTTCCAAGCTTCTGTGGACCGTGGTCTCATTGTGGAGCTTTGG	540
PSB-P0	GTGGTTGAAAGGAGCCTTCCAAGCTTTCTGTGGACCGTGGTCTCATTGTGGAGCTTTGG	540
	***** * * * * * * * * * *	
PBK-P0	CATCTGGGTCATTGTCTCCTGGATCTTTTATCTGGGGACGACATTTACTGTGCCGTCGT	600
PKR-P0	CATCTGGGTCACTGTCTCCTGGACCTTCTATCTAGTGACGACTTTTACAATTCGCCGTCGT	600
PSB-P0	CATCTGGGTCATTGTCTCCTGGACCTTCTATCTAGTGACGACATTTACCATGCCGTCGT	600
	***** * * * * * * * * * *	
PBK-P0	TTGTCTCGCGTTGCTTTACGCCTGTACGGAATTTATGGTGAAGCATTGTTATGGATGTT	660
PKR-P0	ATGTCTCGCATTGCTTTATGCCTTCACAACATTTATGGTGAAGCATTGCGATGGATGTT	660
PSB-P0	TTGTCTCGCGTTGCTTTATGCCTGCACAGAATTTATGGTGAAGCATTGCGATGGATGTT	660
	***** * * * * * * * * * *	
PBK-P0	TACCGGTTGGCCACATGCCTCGCTCAGCTTATATTAAGCGGGGAAAGACTATCTTCAC	720
PKR-P0	TACCGGTTGGCCACATGCCTCGCTCAGTTTATATTAAGCGGGGAAAGACTATCTTCAC	720
PSB-P0	TACCGGTTGGCCACATGCCTCGCTCAGTTTATATTAAGCGGGGAAAGACTATCTTCAC	720
	***** * * * * * * * * * *	
PBK-P0	GGTCCCAGATTCAGAAGGAACTACAGTGA	750
PKR-P0	GGTCCCAGATTCAGAAGGAACTACAGTGA	750
PSB-P0	GATCCCAGATTCAGAAGGAACTACAGTGA	750
	* * * * * * * * * * *	

Figure 8 Multiple alignment of nucleotide of P0 gene Pepper vein yellows virus by ClustalW

PBK: Isolate Bangkok
 PKR: Isolate Kanchanaburi
 PSB: Isolate Salaburi
 (*) refers the nucleotides are identical in all sequence

PKR-P0	MNFELINGSHLKVSLTRKLGYSRERILNLAVFLTQYLITVQENATTNHFLRSICALLPFL	60
PBK-P0	MNFELINGSHLKVSLTRKLGYSRERILNLAVFLSQYLVTQENATTNHFLRSICALLPFL	60
PSB-P0	MNFELINGSHLKVSLTRKLGYSRERILNLAVFLSQYLVTQENATTNHFLRSICALLPFL	60
	*****:***:*****:*****	
PKR-P0	SSQCPFLSGNTPHRNGKREQKRVYRLALYCGVNIIPCWKGEAFSPVWLQTDNKLGA	120
PBK-P0	STRCPFVAGNAPHRNTKREYKRISRLALFCGVNITSSCEGEVTTSAWLQTDNNLGA	120
PSB-P0	SSQCPFLSGNTPHRNGKREQKRVSKLALYCGVNIAPCWNGKASSAWLQTDNNLGA	120
	::***:***:***** ** * *:***:***** .:*. :.*****:*****:*	
PKR-P0	FERGAGSALASYLQRFQTPFLFHGAGEFTKFLRIWTRHCETVVERSFPKLPVDRGL	180
PBK-P0	LKRRAGSAMASYIQRFQTPFLFQGAEEFSRFLRVWTHHCEGVVERSLPKLSVDRGL	180
PSB-P0	LKRRAGSAMASYIQRFQTPFLFQGAEEFSRFLRVWTHHCEVVEGSFPKLSVDRGL	180
	::* *****:***:*****:*** ** *:***:*** ** * :*** *****	
PKR-P0	HLGHCLLDLLSDDFYNSRRMSRIALCLHNIYGDGIADVYRLAHMPRSIVYIKSGEN	240
PBK-P0	HLGHCLLDLLSGDDIYCARRLSRVALRLYGIYGESIVMDVYRLAHMPRSAYIKSGE	240
PSB-P0	HLGHCLLDLLSDDIYHARRLSRVALCLHRIYGESIAMDVYRLAHLPRSVSFKSGE	240
	*****.*:* :***:*** * : ***:*. :*****:***. :***:***	
PKR-P0	GSQIQKELQ	249
PBK-P0	GSQIQKELQ	249
PSB-P0	DSQIQKELQ	249
	.*****	

Figure 9 Multiple alignment of amino acid of P0 protein of Pepper vein yellows virus by Clustal W

PBK: Isolate Bangkok

PKR: Isolate Kanchanaburi

PSB: Isolate Salaburi

(*) refers the amino acids are identical in all sequence

ชนิดของเพลี้ยไก่อัจฉิม *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) และการเป็นพาหะนำโรครินนิง (Huanglongbin) (Citrus greening disease) ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย

Species of Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae) and Insect Vectors of the Citrus Greening Disease (Huanglongbin) in Citrus Species in Thailand

จอมสุรางค์ ดวงธิดาร^{1/} แสนชัย คำหล้า^{2/} จารุวัฒน์ แต่กุล^{1/}

^{1/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

เพลี้ยไก่อัจฉิม (Citrus Psyllid) เป็นแมลงศัตรูพืชสำคัญของพืชตระกูลส้ม ทำลายพืชตระกูลส้ม โดยตัวอ่อนและตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงจากตาและยอดอ่อนของต้นส้ม สำหรับตัวอ่อนขณะดูดกินจะกลั่นสารสีขาวมีลักษณะเป็นเส้นด้าย ชักนำไปเกิดราดำติดตามมา ใบที่ถูกทำลายจะหงิกงอ เหี่ยวแห้ง ถ้าทำลายถึงขั้นรุนแรงทำให้ใบร่วงติดผลน้อยหรือไม่ติดผลเลย และยังเป็นพาหะถ่ายทอดโรครินนิง (Citrus greening disease) ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของพืชตระกูลส้มอีกด้วย สำหรับในประเทศไทยข้อมูลของเพลี้ยไก่อัจฉิมยังมีอยู่น้อยมาก และยังไม่เคยมีการสำรวจ รวบรวม จำแนกชนิดศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งศึกษารหัสทางพันธุกรรมของแมลงชนิดนี้มาก่อน นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาที่สามารถยืนยันได้ว่าเพลี้ยไก่อัจฉิมที่มีอยู่ในประเทศไทยสามารถถ่ายทอดโรครินนิงสู่พืชได้

วัตถุประสงค์ของการศึกษา คือ เพื่อทราบชื่อชนิด ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมของเพลี้ยไก่อัจฉิม และทราบข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. asiaticus* รวมทั้งประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อโรคไปสู่พืช ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการนำไปสู่การหาแนวทางในการบริหารจัดการและป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพต่อไป จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉิม จากแหล่งปลูกพืช เช่น มะนาว ส้ม ส้มโอ ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ในเขตพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคใต้ ในระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2562 ทำการวิเคราะห์ชนิดของเพลี้ยไก่อัจฉิมโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุลสามารถจำแนกชนิดได้ 1 ชนิดคือ *Diaphorina citri* (Kuwayama) รวมทั้งนำไปตรวจสอบเชื้อโรครินนิงด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าเป็นเชื้อ *Ca. L. Asiaticus* สาเหตุโรครินนิงในพืชตระกูลส้ม นอกจากนี้ได้ทำการเตรียมต้นพืชตระกูลส้ม (มะนาว ส้ม) และต้นแก้ว สำหรับเลี้ยงเพลี้ยไก่อัจฉิมให้ได้โคลนของเพลี้ยไก่อัจฉิมที่บริสุทธิ์ เพื่อทำการทดสอบการถ่ายทอดโรคต่อไป

คำหลัก: เพลี้ยไก่อัจฉิม โรครินนิง พืชตระกูลส้ม

รหัสสารทดลอง 03-47-61-01-00-04-61

คำนำ

เพลี้ยไก่แจ้หรือ jumping plant lice จัดอยู่ใน Superfamily Psylloidea (Aubert, 1987) เป็นแมลงที่ดูดกินน้ำเลี้ยงจากพืชและมีความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาหาร (Malenovsky *et al.* 2012) เป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญกับพืชผลทางการเกษตรหลายชนิด และยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อโรคสู่พืชได้อีกด้วยอาทิเช่น 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 โดยตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพืช ทำให้ใบพืชม้วน หงิกงอ สำหรับตัวอ่อนขณะดูดกินจะมีการปล่อยน้ำหวาน (honeydew) ออกมาซึ่งนำไปเกิดราดำติดตามมา และยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อโรครินนิง (Citrus greening disease) สู่พืชได้อีกด้วย (Aubert, 1987)

โรครินนิง (Citrus greening disease) เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มทั่วโลกโดยเฉพาะในแถบเอเชีย สร้างความเสียหายให้กับประเทศที่ปลูกส้มอย่างมากมายรวมทั้งประเทศไทยด้วย ในประเทศไทยมีรายงานการสำรวจพบโรครินนิงครั้งแรกในปี พ.ศ. 2516 (ขวัญดาว, 2552) โรคนี้เกิดจากแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในท่ออาหารของพืช จัดอยู่ในสกุล *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 ชนิด คือ *Trioza erytreae* (Del Guericco) พบในประเทศแถบแอฟริกา และ *D. citri* พบในประเทศแถบเอเชีย (Huang *et al.* 1990)

ต้นส้มที่ได้รับเชื้อจะแสดงอาการใบเล็กเหลือง ชี้อ้วน คล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร ผลผลิตลดลงไม่มีคุณภาพ มักจะร่วงก่อนอายุการเก็บเกี่ยว ต้นส้มจะแสดงอาการทรงกับทรุดอยู่หลายปีและตายในที่สุด (ไมตรี 2534, 2544) ซึ่งส่งผลกระทบต่อผลผลิตส้ม ทำให้ส้มขายได้ราคาตกต่ำ นับว่าเป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งของเกษตรกร (สำนักงานพาณิชย์จังหวัดเชียงใหม่, 2553) ในประเทศไทยพบเพลี้ยไก่แจ้ส้มเริ่มระบาดรุนแรงในแหล่งปลูกส้มเขียวหวานในภาคเหนือ และภาคตะวันออก และได้แพร่กระจายลงสู่แหล่งปลูกภาคกลางที่จังหวัดปทุมธานี โดยพบไข่และตัวอ่อนระยะส้มเขียวหวานแตกยอดอ่อน พบปริมาณมากช่วงเดือน มกราคม-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 ลำดับนิวคลีโอไทด์และหาความสัมพันธ์ของเชื้อโรครินนิงของพืชตระกูลส้มพบว่า ตัวอย่างส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ และตระกูลมะนาวที่สำรวจทั้งหมดอยู่ในกลุ่ม *Ca. L. asiaticus* สำหรับในประเทศไทยข้อมูลของเพลี้ยไก่แจ้ส้มยังมีอยู่น้อยมาก และยังไม่เคยมีการสำรวจ รวบรวม จำแนกชนิด ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งศึกษารหัสทางพันธุกรรมของแมลงชนิดนี้มาก่อน

นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาที่สามารถยืนยันได้ว่าเพลี้ยไก่อัจฉิมที่มีอยู่ในประเทศไทยสามารถถ่ายทอดโรคกรีนนิงส์สู่พืชได้

ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการสำรวจ รวบรวม ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และรหัสทางพันธุกรรมของเพลี้ยไก่อัจฉิมที่เป็นพาหะนำโรคกรีนนิงส์สู่พืช เพื่อทราบชื่อชนิด ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมของเพลี้ยไก่อัจฉิม และทราบข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. asiaticus* รวมทั้งประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อโรคไปสู่พืช ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญในการนำไปสู่การหาแนวทางในการบริหารจัดการและป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) ตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉิมที่รวบรวมได้จากแหล่งปลูกพืชตระกูลส้ม (ส้มโอ มะนาว ส้ม) ของเกษตรกร
- 2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ หลอดดูดแมลง (aspirator) ขวดฆ่าแมลง ขวดดองแมลง ปากคืบพู่กัน กล้องพลาสติก ถุงพลาสติก ถังรักษาความเย็นและเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
- 3) สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ 95%
- 4) อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิมเบอร์ 3 กระจกสามเหลี่ยม ปากคืบ (forcep) ตู้อบแมลง ฯลฯ
- 5) สารเคมีและอุปกรณ์ในการศึกษาสารพันธุกรรม เช่น ชุดสกัดสารพันธุกรรม (Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit; Cat. No: FATGK001-1)
- 6) กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope compound microscope และกล้องถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์
- 7) อุปกรณ์คอมพิวเตอร์ (กระดาษ แผ่นบันทึกข้อมูล หมึกพิมพ์ ซีดี)
- 8) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของเพลี้ยไก่อัจฉิม

วิธีการ

ปี 2561

1) ศึกษา ชนิด และ DNA Barcode ของเพลี้ยไก่อัจฉิมที่เป็นพาหะโรคกรีนนิงส์ในพืชตระกูลส้ม (ส้มเขียวหวาน มะนาว ส้มโอ)

1.1) การเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉิม

เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉิมจากพื้นที่ปลูกพืชตระกูลส้ม (ส้มเขียวหวาน มะนาว ส้มโอ) ของเกษตรกร โดยทำการสำรวจ 5 แปลง/จังหวัด ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทย ดังต่อไปนี้

ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร และกำแพงเพชร (=20 แปลง)

ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดชัยนาท นครปฐม และปทุมธานี (=15 แปลง)

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง (=15 แปลง)

1.2) การตรวจสอบชนิดของเพลี้ยไก่อัจฉิมจากสัณฐานวิทยาภายนอก

1.2.1) นำตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉิมได้จากการเก็บรวบรวมในข้อ 1.1 มาจัดรูปร่าง นำไปอบให้แห้งในตู้อบ (oven) ปรับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 5-7 วัน

1.2.2) นำตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉั้มาตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยดูลักษณะภายนอก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง สี ลักษณะของส่วนหัว ออก ท้อง เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับแต่ละชนิด โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยของ Bhavani (2004) และ Hodgkinson (1979) ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์

6) จัดเก็บตัวอย่างที่ได้ศึกษาไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

7) การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลหมายเลข (Lot number) ตัวอย่างในแต่ละครั้งที่ทำการสำรวจอย่างละเอียดโดยจะแยกเป็นชนิด พิษอาศัย และสถานที่
- ถ่ายภาพลักษณะต่างๆ ของเพลี้ยไก่อัจฉั้ที่ได้จากการศึกษา
- บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยา

1.3) การตรวจสอบ DNA barcode ของเพลี้ยไก่อัจฉั้โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรม

1.3.1) นำตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉั้ที่ได้จากการเก็บรวบรวมในข้อ 1.1 มาดองไว้ในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.3.2) ทำการสกัดสารพันธุกรรม (DNA Extraction) ด้วยชุดสกัดสารพันธุกรรมสำเร็จรูป (Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit; Cat. No: FATGK001-1) ซึ่งเป็นชุดสกัดสารพันธุกรรมที่ใช้สำหรับเนื้อเยื่อสัตว์ ดังวิธีการต่อไปนี้

- การเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation): นำตัวเต็มวัยเพลี้ยไก่อัจฉั้ 1 ตัว มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml

- เตรียมการสลายผนังเซลล์ โดยการเติม FATG1 Buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และ Protinase K Solution ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ใส่ตัวอย่างแมลงไว้แล้ว บดสารและแมลงให้เข้ากันโดยละเอียด ปิดหลอดให้สนิท และนำไปผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vertex) จากนั้นพันด้วย พาราฟิน (Paraffin) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ตลอดทั้งคืน

- หลังจากบ่มตัวอย่างไว้ทั้งคืน นำไปผสมสารให้เข้ากันอีกครั้งด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vertex) จากนั้นทำการย่อยตัวอย่าง โดยเติม FATG2 Buffer ปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vertex) และบ่มที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 96-100%) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำไปผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสมสาร (vertex) และนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (spin) เป็นเวลา 10 วินาที

- เตรียมหลอดกรองดีเอ็นเอขนาดเล็ก (FATG Mini Column) ใส่ในหลอดรองรับสารที่เหลือจากการกรอง (Collection Tube) แล้วดูดสารละลายทั้งหมดที่ได้จากการตกตะกอน ปริมาณ 620 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดกรองดีเอ็นเอขนาดเล็ก (FATG Mini Column) ที่ทำการเตรียมไว้แล้ว เพื่อทำการกรอง จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13,000 x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน)

- นำหลอดกรองดีเอ็นเอขนาดเล็ก (FATG Mini Column) ใส่ในหลอดรองรับสารที่
เหลือจากการกรอง (Collection Tube) หลอดใหม่ เติมสาร W1 Buffer 400 ไมโครลิตร ใส่ลงใน
หลอดกรองดีเอ็นเอขนาดเล็ก (FATG Mini Column) จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง
13,000 x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน)

- เติม Wash Buffer ปริมาณ 750 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดกรองดีเอ็นเอขนาดเล็ก
(FATG Mini Column) จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13,000 x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้ง
ของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน)

- ตกตะกอนสารพันธุกรรมให้แห้ง (Dry silica membrane): ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่น
ความเร็วสูง 13,000 x g เป็นเวลา 3 นาที

- หลอดกรองดีเอ็นเอขนาดเล็ก (FATG Mini Column) ที่ตกตะกอนสารพันธุกรรมแล้ว
มาใส่ในหลอดรองรับสารที่เหลือจากการกรอง (Collection Tube) หลอดใหม่ และทำการละลายสาร
พันธุกรรม (Elute DNA): โดยการเติม Elution Buffer ที่ทำการอุ่นร้อน ปริมาณ 30 ไมโครลิตร
จากนั้น ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 13,000 x g
เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งจะได้ DNA จากเปลือกไข่ไก่แจ้ส้ม จากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศา
เซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

1.3.3) ทำการเพิ่มปริมาณยีน mtCOI ด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction
(PCR) โดยใช้ Primer DCITRI COI-L และ DCITRI COI-R (Boykin *et al.*, 2012)

Primer	Sequence (5' → 3')	Base
DCITRI COI-L	AGG AGG TGG AGA CCC AAT CT	20
DCITRI COI-R	TCA ATT GGG GGA GAG TTT TG	20

สังเคราะห์ยีน mtCOI ของเปลือกไข่ไก่แจ้ส้มจาก DNA ที่เตรียมได้ ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์
(PCR) ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 50 ไมโครลิตรประกอบด้วย

Nuclease free water	16	ไมโครลิตร
Green Mastermix	25	ไมโครลิตร
DCITRI COI-L	2	ไมโครลิตร
DCITRI COI-R	2	ไมโครลิตร
DNA template	5	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาใน
การสังเคราะห์ดังนี้

1) Predenaturation	94 °C	5 นาที
2) Three step-cycling 35 cycles		
Denaturation	94 °C	30 วินาที
Annealing	50 °C	30 วินาที
Extension	72 °C	45 วินาที
3) Final extension	72 °C	10 นาที

1.3.4) ตรวจสอบ PCR product โดยการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของสาร
พันธุกรรมที่ต้องการ โดยการให้ประจุของสารที่มีประจุแยกออกจากกัน ด้วยวิธีการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

(Electrophoresis) โดยหยด PCR product ลงในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.5 % (1.5% agarose gel) และให้ PCR product เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย TBE (Tris-borate, EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 45 นาที

1.3.5) ทำการตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยส่งตัวอย่าง DNA ที่บริสุทธิ์ของเพลี้ยไก่อแจ้ส้ม ส่งตรวจที่ประเทศเกาหลี

1.3.6) นำข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ ที่ได้มาตรวจสอบชนิด กับ GeneBank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมฐานข้อมูลทางพันธุกรรมศาสตร์จากทั่วโลก เพื่อยืนยันความถูกต้อง ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอที่ได้การศึกษาจะถูกเก็บบันทึกและรายงาน เพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืช และดีเอ็นเอที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์แมลง กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

1.3.7) การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลลำดับพันธุกรรมของเพลี้ยไก่อแจ้ส้มในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

1.4) การศึกษาวงจรชีวิตเพลี้ยไก่อแจ้ส้ม (เพิ่มเติม)

1.4.1) นำเพลี้ยไก่อแจ้ส้ม เพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัว มาเลี้ยงในกล่องพลาสติก โดยนำยอดอ่อนของต้นแก้วที่พันด้วยสำลีชุบน้ำมาวางไว้ในกล่องพลาสติกเพื่อเป็นอาหารและให้เพลี้ยไก่อแจ้ส้มวางไข่

1.4.2) สังเกตการวางไข่ การฟักไข่ การเปลี่ยนแปลงจากตัวอ่อนจนเป็นตัวเต็มวัยทุกวัน จดบันทึกเวลาการเปลี่ยนแปลงรวมทั้งถ่ายรูปเพลี้ยไก่อแจ้ส้มในทุกๆระยะการเปลี่ยนแปลง

ปี 2562

1) ศึกษาข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ca. L. asiaticus* สาเหตุโรครีนนิ่งในพืชตระกูลส้ม (ส้มเขียวหวาน มะนาว ส้มโอ) ที่พบในเพลี้ยไก่อแจ้ส้มในประเทศไทย

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากแมลง

- เตรียมตัวอย่างเพลี้ยไก่อแจ้ส้มที่ได้จากการเก็บรวบรวมในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร กำแพงเพชร ชัยนาท นครปฐม ปทุมธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง (5 แปลง/จังหวัด) จากนั้นนำตัวอย่างแมลง (ตัวเต็มวัย 3 ตัว/แปลง แปลงละ 3 ซ้ำ) มาบดให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ 60 – 150 ไมโครลิตร (1M Tris pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0, 1M NaCl, 10%SDS, Proteinase K (2mg/ml) บ่มที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย Phenol: Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมสารละลายให้เข้ากัน (vortex อย่างน้อย 20 วินาที) นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดเก็บเฉพาะสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมสารละลายให้เข้ากัน (vortex) นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดเก็บเฉพาะสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมสารละลาย 3M Sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่า ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส 30 นาที เติมสารละลาย 2-propanol ปริมาตร 1 เท่า พลิกกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% แอลกอฮอล์ ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิต่ำห้อง แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (1M Tris pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0) เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป หรือการใช้ชุดสกัด Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega)

1.2 วิธีการตรวจสอบเชื้อโรครินนึ่งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

- นำสารละลายดีเอ็นเอ ที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค 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

- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (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 ไม่จำเป็นต้องใส่ก็ได้)

- 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

1.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

บันทึกข้อมูลข้อมูลรหัสทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย *Ca. L. asiaticus* และหาความสัมพันธ์ของเชื้อโรครินนึ่งจากเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

2) การเลี้ยงโคลนของเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่บริสุทธิ์สำหรับทดสอบการถ่ายทอดโรค

2.1) เตรียมต้นพืชตระกูลส้ม (ส้ม มะนาว) ที่ปลอดโรครินนึ่ง สำหรับเลี้ยงเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

2.2) นำเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกพืชตระกูลส้ม (ส้มโอ มะนาว) ที่ไม่แสดงอาการเกิดโรครินนึ่ง ในภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดปทุมธานี นครปฐม มาเพาะเลี้ยงบนต้นมะนาว ต้นแก้ว โดยเลี้ยงในกรงตาข่ายสำหรับเลี้ยงแมลง จนได้เพลี้ยไก่แจ้ส้มซึ่งเป็นโคลนบริสุทธิ์สำหรับใช้ทดสอบการถ่ายทอดโรค

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉริยะ จากแหล่งปลูกพืช เช่น มะนาว ส้ม ส้มโอ ฯลฯ ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ในเขตพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคใต้ ในระหว่างเดือน ตุลาคม 2560 - กันยายน 2562 (Figure A-C) และทำการวิเคราะห์ชนิดโดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Bhavani (2004) และ Hodkinson (1979) รวมทั้งตรวจสอบ DNA barcode ของเพลี้ยไก่อัจฉริยะ โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุลสามารถจำแนกชนิดได้ 1 ชนิด คือ *D. citri* (Table 1) โดยมีรายละเอียดดังนี้

Diaphorina citri (Kuawayama, 1907) (Figure D-G)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (description)

ลำตัว (body): ตัวเต็มวัยมีความยาวลำตัวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ลำตัวมีสีน้ำตาลกระด้าง กระดำ

หัว (head): ส่วนหัวมีสีน้ำตาลสว่าง

หนวด (antennae): หนวดตรงส่วนปลายมีสีดำ และมีจุดสีน้ำตาลสว่าง 2 จุด ตรงส่วนกลางของปล้องหนวดส่วนปลาย

ปีก (hemelytra): ปีกคู่หน้าตรงครึ่งส่วนปลายของปีกมีความกว้างที่สุด มีสีน้ำตาล กระดำกระด้างอยู่รอบๆ บริเวณตรงครึ่งส่วนปลายของปีก

ขา (leg): มีลักษณะเรียวยาว มีน้ำตาลอ่อน ส่วนของโคนขา (femur) มีสีน้ำตาลดำ ส่วนของปลายขา (tarsus) ปล้องสุดท้ายมีสีดำ และเล็บ (claw) มีสีดำ

อวัยวะสืบพันธุ์ :

เพศผู้: ปล้องท้องเรียวยาวเล็ก ปลายส่วนท้องมีสีดำ อวัยวะสืบพันธุ์ไม่มีลักษณะเรียวยาวแหลม และโค้งงอขึ้นติดกับส่วนท้องด้านบน

เพศเมีย: ปล้องท้องอ้วนกลม ปลายส่วนท้องมีสีดำ อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมีลักษณะเรียวยาวแหลม ยื่นตรง ไม่โค้งงอขึ้นติดกับส่วนท้องด้านบน

แหล่งที่สำรวจพบ (distribution): จังหวัดนครปฐม ชัยนาท ปทุมธานี เชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร กำแพงเพชร นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง

ความสำคัญและพืชอาศัย: ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ดูดกินยอดอ่อน ใบอ่อน ของพืชตระกูลส้ม เป็นอาหาร โดยเป็นพาหะนำเชื้อโรครินนิ่งเข้าสู่พืชตระกูลส้มได้

รวมทั้งยังได้ทำการศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยไก่อัจฉริยะ *D. citri* เพิ่มเติมเพื่อทราบระยะเวลาเปลี่ยนแปลงในแต่ละวัยที่ชัดเจน โดยทำการเพาะเลี้ยงด้วยยอดอ่อนต้นแก้วในกล่องพลาสติก พบว่าเพลี้ยไก่อัจฉริยะผสมพันธุ์และวางไข่ใช้เวลา 1-2 วัน ไข่มีลักษณะยาวเรียวยาวไปไข่ มีสีเหลืองอมส้ม ตัวอ่อนมีทั้งหมด 5 ระยะ ระยะไข่เปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 ใช้เวลา 2-4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 1 ลำตัวมีขนาดเล็ก สีเหลืองอมส้ม ลอกคราบเปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 2 ใช้เวลา 2-4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 ลำตัวมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเหลืองอมส้ม เริ่มเห็นตุ่มปีกชัดเจน ลอกคราบเปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 3 ใช้เวลา 2-4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 ลำตัวขยายใหญ่ขึ้น ลอกคราบเปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 4 ใช้เวลา 2-3 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 4 ลำตัวขยายใหญ่ขึ้น และตุ่มปีกแผ่ออกขยายใหญ่ขึ้น ส่วนตัวอ่อนวัยที่ 5 ลำตัวขยายใหญ่ขึ้น และตุ่มปีกแผ่ออกขยายใหญ่ขึ้น ปลายส่วนท้องเปลี่ยนเป็นสีดำก่อนจะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย ตัวอ่อนวัยที่ 5 ใช้เวลา 2-3 วัน (Figure H)

นอกจากนี้ได้เก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจฉริยะจากพื้นที่ปลูกพืชตระกูลส้ม (ส้มเขียวหวาน มะนาว ส้มโอ) ของเกษตรกร เพิ่มเติม ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร กำแพงเพชร ชัยนาท นครปฐม ปทุมธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง นำไปสกัด

ดีเอ็นเอ และนำไปตรวจสอบเชื้อโรครินนิ่งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าเป็นเชื้อ *Ca. L. Asiaticus* สาเหตุโรครินนิ่งในพืชตระกูลส้ม (Figure I) รวมทั้งได้ทำการเตรียมต้นพืชตระกูลส้ม (มะนาว ส้ม) และต้นแก้ว สำหรับเลี้ยงเพลี้ยไก่อัจส้มให้ได้โคลนของเพลี้ยไก่อัจส้มที่บริสุทธิ์ เพื่อทำการทดสอบการถ่ายทอดโรคต่อไป (Figure J-N)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเพลี้ยไก่อัจส้ม จากแหล่งปลูกพืช เช่น มะนาว ส้ม ส้มโอ ฯลฯ ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ในเขตพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดนครปฐม ชัยนาท และปทุมธานี เขตพื้นที่ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย พิจิตร และกำแพงเพชร เขตพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ นครศรีธรรมราช กระบี่ และตรัง ในระหว่างเดือนตุลาคม 2560 - กันยายน 2562 ทำการวิเคราะห์ชนิดโดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Bhavani (2004) และ Hodgkinson (1979) และตรวจสอบ DNA barcode ของเพลี้ยไก่อัจส้มโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุลสามารถจำแนกชนิดได้ 1 ชนิดคือ *D. citri* รวมทั้งนำไปตรวจสอบเชื้อโรครินนิ่งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าเป็นเชื้อ *Ca. L. Asiaticus* สาเหตุโรครินนิ่งในพืชตระกูลส้ม นอกจากนี้ได้ทำการเตรียมต้นพืชตระกูลส้ม (มะนาว ส้ม) และต้นแก้ว สำหรับเลี้ยงเพลี้ยไก่อัจส้มให้ได้โคลนของเพลี้ยไก่อัจส้มที่บริสุทธิ์ เพื่อทำการทดสอบการถ่ายทอดโรคต่อไป

จากการศึกษาวงจรชีวิตของเพลี้ยไก่อัจส้มเพิ่มเติม พบว่า เพลี้ยไก่อัจส้มผสมพันธุ์และวางไข่ใช้เวลา 1-2 วัน ไข่มีลักษณะยาวเรียวยาวรูปไข่ มีสีเหลืองอมส้ม ตัวอ่อนมีทั้งหมด 5 ระยะ ระยะไข่เปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 1 ใช้เวลา 2-4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 1 ลำตัวมีขนาดเล็ก สีเหลืองอมส้ม ลอกคราบเปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 2 ใช้เวลา 2-4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 2 ลำตัวมีขนาดใหญ่ขึ้น สีเหลืองอมส้ม เริ่มเห็นตุ่มปีกชัดเจน ลอกคราบเปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 3 ใช้เวลา 2-4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 3 ลำตัวขยายใหญ่ขึ้น ลอกคราบเปลี่ยนแปลงเป็นตัวอ่อนวัยที่ 4 ใช้เวลา 2-3 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 4 ลำตัวขยายใหญ่ขึ้น และตุ่มปีกแผ่ออกขยายใหญ่ขึ้น ส่วนตัวอ่อนวัยที่ 5 ลำตัวขยายใหญ่ขึ้น และตุ่มปีกแผ่ออกขยายใหญ่ขึ้น ปลายส่วนท้องเปลี่ยนเป็นสีดำก่อนจะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย ตัวอ่อนวัยที่ 5 ใช้เวลา 2-3 วัน รวมระยะเวลาตั้งแต่ระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 21 วัน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนักกีฏวิทยา นักวิชาการโรคพืช และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา และกลุ่มวิจัยโรคพืชทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยในการสำรวจ เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลง และเตรียมตัวอย่างแมลงเพื่อการจัดจำแนกชนิด ตลอดจนตรวจสอบ DNA barcode ของเพลี้ยไก่อัจส้ม โดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2555. การจัดการศัตรูส้มโอเพื่อการส่งออก. เอกสารทางวิชาการ. 129 หน้า.

- ขวัญดาว ผิวขาว และอังสนา อัครพิศาล. 2552. การตรวจสอบโรคฮวงลองบิง (กรีนนิง) ในสวนส้มโอที่ผลิตเพื่อการส่งออกที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย. ว. วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 26: 40-46.
- ดารุณี ปุญญพิทักษ์ เยาวภา ตันตวานิช บุรณี พัวพงษ์แพทย์ และณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล. 2553. การสำรวจและจำแนกเชื้อโรครกรีนนิงในประเทศไทยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา.
- ไมตรี พรหมนิทร์. 2534. โรคริสเทซ่าและโรคใบเหลืองต้นโทรมหรือโรครกรีนนิง. 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 erytrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of Citrus Greening Disease: Biology aspects and possible control strategies. Fruit. Vol. 42.
- 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).
- Teixeira, 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.

Table 1 Example of DNA Barcode *D. citri*

ชนิดแมลง	DNA Barcode
<i>Diaphorina citri</i> : 369	CTGATTTTTGGACTCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGCTAATCTCACATATTACTACACAAGAAA GAGGTAAAACCTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAACCTATTGGAAATTTAGGATTTATTGTATG AGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATTGCAGTA CCGACAGGAATAAAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATGAT CATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATTCT TCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGTTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGATTT ATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTCG GAGTAAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATCT TCTCATTTTCTGGAATATTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATCT GAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAAATGAATGCAAAACTCTCCCC AATTGATAACACATAGTGAAGTGGGCA
<i>Diaphorina citri</i> : 328	TTCTGATTTTTGGAATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAG AAAGAGGTAAAACCTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAAATTTAGGATTTATTGT ATGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATTGCA GTACCACAGGAATAAAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCAT GATCATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTAT TCTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGA TTTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTC CGGAGTAAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGAT CTTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTAT CTGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAAATGAATGCAAAACTCTCCCC CCCATGGAGAA
<i>Diaphorina citri</i> : 333	TCTGATTTTTGGACATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGA AAGAGGTAAAACCTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAAATTTAGGATTTATTGTA TGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATTGCAG TACCGACAGGAATAAAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATG ATCATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATT CTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGAT TTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTC GGAGTAAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATC TTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATC TGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAAATGAATGCAAAACTCTCCCC CCANTGAAAA
<i>Diaphorina citri</i> : 350	TTCTGATTTTTGGAATCCTGAAGTGTACATTCTTATTCTCCGGGGTTTGGGTTAATCTCACATATTACTACACAAGA AAGAGGTAAAACCTTCAGCATTCCGGTACATTAGGAATAATTTATGCTATATTAGCTATTGGAAATTTAGGATTTATTGTA TGAGCTCACCACATATTTACTGTAGGAATAGATGTAGACTCACGAGCTTATTTACTTCAGCAACCATAAATTATTGCAG TACCGACAGGAATAAAAATTTTAGTTGACTAGCTACAATTTACGGAATAAAAAATAAAATTTCTCCAAGTATTTTCATG ATCATTAGGATTTATCTTCTTTTTACAGTAGGAGGACTTACAGGAGTAATTTAGCAAATTCATCAATTGACATTATT CTTCATGACACTTATTATGTAGTTGCCACTTTCACTATGTGCTATCAATAGGGGCTGTATTTGCCATTATTGCTAGAT TTATTAATTGATACCCTTTATTAACAGGAAATACAATAAAATAAACTTTACTTAAAGCTCAATTTTTAAGAACCTTCGTC GGAGTAAACACTACCTTTTTCCCAACACTTCTTAGGACTTATAGGAATGCCACGACGATACTCGAACTATCCAGATC TTCTCATTTTCTGAAATATTATTTCTTCTTAGGGTCTATAATTTCACTATTTTCAGTATTACTACTTATAATCATTATC TGAGAAGCAATAACTTCTAATCGAATTGTTTTATTCAATAGAAATTATATAATAATAGAAATGAATGCAAAACTCTCCCC CCCAATGAAAA

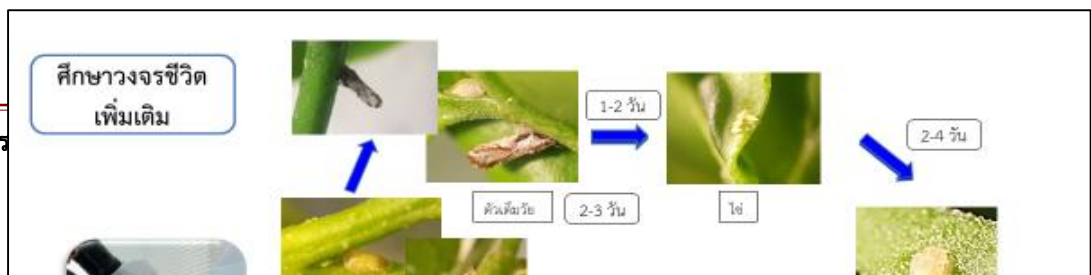


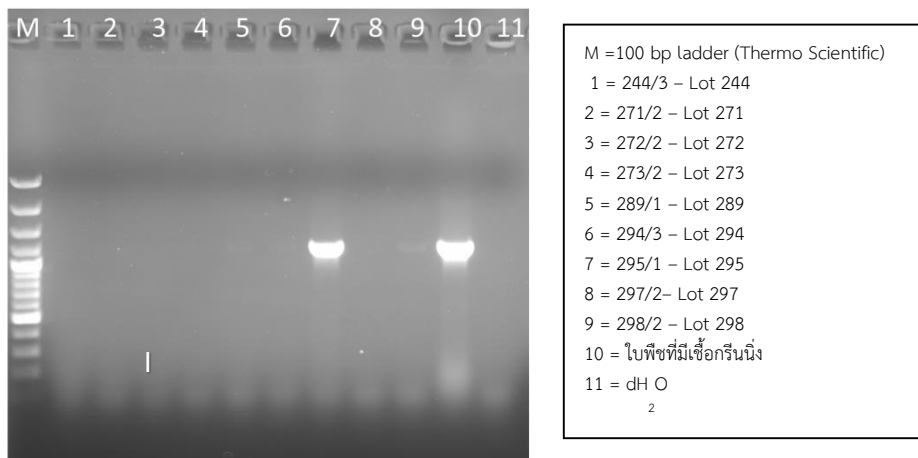
Figure H) life cycle *D. citri*

Figure I) ตรวจสอบเชื้อโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)



Figure J-K) เตรียมต้นพริกตระกูลส้ม (มะนาว ส้ม) และต้นแก้ว สำหรับเลี้ยงเพลี้ยไก่อัจฉริยะที่บริสุทธ์



Figure M-N) เพาะต้นส้มที่บริสุทธ์เพื่อใช้ในการทดสอบการถ่ายทอดโรคกรีนนิง

การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*
จากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าโดยเทคนิค Real-Time PCR

Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from
Potato Tuber Import by Real-Time PCR

ณัฐริมา โขษิตเจริญกุล^{1/} ทิพวรรณ กันหาญาติ^{1/} รุ่งนภา ทองเครื่อง^{1/} ชลธิชา รักใคร่^{2/}
^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/}กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Potato Ring Rot Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* is an economically important disease for the potato seed industry. This is the most regulated disease of potatoes around the world. Thailand has imported a large number of potato tubers from other countries for consumption and cultivation. There is a risk that the bacterium will be contaminated with potato tubers. Effective pest detection techniques are used to prevent the entry of pests that may be attached to agricultural products. This research aims to develop an efficient and rapid method for detecting *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Real-Time PCR was used for the detection of *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers. The primer, Cms probe was designed based on the intergenic spacer region of the 16S– 23S rRNA genes of *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. However, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* has not been found in Thailand. Therefore, it is necessary to synthesize the DNA of the 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer gene of *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* as a DNA positive control for specificity and sensitivity testing. The results showed that Cms probe was only specific with *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* and able to detect the lowest concentration of DNA at 25 pg / reaction. The result of the detection of *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* from potato tubers that imported from Australia using Real-Time PCR showed that not found *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Keywords: Potato Ring Rot, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Detection

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-00-01-60

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* สาเหตุโรคเน่าวงแหวน (Bacterial Ring Rot disease) ของมันฝรั่งเป็นแบคทีเรียที่ทำความเสียหายให้กับระบบการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในหลายๆประเทศ ประเทศไทยนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อการบริโภคและใช้เพาะปลูกเป็นจำนวนมาก ทำให้มีความเสี่ยงที่จะมีศัตรูพืชกักกันติดเข้ามาพร้อมกับหัวพันธุ์มันฝรั่ง การหาวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้สำหรับป้องกันการเข้ามาของศัตรูพืชที่อาจติดมากับสินค้าเกษตร การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่มีประสิทธิภาพ และรวดเร็ว เทคนิค Real-Time PCR ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ในหัวพันธุ์มันฝรั่ง โดยใช้ไพรเมอร์ Cms probe ซึ่งได้ออกแบบมาจากยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เท่านั้น ไม่เพิ่มกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง ที่ใช้ทดสอบ การทดสอบความไว พบว่าสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 25 pg/ปฏิกิริยา ผลการสุ่มตรวจหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากประเทศออสเตรเลียด้วยวิธี Real-Time PCR ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ในตัวอย่างที่ตรวจ

คำหลัก: โรคเน่าวงแหวน วิธีการตรวจสอบวินิจฉัยโรคพืช ศัตรูพืชกักกัน

คำนำ

แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* สาเหตุโรคเน่าวงแหวน (Bacterial Ring Rot disease) ของมันฝรั่งเป็นแบคทีเรียที่ทำความเสียหายให้กับระบบการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในหลายๆประเทศ แบคทีเรียเข้าทำลายส่วนท่อน้ำท่ออาหารของต้นมันฝรั่ง ทำให้เกิดอาการเหี่ยวแห้งและต้นมันฝรั่งตายแบคทีเรียจะเข้าไปอยู่ในหัวพันธุ์ ถ้าปริมาณแบคทีเรียไม่มากจะแฝงอยู่ในหัวพันธุ์ หากมีปริมาณแบคทีเรียมากจะทำให้หัวพันธุ์เน่าได้ มีรายงานความเสียหายที่เกิดจากโรคเน่าวงแหวนในประเทศสหรัฐอเมริกา โรคนี้ทำให้ผลผลิตเสียหายถึง 50% ในประเทศรัสเซียเสียหาย 30% แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* มีความสำคัญทางกักกันพืช โดยในกลุ่มสหภาพยุโรปจัดให้อยู่ในกลุ่ม EPPO A2 พบมีการระบาดในบางประเทศของสหภาพยุโรปแต่หลายประเทศในสหภาพยุโรปที่เป็นแหล่งผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง ไม่พบการระบาดของแบคทีเรียนี้สำหรับประเทศไทยแบคทีเรียนี้เป็นศัตรูกักกันพืช ยังไม่รายงานการพบแบคทีเรียชนิดในประเทศไทย แต่ประเทศไทยมีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งเข้ามาจากต่างประเทศเพื่อเข้าโรงงานผลิตแผ่นมันฝรั่งและมาเพื่อใช้เพาะปลูก ประเทศไทยนำเข้ามันฝรั่งมีหลายประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา แคนาดา ที่มีการระบาดของโรคเน่าวงแหวน ทำให้มีความเสี่ยงที่เป็นเส้นทาง (pathway) ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่อาจติดมากับหัวพันธุ์ได้ ทำให้ต้องมีการสุ่มหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าเพื่อตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากทุกตู้สินค้าที่เข้ามา การตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่ต้องมีการพัฒนาไปใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรีย โดยวิธีการตรวจต้องมีประสิทธิภาพ มีความไวในการตรวจสามารถตรวจหาแบคทีเรียพบในระดับปริมาณน้อย ดังนั้น การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนา

วิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยวิธี Real Time PCR ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และความแม่นยำสูง เป็นที่ยอมรับจากประเทศนำเข้า และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าวงแหวนจากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้แช่แข็งชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดัน ไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่อง Thermocycler (Biometra ®)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

1. การเตรียม DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องสังเคราะห์ยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เพื่อนำมาใช้เป็น DNA positive control เพื่อดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ต่อไป

2. การคัดเลือก probe สำหรับ Real-Time PCR

สืบค้นข้อมูล probe สำหรับ Real-Time PCR ที่มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนของมันฝรั่งได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* คัดเลือก probe ที่เฉพาะเจาะจง จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ probe ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนโดยวิธี Real time PCR ต่อไป

3. การทดสอบ DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

ทดสอบ DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่สังเคราะห์จากส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ด้วย conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FP Cm primer 5'-TGTCGAGGGCATGTTGCACG-3 / RP Cm primer 5'-GGAGACAGAATTGACCAATGAT-3 ที่เฉพาะเจาะจงกับ แบคทีเรียกลุ่ม *Clavibacter michiganensis* (Bach et al.,2003) และ Real-Time PCR โดยใช้ probe ที่ได้คัดเลือกไว้

4. การสกัด genomic DNA และทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real-Time PCR

การสกัด genomic DNA

การแยก genomic DNA แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher et al. (1989) โดยใช้แบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรีย ให้เต็มหนึ่งลูป ละลายใน 1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไป

ปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่มีส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate–EDTA–Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น-20 °C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาทีเติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วย เครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C จำนวน 378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บ ตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วง คลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อ นำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real-Time PCR

โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real Time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการ ทำปฏิกิริยาในแต่ละช่วงเวลา ทดสอบสภาวะที่เหมาะสม ของ Real time PCR

5. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real Time PCR

ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เป็นการทดสอบ primer ที่สังเคราะห์ไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะของ primer โดยใช้ DNA เชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีรายงานทำให้เกิดโรคน้ำมันฝรั่ง ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และทดสอบความไวในการ ตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (sensitivity) ของ primer โดยใช้ สภาพที่เหมาะสมที่ได้ จากข้อ 3 โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม

6. ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp.

sepedonicus จากหัวพันธุ์ฝรั่งที่นำเข้า

ทำการสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์ฝรั่งนำเข้าจากด่านตรวจพืช จำนวน 0.1% นำมาผ่าดูลักษณะ อาการของโรคเน่าวงแหวน ตัดเอาส่วนท่อน้ำท่ออาหารของตัวอย่างมาใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge ที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียด นำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็น เวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ทิ้งส่วนตะกอน นำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจเชื้อบนอาหาร semi-selective for *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

เวลาและสถานที่

เวลา	ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562
สถานที่	ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียม DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

สืบค้นยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จาก Gen Bank :ซึ่งเป็นยีนที่ใช้สำหรับออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้รายละเอียดดังนี้

ชื่อแบคทีเรีย	Accession number
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> LMG 2889	U09382
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> LMG 2901	JN613837
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> K0090	HM181750

ดำเนินการสังเคราะห์ของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากบริษัท Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH ประเทศเยอรมันนี้ เพื่อนำมาใช้เป็น DNA positive control เพื่อดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ต่อไป

2. การคัดเลือก probe สำหรับ Real-Time PCR

สืบค้นข้อมูล probe สำหรับ Real-Time PCR ที่ใช้สำหรับตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่ได้มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนของมันฝรั่งได้ดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* คัดเลือกได้ Cms probe ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ตามรายงานของ Bach et al (2003) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

Cms probe FAM -5' TTCCGTCGTCCTTGAGTGGAT3' -TAMRA

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ probe ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการทดสอบการสภาพที่เหมาะสมและการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนโดยวิธี Real time PCR ต่อไป

3. การทดสอบ DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

ทดสอบ DNA positive control ที่สังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ด้วย conventional PCR และ Real-Time PCR ผลการทดสอบพบว่า การทดสอบด้วย conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FP Cm/RP Cm primer ที่เฉพาะเจาะจงกับ แบคทีเรียกลุ่ม *Clavibacter michiganensis* พบว่าดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อ 3 สายพันธุ์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 bp ได้แก่ สายพันธุ์ LMG 2889, LMG 2901 และ K0090 (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับผลทดสอบด้วย Real-Time PCR โดยใช้ Cms probe ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อ 3 สายพันธุ์ จึงใช้ดีเอ็นเอสังเคราะห์

ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็น DNA positive control สำหรับทดลองต่อไป

4. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

ผลการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR สำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

นำดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* มาวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul ทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) ในการทำปฏิกิริยาจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Thailand), 0.25 uM primer, 0.25 uM probe, น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 1 ไมโครลิตร โดยมีรายละเอียดโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	95	00:10:00	4.40	none
Amplification	40	95	00:00:20	4.40	none
		66	00:01:00	2.20	none
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

5. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR

ผลทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยใช้ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ไว้

การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เท่านั้นไม่เพิ่มกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง จำนวน 10 ไอโซเลท ที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 2)

การทดสอบความไว โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม ผลการทดสอบพบว่า สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 25 pg/ ปฏิกิริยา (ภาพที่ 3)

6. ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้า

สุ่มเก็บตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย จำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อแยกเชื้อและตรวจด้วย Real time PCR ผลการแยกเชื้อไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากนั้นดำเนินการตรวจเชื้อที่แยกได้และนำส่วนบนที่เป็นน้ำใสจากตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่หลอด ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้และตัวอย่างมันฝรั่งที่นำเข้า

จากออสเตรเลีย 12 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (ภาพที่ 4)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีดีเอ็นเอของเชื้อที่ส่งส่งเคราะห์บางส่วนของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จำนวน 4 สายพันธุ์ เพื่อนำมาเป็น DNA positive control

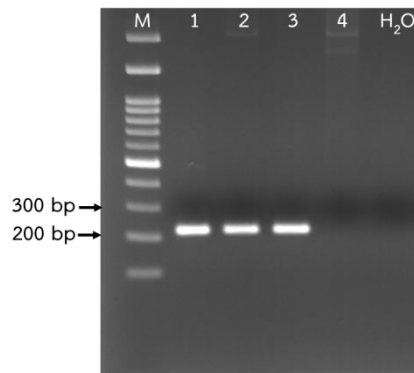
การสืบค้นข้อมูลลำดับ nucleotide ของยีนที่สำคัญของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ใน GenBank เพื่อนำมาออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* พบว่ายีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือ ยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic space

การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เท่านั้น ไม่เพิ่มกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรครากเน่าและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง จำนวน 10 ไอโซเลท ที่ใช้ทดสอบ การทดสอบความไว โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม พบว่า สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 25 pg/ ปฏิกริยา

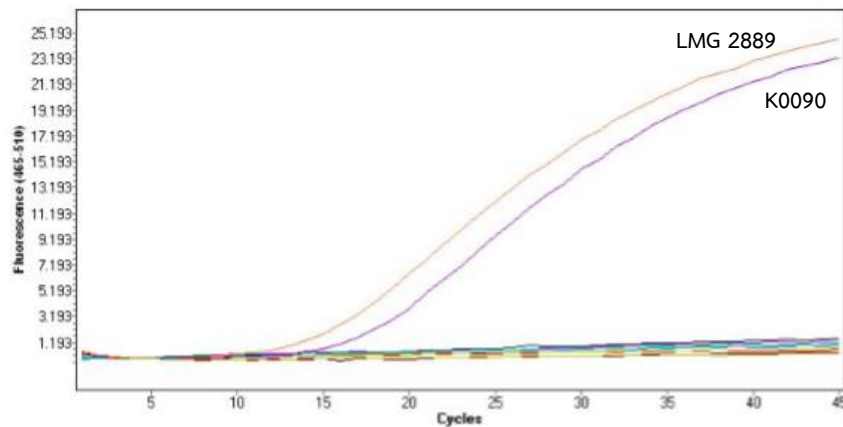
สุ่มเก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย จำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อแยกเชื้อและตรวจด้วย Real time PCR ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ผลการตรวจเชื้อที่แยกได้และนำส่วนบนที่เป็นน้ำใสของตัวอย่างมันฝรั่งที่นำเข้าจากออสเตรเลีย 12 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

เอกสารอ้างอิง

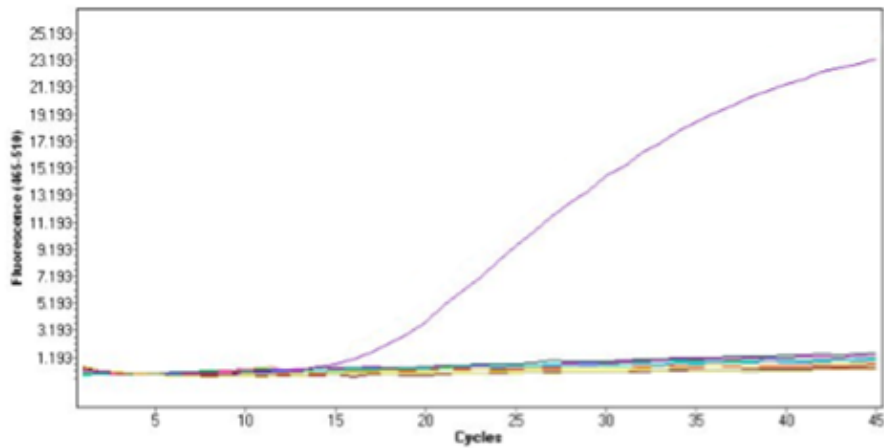
- Gudmestad, N.C., I. Mallik, J.S. Pasche, N.R. Anderson and K. Kinzer. 2009. A real time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulose A gene sequence. Plant Dis. 93:649-659.
- Mavrodieva, V., L. Levy and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for realtime polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. Phytopathology 94:61-68.
- Higuchi, R., G. Dollinger, P.S. Walsh and R. Griffith. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology (NY) 10:413-417.
- Reischi, U. and B. Kochanowski. 1999. Quantitative PCR. In Method in Molecur Medicine: Quantitative PCR Protocol. Edited by Kochanowski B. and Reischi, U. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pp 3-30



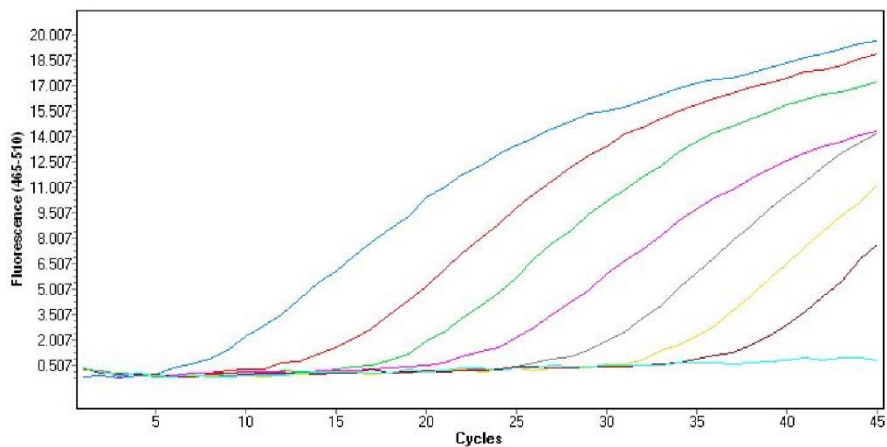
ภาพที่ 1 แสดงผลทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ด้วย conventional PCR โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน OneMark 100
 ช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* LMG 2889
 ช่อง 2 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* LMG 2901
 ช่อง 3 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* K0090
 ช่อง 4 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* Ac-1405



ภาพที่ 2 แสดงผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับแบคทีเรียชนิดอื่นที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*



ภาพที่ 3 แสดงผลทดสอบความไวของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*



ภาพที่ 4 แสดงผลการตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากประเทศด้วย Real time PCR

การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*
จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเทคนิค Real time PCR
Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* from
Corn seeds import from United States of America by Real time PCR

ณัฐจิมา โฆษิตเจริญกุล^{1/} ทิพวรรณ กันหาญาติ^{1/} รุ่งนภา ทองเครื่อง^{1/} ชลธิชา รักใคร่^{2/}
^{1/}กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/}กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Goss's Bacterial Wilt (corn) or Leaf Blight of corn caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* is a major disease of corn and has an original and epidemic source in the United States. This bacterium will be transmitted through seed (seed transmission) and is a quarantine pest of Thailand. Thailand has imported corn seeds from the United States for seed production. There is a risk that the bacteria *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* will be contaminated with seeds. The objective of this experiment to develop the detection of *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* by real time PCR. Real time PCR is an efficient and rapid method for detecting

C. michiganensis subsp. *nebraskensis*. The primer, Cmn probe was designed based on the intergenic spacer region of the 16S–23S rRNA genes of *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*. However, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* has not been found in Thailand. Therefore, it is necessary to synthesize the DNA of the 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer gene of *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* as a DNA positive control for specificity and sensitivity testing. The results showed that Cmn probe primer was only specific with *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* and able to detect the lowest concentration of DNA at 50 pg / reaction. The result of the detection of *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* from corn seeds that imported from the United States using Real-time PCR showed that not found *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*.

Keywords: bacterial detection, Goss's Bacterial Wilt, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, Real-time PCR

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-00-02-60

บทคัดย่อ

โรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) หรือ โรคใบไหม้ (Leaf Blight of corn) โรคที่สำคัญของข้าวโพดและเป็นศัตรูกักกันพืชของประเทศไทย เชื้อสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีแหล่งกำเนิดดั้งเดิมและระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์ (seed transmission) ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้มีความเสี่ยงที่แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ด้วยวิธี real time PCR ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องสังเคราะห์ดีเอ็นเอส่วนของยีน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เพื่อนำมาเป็น DNA positive control การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cmn probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เท่านั้น ไม่เพิ่มกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Clavibacter* spp. และแบคทีเรียอื่นๆ ที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ทดสอบ การทดสอบความไว พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 50 pg/ ปฏิบัติการ ผลการสุ่มตรวจเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาด้วยวิธี Real time PCR ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ในตัวอย่างที่ตรวจ

คำหลัก: การตรวจสอบแบคทีเรียโรคพืช โรคเหี่ยวข้าวโพด

คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตข้าวโพดที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีพื้นที่ปลูกประมาณ 7 ล้านไร่ ประเทศไทยนำเข้าเมล็ดข้าวโพดเพื่อการบริโภคและใช้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม สำหรับใช้ในประเทศและส่งออกไปยังประเทศต่างๆ โดยในปี 2556 มีปริมาณการนำเข้า ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ จำนวน 182,174,288 กิโลกรัม/ปี มูลค่าการนำเข้า 751,421,853 บาท มีปริมาณการส่งออกข้าวโพด 561,133,133 กิโลกรัมต่อปี มูลค่าการส่งออกประมาณ 4,138,610,061 ล้านบาท (ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทำให้มีความเสี่ยงในการเป็นเส้นทาง (pathway) ของศัตรูพืชกักกันที่สำคัญที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ โรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) หรือ โรคใบไหม้ (Leaf Blight of corn) โรคที่สำคัญของข้าวโพดและเป็นศัตรูกักกันพืชของประเทศไทย เชื้อสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีแหล่งกำเนิดดั้งเดิมในประเทศสหรัฐอเมริกา พบระบาดอย่างกว้างขวางในประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์ (seed transmission) ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีมูลค่าการนำเข้า 85,984,962 บาท ทำให้มีความเสี่ยงที่แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพจึงมีความ

จำเป็นที่ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรียศัตรูกักกันเพื่อป้องกันไม่ให้แบคทีเรียศัตรูกักกันเข้ามาในประเทศไทย การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยวิธี real time PCR ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถตรวจหาแบคทีเรียพบในปริมาณน้อย เป็นที่ยอมรับจากประเทศนำเข้า และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าจากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าได้ การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* สาเหตุโรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) ของข้าวโพด ได้มีการพัฒนาโดย Gross and Vidaver (1979) ได้รายงานการใช้อาหารที่เหมาะสม semi-selective medium CNS ในการแยกแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากตัวอย่างพืชและดิน โดยจะได้แบคทีเรียโคโลนีสีเหลืองอมส้ม มีเมือก ขอบเรียบ เป็นประกาย โคโลนีมีผิวคล้ายเนย มีขนาด 4 มม.หลังจาก 6 วันที่ยอดหมุม 25 องศาเซลเซียส Pstrik and Rainey (1999) ได้ศึกษาการจัดจำแนกและความแตกต่างของแบคทีเรียในกลุ่ม *C. michiganensis* species โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ทำให้ได้ primer ที่เฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียในกลุ่ม *C. michiganensis* โดยสามารถแยกความแตกต่างของ 5 ชนิดได้ด้วยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้ขนาด 502 bp, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ขนาด 210 bp, *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* ขนาด 393 bp, *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* ขนาด 587 bp และ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ขนาด 393 bp .Ye et.al. (2014) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้า โดยได้พัฒนาวิธี nested PCR ใช้ primer CM1/CM4 และ PSM1/CM3 พบว่าสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ระดับดีเอ็นเอในปริมาณต่ำสุดที่ตรวจได้ที่ 8 fg และในระดับเซลล์แบคทีเรียได้ 6.8 CFU และมีความไวในการตรวจมากกว่าเทคนิค PCR ด้วย primer PSM1/CM3 ผลจากการสุ่มตรวจเมล็ดพันธุ์ 100 เมล็ดที่นำเข้ามาจากสหรัฐอเมริกา วิธี nested PCR สามารถตรวจพบ 24% ส่วนเทคนิค PCR ตรวจได้เพียง 8% เท่านั้น ซึ่งวิธีการตรวจสอบสามารถใช้เป็นวิธีการประจำในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้า เทคนิค Real time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาจากข้อจำกัดของเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ (Quantitative) เห็นผลได้แบบทันที (real time & on line) บนหน้าจอคอมพิวเตอร์ (Higuchi et al., 1992) ในขณะที่ เทคนิค PCR ไม่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ และการวิเคราะห์ผลต้องทำในแผ่นวุ้นใช้เวลานานและ ย้อมด้วยสาร ethidium bromide ที่อันตราย (Reischl and Kochanowski, 1999) เทคนิค Real time PCR เป็นการพัฒนานำเทคโนโลยี 2 ส่วน ได้แก่ การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจหาดีเอ็นเอใน สารละลายโดยใช้สารเรืองแสง (Fluorescence reporters) ต่างๆ และการใช้เครื่อง thermocycler ซึ่งเป็นเครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนดมารวมกันเป็นเครื่อง Real time themocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของชิ้นดีเอ็นเอ และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้น ณ เวลานั้นๆ (Higuchi et al., 1992) Gudmestad et al. (2004) ได้มีการออกแบบไพรเมอร์จากยีน cellulaseA (CelA) gene sequence เพื่อใช้กับเทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อรับรองหัวพันธุ์ในอุตสาหกรรมการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในประเทศสหรัฐอเมริกา ไพรเมอร์ CelA มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp.

sepedonicus มีความไวในการตรวจมากกว่าไพรเมอร์อื่น ได้แก่ CMS50/72a โดยสามารถตรวจได้ในระดับ 10 เซลล์/ml การตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยเทคนิค Real time PCR ด้วยไพรเมอร์ CelA เป็นวิธีการที่ให้ผลการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ แม่นยำ และรวดเร็ว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่อง Thermocycler (Biometra ®)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. เมล็ดข้าวโพด

วิธีการ

1. การเตรียม DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องสังเคราะห์ยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เพื่อนำมาใช้เป็น DNA positive control เพื่อดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ต่อไป

2. การคัดเลือก specific primer

สืบค้นข้อมูล primer ที่มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจโรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) หรือโรคใบไหม้ (Leaf Blight of corn) ได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* คัดเลือก primer จากนั้นนำลำดับเบสของ primer ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคโดยวิธี Real time PCR ต่อไป

3. การสกัด genomic DNA และทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

การสกัด genomic DNA

การแยก genomic DNA แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้แบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูบฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรีย ให้เต็มหนึ่งลูบ 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 ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate-EDTA-Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น-20 °C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วย

เครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20°C จำนวน 378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อ นำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

โดยการหา T_m ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสมตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาในแต่ละช่วงเวลา ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR

4. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR

ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เป็นการทดสอบ primer ที่สังเคราะห์ไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะของ primer โดยใช้ DNA เชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพิษที่มีรายงานทำให้เกิดโรคในข้าวโพด ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และทดสอบความไวในการตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* (sensitivity) ของ primer โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้ จากข้อ 3 โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม

5. ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp.

nebraskensis จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้า

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าจากด่านตรวจพืชตามวิธีของ ASTA นำมาบดแล้วที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียด นำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ทิ้งส่วนตะกอน นำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจเชื้อบนอาหาร semi-selective for *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*

- เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียม DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*

สืบค้นยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จาก Gen Bank :ซึ่งเป็นยีนที่ใช้สำหรับออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ได้รายละเอียดดังนี้

ชื่อแบคทีเรีย	Accession number
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> ATCC27794	JX216836
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> NCPPB2578	JX216839

ดำเนินการสั่งสังเคราะห์ของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากบริษัท Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH ประเทศเยอรมันนี้ เพื่อนำมาใช้เป็น DNA positive control เพื่อดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ต่อไป

2. คัดเลือก specific primer

ดำเนินการสืบค้นข้อมูลลำดับ nucleotide ของยีนที่สำคัญของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ใน GenBank เพื่อนำมาออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยพบว่ายีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือ ยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer โดยได้ไพรเมอร์ดังนี้

FP Cm primer 5'-TGTCGAGGGCATGTTGCACG-3'

RP Cm primer 5'-GGAGACAGAATTGACCAATGAT-3'

Cmn probe FAM -5' TTCCGTCGTCCTTTCGTGGATG 3' -TAMRA

3. การสกัด genomic DNA และทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

ทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ด้วย conventional PCR พบว่าดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อสายพันธุ์ NCPPB2578 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 bp (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับผลทดสอบด้วย real time PCR จึงใช้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อสายพันธุ์ NCPPB2578 เป็น DNA positive control สำหรับทดลองต่อไป

ผลการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR สำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

นำดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* มาวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul ทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) ในการทำปฏิกิริยาจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Thailand), 0.25 uM primer, 0.25 uM probe, น้ำ

กลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 1 ไมโครลิตร โดยมีรายละเอียดโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	95	00:10:00	4.40	none
Amplification	40	95	00:00:20	4.40	none
		66	00:01:00	2.20	none
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

4. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR

การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cmn probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เท่านั้น ไม่เพิ่มกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Clavibacter* spp. และแบคทีเรียอื่นๆ ที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 2)

การทดสอบความไว โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม ผลการทดสอบพบว่า สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 50 pg/ ปฏิกิริยา (ภาพที่ 3)

5. ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้า

สุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อแยกเชื้อและตรวจด้วย Real time PCR ผลการแยกเชื้อไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากนั้นดำเนินการตรวจเชื้อที่แยกได้และนำส่วนบนที่เป็นน้ำใสจากตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่หลอด ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้และเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา 10 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* (ภาพที่ 4)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศ โดยการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นดีเอ็นเอของเชื้อที่ส่งสังเคราะห์บางส่วนของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จำนวน 1 สายพันธุ์ เพื่อนำมาเป็น DNA positive control

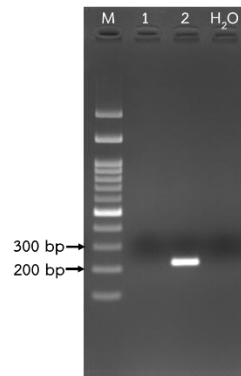
การสืบค้นข้อมูลลำดับ nucleotide ของยีนที่สำคัญของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ใน GenBank เพื่อนำมาออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* พบว่ายีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือ ยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic space

การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เท่านั้น ไม่เพิ่มกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Clavibacter* spp. และแบคทีเรียอื่นๆ ที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด จำนวน 10 ไอโซเลท ที่ใช้ทดสอบ การทดสอบความไว โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม พบว่า สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 50 pg/ ปฏิกริยา

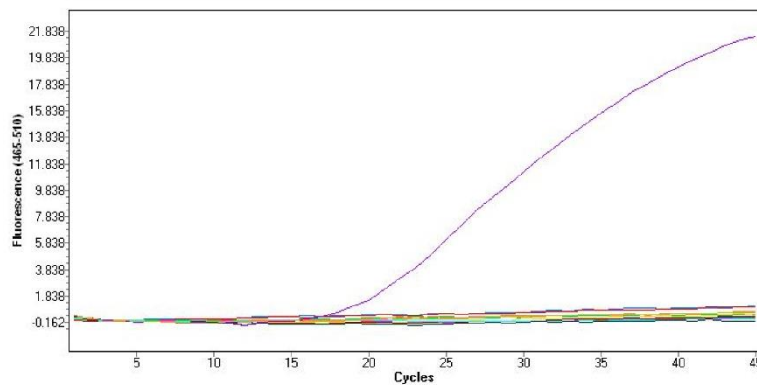
สุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อแยกเชื้อและตรวจด้วย Real time PCR ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ผลการตรวจเชื้อที่แยกได้และนำส่วนบนที่เป็นน้ำใสของเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา 10 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*

เอกสารอ้างอิง

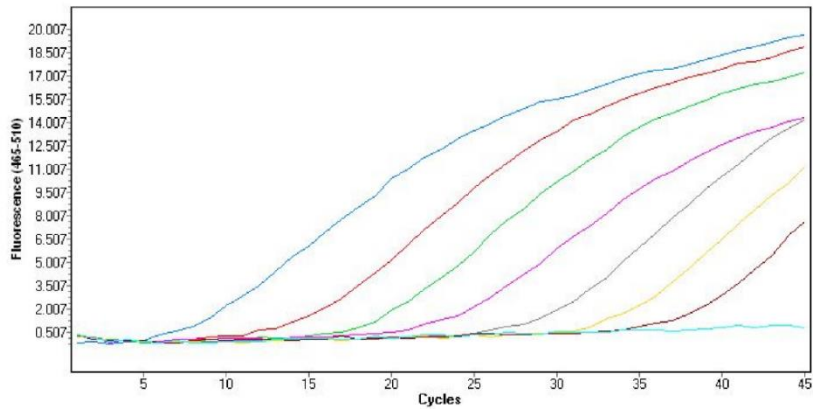
- CAB International. 2007. Crop Protection Compendium 2007 Edition. (Computer Program).CAB International. Wallingford, UK.
- Gross DC, Vidaver AK, 1979. A selective medium for isolation of *Corynebacterium nebraskense* from soil and plant parts. *Phytopathology*, 69(1):82-87
- Gudmestad, N. C., Mallik, I., Pasche, J. S., Anderson, N. R., and Kinzer, K. 2009. A real-time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulose A gene sequence. *Plant Dis*. 93:649-659.
- Higuchi, R., Dollinger, G, Walsh, P.S. and Griffith, R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10:413-417.
- Pastrik K- H and Rainey FA. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction- based techniques. *Journal of Phytopathology* 147, 687-693..
- Reischi, U. and Kochanowski B. 1999. Quantitative PCR. In *Method in Molecur Medicine: Quantitative PCR Protocol*. Edited by Kochanowski B. and Reischi, U. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pp 3-30.
- YE Lu-fei, SU Han, ZHOU Guo-liang, YIN Li-ping, LI Xiao-jun, YANG Sai-jun, YI Jian-ping, 2014. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in imported corn by PCR. *ACTA Phytopathological sinica* 44(2) 121-128.



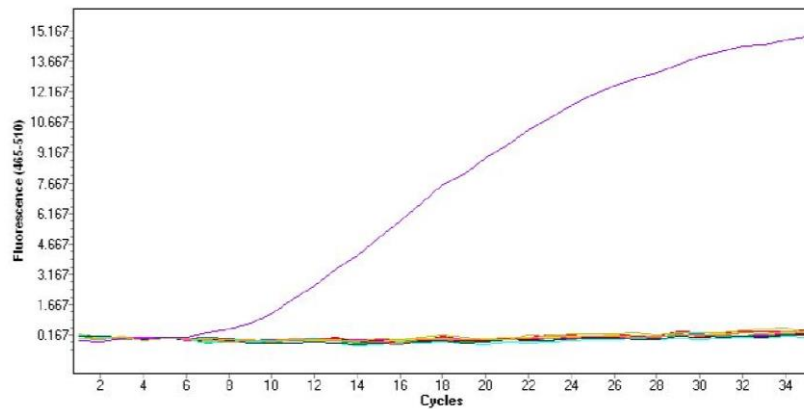
ภาพที่ 1 แสดงผลทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ด้วย conventional PCR โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน OneMark 100
 ช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ATCC27794
 ช่อง 2 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* NCPPB2578



ภาพที่ 2 แสดงผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับแบคทีเรียในกลุ่ม *Clavibacter* spp. และแบคทีเรียอื่นๆ ที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดพบว่าไพรเมอร์ Cmn probe มีความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*



ภาพที่ 3 แสดงผลทดสอบความไวของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*



ภาพที่ 4 แสดงผลการตัวอย่างหัวพันธุ์เมล็ดข้าวโพดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาด้วย Real time PCR

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* ในข้าว
ด้วยเทคนิค Real-Time PCR

Detection of *Burkholderia glumae* in Rice by Real-Time PCR

ทิพวรรณ กันหาญาติ ณีฎฐิมา โฆษิตเจริญกุล บุรณี พัวพงษ์แพทย์
รุ่งนภา ทองเคิ่ง กาญจนา ศรีไม้
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สืบค้นข้อมูลและทดสอบสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Real-Time PCR สำหรับตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* ในข้าว ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560 – กันยายน 2562 พบรายงานไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจเบื้องต้นจำนวน 4 คู่ ดำเนินการทดสอบและคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ได้เฉพาะเจาะจง จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ คือ GL-13F/GL-14R, Forward/Reverse และ Glu-FW/Glu-RW ส่วนคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R ไม่เฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *B. glumae* เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 138 bp ของเชื้อ *B. gladioli* ได้ด้วย ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค Real-Time PCR และได้สถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Real-Time PCR ของคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R และคู่ไพรเมอร์ Forward/Reverse

คำหลัก : การตรวจสอบ โรครวงไหม้ ข้าว

คำนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรครวงไหม้ (bacterial panicle blight) ของข้าว พบรายงานครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่นและแพร่ระบาดในพื้นที่ปลูกข้าวของหลายประเทศทั่วโลก โดยเชื้อสร้างความเสียหายทำให้ผลผลิตของข้าวลดลงสูงสุดถึง 75 % (Trung *et al.*, 1993) สำหรับในประเทศไทยยังไม่พบรายงานการเกิดโรคจากเชื้อชนิดนี้ แต่เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สามารถติดไปกับเมล็ด (seed-borne) และเชื้อสามารถเจริญได้ถึงแม้มีอุณหภูมิสูงถึง 41 องศาเซลเซียส จึงทำให้เป็นที่กังวลของหลายประเทศเพราะเริ่มมีรายงานการแพร่ระบาดของโรครวงไหม้ในประเทศเขตร้อนและกึ่งร้อนมากขึ้น (Ham *et al.*, 2011) หากเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ในไทยย่อมส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจเนื่องจากข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญของประเทศไทยซึ่งมีพื้นที่ปลูกประมาณ 62 ล้านไร่กระจายอยู่ทั่วประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) แบคทีเรีย *B. glumae* จึงนับเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งทางด้านการกักกันพืชที่ต้องมีการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเคลื่อนย้ายหรือนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวจากประเทศที่มีการระบาดของโรค ดังนั้นการหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ จะสามารถลดโอกาสการแพร่ระบาดของเชื้อที่อาจติดมากับเมล็ดได้ จากรายงานของ Nandakumar *et al.* (2009) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* เป็นสาเหตุอาการโรครวงไหม้ในข้าวได้เช่นเดียวกัน ทำให้การตรวจสอบในเบื้องต้นโดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อและลักษณะอาการของโรคทำได้ยากขึ้น เทคนิค real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) เป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่มีประสิทธิภาพ ตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว 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. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
8. เครื่องชั่ง
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) บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขึ้นตอนตามแนะนำของบริษัท โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 ลูบ ละลาย ในบัฟเฟอร์ 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 รอบต่อ นาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อ นาที นาน 1 นาที แล้วเติม บัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อ นาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้ว เติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อ นาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์และทดสอบสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค Real-Time PCR ใน การตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae*

2.1 สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวได้อย่าง เฉพาะเจาะจง และคัดเลือกเพื่อส่งสังเคราะห์สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Real-Time PCR ต่อไป โดยมีรายงานไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจเบื้องต้นจำนวน 4 คู่ ดังนี้

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
BG1F	CCGCGCTGTTTCATGAGGGATAA	138	Kim <i>et al.</i> (2012)
BG1R	CGGGCGGAACGACGGTAAGT		
Forward	ACGTTTCAGGGATRCTGAGCAG	282	Sayler <i>et al.</i> (2006)
Reverse	AGTCTGTCTCGCTCTCCCGA		
Glu-FW	GAAGTGTCGCCGATGGAG	529	Maeda <i>et al.</i> (2006)
Glu-RW	CCTTCACCGACAGCACGCAT		
GL-13f	ACACGGAACACCTGGGTA	400	Takeuchi <i>et al.</i> (1997)
GL-14r	TCGCTCTCCCGAAGAGAT		

2.2 ทดสอบสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค Real-Time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย

B. glumae

ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค Real-Time PCR โดยใช้ไพรเมอร์เบื้องต้นจำนวน 4 คู่ ทำการทดสอบปฏิกิริยา Real-Time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) โดยใช้ชุดน้ำยา LightCycler 480 SYBR green I master (Roche Diagnostics, Thailand) ในการทำปฏิกิริยาจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X LightCycler 480 SYBR Green I Master (Faststart Taq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP, SYBR green dye และ MgCl₂), 0.25 uM primer และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* 1 ไมโครลิตร โดยมีขั้นตอนดังนี้ initial-denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที, denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที, annealing 63 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 45 รอบ) และ final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า melting temperature (Tm) ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 72-95 องศาเซลเซียส โดยเพิ่ม 0.1 องศาเซลเซียส/วินาที เมื่อสิ้นสุดให้ลดอุณหภูมิลงที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที โดยมีรายละเอียดโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยา Real-Time PCR ในเบื้องต้นดังนี้

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

การรายงานผลการมีหรือไม่มีผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายได้จากการวิเคราะห์ค่า Cp และ melting curve เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก International Rice Research Institute (IRRI)

เวลาและสถานที่

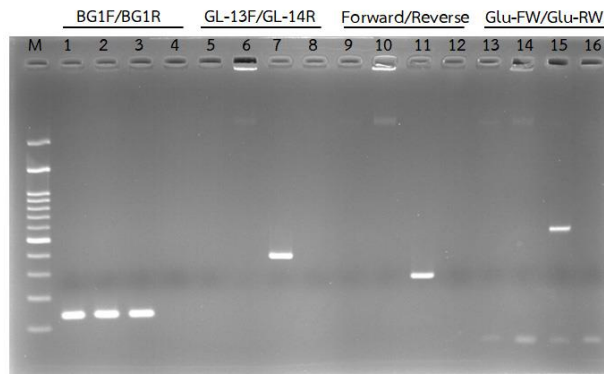
เวลา	ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562
สถานที่	ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลองและเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ที่เก็บรักษาไว้

ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาพันธุ์ 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 เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้อัตุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



2. สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์และทดสอบสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค Real-Time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae*

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวได้อย่างเฉพาะเจาะจง และส่งผลกระทบต่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Real-Time PCR โดยมีรายงานไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจเบื้องต้นจำนวน 4 คู่ ดำเนินการทดสอบและคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ได้เฉพาะเจาะจง จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ คือ GL-13F/GL-14R, Forward/Reverse และ Glu-FW/Glu-RW ส่วนคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R ไม่เฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *B. glumae* เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 138 bp ของเชื้อ *B. gladioli* pv. *gladioli* ได้ด้วยทดสอบคู่ไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae*

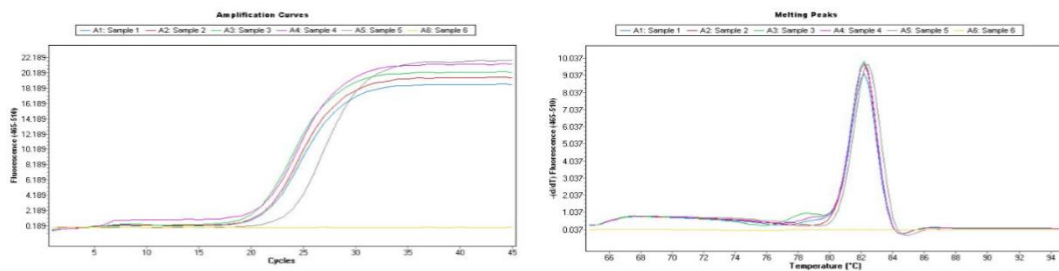
- โดย ช่อง M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน OneMark 100
- ช่อง 1 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*
- ช่อง 2 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*
- ช่อง 3 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. glumae*
- ช่อง 4 คือ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ
- ช่อง 5 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*
- ช่อง 6 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*
- ช่อง 7 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. glumae*
- ช่อง 8 คือ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ
- ช่อง 9 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*
- ช่อง 10 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*
- ช่อง 11 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. glumae*
- ช่อง 12 คือ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ
- ช่อง 13 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*
- ช่อง 14 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli*

ช่อง 15 คือ เชื้อแบคทีเรีย *B. glumae*

ช่อง 16 คือ น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

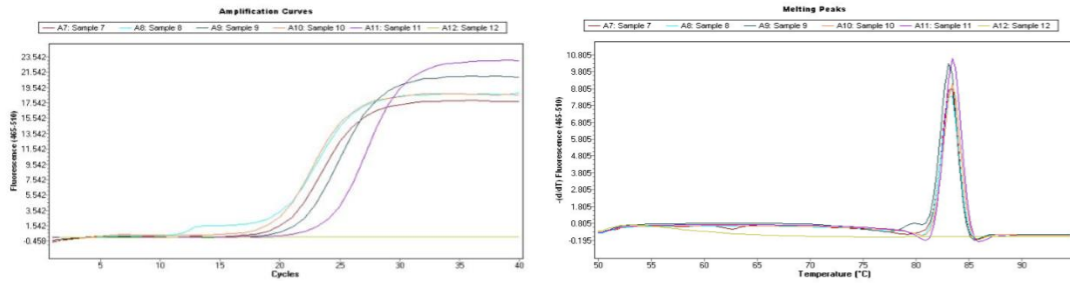
ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค Real-Time PCR พบว่าคูไพรเมอร์ BG1F/BG1R มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Real-Time PCR ดังนี้

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	40	95	00:00:10	4.40	none
		63	00:00:20	2.20	none
		72	00:00:30	4.40	none
Melting curve	1	95	00:00:05	4.40	none
		65	00:01:00	2.20	none
		95	00:00:00	0.10	continuous
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none



คูไพรเมอร์ Forward/Reverse มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา 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	40	95	00:00:10	4.40	none
		63	00:00:20	2.20	none
		72	00:00:30	4.40	none
Melting curve	1	95	00:00:05	4.40	none
		65	00:01:00	2.20	none
		95	00:00:00	0.10	continuous
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none



สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวได้อย่างเฉพาะเจาะจง และสั่งสังเคราะห์ โดยมีรายงานไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจเบื้องต้นจำนวน 4 คู่ ดำเนินการทดสอบและคัดเลือกไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ได้เฉพาะเจาะจงจำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ คือ GL-13F/GL-14R, Forward/Reverse และ Glu-FW/Glu-RW ส่วนคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R ไม่เฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *B. glumae* เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 138 bp ของเชื้อ *B. gladioli* ได้ด้วย ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR และได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา real-time PCR ของคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R และคู่ไพรเมอร์ Forward/Reverse

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.
- Maeda Y., H. Shinohara, A. Kiba, K. Ohnishi, N. Furuya, Y. Kawamura, T. Ezaki, P. Vandamme, S. Tsushima and Y. Hikichi. 2006. Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii*, *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using gyrB and rpoD sequences. *Int J Syst Evol Microb*, 56: 1031–1038.
- Nandakumar, R., A. Shahjahan, X. Yuan, E. Dickstein, D. Groth, C. Clark and R.R. Cartwright. 2009. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Dis.* 93: 896-905.
- Sayler, R.J., R.D. Cartwright and Y.N. Yang. 2006. Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. *Plant Dis.* 90: 603–610.

- Takeuchi, T. , H. Sawada, F. Suzuki and I. Matsuda. 1997. Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by PCR using primers selected from the 16S-23S rDNA spacer regions. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63: 455-462.
- Trung, H.M., N.V. Van, N.V. Vien, D.T. Lam and M. Lien. 1993. Occurrence of rice grain rot disease in Vietnam. *Int Rice Res Notes* 18: 30.

พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

Detection of *Ralstonia solanacearum* Species Complex cause of Bacterial Wilt Disease of Banana

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

รายงานความก้าวหน้า

สืบค้นข้อมูลและทดสอบสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา PCR สำหรับตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2560 – กันยายน 2562 พบรายงานไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจเชื้อเบื้องต้นจำนวน 3 ชุด มีไพรเมอร์ 7 คู่ ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย พบว่าไพรเมอร์ 759/760 และไพรเมอร์ 121F/121R สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยได้เฉพาะเจาะจง

คำหลัก : การตรวจสอบ โรคเหี่ยว กล้วย

คำนำ

โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นโรคพืชที่มีความสำคัญมาก โรคหนึ่งของกล้วยเนื่องจากก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงแก่พืชจนไม่สามารถให้ผลผลิตได้ โดยเฉพาะในโคลอมเบียทำความเสียหายสูงถึง 100% (Álvarez *et al.*, 2015) ในเอเชียพบการแพร่ระบาดของโรคครั้งแรกที่ประเทศฟิลิปปินส์ (Rillo, 1979) ประเทศอินเดีย (Mondal *et al.*, 2012) และต่อมาพบที่ประเทศมาเลเซีย (Zulperi and Sijam, 2014) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้ในกล้วย (วนิดา, 2542) แต่เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกกล้วยเพื่อบริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกกระจายอยู่ทั่วทั้งประเทศ (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) และมีรายงานการระบาดของโรคเหี่ยวของกล้วยที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียในประเทศเพื่อนบ้านที่มีชายแดนติดกับประเทศไทย จึงต้องหาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่เฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ 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

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-01-00-05-62

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
8. เครื่องซั่ง
9. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยา PCR

วิธีการ

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกสกัด ดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขั้นตอนตามแนะนำของบริษัท โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 ลูก ละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นเติมด้วย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. คัดเลือกไพรเมอร์และทดสอบสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

2.1 สืบค้นข้อมูลและคัดเลือกไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยได้อย่างเฉพาะเจาะจง และคัดเลือกเพื่อส่งสังเคราะห์สำหรับการใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ต่อไป โดยมีรายงานคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจเชื้อเบื้องต้น ดังนี้

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
759	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC	281	Opina <i>et al.</i> (1997)
760	GTCGCCGTGAGCAATGCGGAATCG		
93F	CGCTGCGCGGCCGTTTCAC	477	Cellier <i>et al.</i> (2015)
93R	CGGTGCGGGCATGGGCTTGG		
5F	GCGCGGAGGCTGGTGATGT	661	
5R	TGGGTTTCGAGGCGGACAGC		
Nmult21:1F	CGTTGATGAGGCGCGCAATTT	144	Fegan and Prior (2005)
Nmult21:2F	AAGTTATGGACGGTGAAGTC	372	
Nmult23:AF	ATTACSAGAGCAATCGAAAGATT	91	
Nmult22:InF	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA	213	
Nmult22:RR	TCGCTTGACCCTATAACGAGTA		

2.2 ทดสอบภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 50 ng/μl, 1X One PCR Master Mix (GeneDirex® Inc., Taipei, Taiwan) และไพรเมอร์ 0.5 μM เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische 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 มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UVITEC Cambridge Platinum (Uvitec Ltd., Cambridge, UK)

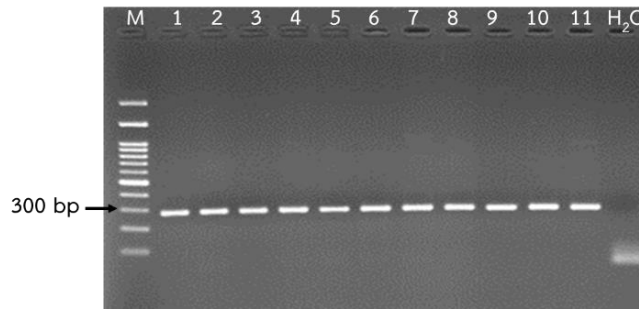
เวลาและสถานที่

เวลา	ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562
สถานที่	ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลองและเก็บรักษาไว้ในแหล่งเก็บจุลินทรีย์ของกลุ่มวิจัยโรคพืชมาฟื้นฟู 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 คู่ ในการสกัดดีเอ็นเอขึ้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท เก็บรักษาดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. คัดเลือกไพรเมอร์และทดสอบภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

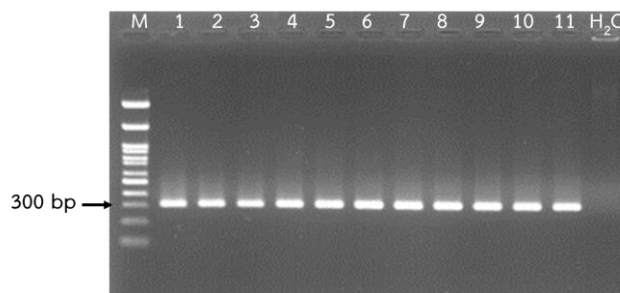
สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยได้อย่างเฉพาะเจาะจง และสั่งสังเคราะห์สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR โดยมีรายงานไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจเชื้อเบื้องต้นจำนวน 3 ชุด มีไพรเมอร์ 7 คู่ ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย พบว่ามีไพรเมอร์ 759/760 ตามรายงานของ Opina *et al.* (1997) และ 121F/121R ตามรายงานของ Tan (2003) สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยได้เฉพาะเจาะจง

ไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)

ไพรเมอร์ 121F/121R (Tan, 2003)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยได้อย่างเฉพาะเจาะจง และสั่งสังเคราะห์สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR โดยมีรายงานไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจเชื้อเบื้องต้นจำนวน 3 ชุด มีไพรเมอร์ 7 คู่ ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์สำหรับตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย พบว่ามีไพรเมอร์ 759/760 ตามรายงานของ Opina *et al.* (1997) และ 121F/121R ตามรายงานของ Tan (2003) สามารถใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยได้เฉพาะเจาะจง



เอกสารอ้างอิง

- วนิดา ฐิตะฐาน. 2542. โรคเหี่ยวของพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*. 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)
- Cellier, G., A. Moreau, A. Chabirand, B. Hostachy, F. Ailloud and P. Prior. 2015. A Duplex PCR Assay for the Detection of *Ralstonia solanacearum* Phylotype II Strains in *Musa* spp. PLoS ONE 10 (3): e0122182. doi:10.1371/journal.pone.0122182.
- Fegan, M and P. Prior. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex? In: Allen C; Prior P; Hayward AC, eds. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* complex. American Phytopathological Society (APS) Press, St. Paul, MN, USA. p 449–461.
- 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 *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 5: 19-30.
- Rillo, A. R. 1979. Bacterial wilt of banana in the Philippines. *FAO Plant Protect. Bull.* 27: 105–108.
- 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 *Ralstonia solanacearum* Race 2 biovar 1 causing Moko disease of banana in Malaysia. *Plant Dis.* 98: 275. doi: 10.1094/PDIS-03-13-0321-PDN.

การพัฒนาชุดตรวจสอบ Immuno Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย
Xanthomonas campestris pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า
 Development of Immuno-Strip for the Detection of *Xanthomonas*
campestris pv. *campestris* the Causal Agent of Chinese Kale
 Black Rot Disease

รุ่งนภา ทองเครื่อง ภัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
 บุรณี พัววงศ์แพทย์ ทิพวรรณ กันหาญาติ
 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Development of Immuno Strip for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) the causal agent of Chinese kale black rot disease was carried out to obtain the ease, rapid, high efficiency and accuracy of diagnostic method. The experiment was carried out during October 2016 to September 2019. Specific antiserum for Xcc was produced with Membrane protein complex (MPC) the titer was 1:128,000. The IgG was purified by precipitation with saturated ammonium sulfate and dialysis in 0.5x PBS. The concentration of the IgG was 1 mg/ml. The IgG was labelled with Colloidal Gold and painted on conjugated release pad. Goat anti rabbit (GAR) was used for control line and the prepared IgG was used for the test line on S&S-AE 99 nitrocellulose membrane. The test kit was then assembled and tested. The sensitivity of the kit was 10^4 cfu/ml and could detect Xcc in 1:2000 plant sap within 10-15 minutes. The Xcc diagnostic kit obtained from this research will be introduced to Chinese kale farmer for a convenient rapid disease diagnosis for efficient disease management.

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-01-60

บทคัดย่อ

การพัฒนาชุดตรวจสอบ Immuno Strip สำหรับตรวจแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) สาเหตุโรคน้ำดำของคะน้า มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบโรคให้มีความสะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ แม่นยำ และสามารถใช้งานได้ง่าย ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2559 - กันยายน 2562 ผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ Xcc ด้วย Membrane protein complex (MPC) ได้ค่าไตเตอร์เท่ากับ 1:128,000 มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ Xcc เตรียม IgG ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย saturated ammonium sulfate และ dialysis ใน 0.5x PBS วัดความเข้มข้นให้ได้ปริมาณ IgG เท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปติดฉลากด้วยสารละลาย Colloidal Gold ระบายลงบน conjugated release pad ใช้ Goat anti rabbit (GAR) ในการทำ control line ใช้ IgG ที่เตรียมไว้ทำ test line บน nitrocellulose membrane ชนิด S&S-AE 99 ประกอบเป็นชุดตรวจสอบ ผลการทดสอบประสิทธิภาพพบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้ปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร และตรวจเชื้อได้ในน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1: 2,000 ภายในเวลา 10-15 นาที จากงานวิจัยนี้สามารถนำชุดตรวจแบคทีเรีย Xcc ไปแนะนำให้เกษตรกรผู้ปลูกคะน้าใช้งานได้อย่างสะดวก และทราบผลได้รวดเร็ว เพื่อหาแนวทางการป้องกันกำจัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและทันต่อสถานการณ์การระบาดของโรค

คำหลัก : ชุดตรวจแบคทีเรีย อิมมูโนสตริป โรคขอบใบทอง พืชตระกูลกะหล่ำ

คำนำ

โรคขอบใบทองหรือน้ำดำมีสาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* เป็นโรคที่พบได้ทั่วไปและเป็นปัญหามากกับพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งประกอบด้วย บล็อกโคลี (broccoli) กะหล่ำดาว (Brussels sprouts) กะหล่ำปลี (cabbage) กะหล่ำดอก (cauliflower) collards คะน้า (kale) กะหล่ำปม (kohlrabi) มัสตาร์ด (mustard) radish rutabaga และ turnip โรคน้ำดำทำให้ผลผลิตเสียหายค่อนข้างมาก โดยเฉพาะในช่วงที่สภาวะแวดล้อมเหมาะสม พืชจะเริ่มแสดงอาการโรคให้เห็นในส่วนใบ โดยใบจะเริ่มเหลืองจากขอบใบแล้วลามลึกเข้ามาในเนื้อใบจนจรดแกนกลางของใบเป็นรูปตัววี (V) เส้นใบบริเวณนี้จะมีสีน้ำตาลดำ ต่อมาจะเกิดอาการแห้งจากขอบใบ ใบเหี่ยวเฉาและหลุดจากต้น เมื่อตัดลำต้นตามขวางจะพบว่าส่วนที่เป็นท่อน้ำ (xylem) เนามีสีดำ ในระยะกล้าที่งอกใหม่ๆ จะเกิดอาการน้ำดำที่ขอบใบเลี้ยง ต่อมาใบเลี้ยงจะเหี่ยวและต้นกล้าตาย นอกจากอาการดังกล่าวแล้ว บางครั้งพบอาการแผลจุดบนใบกับพืชตระกูลกะหล่ำบางชนิด เช่น ผักคะน้า โดยจะเริ่มเกิดจุดแผลขนาดเล็กๆ ต่อมาจุดขนาดใหญ่ขึ้นมีสีน้ำตาล ขนาดประมาณ ๑ มิลลิเมตร และถ้าความชื้นสูงจะปรากฏลักษณะน้ำารอบจุดแผลสีน้ำตาล เมื่อจุดแผลเกิดใกล้ชิดกันทำให้เกิดลักษณะไหม้แห้งตายเป็นหย่อมๆ เนื้อใบที่เป็นแผลขาดทะลุเป็นรู การแพร่ระบาดของโรคนี้ที่สำคัญและไปได้ไกลที่สุด คือการติดไปกับเมล็ดพันธุ์และแพร่ไปยังต้นกล้าอื่นในแปลงเพาะกล้า ส่วนการเกิดโรคในแปลงเกิดจากต้นกล้าที่ได้รับเชื้อในแปลงเพาะ หรือจากเชื้อที่ตกค้างอยู่ในเศษซากพืชในดิน หรือในพืชอาศัยที่ตกค้างอยู่ในแปลง (volunteer plants) แล้วแพร่กระจายโดยน้ำฝน หรือน้ำที่ใช้รดต้นพืช เชื้อเข้าสู่พืชทางระบบราก ทางปากใบ (stomata) ต่อมคายน้ำ (hydathodes) หรือทางแผลแล้วกระจายไปสู่ส่วนต่างๆ ทาง xylem เชื้อแพร่กระจายจากต้นเป็นโรคไปยังต้นข้างเคียงโดยไปกับลม ฝน

น้ำ ชลประทาน เป็นต้น การระบาดของโรคจะเกิดได้ดีเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม และพืชเกิดบาดแผลโดยแมลงกัดกิน หรือแผลจากการเชตกรรม

จากการระบาดที่พบในปัจจุบันทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรอย่างมากเนื่องมาจากเกษตรกรไม่สามารถจำแนกชนิดของโรคได้ถูกต้องในระยะแรกทำให้เกิดการแพร่ระบาด ดังนั้นหากเกษตรกรสามารถวินิจฉัยและรู้ถึงสาเหตุที่ถูกต้องจะทำให้สามารถป้องกันกำจัดได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว การตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชจำเป็นต้องมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำเพิ่มมากขึ้น และที่สำคัญต้องมีการพัฒนาให้รวดเร็วขึ้น เพื่อสามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชเป็นหัวใจสำคัญในการอารักขาพืช เมื่อมีการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชอย่างถูกต้องแม่นยำ ประกอบกับการตรวจที่รวดเร็ว ทำให้สามารถหาแนวทางการป้องกันกำจัดศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ควบคุมการระบาดของศัตรูพืชได้ทันสถานการณ์ ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการตรวจสอบสาเหตุโรคหลายชนิด ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านี้จำเป็นต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนาน หรือมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงานในภาคสนามและการให้บริการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ งานวิจัยนี้จึงได้นำ เทคนิค Immuno Strip มาปรับใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียชนิดนี้ เพื่อให้สามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวกรวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

เทคนิค Immuno Strip มีพื้นฐานมาจากเทคนิค latex agglutination test เริ่มคิดค้นพัฒนาขึ้นครั้งแรกโดย Singer and Plotz (1956) เพื่อให้เกิดความรวดเร็ว สะดวก ลดค่าใช้จ่ายในการตรวจเชื้อไวรัส ต่อมา Yallow and Berson (1959) ได้พัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีหรือ lateral flow test ขึ้นจากพื้นฐานของ 3 เทคนิค คือ latex agglutination tests, sandwich assay และโครมาโทกราฟี เพื่อใช้ตรวจหา anti-insulin antibodies จากแนวคิดที่ว่าแอนติบอดี 2 ชนิดมีความจำเพาะต่ออีพิโทปที่แตกต่างกันบนแอนติเจน ดังนั้นหากนำแอนติบอดีชนิดที่หนึ่งมาติดกับ solid support แล้ว เมื่อเติมตัวอย่างที่มีแอนติเจนลงไป แอนติเจนดังกล่าวจะถูกจับโดยแอนติบอดีที่ติดกับ solid support แอนติเจนที่เกาะอยู่กับแอนติบอดีนี้จะถูกตรวจ โดยแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากกับอนุภาค bead ที่มีขนาดต่างกันเช่น latex bead, erythrocytes, colloidal dyes หรือ metal solution ทำให้สามารถอ่านค่าปฏิกิริยาได้จากสี bead ที่เกิดขึ้น (Garland *et al.*, 1986; Borque *et al.*, 1995) สุรภี และคณะ (2551) ได้พัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส 11 ชนิด และแบคทีเรีย 2 strain โดยวิธี Gold labeled IgG Flow Technique (GLIFT) ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ได้แก่ กัญชง ไม้ มันฝรั่ง ถั่วเหลือง พืชผัก และยาสูบ เสาวรส มะละกอ ปทุมมา และพืชตระกูลแตง โดยการนำแอนติซีรัมของเชื้อแต่ละชนิดมาสกัด IgG และปรับความเข้มข้นเป็น 1 มก./มล. และทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ IgG ต่อเชื้อด้วยเทคนิค DIBA จากนั้นนำมาติดฉลากด้วยอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร ทดสอบอัตราที่ใช้กับชนิดของ membrane ขั้นตอนสุดท้ายประกอบเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบกับพืช ใช้เวลาในการตรวจ ประมาณ 5 นาที และชุดตรวจสอบนี้สามารถเก็บในสภาพแห้งที่อุณหภูมิห้องได้นาน 2 ปี

วิธีดำเนินการ

วิธีการ

1. การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลิน

1.1 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Xcc 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ กวนด้วย magnetic stirrer ชั่วๆ เติม saturated ammonium sulfate 10 มิลลิลิตร ที่ลดหยดขณะกวนด้วย magnetic stirrer บ่มไว้ 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.5xPBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้ว dialysis ใน 0.5x PBS นาน 4 ชั่วโมง 3 ครั้ง จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นของ IgG ด้วย spectrophotometer ที่ OD 280 แล้วคำนวณความเข้มข้น IgG ที่แยกได้จากสูตร $O.D._{280}/1.4 = 1$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

1.2 การทดสอบหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ในการทำปฏิกิริยาเชื้อ Xcc

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี indirect ELISA เตรียมสารแขวนลอยเชื้อ Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมี PBS เป็น negative control สำหรับเคลือบในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนล้างด้วย PBST (Phosphate buffer+0.05% Tween 20) หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที เติม blocking solution (PBS+2% skim milk) หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ เริ่มจาก 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนถึง 90 พิโคกรัม/มิลลิลิตร โดยมีอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์เข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ PBS เป็น negative control นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที เติม Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphates ที่เจือจางใน PBST อัตราส่วน 1 : 1000 หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วเจือจางสาร PNPP ใน substrate buffer อัตราส่วน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Optical density ; OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

1.3 การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

ทดสอบคุณภาพของ IgG ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ Xcc โดยวิธี DIBA บดตัวอย่างใบคะน้าที่เป็นโรคใบเน่าดำด้วย extraction buffer ในอัตรา 1:10 (ตัวอย่างพืช : บัพเฟอร์) เตรียมน้ำคั้นใบคะน้าปกติเช่นเดียวกัน และเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร นำน้ำคั้นพืชและเซลล์แขวนลอยเชื้อมาหยดลงบนแผ่น NCM ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำแผ่น NCM ที่หยดตัวอย่างแล้วแช่ลงในกล่องที่มี blocking solution (2% skim milk) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากครบเวลาแล้ว ย้ายแผ่น NCM ไปแช่สารละลาย IgG ที่เจือจาง 1:500 ใน TBS เขย่านาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่น NCM มาแช่ใน GAR เจือจาง 1:10,000 ใน TBS บ่มนาน 30 นาที ล้าง 3 ครั้ง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย BCIP/NP หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นเมื่อสังเกตเห็นปฏิกิริยาชัดเจน

2. การพัฒนาชุดตรวจ Immuno strip

2.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทอง (Gold conjugated IgG)

ใช้สารละลายอนุภาคทอง (Colloidal gold) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร (Biodot, USA) OD 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กวนด้วย magnetic stirrer นาน 45 นาที เติม 10 เปอร์เซ็นต์ Bovine Serum Albumin กวนต่ออีก 45 นาที นำไปหมუნเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บ IgG ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองที่ 4 องศาเซลเซียส

2.2. การหาความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad

การติดฉลากอนุภาคทองกับ IgG ใช้สารละลายอนุภาคทอง (Colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กวนด้วย magnetic stirrer นาน 45 นาที เติม 10 เปอร์เซ็นต์ Bovine Serum Albumin กวนต่ออีก 45 นาที นำไปหมუნเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเจือจางอนุภาคทองใน gold diluted buffer แบบ 2 เท่า อีก 2 ความเจือจางคือ 1:2 (0.3 เท่า) และ 1:4 (0.6 เท่า) เติมน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บ IgG ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองที่ 4 องศาเซลเซียส นำไประบายลงบนแผ่น CRP ประกอบเป็นชุดตรวจสอบ เปรียบเทียบความเข้มสีบนเส้น control line

2.3. การเตรียมแผ่น conjugate release pad (CRP)

นำแผ่น CRP (วัสดุเป็น cotton linters paper) ตัดให้มีขนาด กว้างประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15-18 เซนติเมตร (ขึ้นกับขนาดของ Backing pad ที่เลือกใช้) ใช้ฟู่กันเบอร์ 0 จุ่ม gold conjugated IgG ป้ายลงบนแผ่น CRP ตรงกึ่งกลางแผ่น โดยใช้ Gold conjugated IgG ประมาณ 90 ไมโครลิตร/15 เซนติเมตร คิดเป็นอัตรา 5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.4. การทำเส้น test line และ control line

ใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส (NCM) วัสดุที่ใช้เป็น S&S-AE 99 size 8 ไมโครโมลาร์ มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 18 เซนติเมตร ตามขนาดของ backing pad ใช้ดินสอดทำเครื่องหมายด้านบนแผ่น และเครื่องหมายตำแหน่งเส้น control line ที่จะอยู่ห่างจากริมบนของแผ่น NCM 1 เซนติเมตร และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจากเส้น control line 0.5 เซนติเมตร ใช้ปากกาหมึกซึม (ขนาด 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่ม Anti-rabbit IgG ที่อัตราความเข้มข้น 1:3 จำนวน 40 ไมโครลิตร/แผ่น ใช้ไม้บรรทัดวางให้เป็นแนวเส้นตรง และปากกาแล้วลากเส้นจากด้านซ้ายไปทางขวาเพียงเบาๆ เป็นเส้น control line และใช้ปากกาหมึกซึมด้ามใหม่ จุ่มซับ IgG (เข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 40 ไมโครลิตร/แผ่น ปฏิบัติเช่นเดียวกับทำเส้น control line เป็นเส้น test line นำไปอบแห้ง 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

2.5. การประกอบเป็นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

วางแผ่นเมมเบรนที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่นพลาสติกการรองรับพื้น (plastic backing polyester) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร วางแผ่น CRP ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร วางแผ่นใยแก้วรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) เกยทับ CRP 1-2 มิลลิเมตร และวางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (wicking paper) เกยทับด้านบนของแผ่น

เมมเบรน 1-2 มิลลิเมตร ตัดชุดที่ประกอบเสร็จแล้วออกเป็นเส้นที่มีความกว้างเท่ากับ 0.4 เซนติเมตร บรรจุลงในตลับพลาสติก การเก็บชุดตรวจไว้ในระยะยาวต้องเก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ ที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้น

3. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

การเตรียมตัวอย่างคั้นน้ำสำหรับทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเก็บตัวอย่างคั้นน้ำที่แสดงอาการเน่าดำจากแปลงปลูกของเกษตรกร และตัวอย่างคั้นน้ำที่แสดงอาการเน่าดำที่ได้จากการปลูกเชื้อ ล้างทำความสะอาดตัวอย่างด้วยน้ำไหลผ่าน ตัดแบ่งตัวอย่างพืชบริเวณที่แสดงอาการออกเป็น 2 ส่วน ให้มีขนาดชิ้นละ 1 กรัม นำชิ้นพืชไปบดในสารละลายบัฟเฟอร์ (DOA Extraction buffer pH 5.6) อัตราส่วน 1 กรัม/10 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป และบดชิ้นพืชในน้ำนิ่งฆ่า อัตราส่วน 1 กรัม/10 มิลลิลิตร สำหรับนำไปตรวจสอบปริมาณเชื้อ Xcc บนอาหาร PSA

3.1 การทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

3.1.1 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์

ทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปในการตรวจเชื้อ Xcc บริสุทธิ์ โดยเจือจางสารละลายเชื้อแบคทีเรีย Xcc ในสารละลายบัฟเฟอร์ ครั้งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10^1 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ และน้ำนิ่งฆ่าเชื้อเป็น negative control หยตสารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนชุดตรวจสอบดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับชุดตรวจสอบเชื้อ Xcc บริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบคั้นน้ำปกติให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบ 10 เท่าเหมือนข้างต้นและเปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA โดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อบริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบคั้นน้ำปกติ นำไปทำปฏิกิริยากับโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Xcc อ่านค่าปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3.1.2 การทดสอบความไวในการตรวจตัวอย่างคั้นน้ำที่เป็นโรคเน่าดำ

เตรียมตัวอย่างพืชตามวิธีการเตรียมตัวอย่างคั้นน้ำ สำหรับทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปข้างต้น เจือจาง 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 และ 1:2000 ทดสอบน้ำคั้นพืชแต่ละความเจือจางกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยมีน้ำคั้นใบคั้นน้ำปกติเป็น negative control แล้วตรวจผลของการเกิดปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA โดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยน้ำคั้นตัวอย่างใบคั้นน้ำตามค่าความเจือจางข้างต้น นำไปทำปฏิกิริยากับโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Xcc อ่านค่าปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3.2 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

3.2.1 ทดสอบความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *Pantoea* sp., Xcc และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบคั้นน้ำที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์นำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ให้มีปริมาณเชื้อ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ เป็น negative control

3.2.2 ทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างคั้นน้ำ

เตรียมตัวอย่างคั้นน้ำที่ได้จากการปลูกเชื้อ และตัวอย่างคั้นน้ำที่เก็บจากแปลงตามวิธีการเตรียมตัวอย่างคั้นน้ำสำหรับทดสอบชุดตรวจอิมมูโนสตริปข้างต้น โดยมีน้ำคั้นใบคั้นน้ำปกติเป็น negative control

เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเทรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลิน

1.1 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

การเตรียม IgG บริสุทธิ์จากโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ Xcc โดยใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 5 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและทำ dialysis แล้ว นำสารละลาย IgG ที่ได้จากการทำ dialysis มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้ (ตารางที่ 1) ปรับความเข้มข้นของ IgG ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ก่อนนำไป conjugate กับ Colloidal gold

1.2 การทดสอบหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์

จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ เริ่มจาก 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนถึง 90 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเชื้อ Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่าอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ที่เจือจาง 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรได้ มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร เท่ากับ 1.405 โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ

1.3 การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

อิมมูโนโกลบูลินทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นตัวอย่างใบคั้นน้ำที่มีอาการโรคเน่าดำ และแบคทีเรีย Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลของปฏิกิริยาเป็นสีม่วง และพบว่าอิมมูโนโกลบูลินไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบคั้นน้ำปกติ เมื่อเจือจางที่ 1:500

2. การพัฒนาชุดตรวจ Immuno strip

2.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทอง (Gold conjugated IgG)

สารละลาย Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร แสดงการเกิดปฏิกิริยาชัดเจนบน test line และ control line มีสีม่วงคมชัด จึงเป็นความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad (CRP) สำหรับการพัฒนาชุดตรวจอิมมูโนสตริปสำหรับตรวจแบคทีเรีย Xcc

2.2 การหาความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad

เมื่อนำสารละลาย Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร มาเจือจางแบบ 2 เท่า อีก 2 ความเจือจางคือ 1:2 และ 1:4 แล้วนำไประบายลงบนแผ่น CRP จากผลการทดลองพบว่า Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง

540 นาโนเมตร จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีม่วงชัดเจนบน test line และ control line ในขณะที่ Gold conjugated IgG ที่ทำการเจือจาง 1:2 และ 1:4 จะเกิดปฏิกิริยาสีชมพูอ่อนข้างชัดเจนบน test line แต่จะเกิด ปฏิกิริยาเป็นสีชมพูอ่อนไม่ชัดเจนบน control line

2.3 การเตรียมแผ่น conjugate release pad (CRP)

นำแผ่น CRP ตัดให้มีขนาด กว้างประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15-18 เซนติเมตร ใช้พู่กันเบอร์ 0 จุ่ม gold conjugated IgG ป้ายลงบนแผ่น CRP ตรงกึ่งกลางแผ่น โดยใช้ Gold conjugated IgG ประมาณ 90 ไมโครลิตร/15 เซนติเมตร อัตรา 5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้แผ่น CRP พร้อมนำไปประกอบเป็นชุดตรวจสอบ Immuno strip

2.4 การทำเส้น test line และ control line

ใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส (NCM) วัสดุที่ใช้เป็น S&S-AE 99 size 8 ไมโครโมลาร์ มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 18 เซนติเมตร ตามขนาดของ backing pad ใช้ดินสอดำทำเครื่องหมาย ด้านบนแผ่น และเครื่องหมายตำแหน่งเส้น control line ที่จะอยู่ห่างจากริมบนของแผ่น NCM 1 เซนติเมตร และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจากเส้น control line 0.5 เซนติเมตร ใช้ปากกาหมึกซึม (ขนาด 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่ม Anti-rabbit IgG ที่อัตราความเข้มข้น 1:3 จำนวน 40 ไมโครลิตร/แผ่น ใช้ไม้บรรทัดวางให้เป็นแนวเส้นตรง และปากกาแล้วลากเส้นจากด้านซ้ายไปทางขวาเพียงเบาๆ เป็นเส้น control line และใช้ปากกาหมึกซึมด้ามใหม่ จุ่มซับ IgG (เข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 40 ไมโครลิตร/แผ่น ปฏิบัติเช่นเดียวกับทำเส้น control line เป็นเส้น test line นำไปอบแห้ง 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

2.5 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

วางแผ่นเมมเบรนที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่นพลาสติกกาารองพื้น (plastic backing polyester) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร วางแผ่น CRP ให้เกยทับแผ่นเมมเบรนประมาณ 1-2 มิลลิเมตร วางแผ่นใยแก้วรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) เกยทับ CRP 1-2 มิลลิเมตร และวางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (wicking paper) เกยทับด้านบนของแผ่นเมมเบรน 1-2 มิลลิเมตร ตัดชุดที่ประกอบเสร็จแล้วออกเป็นเส้นที่มีความกว้างเท่ากับ 0.4 เซนติเมตร การเก็บชุดตรวจไว้ในระยะยาวต้องเก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ ที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้น

3. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

3.1 ทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

3.1.1 ทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์

จากการทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยการเจือจางสารละลายเชื้อแบคทีเรีย Xcc ในสารละลายบัฟเฟอร์ ครั้งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10^1 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจเชื้อปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบคะน้าปกติให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบ 10 เท่า เหมือนข้างต้น พบว่าสามารถตรวจเชื้อปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกัน

3.1.2 ทดสอบความไวในการตรวจตัวอย่างใบคะน้าที่เป็นโรค

ทำการเจือจางน้ำคั้นใบค่น้ำที่แสดงอาการของโรคเน่าดำแบบ 10 เท่า โดยมีน้ำคั้นใบค่น้ำปกติเป็น negative control พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจพบเชื้อได้ในน้ำคั้นพืชที่แสดงอาการของโรคที่เจือจาง 1: 2,000

3.2 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

3.2.1 ทดสอบความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้นให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *Pantoea* sp., และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบค่น้ำที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน

3.2.2 ทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างค่น้ำ

เมื่อนำตัวอย่างค่น้ำที่มีลักษณะอาการต่างๆ มาทดสอบกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปพบว่าเมื่อเฉพาะอาการโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อ Xcc เท่านั้นที่ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเกิดปฏิกิริยาเป็นบวก เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ได้จากคั้นใบค่น้ำที่มีลักษณะอาการต่างๆ และใบค่น้ำปกติ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปมีความไวในการตรวจเชื้อ Xcc 10^4 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ตรวจเชื้อในน้ำคั้นพืชที่การเจือจาง 1: 2,000 ได้ ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ Xcc จากผลการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นที่พบบนผิวใบค่น้ำและอาการผิดปกติในค่น้ำที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคเน่าดำ พบว่ามีเฉพาะอาการโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อ Xcc เท่านั้นที่ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเกิดปฏิกิริยาเป็นบวก เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ได้จากคั้นใบค่น้ำที่มีลักษณะอาการต่างๆ และใบค่น้ำปกติ ซึ่งชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาได้ในการทดลองนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจโรคเน่าดำของค่น้ำได้ ณ จุดตรวจโรค (point of care) ในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อให้เกิดการตรวจวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว แม่นยำ นำมาสู่การแนะนำการควบคุมโรคในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

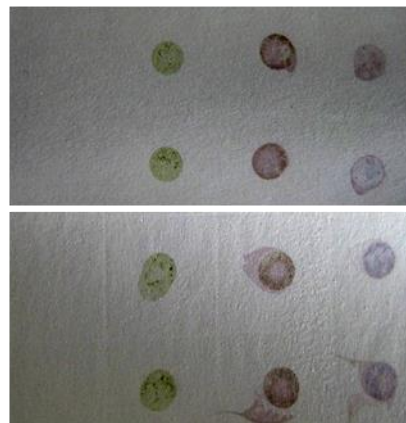
- สุรณี กิรติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ณ์ภูริมา โฆษิตเจริญกุล และ เยาวภา ตันติวานิช. 2551. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม “โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์” กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.
- Divinagracia, G. G., B. L. Candole and E. T. Cadapan. 1984. Some studies on bacterial brown spot of orchids caused by *Pseudomonas cattleyae* (Pavarino) saverlesco. Summary in Philippine Phytopathology 20: 3-4.
- Garland, D. L., S. Leuy, R. Miller, S. Moore and S. Reicherg. 1986. Comparison of techicon latex particle immunoassay for theophylline with the abbot TDX and high pressure liquid chromatography methods. Clinical Chemistry 32: 1104.
- Singer, J.M. and C.M. Plotz. 1956. The latex fixation test application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. American Journal of Medicine 21: 888-892.
- Yallow, R.S. and S.A. Berson. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 184: 1648-1649.

ตารางที่ 1 การแยกอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์จากโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Xcc บริสุทธิ์ ด้วยการ dialysis

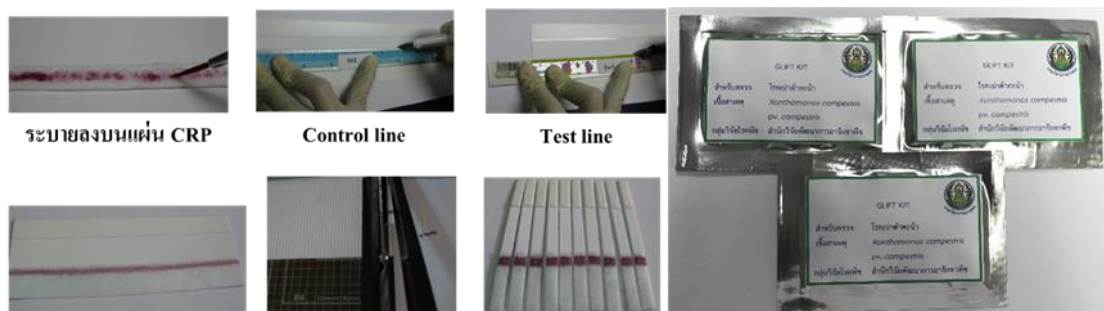
ครั้งที่วัด	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีน มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
1	2.696	1.883
2	2.708	1.934
3	2.762	1.972
4	2.797	1.998
5	2.257	1.612
ค่าเฉลี่ย	2.64	1.870

TBS	H	D	P
TBS	H	D	P

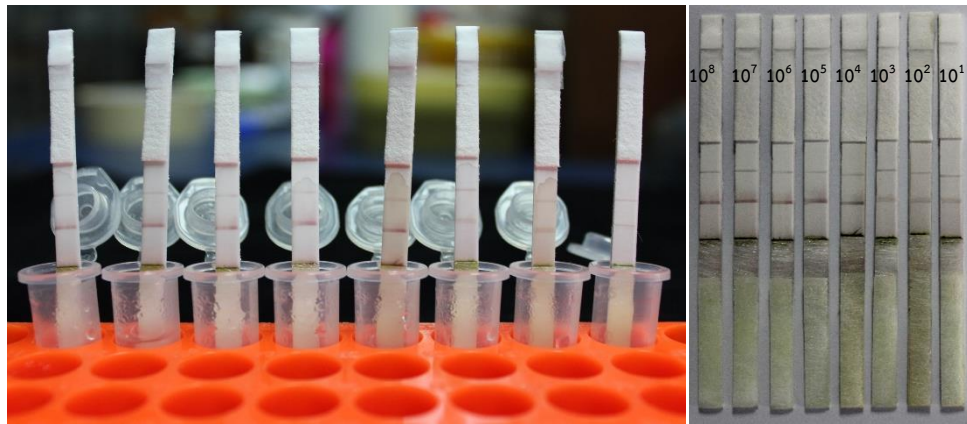
TBS Tris-saline buffer
H ไบคะน้ำปกติ
D ไบคะน้ำเป็นโรค
P เชื้อแบคทีเรีย Xcc



ภาพที่ 1 การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)



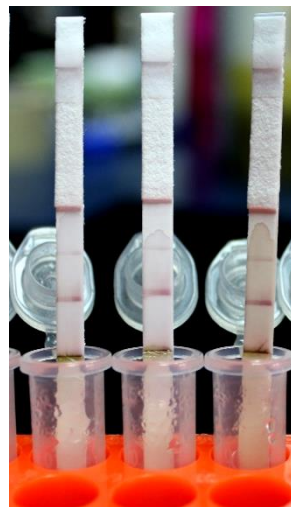
ภาพที่ 2 ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป



ภาพที่ 3 การทดสอบความไว (sensitivity) ของตรวจสอบอิมมูโนสตริป



ภาพที่ 4 ลักษณะอาการโรคเน่าดำ (black rot) ของคะน้า



ภาพที่ 5 การเกิดปฏิกิริยาเป็นบวกของตรวจสอบอิมมูโนสตริป

การผลิตแอนติบอดีของเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus ในระบบ
เซลล์แบคทีเรีย

Antibody Production for Watermelon Silver Mottle Virus in the
Bacterial cell system

กาญจนา วาระวิชนี แสนชัย คำหล้า
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส Watermelon silver mottle virus โดยใช้โปรตีนลูกผสมส่วน coat protein ที่ผลิตในระบบเซลล์แบคทีเรีย ค่าความเจือจางของแอนติซีรัมสูงสุดที่ 16,384 เท่า พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส WSMoV ตรวจพบเชื้อไวรัสได้ในส่วนของ ยอด ใบ กิ่งก้านและผิวผลของแตงโมด้วยเทคนิค indirect ELISA แต่พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับตัวอย่างแตงโมปกติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจแบบ DAS-ELISA Kit ทางการค้าที่มีจำหน่าย

Abstract

Production of Polyclonal Antibody prepared against coat protein gene of Watermelon silver mottle virus acquired from bacteria system. The titer of polyclonal antibody is 16,384 times. Infected watermelon samples from various parts; shoots, leaves, vines tendrils and fruit rind showed positive against polyclonal antibody using indirect ELISA technique. However, polyclonal antibody has also cross reaction against healthy watermelon comparison to antibody purchased from commercial product.

คำหลัก : แตงโม, ทอสโพไวรัส, โพลีโคลนอลแอนติบอดี, *Watermelon Silver mottle virus* (WSMoV), recombinant protein, indirect-ELISA

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-02-60

คำนำ

ทอสปอไวรัส (*Tospovirus*) เชื้อสาเหตุโรคพืชสำคัญชนิดหนึ่งสามารถสร้างความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจสำคัญหลายชนิดทั่วโลก มีพืชอาศัยกว้างมากกว่า 600 ชนิด ทั้งไม้ผล ไม้ประดับ และพืชผัก (Peters and Goldbach, 1995) จัดอยู่ใน Family *Bunyaviridae* และ Genus *Tospovirus* อนุภาคไวรัสมีลักษณะทรงกลม (spherical) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80-120 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) สายเดี่ยว จำนวน 3 โมเลกุล คือ L-RNA ขนาด 8.9 กิโลเบส M-RNA ขนาด 4.8 กิโลเบส และ S-RNA ขนาด 2.9 กิโลเบส กรดนิวคลีอิกแต่ละโมเลกุลห่อหุ้มด้วยโปรตีน (nucleocapsid protein) และมีเยื่อหุ้ม (envelope) ประกอบด้วยไขมันและไกลโคโปรตีน 2 ชนิด มีเปลือกไฟเป็นแมลงพาหะในการถ่ายทอดโรคความสัมพันธ์แบบคงทน (persistent) เชื้อไวรัสสามารถเพิ่มปริมาณได้ทั้งในพืชและแมลงพาหะ (Chen *et al.*, 1990; Cortes *et al.*, 1998) ลักษณะอาการของโรคที่พบแตกต่างกันไปตามชนิดเชื้อไวรัส ชนิดพืชอาศัย และสภาพแวดล้อม (German *et al.*, 1992) พบรายงานการเกิดโรคในกลุ่มประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ ไต้หวัน ญี่ปุ่น และจีน ประสบปัญหาการระบาดของโรคจากทอสปอไวรัส (*Tospovirus*) กับพืชตระกูลแตง สาเหตุหลักเกิดจากไวรัส Watermelon silver mottle virus (WSMoV) เป็นทอสปอไวรัส ใน serogroup IV สร้างความเสียหายอย่างมากกับผลผลิตเมลอน (Yeh *et al.*, 1992 ; Okuda *et al.*, 2002; Rao X. *et al.*, 2011) สำหรับประเทศไทยเชื้อไวรัส WSMoV ระบาดและสร้างความเสียหายกับผลผลิตเมลอนและแตงโมในพื้นที่ปลูกหลายจังหวัด เช่น ขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม กาฬสินธุ์ กาญจนบุรี ราชบุรี ตาก เชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน เป็นต้น (วิมล และคณะ, 2547; ศลิขณ์ และอรอุมา, 2562) แปลงปลูกพืชตระกูลแตงที่มีการระบาดของเชื้อไวรัส WSMoV ส่วนใหญ่พบเปลือกไฟชนิด *Thrips tabaci* เป็นแมลงพาหะ (พิสสรณ และคณะ, 2549) ลักษณะอาการที่พบ ใบเป็นแผลเนื้อเยื่อตาย แถบแสดงอาการเนื้อเยื่อตายสีน้ำตาลไหม้ลามจากส่วนยอดลงมา ผลเป็นแผลสะเก็ดสีดำลักษณะแผลรูปร่างไม่แน่นอน ผลมีขนาดเล็กทำให้เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ไม่มีคุณภาพ (วิมล และคณะ, 2547; วิมล, 2548 ; Pongsapich and Chiemsombat, 2002 ; Rao X. *et al.*, 2011) สร้างปัญหาให้เกษตรกรและบริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เป็นอย่างมาก ทั้งนี้ทอสปอไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชกักกันการตรวจรับรองเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศ เช่น Le (1970) เคยรายงานไว้ว่า *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ดไม้ดอกซิเนอราเรีย *cineraria* ได้สูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น หากมีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนได้ในเมล็ดพันธุ์ส่งออกอาจจะส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจในภาพรวมของประเทศ

สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อทอสปอไวรัสที่นิยมและมีความน่าเชื่อถือ คือ การตรวจสอบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสโดยตรง เช่น วิมล และคณะ (2548) ทำการตรวจวินิจฉัยทอสปอไวรัสด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR จากตัวอย่างแตงโมจากส่วนพบติเอ็นเอขนาด nucleocapsid gene (N เชื้อไวรัส WSMoV ขนาด 828 คู่เบส และเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาโดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัส เช่น เทคนิค ELISA ซึ่งมีข้อได้เปรียบ คือ วิธีการและเครื่องมือไม่ซับซ้อนน้อยกว่าการตรวจสอบสารพันธุกรรม ตรวจสอบตัวอย่างได้มากต่อครั้งและมีความแม่นยำ อรประไพ และคณะ (2556) ได้ทำการผลิตโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถตรวจทอสปอไวรัส ใน serogroup IV ได้หลายชนิด ดังนั้น งานวิจัยนี้ต้องการพัฒนาแอนติบอดีที่สามารถตรวจเชื้อไวรัส WSMoV ได้จำเพาะขึ้นเพื่อประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาที่มีการระบาดอยู่ในแหล่งปลูกแตงโมของประเทศไทยสามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ให้ทนทาน

ต่อเชื้อไวรัสและการตรวจติดตามหากเชื้อไวรัสมีการกลายพันธุ์ในอนาคต ตรวจเมล็ดพันธุ์นำเข้าหรือส่งออกสำหรับใช้ทำพันธุ์เพื่อให้มั่นใจว่าปราศจากเชื้อไวรัส WSMoV ที่อาจปนเปื้อนได้ รวมทั้ง การผลิตแอนติบอดีได้เองสามารถลดข้อจำกัดเรื่องต้นทุนต่อหน่วยที่ค่อนข้างสูงมากเมื่อซื้อจากบริษัทการค้าเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุและแอนติบอดีที่ได้ยังเป็น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค และตัวอย่างพืชปกติ
2. อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ ได้แก่
 - เครื่องชั่งละเอียด (precision balance) 2 และ 4 ตำแหน่ง
 - ตู้แช่แข็ง -20, -40 องศาเซลเซียส (freezer)
 - ตู้ดูดควัน / ตู้ดูดไอสารเคมี (Fume Hood)
 - อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker)
 - เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
 - เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000TM Thermal Cycler, BIO-RAD)
 - เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)
 - เครื่องวิเคราะห์เจลและบันทึกภาพ (ChemiDocTM Touch Imaging System, BIO-RAD)
 - เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Thermo ScientificTM MultiskanTM GO Microplate Spectrophotometer)
3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
 - โกร่งบดตัวอย่าง (mortars and pestles)
 - หลอดไมโครทิวบ์ (Microtube) ขนาด 0.5, 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
 - ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tip) ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
 - เพลทแบบ 96 หลุม (96-microwell plate)
4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่
 - ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป FavorPreptm Total RNA Mini kit (FAVORGEN)
 - ชุดสกัดเจลและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPreP GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN)
 - ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป FavorPreP Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN)
 - SuperScriptTM III One-Step RT-PCR System with PlatinumTM Taq DNAPolymerase (Invitrogen)
 - ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp, 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific)
 - โปรตีนมาตรฐาน BLUltra Prestained Protein Ladder (BIO-HELIX, Cat#1BHC-PM001-0500)
 - Agarose gel (SeaKem®)
 - Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Gels, 1.0 mm, 10 well (Invitrogen)
 - สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin, laboratory grade)
 - ชุดไพรเมอร์ (Primer set)
 - พลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega)
 - พลาสมิดพาหะ pBAD/His A, B, and C vector (Invitrogen)
 - competent cell (E. coli สายพันธุ์ Top 10) (Invitrogen)
 - ProBondTM Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen)
 - แอนติบอดีต่อเชื้อ WSMoV (ELISA Reagent Set for WSMoV, Agdia)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างแดงโม่จากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น ที่แสดงลักษณะอาการโรคคล้ายทอสโพไวรัสเข้าทำลายจากเชื้อไวรัส WSMoV โดยเก็บส่วนต่าง ๆ ของพืช ใส่ถุงพลาสติกที่ถูกหุ้มด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์พร้อมเขียนหมายเลขตัวอย่าง วันที่ สถานที่เก็บจากนั้นจึงนำตัวอย่างเก็บไว้ในกระติกน้ำแข็งตลอดเวลา เพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยที่ห้องปฏิบัติการ ต่อไป

2. การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

สกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนต่างๆ ของแดงโม่ที่เก็บจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPreptm Total RNA Mini kit (FAVOGEN) ดังนี้ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืชแต่ละส่วนที่ต้องการทดสอบประมาณ 0.1 กรัม ใส่ในโกร่งแล้วเติมไนโตรเจนเหลวบดให้เป็นผงละเอียด เติม FARB buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติม 2B-mercaptoethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วย้ายสารละลายใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นเทสารละลายลงใน Filter Column (สีขาว) ที่บรรจุอยู่ใน Collection tube แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บสารละลายส่วนใสมาเติม 70 % ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยไมโครปิเปตต์ทีป หลังจากนั้นเทสารละลายส่วนใสลงใน FARB Mini Column (สีแดง) ที่บรรจุอยู่ใน Collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่ เติม Wash Buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่ เติม Wash Buffer 2 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที (ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง) แล้วย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 1.5 ไมโครลิตร แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ได้สารละลายอาร์เอ็นเอและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป

3. การสังเคราะห์ Nucleocapsid gene (N gene) เชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

สังเคราะห์ N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้ครอบคลุม Nucleocapsid gene (N gene/CP gene) จำนวน 1 คู่ คือ ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3 (10 pmol) (5' ATG TCT AAC GTT AAG CAG CTT 3') และไพรเมอร์ WSMoV-N-R3 (10 pmol) (5' TTA CAC TTC CAA GGA AGT GCT 3') เพื่อใช้ประกอบปฏิกิริยา One step RT-PCR (Invitrogen) ดังนี้ นำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ (dH₂O) จำนวน 18 ไมโครลิตร, 2x buffer จำนวน 25 ไมโครลิตร, MgCl₂ (25 mM) จำนวน 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3 (10 pmol) จำนวน 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ WSMoV-N-R3 (10 pmol) จำนวน 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ SuperScript™ III /platinum Taqmix จำนวน 2 ไมโครลิตร (0.1 unit/μl) และอาร์เอ็นเอต้นแบบจำนวน 2 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ทำการสังเคราะห์ WSMoV-CP gene ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD) ตั้งรอบปฏิกิริยา ดังนี้ ขั้นที่ 1: cDNA synthesis ที่ 48°C นาน 30

นาที่ ขั้นที่ 2: Pre-denature 94°C นาน 1 นาที ขั้นที่ 3 : denature 94°C นาน 15 วินาที ขั้นที่ 4 : annealing 60°C นาน 30 วินาที ขั้นที่ 5: Extension 68°C นาน 1 นาที (วนซ้ำขั้นที่ 3 – 5 จำนวน 30 รอบ) Post-extension 68°C นาน 10 นาที และ Hold ที่ 15°C และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ทำการวิเคราะห์และบันทึกภาพด้วยเครื่อง ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD

4. เพิ่มบริเวณจดจำของ restriction enzyme site กับไพรเมอร์

เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่เหมาะสมนำมาออกแบบตำแหน่งจดจำ บริเวณ 5' และบริเวณ 3' ของคู่ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3 /WSMoV-N-R3 และเพิ่มตำแหน่ง stop codon (TAA) บริเวณ 3' เพื่อใช้ประกอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ WSMoV-CP adapter ด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD)

5. ตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและโคลนยีนเข้า Expression vector

นำชิ้นยีน WSMoV-CP adapter และพลาสมิดพาหะ pBad/HisA Expression vector ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Eco*RI แบบ Double digestion ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ (FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) และโคลนยีน digested WSMoV-CP adapter โดยเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ digested pBad/HisA Expression vector (Invitrogen) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่คอมพีเทนท์ *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) ทำการเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค blue white colony และตรวจสอบยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค colony PCR

6. เตรียม starter gene ทดสอบกระตุ้นแสดงออกของโปรตีนลูกผสมและวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE

การเตรียม starter gene โดยนำโคลนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 จำนวน 1 โคโลนี ที่ตรวจสอบแล้วว่า มีพลาสมิดสายผสมของชิ้นยีน WSMoV-CP adapte/6xHisTag ใน pBAD/His A expression vector (WSMoV-CP recombinant protein) เลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำสารละลาย starter gene ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 20% L-Arabinose ความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 5 ระดับ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนลูกผสม และหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม หลังจากนั้นวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ด้วย TGX Stain-Free FastCast Acrylamine Kit, 12 % (BIO-RAD, Cat#1610185) ด้วยเครื่อง Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD, Cat#1658005) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 120 เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นย้อมแถบโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยสารละลาย Destaining เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดโปรตีนลูกผสมกับแถบโปรตีนมาตรฐาน BLUltra Prestained

Protein Ladder (BIO-HELIX, Cat#1BHC-PM001-0500) ตรวจสอบแถบโปรตีนและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

7. การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสม WSMoV-CP-adapter gene/6xHisTag (WSMoV-CP recombinant protein) เพื่อนำมาใช้เป็น starter gene ตามวิธีการข้อ 6 จากนั้นนำสารละลาย starter gene ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 500 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนด้วยสารละลาย 20% L-Arabinose ตามความเข้มข้นที่เลือกให้เหมาะสม เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนมากที่สุด ทำการตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บตะกอนมาละลายด้วย lysis buffer A นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultra schall BANDELIN SONOPULS HD และแยกสกัดโปรตีน WSMoV-CP recombinant protein ให้บริสุทธิ์ด้วย ProBond™ Nickel-Chelating Purification System ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ (Novex, Catalog Numbers R801-01) ทำการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

8. ผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส WSMoV-CP ในสัตว์ทดลอง โดยเตรียมแอนติเจนโปรตีนลูกผสมของ WSMoV-CP recombinant protein ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 ให้ผสมเข้ากันเป็น emulsion ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (immunized intramuscular) ของกระต่าย (New Zealand White rabbit) ในครั้งแรก สำหรับการฉีดครั้งต่อไปผสมแอนติเจนกับ Incomplete Freund's adjuvant (IFA) ในอัตราส่วนและปริมาตรเท่าเดิม ใช้ฉีดสัตว์ทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ รวมอีก 3 ครั้ง หลังจากฉีดสัตว์ทดลองครั้งที่ 2 ทำการเก็บเลือดโดยเจาะเส้นเลือดบริเวณใบหู และดำเนินการเก็บเลือดต่อเนื่องทุก ๆ 1 สัปดาห์อีก 5 ครั้ง

9. ทดสอบประสิทธิภาพโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตด้วยเทคนิค ELISA

บดตัวอย่างพืชเป็นโรคใน carbonate coating buffer, pH 9.6 หยดลงในหลุมของโครเพลท (96-microwell plate) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (1X PBST) 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที เจือจางโพลีโคลนอลแอนติบอดีเชื้อไวรัส WSMoV ที่ผลิตได้ใน conjugate buffer 1: 500 และ 1 : 1,000 หยดลงในหลุมของไมโครเพลท 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเคาะ plate ให้แห้ง เพื่อเติม Goat anti-rabbit IgG with alkaline phosphatase (AP3074, formerly Roche 1814206) ที่เจือจางใน PBS 1 : 3,000 หยดลงในหลุมของไมโครเพลท 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเคาะ plate ให้แห้ง จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เตรียม 1x PNP substrate solution เติมนลงในไมโครเพลท ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37

องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง Microplate Readers (Multiskan™ GO, ThermoFisher Scientific, USA)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา	ตุลาคม 2559-กันยายน 2562
สถานที่	กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรียนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการเก็บตัวอย่างพืช

ตัวอย่างแดงโมจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น โดยเก็บส่วนต่าง ๆ ของพืชที่แสดงอาการจุดเนื้อเยื่อฉ่ำน้ำและไหม้ตายเป็นสีน้ำตาลดำบริเวณยอด ใบ กิ่งก้าน และข้าวผล (ภาพที่ 1A-C) ผิวผลระยะเริ่มแรกแสดงอาการเนื้อเยื่อฉ่ำน้ำเป็นจุดนูนใส ผิวผลสีไม่สม่ำเสมอลักษณะต่างเหลือง ต่อมาจุดเนื้อเยื่อเป็นแผลไหม้ดำลึกเข้าเนื้อผลขยายติดกันจนเป็นแผลขนาดใหญ่ และแห้งเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลเข้มหรือสีขาวกระจายทั่วผล (ภาพที่ 2A-D) ซึ่งลักษณะอาการโรคที่พบจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น คล้ายกับอาการโรคจากเชื้อไวรัส WSMoV เข้าทำลาย (กาญจนา และคณะ, 2558) จึงนำมาตรวจยืนยันเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค RT-PCR ก่อนใช้ทดลองต่อไป

2. ผลการสังเคราะห์ Nucleocapsid gene (N gene) เชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค RT-PCR

นำตัวอย่างแดงโมส่วน ยอด ใบ กิ่งก้าน ข้าวผล และผิวผล ที่เก็บจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น มาสกัดชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป FavorPreptm Total RNA Mini kit (FAVOGEN) ได้สารละลายอาร์เอ็นเอมาสังเคราะห์ Nucleocapsid gene (N gene) เชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยคู่ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3/ WSMoV-N-R3 เมื่อตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ทุกส่วนของพืชที่ใช้ทดสอบสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดที่ประมาณ 800 bp ซึ่งเป็นส่วนของ Nucleocapsid gene (N gene/CP gene) ของเชื้อไวรัส WSMoV เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ภาพที่ 3) ดังนั้น คู่ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3/ WSMoV-N-R3 ที่ออกแบบสำหรับการทดลองครั้งนี้สามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV ได้

3. ผลการเพิ่มบริเวณจดจำของ restriction enzyme site กับไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่บริเวณ 5' และบริเวณ 3' ได้แก่ *Pst*I (5'-CTGCA□G-3' 3'-G□ACGTC-5') และ *Eco*RI (5'-G□AATTC-3' 3'-CTTAA□G-5') ตามลำดับ และเพิ่มตำแหน่ง stop codon (TAA) บริเวณ 3' จำนวน 1 คู่ (ตารางที่ 1) สำหรับใช้เป็นส่วนประกอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ WSMoV-CP gene adapter ด้วยเทคนิค PCR ทำการตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,100 bp เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

4. ผลตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและโคลนยีนเข้า Expression vector

ตัดชิ้นยีน WSMoV-CP adapter และพลาสมิดพาหะ pBad/HisA Expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ PstI และ EcoRI แบบ Double digestion ทำการเชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase โคลนยีนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 คัดเลือกด้วยเทคนิค colony PCR โดยคูเปอร์เมอร์ pBAD-F/pBAD-R พบว่า โคลนนี้แบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมของชิ้น WSMoV-CP gene/6xHisTag จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ ~ 950 เบส เมื่อเทียบกับโคลนนี้แบคทีเรียปกติที่ได้รับเฉพาะพลาสมิด Expression vector จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 300 เบส (ภาพที่ 4) ซึ่งเป็นขนาดของลำดับเบสบางส่วนของ pBAD/His A expression vector เมื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ FIRST BASE LABORATORIES SDN BHD ประเทศมาเลเซีย พบว่า WSMoV-CP gene/6xHisTag มีจำนวน 954 นิวคลีโอไทด์ และพบลำดับเบสทั้ง start codon (ATG) และ stop codon (TAA) เมื่อตรวจตำแหน่ง frame shift ของการแปลรหัสลำดับแอมิโนพบการจัดเรียงกรดแอมิโนได้ถูกต้องจำนวน 318 เรซิดิวส์ และพบตำแหน่งแอมิโนของ HHHHHH-Polyhistidine Region (6xHisTag) เพื่อประโยชน์สำหรับการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.)

5. ผลการแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสม WSMoV-CP gene/6xHisTag/pBAD-HisA expression vector (fusion protein) เหนี่ยวนำโปรตีนลูกผสมให้แสดงออกด้วยสารละลาย 20% L-(+)-Arabinose จำนวน 2 เท่า ในสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทดสอบการสกัดโปรตีนด้วยวิธี Native condition และ denature condition และวิเคราะห์การแสดงออกโปรตีนลูกผสมด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า การสกัดโปรตีนลูกผสมแบบ denature condition ได้ผลผลิตโปรตีนออกมาได้มากกว่าแบบ Native condition จากนั้นเก็บส่วนน้ำใส (supernatant) จากการสกัดโปรตีนลูกผสมแบบ denature condition ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ProBond™ Nickel-Chelating Purification System แบบวิธี affinity column chromatography หลังจากวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบ fusion protein ที่ขนาดประมาณ 36 กิโลดาลตัน (โปรตีน WSMoV-CP-Protein ขนาดประมาณ 31 กิโลดาลตัน และโปรตีน pBAD/HisA-6xHisTag ขนาดประมาณ 5 กิโลดาลตัน) แต่มีปริมาณน้อยเนื่องจากมีโปรตีนอื่น ๆ ปนเปื้อนค่อนข้างมาก และวัดความเข้มข้นของ fusion protein ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Multiskan™ Go, Thermo Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ได้ความเข้มข้นค่อนข้างต่ำเพียง 0.244 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยทั่วไปความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการฉีดกระทายเพื่อแอนติบอดีอยู่ระหว่าง 0.3 – 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร [300 – 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร] สำหรับใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้ผลิตแอนติบอดีต่อ Coat protein ของเชื้อไวรัส WSMoV

6. ผลการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจเชื้อไวรัส WSMoV

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ WSMoV โดยใช้ recombinant WSMoV coat protein ฉีดเข้าสู่กระต่ายบริเวณกล้ามเนื้อ (immunized muscular) แล้วทำการเก็บแอนติซีรัมทั้งหมด 5 ครั้ง ปริมาณรวม 50 มิลลิลิตร จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เก็บมาทั้งหมด

5 ครั้ง ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่า มีค่าไตเตอร์สูงสุด 16,384 เท่า เมื่อนำแอนติบอดีมาตรวจสอบความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส โดยใช้ตรวจตัวอย่างแตงโม ส่วนยอด ใบ กิ่งก้าน ขั้วผล และผิวผลจากจังหวัดขอนแก่น ที่เป็นโรคจากเชื้อไวรัส WSMoV พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถตรวจเชื้อไวรัส WSMoV ได้ แต่พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับตัวอย่างแตงโมปกติค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจแบบ DAS-ELISA Kit ยี่ห้อ Agdia (ตารางที่ 2) ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในครั้งนี้จึงยังไม่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับแอนติบอดีที่มีจำหน่ายเพื่อการค้าเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างพืชปกติซึ่งอาจทำให้มีการแปลผลการตรวจผิดพลาดได้ หากผู้ทดสอบไม่คุ้นเคยกับเชื้อไวรัส WSMoV หรือเพื่อลดการการปฏิกิริยากับตัวอย่างพืชปกติอาจมีความจำเป็นต้องการเจือจางแอนติบอดีกับตัวอย่างพืชปกติ(cross-absorption) ก่อนนำไปใช้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

โปรตีนลูกผสมส่วน coat protein ของเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ที่ถูกผลิตในระบบเซลล์แบคทีเรียสามารถกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส WSMoV มีค่าความเจือจางของแอนติซีรัมสูงสุดที่ 16,384 เท่า ตรวจพบเชื้อไวรัสได้ในส่วนของ ยอด ใบ กิ่งก้านและผิวผลของแตงโม แต่พบว่าเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับตัวอย่างแตงโมปกติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจแบบ DAS-ELISA Kit (Agdia® Inc) ดังนั้นการทำ cross-absorption สามารถเพิ่มความแม่นยำในการตรวจเชื้อไวรัสในตัวอย่างพืชได้

Table 1 Primers for WSMoV-CP adapter synthesis (WSMoV-CP-F3 (PstI)/WSMoV-CP-F3 (EcoRI)

Primer Name	Primer Sequences 5' → 3'	bp	Tm °C	Product Size (bp)
WSMoV-CP-F3 (PstI)	GAG AT <u>CTGCAG</u> C ATG TCT AAC GTT AAG CAG CTT	33	72-73	~ 950
WSMoV-CP-F3 (EcoRI)	TGC TTA <u>GAATTC</u> C TTA CAC TTC CAA GGA AGT GCT	34		

Table 2 Efficiency of Polyclonal Antibody Ab-WSMoV-CP Against WSMoV Viruses in Watermelon Samples with Indirect ELISA Technique

Samples	Ab-WSMoV-CP ^{/1}	Ab-WSMoV ^{/2}
Shoots	1.460 ^{/3}	3.056
Leaves	1.384	2.871
Vines	0.673	2.521
Rinds	0.442	1.643
WSMoV samples (Agdia®) (positive control)	1.803	3.299
Buffer (negative control)	0.138	0.018
Healthy watermelon (negative control)	0.364	0.103

Note

^{/1} means: an antibody produced using a recombinant WSMoV coat protein in this experiment

^{/2} means: WSMoV antibody purchased from Agdia® Inc.

^{/3} means: Absorbance (optical density) at 405 nm

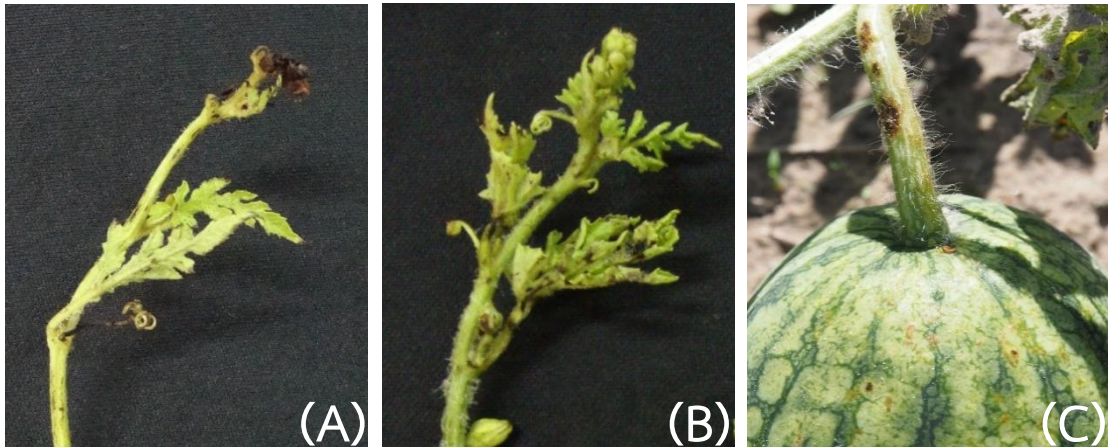


Figure 1 Watermelon infected by WSMoV (A-C) showed water-soaked, black necrotic patches on shoots, leaves, vines, tendrils tissues



Figure 2 Watermelon fruit exhibited water-soaked transparent raised spot and uneven yellow mosaic rind (A-B), Necrotic spots coalesced and turned into dark brown or white spots

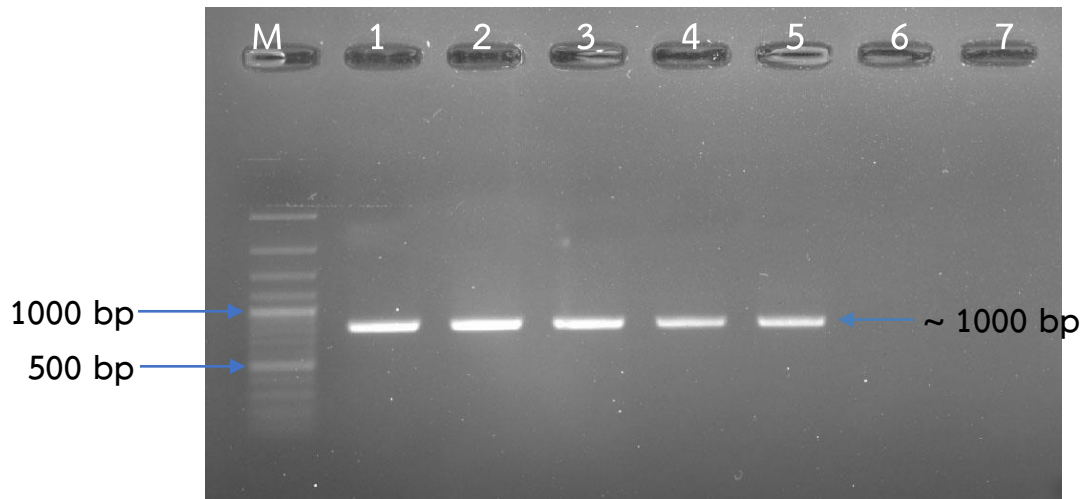


Figure 3 Gel electrophoresis of RT-PCR products of WSMoV N gene using

WSMoV-N-F3/ WSMoV-N-R3 primers

M = 100 bps DNA ladder (fermentas®)

1 = infected watermelon shoots

2 = infected watermelon leaves

3 = infected watermelon vines

4 = infected watermelon tendrils

5 = infected watermelon rinds

6 = healthy watermelon (negative control)

7 = dH₂O (negative control)

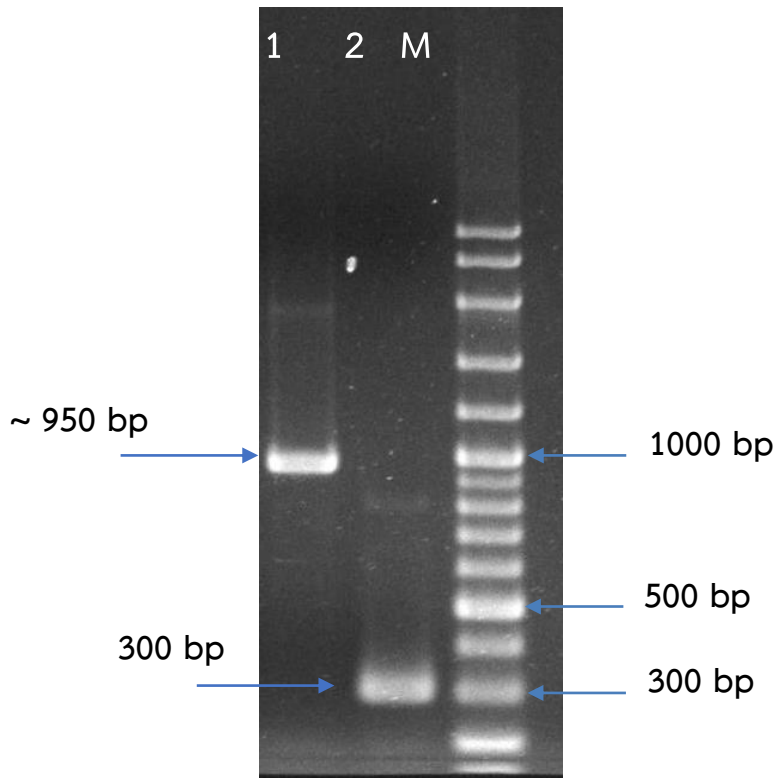


Figure 4 Gel electrophoresis of WSMoV-CP gene/6xHisTag plasmid using pBad-F / pBad-R primers by colony PCR
 M = 1 kp DNA Ladder (fermentas®)
 1 = pBad/HisA Expression vector inserted with WSMoV-CP gene/6xHisTag ~ 950 bp
 2 = pBad/HisA Expression vector without WSMoV-CP gene/6xHisTag ~ 300 bp

เอกสารอ้างอิง

- วิมล สีเทา พิษสุวรรณ เจียมสมบัติ อรประไพ คชนันท์ อัญญา บุญชิต นุชนาถ วารินทร์ ปิยาภรณ์ เพชรสูงเนิน และชาญณรงค์ ศรีภิบาล. 2547. การจำแนกทอสปอไวรัสที่พบในพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง. น. 445-451. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42: สาขาพืช สาขาส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร. 1-4 กุมภาพันธ์ 2547 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- วิมล สีเทา. 2548. การตรวจวินิจฉัยและจำแนกทอสปอไวรัสของพริก มะเขือ แตงโม และถั่วลิสง ที่พบในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เกษตรศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.
- วิมล สีเทา พิษสุวรรณ เจียมสมบัติ โสภณ วงศ์แก้ว อรประไพ คชนันท์ อัญญา บุญชิต นุชนาถ วารินทร์. 2548. การตรวจพบทอสปอไวรัสสองชนิดเข้าทำลายพืชร่วมกันในประเทศไทย. น. 558-564. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43: สาขาพืช. 1-4 กุมภาพันธ์ 2548. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ศลิขภูมิ ศุภกิจธนากร และอรอุมา เรืองวงษ์. การตรวจสอบเชื้อไวรัสในเมลอนและแคนตาลูปที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลาพูน. 2562. วารสารเกษตร 35(1): 75 – 85.
- พิษสุวรรณ เจียมสมบัติ อรประไพ คชนันท์ รัชณี ฮงประยูร อัญญา บุญชิต วิมล สีเทา นุชนาถ วารินทร์ ชาญณรงค์ ศรีภิบาล และปิยาภรณ์ เพชรสูงเนิน. 2549. ความหลากหลายของทอสปอไวรัสที่พบในประเทศไทยและเปลี้ยไฟที่เป็นพาหะนำโรค. น. 42-48 ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขาพืช. 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2549 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- อรประไพ คชนันท์ ชาญณรงค์ ศรีภิบาล สุภาวิณี ปานสอาด อัญญา บุญชิต นุชนาถ วารินทร์ อรวรรณ หิมานันโต ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ พิษสุวรรณ เจียมสมบัติ และ รัชณี ฮงประยูร. 2549. การผลิตแอนติบอดีเพื่อตรวจเชื้อทอสปอไวรัสที่พบในประเทศไทย. น.556-563. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขาพืช. 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2549 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- le, T.S. 1970. Tomato Spotted wilt Virus. C.M.I./A.A.B. Plant Virus Description No. 39. 4 p.
- Cortes, I., I.C. Livieratos, A. Derks, D. Peters and R. Kormelink. 1998. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new distinct tospovirus species. Phytopathology 88: 1276-1282.
- Chen CC, Shy JF, Yeh SD, 1990. Thrips transmission of Tomato spotted wilt virus from watermelon. Plant Protection Bulletin 32, 331–332.
- German, T.L., D.E. Ullman and J.W. Moyer. 1992. Tospovirus: diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. Annual Review of Phytopathology. 30 :315-348.
- Okuda M, Takeuchi S, Taba S, Kato K, Hanada K, 2002. Melon yellow spot virus and Watermelon silver mottle virus: outbreak of cucurbit infecting tospovirus in Japan. Acta Horticulture 588, 143-148.

- Peter, D. and R. Goldbach. 1995. The biology of tospoviruses, pp. 199-210. In R. P. Singh and K. Kohmoto (eds.) Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases Volume III : Viruses&Viroide. Elsevier Science Ltd., Kidlington, Oxford.
- Pongsapich, P. and P. Chiemsombat. 2002. Characterization of tospovirus infecting tomatos in Thailand revealed the presence of serogroup IV-tospovirus but not serogroup I-tomato spotted wilt virus. pp. 92. In The First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease. Chaing Mai, Thailand.
- Rao X., Liu Y., Wu Z. and Li Y. 2011. First report of natural infection of watermelon by Watermelon silver mottle virus in China. New Disease Reports. p 12. [doi:10.5197/j.2044-0588.2011.024.012]
- Yeh SD, Lin YC, Cheng YH, Jih CL, Chen MJ, Chen CC, 1992. Identification of tomato spotted wilt-like virus infecting watermelon in Taiwan. Plant Disease 76, 835-840. [doi:10.1094/PD-76-0835.]

การตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* ด้วยเทคนิค
 Polymerase Chain Reaction
 Detection of *Phyllosticta citriasiana* by Polymerase Chain Reaction

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

^{1/} ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Tan spot disease of pummelo caused by *Phyllosticta citriasiana*, which closely related to *P. citricarpa* (syn. *Guignardia citricarpa*), the causal agent of black spot disease of pummelo, has been listed as a quarantine pest for several countries, especially in Europe and America. The status of *P. citricarpa* (syn. *G. citricarpa*) is absent from Thailand. The limitation and similarity of morphological characters of *Phyllosticta* species resulted in uncertainty identification between *P. citricarpa* (quarantine pest and absent from Thailand) and *P. citriasiana* (the causal agent of tan spot disease of pummelo in Thailand). To clarify and confirm the identification of the causal agent of spot disease of pummelo, this study was conducted to develop detection technique for *P. citriasiana* based on genealogical concordance approach in order to support the pummelo export from Thailand to overseas as well as to monitor the tan spot disease on the import of *Citrus*. In addition, the accuracy in identification will led to the effectiveness of plant disease management. To clarify and confirm the identification of the causal agent of spot disease of pummelo, this study was conducted to identify species of *Phyllosticta* isolated from spot lesions on pummelo and also others isolates from some plants based on genealogical concordance approach. The phylogenetic reconstruction of ITS, TEF1 and ACT gene dataset revealed that the causal of tan spot disease of *Citrus maxima* (pummelo) was *P. citriasiana*. Based on the results from this study, the status of *P. citricarpa* (syn. *G. citricarpa*), causal agent of black spot disease, in Thailand is determined as absence. In addition, the isolates of *Phyllosticta* from *Musa acuminata*, *Punica granatum*, *Psidium guajava*, *Hyalocereus undatus* and *Dendrobium* 'Hybrids'

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-03-60

were identified as *P. capitalensis*. It was also found that the endophyte *Phyllosticta* obtained from *Paris polyphylla* and *C. maxima* had similar identity to *P. capitalensis*. In order to reduce the limitations of morphological identification and the requirement of fast and accurate diagnosis, the species-specific primer was designed to detect *P. citriasiana*. Three pairs of primers from this study namely, PcDOAF1/ ITS4 PcDOAF3/ITS4 and PcDOAF3/ PcDOAR3 as well as published primers, Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4, showed the highly specific results to *P. citriasiana*. In addition, the process of detection had been validated and could detect *P. citriasiana* directly from plant tissue. The fungal isolation from plant materials was not required, which could reduce the time for detecting from more than 15 days to 2 days. Developed the detection method can support the fast and accurate diagnosis of *P. citriasiana*, which could bring the advantages for making a decision for disease management as well as support the export and import of *Citrus* commodities

Key words: pummelo, Tan spot disease, *Phyllosticta citriasiana*, Polymerase Chain Reaction (PCR)

บทคัดย่อ

Phyllosticta citriasiana เป็นสาเหตุโรคจุดน้ำตาลของส้มโอ (tan spot) รานี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลใกล้เคียงกับรา *Guignardia citricarpa* มากและรา *G. citricarpa* เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา ซึ่งสถานภาพของรา *G. citricarpa* ยังไม่ปรากฏอยู่ในประเทศไทย สำหรับประเทศไทยพบรา *P. citriasiana* เป็นสาเหตุโรคจุดน้ำตาลบนผลของส้มโอที่ส่งออกไปยุโรป ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อวินิจฉัยโรคให้รวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้นก่อนการแสดงอาการของโรค โดยการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบวินิจฉัยสาเหตุโรคก่อนการส่งออกและการนำเข้าสินค้าเกษตรตลอดจนเพื่อการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ จากการจัดจำแนกด้วยชุดข้อมูลของรหัสพันธุกรรมตำแหน่ง ITS TEF1 and ACT พบว่าเชื้อสาเหตุของโรคจุดสีน้ำตาลของส้มโอในประเทศไทย คือ *P. citriasiana* ดังนั้นสถานภาพของรา *P. citricarpa* ยังไม่ปรากฏอยู่ในประเทศไทย นอกจากนี้พบว่ารา *Phyllosticta* สาเหตุของโรคบนพืชอาศัยชนิดอื่น ๆ ได้แก่ กล้วย ทับทิม ฝรั่ง กล้วยไม้ แก้วมังกร คือ *P. capitalensis* และยังพบว่าราชนิดนี้เป็นราชนิดเอนโดไฟท์ของส้มโอและตีนสูง เพื่อลดข้อจำกัดของการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเพื่อการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว แม่นยำ จึงพัฒนาวิธีการตรวจสอบรา *P. citriasiana* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล จากการศึกษาครั้งนี้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *P. citriasiana* จำนวน 3 คู่ ได้แก่ PcDOAF1/ITS4 PcDOAF3/ITS4 และ PcDOAF3/ PcDOAR3 รวมถึงไพรเมอร์ที่มีรายงานได้แก่ Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 สามารถตรวจจำรา *P. citriasiana* ได้ และสามารถนำเยื่อเยื่อจากบริเวณที่แสดงอาการมาตรวจได้โดยตรงโดยใช้ระยะเวลาเพียง 2 วัน ช่วยลดขั้นตอนและระยะเวลาจากวิธีการเดิมที่ต้องแยกหาเชื้อราสาเหตุ ซึ่งใช้เวลานานกว่า 15 วัน ผลจากการศึกษาครั้งนี้นอกจากสามารถตรวจสอบวินิจฉัยสาเหตุโรคได้อย่าง

รวดเร็วเพื่อการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพแล้ว ยังสามารถสนับสนุนและเพิ่มศักยภาพในวินิจฉัยสาเหตุโรคก่อนการส่งออกและการนำเข้าสินค้าเกษตรโดยเฉพาะพืชตระกูลส้มได้อีกด้วย

ราสกุล *Phyllosticta* เป็นสาเหตุโรคพืชแล้วยังเป็นราเอ็นโดไฟท์ซึ่งเป็นสกุลเด่นที่พบเจริญอยู่ในพืชแทบทุกชนิด โดยเฉพาะโรค Black spot ของพืชส้ม ซึ่งมีสาเหตุเกิดจาก *Phyllosticta citricarpa* (Teleomorph state: *Guignardia citricarpa*) แต่มักพบรา *P. capitalensis* (Teleomorph state: *G. mangiferae*) เจริญอยู่ในผลส้มด้วยแต่ไม่แสดงลักษณะอาการ (Glienke-Blanco *et al.*, 2002; Baayen *et al.*, 2002) เช่นเดียวกับโรค Tan spot ของส้มโอ สาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citriasiana* ก็พบรา *P. capitalensis* เจริญอยู่ด้วย และเมื่อทำการแยกเชื้อก็มักพบราทั้งสองชนิดนี้ รา *P. citriasiana* เป็นราที่พบในประเทศจีน เวียดนาม และ ไทย จากรายงานไม่พบราชนิดนี้ในสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกา (Wang *et al.*, 2012; Wikee *et al.*, 2011; Wulandari *et al.*, 2009) แต่ในขณะเดียวกันมีรายงานพบรา *Phyllosticta citribrazillensis* C. Glienke & Crous ที่แยกได้จากแผล necrotic spots บนผลส้มโอในประเทศบราซิล ดังนั้นการส่งออกส้มโอไปประเทศเหล่านี้และการนำเข้าส้มมาจากประเทศบราซิลจะต้องมีมาตรการในการควบคุมการระบาดของโรค

เนื่องจากรา *Phyllosticta citriasiana* เป็นสาเหตุโรค Tan spot ของส้มโอ มีรายงานพบในประเทศไทย ในปี 2550 (Wulandari *et al.*, 2009) และมีรายงานแพร่ระบาดในส้มประเทศจีน (Seaver, 2012) เวียดนาม ด้วยเหมือนกัน ราเข้าทำลายผลส้มโอระยะใกล้สุกและเข้าทำลายใบสำหรับพืชอาศัยของราชนิดนี้ ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับพืชอาศัยเลย (Wang *et al.*, 2012; Wikee *et al.*, 2011; Wulandari *et al.*, 2009) จากการศึกษาของ Wulandari และคณะ (2009) รายงานว่ารานี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลใกล้เคียงกับรา *Guignardia citricarpa* มาก ซึ่งรา *G. citricarpa* เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา เนื่องการตรวจสอบรา *P. citriasiana* และโรค อาจจะได้รากลายชนิดในสกุล *Phyllosticta* ที่เป็นเอ็นโดไฟท์ *P. capitalensis* ซึ่งจะพบมากในเขตร้อนร้อนและกึ่งร้อนชื้นในพืชพื้นเมืองและพืชอื่นๆ รา *P. capitalensis* สามารถเข้าไปเจริญในผลได้ โดยทั่วไปการตรวจสอบเชื้อสาเหตุเบื้องต้น ได้แก่ การนำผลส้มโอไปบ่มเชื้อ ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ และนำไปแยกเชื้อโดยวิธี Tissue transplanting การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุ ซึ่งอาจจะทำให้การจำแนกชนิดของเชื้อผิดพลาดได้ และต้องใช้เวลาหลายวัน (7-15 วัน) ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อวินิจฉัยโรคให้รวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้นก่อนการแสดงอาการของโรค โดยการใช้นาฬิกาชีวโมเลกุลก็เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างรา *P. citriasiana* และ *P. capitalensis* เพื่อตรวจสอบวินิจฉัยสาเหตุโรคก่อนการส่งออกและการนำเข้าสินค้าเกษตรตลอดจนเพื่อการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยราทั้งสองชนิดนี้ต้องเป็นวิธีการที่เป็นมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับจากประเทศผู้ค้า

คำหลัก: ส้มโอ โรคจุดน้ำตาล *Phyllosticta citriasiana* Polymerase Chain Reaction (PCR)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก, ถุงกระดาษ, กรรไกรตัดแต่งกิ่ง, ไม้ทาบตัวอย่าง, กระดาษหนังสือพิมพ์, ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง
- อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR machine) เครื่องเขย่า (vortex) เครื่อง tissue lyser gel tank เครื่องกำเนิดกระแสไฟ gel plate comb เครื่องถ่ายภาพเจล เครื่อง microwave micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร กล้องจุลทรรศน์แบบ compound กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ water bath และ heat block
- วัสดุในห้องปฏิบัติการ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate
- สารเคมี ได้แก่ เอนไซม์สำหรับทำปฏิกิริยา Taq DNA Polymerase Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Proteinase K enzyme Lithium Borate buffer (LB) ชุดสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ Microbial DNA Isolation Kit Power Plant Isolation Kit ชุดสำหรับการสกัดเจล ชุดสำหรับทำความสะอาดดีเอ็นเอ Stain G loading dye agarose gel (PCR grade) PCR water DNA ladder อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA) และ ไพรเมอร์ ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990)
- Sequence assemble programs ได้แก่ Bioedit และ Geneious version 8.1.9

วิธีการ

การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana*

1. สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ รา *P. citriasiana*

ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม

2. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta*

2.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และฐานข้อมูลนานาชาติ (2560-2561)

2.1.1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน genus *Phyllosticta*

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราในสกุล *Phyllosticta* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอภิศรีศรีการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2.1.2 แยกราให้บริสุทธิ์

แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมามาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่

ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.1.3 จำแนกชนิดของรา *Phyllosticta*

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Phyllosticta* ที่ศึกษากับคู่มือการจำแนกชนิดที่เกี่ยวข้อง

2.1.4 สกัดดีเอ็นเอของรา *Phyllosticta* (DNA extraction) จากตัวอย่างราที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากราในสกุล *Phyllosticta* และจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เขี่ยเส้นใยของรา *Phyllosticta* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Dungsard และคณะ (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

2.1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง ITS กำหนดใช้ค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่คุณผลิตแนะนำ

2.1.6 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 เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1.7 การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

3. รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Phyllosticta* จาก GenBank

รวบรวมข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Phyllosticta* ที่มีใน GenBank ทั้งหมด เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากข้อ 2.1

4. การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Phyllosticta*

นำข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Phyllosticta* ทั้งหมดที่ได้จากข้อ 2.1 และ

2.2 มาจัดเรียง และบันทึกเป็นชุดข้อมูลในรูปแบบ fasta ไฟล์ โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar et al., 2008) หรือใช้โปรแกรม online จากเว็บไซต์ www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/

5. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *P. citriasiana*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *P. citriasiana* โดยการพิจารณาชุดข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ ใช้โปรแกรม GPRIME

6. ทดสอบไพรเมอร์ (Primers validation)

ทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับดีเอ็นเอของรา *P. citriasiana* และราใน สกุล *Phyllosticta* โดยทำตามขั้นตอน 2.1.5 – 2.1.7

การตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* ในตัวอย่างต่างๆ ของพืชตระกูลส้ม โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *P. citriasiana*

1. การเตรียมตัวอย่างต้นแบบดีเอ็นเอ (DNA templates) จากแหล่งตัวอย่างๆ พร้อมวิธีการสกัด ดังนี้

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจาก clean culture หรือ mixed cultures ของรา *Phyllosticta*

เขียนเส้นใยของรา *Phyllosticta* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอเติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard และคณะ (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบส้มสด และตัวอย่างใบส้มร่วง

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบส้มสด หรือใบร่วง จากใบที่ไม่แสดงอาการของโรค มาล้างน้ำให้สะอาด นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีกครั้งหนึ่ง และนำตัวอย่างใบส้มมาแช่น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที รินน้ำออกแล้วซับด้วยกระดาษซับจนแห้ง นานประมาณ 5 นาที ย้ายชิ้นตัวอย่างใบส้มลงในถุงพลาสติก บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างใบส้มออกมาผึ่งที่อุณหภูมิห้อง (22-26 องศาเซลเซียส) นานประมาณ 17 ชั่วโมง ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นประมาณ 4 วัน ทำการตรวจหาเส้นใยของราที่เจริญออกมา และอีกประมาณ 10 วัน ตรวจหา fruiting bodies ของรา จากนั้นนำตัวอย่างใบพืชที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างมากทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard และคณะ (2015)

1.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างผลส้ม

นำตัวอย่างผลส้มมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีก จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการลนไฟ เนื้อเอาผิวผลส้มบริเวณที่แสดงอาการจุดรวมถึงเนื้อเยื่อรอบแผล ขนาดประมาณ 2 x 2 mm ใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการสกัดตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard และคณะ (2015)

1.4 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกิ่งและยอดอ่อนของส้ม

นำตัวอย่างกิ่งหรือยอดอ่อนของส้มมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีก จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการลนไฟ เนื้อเอาบริเวณผิวที่แสดงอาการจุดรวมถึงเนื้อเยื่อรอบแผล ขนาดประมาณ 1-2 mm จากนั้นหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ เขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 6 นาที และทำการสกัดตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard และคณะ (2015)

1.5 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินที่เก็บบริเวณรอบรากของต้นส้ม โดยแยกเอาส่วนของเศษซากพืชหรือใบพืชออกจากตัวอย่างดิน ประมาณ 0.1 กรัมใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ เขย่าด้วย TissueLyser ที่ความเร็ว 20 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที และทำการสกัดตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard และคณะ (2015)

2. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง ITS (ITS1/ITS4) กำหนดค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ได้ผลิตแนะนำ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำ PCR อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ รา *P. citriasiana* ที่ออกแบบได้

3. 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 เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4. การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ 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

- การบันทึกข้อมูล

เก็บรักษาสายพันธุ์ราที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ราที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana*1. สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ รา *P. citriasiana*

สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ รา *P. citriasiana* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา

รายละเอียดของรา *Phyllosticta* ดังนี้

Scientific name	<i>Phyllosticta</i>
Kingdom	Fungi
Division	Ascomycota
Class	Dothideomycetes
Subclass	Incertae sedis
Order	Botryosphaerales
Family	Botryosphaeriaceae
Genus	<i>Phyllosticta</i>
Perfect state	<i>Guignardia</i>

ราสกุลนี้เจริญอยู่บนใบพืชทำให้เกิดโรคใบจุดกับพืชหลายชนิด โดยราสร้าง pycnidia บนใบพืชและที่ผล conidia มี 1 เซลล์ นอกจากอยู่บนใบพืชแล้วรายังเจริญอยู่บนกิ่ง ลำต้นของพืชด้วย และที่สำคัญรานี้เป็นสาเหตุของโรคจุดดำหรือ Citrus Black Spot ของพืชตระกูลส้ม สาเหตุเกิดจาก *Guignardia citricarpa* (anamorphic state: *Phyllosticta citricarpa*) (Kiely, 1949; Sutton and Waterston, 1966) ราสกุล *Phyllosticta* เป็นสาเหตุโรคพืชแล้วยังเป็นราเอ็นโดไฟท์ซึ่งเป็นสกุลเด่นที่พบเจริญอยู่ในพืชแทบทุกชนิด โดยเฉพาะโรคจุดดำของส้ม ซึ่งมีสาเหตุเกิดจาก มักพบรา *P. capitalensis* (Teleomorph state: *G. mangiferae*) เจริญอยู่ในผลส้มด้วย แต่ไม่แสดงลักษณะอาการ (Glienke-Blanco et al., 2002; Baayen et al., 2002) เช่นเดียวกับโรคจุดน้ำตาล (Tan spot) ของส้มโอ สาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citriasiana* (Figure 1) ก็พบรา *P. capitalensis* เจริญอยู่ด้วย และเมื่อทำการแยกเชื้อก็มักพบราทั้งสองชนิดนี้ รา *P. citriasiana* เป็นราที่พบในประเทศจีน เวียดนาม และ ไทย จากรายงาน ไม่พบราชนิดนี้ในสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกา (Wang et al., 2012; Wikee et al., 2011; Wulandari et al., 2009) แต่ในขณะเดียวกันมีรายงานพบรา *Phyllosticta citribrazilliensis* C. Glienke & Crous ที่แยกได้จากแผล necrotic spots บนผลส้มโอในประเทศบราซิล ดังนั้นการส่งออกส้มโอไปประเทศเหล่านี้และการนำเข้าส้มมาจากประเทศบราซิลจะต้องมีมาตรการในการควบคุมการระบาดของโรค นอกจากนี้โรค Black rot ขององุ่น สาเหตุเกิดจาก *Guignardia bidwelli* (anamorphic state: *Phyllosticta ampellicida*) (Sivanesan and Holliday, 1981) โรคใบจุดของกล้วยสาเหตุเกิดจาก *Guignardia musae* (anamorphic state: *Phyllosticta musarumi*) (Punithalingam and Holliday, 1975) โรคผลเน่าของฝรั่ง สาเหตุเกิดจาก *Guignardia psidii* (anamorphic state: *Phyllosticta psidiicola*) (Gonzalez and Rondn, 2005) เป็นต้น

2. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta*

2.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และฐานข้อมูลนานาชาติ

รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราใน genus *Phyllosticta* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต (DOA 009, 010, 011, 018, 019 058, 040, 088, 090 และ 201) (Table 1) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และนำมาเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร V-8 agar เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราสกุล *Phyllosticta* จากฐานข้อมูลนานาชาติของรา *Phyllosticta* จาก Wikee *et al.*, 2013 (Table 2) โดยจะศึกษาลำดับเบสเพื่อหาความแตกต่างที่เฉพาะเจาะจงต่อ *Phyllosticta citriasiana* บนตำแหน่ง ITS

2.1.1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน genus *Phyllosticta*

เก็บตัวอย่างโรคพืชมาแยกเชื้อสาเหตุ ดังนี้ ที่เกิดจาก *Phyllosticta* มาแยกเชื้อ

1. โรคจุดน้ำตาล (tan spot) ของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม จาก อำเภอปากพ่อง จังหวัดนครศรีธรรมราช มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้รา 2 ไอโซเลต จำแนกเชื้อราโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราบนอาหาร PDA จำแนกชนิดเป็นราในสกุล *Phyllosticta* ทั้ง 2 ไอโซเลต พบว่าราสร้างสปอร์ในระยะ anamorph state ทั้ง 2 ไอโซเลต และเก็บตัวอย่างส้มโอโรคจุดน้ำตาล จากอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย มาแยกเชื้อและจำแนกชนิดได้รา *Phyllosticta citriasiana* (Figure 2)

2. โรคผลจุดดำของผลฝรั่ง มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้ราสกุล *Phyllosticta* 1 ไอโซเลต

3. อาการใบจุดของใบวาสนา มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้ราสกุล *Phyllosticta* 1 ไอโซเลต

4. อาการใบจุดของส้มโอ จังหวัดนครปฐม มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้ราสกุล *Phyllosticta* จำนวน 2 ไอโซเลต (จากวัดไร่ขิง อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม และอำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม) (Figure 3)

5. อาการใบจุดส้มโอ อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ จำนวน 4 ไอโซเลต

6. ใบจุดกล้วยไม้ อำเภอเมือง จังหวัดยะลา

2.1.2 แยกราให้บริสุทธิ์

แยกราจากข้อ 2.1.1 บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1.3 จำแนกชนิดของรา *Phyllosticta*

จากตัวอย่างโรคจุดน้ำตาลของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม โรคผลจุดดำของฝรั่ง อาการใบจุดของใบวาสนา อาการใบจุดส้มโอ อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ และใบจุดกล้วยไม้ อำเภอเมือง จังหวัดยะลา ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์และจำแนกชนิดเป็นรา *Phyllosticta* spp. ทั้งหมด

2.1.4 สกัดดีเอ็นเอของรา *Phyllosticta* (DNA extraction) จากตัวอย่างราที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากราในสกุล *Phyllosticta* และจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2.1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1.6 การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

2.1.7 การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยเลี้ยงรา *Phyllosticta* จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ *Phyllosticta mangifera-indica* (018) แยกได้จากมะม่วง *Phyllosticta* sp (040) แยกได้จากขนุน *P. capitulensis* (058) แยกได้จากต้นวาสนา *P. capitulensis* (201) แยกได้จากทับทิม *Phyllosticta* sp (118) แยกได้จากกล้วยไม้ *Dendrobium* และ *Phyllosticta* sp (121) แยกได้จากฝรั่ง และแยกได้จากกล้วย 2 ไอโซเลต (Table 1) และสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของรา *Phyllosticta* spp. จำนวน 10 ไอโซเลต โดยใช้ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และส่ง Sequencing จากนั้นทำการวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และจัดเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบชุดข้อมูลเพื่อทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการจัดจำแนก และวิเคราะห์หาตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อ *Phyllosticta citriasiana* เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไป

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และจัดเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ เพื่อเปรียบเทียบชุดข้อมูลเพื่อทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการจัดจำแนก และวิเคราะห์หาตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อ *Phyllosticta citriasiana* เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไป ทำการออกแบบและได้คู่ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ เพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะในการตรวจคัดเลือกรววิเคราะห์รา *Phyllosticta citriasiana* และทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Phyllosticta* ในฐานข้อมูล GenBank (Figure 4)

2.1.8 ทดสอบความจำเพาะและความสามารถของคู่ไพรเมอร์ในการตรวจจำแนกรว

P. citriasiana จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างโดยปฏิกิริยา PCR

ดำเนินการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบในการทดลองนี้ ต่อรา *Phyllosticta* spp. จำนวน 6 เส้น คือ PcDOAF1, PcDOAR1, PcDOAF2, PcDOAR2, PcDOAF3 และ PcDOAR3 พบว่าไพรเมอร์ PcDOAF1 และ PcDOAF2 จำเพาะต่อ *P. citriasiana* เพียงชนิดเดียว แต่ PcDOAF3 สามารถ align ได้ทั้งรา *P. citriasiana* และ *P. citrimaxima* (Figure 5) ทั้งนี้ reverse ไพรเมอร์ทั้ง 3 แบบ (PcDOAR1 PcDOAR2 และ PcDOAR3) มีความจำเพาะต่ำ ซึ่งสามารถ anneal กับ *Phyllosticta* หลายชนิด ได้แก่ *P. citriasiana*, *P. citrimaxima*, *P. citricarpa*, *P. brazilianiae*, *P. citrichinaensis*, *P. citribraziliensis* และ *P. brazilianiae*

ทำการ optimize ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ ต่อรา *P. citriasiana* isolate M0086 ได้แก่ PcDOAF1 / PcDOAR1, PcDOAF1/ ITS4, PcDOAF2/ PcDOAR2, PcDOAF2/ ITS4, PcDOAF3/PcDOAR3, PcDOAF3/ITS4 (ออกแบบในการทดลองนี้), Pca8-F/ITS4 และ Pca9-F/ITS4 (ออกแบบโดย Wang et al., 2011) ได้ annealing temperature อยู่ระหว่างอุณหภูมิ 46-60 โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 56-60 องศาเซลเซียส (Figure 6)

ผลการทดสอบ primer จำนวน 8 คู่ ต่อ DNA ที่สกัดจาก culture ของ รา *Phyllosticta* ไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ M0085, M0086, M0089, M0387, M0413, M0414 M0415 และ *Colletotrichum* sp. isolate M0301 พบว่า PcDOAF1/ITS4, PcDOAF3/PcDOAR3, PcDOAF3/ITS4, Pca8-F/ITS4 และ Pca9-F/ITS4 มีความจำเพาะต่อ *P. citriasiana* (Figure 7)

ผลการทดสอบไพรเมอร์ PcDOAF1/ITS4, PcDOAF3/ITS4, Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 ต่อ DNA ที่สกัดจากแผลจุดสีน้ำตาลที่ตัดจากเนื้อเยื่อผิวส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล พบว่าไพรเมอร์ PcDOAF1/ITS4, PcDOAF3/ITS4, Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 สามารถตรวจจับได้ (Figure 8)

ผลการทดสอบไพรเมอร์ PcDOAF1/ITS4 ต่อ DNA ที่สกัดจากใบส้มโอที่มีระยะห่างจากแผลจุดสีน้ำตาลที่ระยะ 0 0.5 1 1.5 2 2.5 และ 3 เซนติเมตร (Figure 9) พบว่าเบื้องต้น ไพรเมอร์ PcDOAF1/ITS4 สามารถตรวจจับรา *P. citriasiana* ได้ ในเนื้อเยื่อใบส้มโอที่มีระยะห่างจากแผลจุดสีน้ำตาลได้ห่างสุดประมาณ 1.5-3 เซนติเมตร (Figure 9)

ทำการทดสอบไพรเมอร์ PcDOAF1/ITS4 กับตัวอย่างผลส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างผลปกติ ตัวอย่างใบส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างใบปกติ และกิ่งของส้มโอ โดยสกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวจากผลส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างผลปกติ ตัวอย่างใบส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างใบปกติ และกิ่งของส้มโอ รวมจำนวน 138 ตัวอย่าง และดำเนินการทดลองไพรเมอร์ PcDOAF1/ITS4 ต่อ DNA ที่สกัด พบว่าไพรเมอร์ PcDOAF1/ITS4 สามารถตรวจจับรา *P. citriasiana* บนใบและผลที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาลได้ แม้แผลจุดสีน้ำตาลจะอยู่ในระยะเริ่มต้นและยังไม่พบการสร้าง fruiting body (Figure 10A) และให้ผลการตรวจจับที่ชัดเจนขึ้นเมื่อแผลจุดสีน้ำตาลพบโครงสร้างของ fruiting body (Figure 10B)

ทั้งนี้ได้ทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างปกติที่ไม่แสดงอาการเพื่อยืนยันความประสิทธิภาพ ของไพรเมอร์ที่ได้ ไม่พบหรือไม่แสดงผลบวกในการตรวจจับรา *P. citriasiana* บนตัวอย่างปกติใด ๆ ดังนั้นจากการทดลองนี้ ได้ไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพและจำเพาะต่อการตรวจจับรา *P. citriasiana* จำนวน 3 คู่คือ PcDOAF1/ITS4 PcDOAF3/ PcDOAR3 PcDOAF3/ITS4 รวมถึงไพรเมอร์ Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 ที่ออกแบบโดย Wang *et al.* (2012)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบรา *P. citriasiana* โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล จากการศึกษาครั้งนี้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *P. citriasiana* จำนวน 3 คู่ ได้แก่ PcDOAF1/ITS4 PcDOAF3/ITS4 และ PcDOAF3/ PcDOAR3 รวมถึงไพรเมอร์ที่มีรายงานได้แก่ Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 สามารถตรวจจับรา *P. citriasiana* ได้ และสามารถนำเยื่อเยื่อจากบริเวณที่แสดงอาการมาตรวจได้โดยตรงโดยใช้ระยะเวลาเพียง 2 วัน ช่วยลดขั้นตอนและระยะเวลาจากวิธีการเดิมที่ต้องแยกหาเชื้อราสาเหตุ ซึ่งใช้เวลานานกว่า 15 วัน ผลจากการศึกษาครั้งนี้นอกจากสามารถตรวจสอบวินิจฉัยสาเหตุโรคได้อย่างรวดเร็วเพื่อการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพแล้วยังสามารถสนับสนุนและเพิ่มศักยภาพในวินิจฉัยสาเหตุโรคก่อนการส่งออกและการนำเข้าสินค้าเกษตรโดยเฉพาะพืชกระถุนส้มได้อีกด้วย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ดร. ชนินทร ดวงสอดา ที่ให้ความช่วยเหลือในงานทางด้านชีวโมเลกุล พัฒนาเทคนิคในการตรวจวินิจฉัยรา *P. citriasiana* สาเหตุโรค Tan spot ของส้มโอ ซึ่งสามารถตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ จนประสบความสำเร็จในการพัฒนา และขอขอบคุณ นางสาวศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช (อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช) นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน และกลุ่มงานวิทยาไม้โค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือ และความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช สุธามาศ ณ น่าน บุรณี พัววงษ์แพทย์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ และ ไมตรี พรหมมินทร์. 2550. โรคจุดดำของส้มโอสาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citricarpa*. หน้า 1-12. ใน การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 “อารักขาพืชไทยได้ร่วมพระบารมี” ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน จังหวัดพิษณุโลก. 20-22 พฤศจิกายน 2550.
- Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- 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.
- 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.
- Kotze, I.M. 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease* 65:945-950.
- Meyer, L., R. Jacobs, J.M. Kotze, M. Truter and L. Korsten. 2012. Detection and molecular identification protocols for *Phyllosticta citricarpa* from citrus matter. *S. Afr. J. Sci* 108 (3/4): 1-6.
- PestID. 2012. Pest Identification Database (PestID). United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine. <https://moks14.aphis.usda.gov/aqas/login.jsp>. (Archived at PERAL).
- Schubert, T., B. Sutton, and A. Jeyaprakash. 2010. Pest Alert: Citrus Black Spot (*Guignardia citricarpa*) discovered in Florida (DACS-P-01723). Plant Pathology Section, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, FL.

- Sutton, B.C and J.M Waterson. 1966. *Guignardia citricarpa*. No. 85 In: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.
- Wang, X., G. Chen, F. Huang, J. Zhang, K. D. Hyde, and H. Li. 2012. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. *Fungal Diversity* 52:209-224.
- Wikey, S., D. Udayanga, P. W. Crous, E. Chukeatirote, E. H. C. McKenzie, A. H. Bahkali, D.-Q. Dai, and K. D. Hyde. 2011. *Phyllosticta*—an overview of current status of species recognition. *Fungal Diversity* 51:43-61.
- Wulandari, N. F., C. To-anun, K. D. Hyde, L. M. Duong, J. de Gruyter, J. P. Meffert, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Diversity* 34:23-39.

Table 1: List of *Phyllosticta* collected in this study

Isolate	<i>Phyllosticta</i>	Host	Location	Source
009	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Wiang Kaen, Chiang Rai	collection
010	<i>P. citriasiana</i>	<i>Citrus maxima</i>	Wiang Kaen, Chiang Rai	collection
011	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Wiang Kaen, Chiang Rai	collection
018	<i>P. mangifera-indica</i>	<i>Mangifera indica</i>	Chanthaburi	collection
019	<i>P. citriasiana</i>	<i>Citrus maxima</i>	Nakhon Pathom	collection
040	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Bangkok	collection
058	<i>P. captitalensis</i>	<i>Dracaena goldieana</i>	Bangkok	collection
201	<i>P. captitalensis</i>	<i>Punica granatum</i>	Chiang Rai	collection
088	<i>P. citriasiana</i>	<i>Citrus maxima</i>	Chiang Dao, Chiang Mai	collection
090	<i>P. citriasiana</i>	<i>Citrus maxima</i>	Kasetsombun, Chaipayum	collection
	<i>P. captitalensis</i>	<i>Dendrobium</i> sp.	Chiang Rai	collection
091	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Kasetsombun, Chaipayum	isolation
092	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Kasetsombun, Chaipayum	isolation
093	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Kasetsombun, Chaipayum	isolation
094	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Kasetsombun, Chaipayum	isolation
116	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Samparn, Nakhon Pathom	isolation
117	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Phutthamonthon, Nakhon Pathom	isolation
118	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Dendrobium</i> sp.	Sai Noi, Nonthaburi	isolation
119	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Phanang, Nakhon Sri Thammarat	isolation
120	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Phanang, Nakhon Sri Thammarat	isolation
121	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Guava psidii</i>	Samparn, Nakhon Pathom	isolation
	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Dendrobium</i> sp.	Mae Tang, Chiang Mai	isolation
	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Musa</i> sp.	Mae Tang, Chiang Mai	isolation

Table 2 *Phyllosticta* isolates from Wikee *et al.*, 2013

Species	Culture no. ¹	Host	Country	GenBank no. ²				
				ITS	LSU	TEF1	ACT	GPDH
	CPC 20258	<i>Ophiopogon japonicus</i>	Thailand	KC291339	KF206245	KC342559	KC342536	KF289094
	CPC 20259	Orchidaceae	Thailand	KC291340	KF206244	KC342560	KC342537	KF289104
	CPC 20263	Magnoliaceae	Thailand	KC291341	KF206241	KC342561	KC342538	KF289085
	CPC 20265	Euphobiaceae	Thailand	KF206194	KF206239	KF289182	KF289297	KF289105
	CPC 20266	<i>Polyscias</i> sp.	Thailand	KC291342	KF206238	KC342562	KC342539	KF289109
	CPC 20267	<i>Baccaurea ramiflora</i>	Thailand	KF206195	KF206237	KF289173	KF306233	KF289078
	CPC 20268	<i>Hibiscus syriacus</i>	Thailand	KC291343	KF206236	KC342563	KC342540	KF289117
	CPC 20269	<i>Ophiopogon japonicus</i>	Thailand	KC291344	KF206235	KC342564	KC342541	KF289118
	CPC 20270	<i>Tectona grandis</i>	Thailand	KC291345	KF206234	KC342565	KC342542	KF289110
	CPC 20271	<i>Crinum asiaticum</i>	Thailand	KF206196	KF206233	KF289183	KF289298	KF289106
	CPC 20272	Orchidaceae	Thailand	KC291346	KF206232	KC342566	KC342543	KF289079
	CPC 20274	<i>Mangifera indica</i>	Thailand	KF206197	KF206231	KF289188	KF289299	KF289119
	CPC 20275	<i>Polyalthia longifolia</i>	Thailand	KC291347	KF206230	KC342567	KC342544	KF289107
	CPC 20278	<i>Euphorbia milii</i>	Thailand	KC291348	KF206227	KC342568	KC342545	KF289113
	CPC 20423	<i>Philodendron</i> sp.	Thailand	KC291349	KF206226	KC342569	KC342546	KF289116
	CPC 20508	<i>Ixora chinensis</i>	Thailand	KF206198	KF206225	KF289185	KF289302	KF289111
	CPC 20509	<i>Cordyline fruticosa</i>	Thailand	KF206199	KF206224	KF289186	KF289303	KF289112
	CPC 20510	<i>Pyrrosia adnascens</i>	Thailand	KF206200	KF206223	KF289174	KF289304	KF289080
	CPC 21035	<i>Citrus</i> sp.		KF206201	-	-	KF289305	-
	LGMF 219	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	KF206202	KF206220	JF261490	KF289306	JF343737
	LGMF 220	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	KF206203	KF206219	JF261488	KF289307	JF343735
	LGMF 222	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	KF206204	KF206218	JF261492	KF289308	JF343739
<i>P. citriasiatica</i>	CBS 120486	<i>Citrus maxima</i>	Thailand	FJ538360	KF206314	FJ538418	FJ538476	JF343686
	CBS 120487	<i>Citrus maxima</i>	China	FJ538361	KF206313	FJ538419	FJ538477	JF343687
	CBS 120488	<i>Citrus maxima</i>	Thailand	JN692545	KF206312	JN692533	JN692521	KF289144
	CBS 123370	<i>Citrus maxima</i>	Vietnam	FJ538355	KF206310	FJ538413	FJ538471	JF343689
	CBS 123371	<i>Citrus maxima</i>	Vietnam	FJ538356	KF206309	FJ538414	FJ538472	JF343690
	CBS 123372	<i>Citrus maxima</i>	Vietnam	FJ538357	KF206308	FJ538415	FJ538473	KF289145
<i>P. citribraziliensis</i>	CBS 100098	<i>Citrus limon</i>	Brazil	FJ538352	KF206221	FJ538410	FJ538468	JF343691
	CPC 17464	<i>Citrus</i> sp.	Brazil	KF170300	KF206263	KF289224	KF289280	KF289159
	CPC 17465	<i>Citrus</i> sp.	Brazil	KF170301	KF206262	KF289225	KF289281	KF289160
	CPC 17466	<i>Citrus</i> sp.	Brazil	KF170302	KF206261	KF289226	KF289282	KF289161
<i>P. citricarpa</i>	CBS 102374	<i>Citrus aurantium</i>	Brazil	FJ538313	KF206324	GU349053	FJ538429	JF343679
	CBS 120489	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	FJ538315	KF206311	FJ538373	FJ538431	KF289150
	CBS 127454	<i>Citrus limon</i>	Australia	JF343583	KF206306	JF343604	JF343667	JF343771
	CBS 127452	<i>Citrus reticulata</i>	Australia	JF343581	KF206307	JF343602	KF289241	JF343769
	CBS 127455	<i>Citrus sinensis</i>	Australia	JF343584	KF206305	JF343605	JF343668	JF343772
	CBS 122482	<i>Citrus sinensis</i>	Zimbabwe	FJ538317	KF306230	FJ538375	KF289265	KF289146
	CPC 16586	<i>Citrus limon</i>	Argentina	KF170293	KF206274	KF289220	KF289269	KF289155
	CPC 16587	<i>Citrus limon</i>	Argentina	KF170294	KF206273	KF289219	KF289270	KF289154
	CPC 16603	<i>Citrus limon</i>	Uruguay	KF170295	KF206269	KF289213	KF289274	KF289147
	CPC 16604	<i>Citrus limon</i>	Uruguay	KF206191	-	-	KF289292	-
	CPC 16605	<i>Citrus limon</i>	Uruguay	KF170296	KF206268	KF289214	KF289275	KF289148
	CPC 16606	<i>Citrus limon</i>	Uruguay	KF170297	KF206267	KF289215	KF289276	KF289149
	CPC 16609	<i>Citrus</i> sp.	Argentina	KF170298	KF206266	KF289217	KF289277	KF289152
	CPC 16149	<i>Citrus</i> sp.	Argentina	KF170290	KF206277	KF289216	KF289266	KF289151
	CPC 16151	<i>Citrus</i> sp.	South Africa	KF170291	KF206276	KF289221	KF289267	KF289156
	CPC 16152	<i>Citrus</i> sp.	South Africa	KF170292	KF206275	KF289218	KF289268	KF289153
<i>P. citrichinaensis</i>	ZJUC 200956	<i>Citrus reticulata</i>	China	JN791620	-	JN791459	JN791533	-
	ZJUC 200964	<i>Citrus maxima</i>	China	JN791611	-	JN791461	JN791535	-

Table 2 *Phyllosticta* isolates from Wikke *et al.*, 2013 (Continued)

Species	Culture no. ¹	Host	Country	GenBank no. ²				
				ITS	LSU	TEF1	ACT	GPDH
	ZJUCC 2010150	<i>Citrus maxima</i>	China	JN791662	-	JN791514	JN791582	-
	ZJUCC 2010152	<i>Citrus sinensis</i>	China	JN791664	-	JN791515	JN791589	-
<i>P. citrimaxima</i>	CPC 20276 = MFLUCC10-0137 = CBS 136059	<i>Citrus maxima</i>	Thailand	KF170304	KF206229	KF289222	KF289300	KF289157
<i>P. concentrica</i>	CBS 937.70	<i>Hedera helix</i>	Italy	FJ538350	KF206291	FJ538408	KF289257	JF411745
	CBS 134749 = CPC 18842	<i>Hedera</i> sp.	Spain	KF170310	KF206256	KF289228	KF289288	KF289163
<i>P. cordylinophila</i>	CPC 21880 = MUCCJ 521	<i>Cordyline fruticosa</i>	Japan	AB454357	AB454357	-	AB704244	-
	CPC 20261 = MFLUCC10-0166 = WK024	<i>Cordyline fruticosa</i>	Thailand	KF170287	KF206242	KF289172	KF289295	KF289076
	CPC 20277 = MFLUCC12-0014 = WK048	<i>Cordyline fruticosa</i>	Thailand	KF170288	KF206228	KF289171	KF289301	KF289075
<i>P. cornicola</i>	CBS 111639	<i>Cornus florida</i>	USA	KF170307	-	-	KF289234	-
<i>P. cussonia</i>	CPC 13812	<i>Cussonia</i> sp.	South Africa	KF170311	KF206282	KF289223	KF289262	KF289158
	CPC 14873	<i>Cussonia</i> sp.	South Africa	JF343578	KF206279	JF343599	JF343662	JF343764
	CPC 14875	<i>Cussonia</i> sp.	South Africa	JF343579	KF206278	JF343600	JF343663	JF343765
<i>P. elongata</i>	CBS 126.22	<i>Oxycoccus macrocarpos</i>	USA	FJ538353	AB095508	FJ538411	FJ538469	KF289164
<i>P. ericarum</i>	CBS 132534 = CPC 19744	<i>Erica gracilis</i>	South Africa	KF206170	KF206253	KF289227	KF289291	KF289162
<i>P. eugeniae</i>	CBS 445.82	<i>Eugenia aromatica</i>	Indonesia	AY042926	KF206288	KF289208	KF289246	KF289139
<i>P. foliorum</i>	CBS 174.77	<i>Cryptomeria japonica</i>	USA	KF170308	KF206290	KF289200	KF289245	KF289131
	CBS 447.68	<i>Taxus baccata</i>	Netherlands	KF170309	KF206287	KF289201	KF289247	KF289132
<i>P. gaultheriae</i>	CBS 447.70	<i>Gaultheria humifusa</i>	USA	JN692543	KF206298	JN692531	KF289248	JN692508
<i>P. hamamelidis</i>	MUCC 149	<i>Hamamelis japonica</i>	Japan	KF170289	-	-	KF289309	-
<i>P. hostae</i>	CGMCC 3.14355	<i>Hosta plantaginea</i>	China	JN692535	-	JN692523	JN692511	JN692503
	CGMCC 3.14356	<i>Hosta plantaginea</i>	China	JN692536	-	JN692524	JN692512	JN692504
	CGMCC 3.14357	<i>Hosta plantaginea</i>	China	JN692537	-	JN692525	JN692513	JN692505
<i>P. hubeiensis</i>	CGMCC 3.14986	<i>Viburnum odoratissimum</i>	China	JX025037	-	JX025042	JX025032	JX025027
	CGMCC 3.14987	<i>Viburnum odoratissimum</i>	China	JX025038	-	JX025043	JX025033	JX025028
	CGMCC 3.14988	<i>Viburnum odoratissimum</i>	China	JX025039	-	JX025044	JX025034	JX025029
<i>P. hymenocallidicola</i>	CBS 131309	<i>Hymenocallis littoralis</i>	Australia	JQ044423	JQ044443	KF289211	KF289242	KF289142
	CPC 19331	<i>Hymenocallis littoralis</i>	Australia	KF170303	KF206254	KF289212	KF289290	KF289143
<i>P. hypoglossi</i>	CBS 101.72	<i>Ruscus aculeatus</i>	Italy	FJ538365	KF206326	FJ538423	FJ538481	JF343694
	CBS 167.85	<i>Ruscus hypoglossum</i>	Italy	FJ538366	KF206302	FJ538424	FJ538482	JF343696
	CBS 434.92	<i>Ruscus aculeatus</i>	Italy	FJ538367	KF206299	FJ538425	FJ538483	JF343695
<i>P. ilicis-aquifolii</i>	CGMCC 3.14358	<i>Ilex aquifolium</i>	China	JN692538	-	JN692526	JN692514	-
	CGMCC 3.14359	<i>Ilex aquifolium</i>	China	JN692539	-	JN692527	JN692515	-
	CGMCC 3.14360	<i>Ilex aquifolium</i>	China	JN692540	-	JN692528	JN692516	-
<i>P. leucothoicola</i>	MUCC 553 = CBS 136073	<i>Leucothoe catesbaei</i>	Japan	AB454370	AB454370	-	KF289310	-
<i>P. mangifera-indica</i>	CPC 20274 = MFLUCC10-0029	<i>Mangifera indica</i>	Thailand	KF170305	KF206240	KF289190	KF289296	KF289121
<i>P. minima</i>	CBS 585.84 = IFO 32917	<i>Acer rubrum</i>	USA	KF206176	KF206286	KF289204	KF289249	KF289135
<i>P. neopyrolae</i>	CPC 21879 = MUCC 125	<i>Pyrola asarifolia</i>	Japan	AB454318	AB454318	-	AB704233	-
<i>P. owaniana</i>	CBS 776.97 = CPC 1009	<i>Brabejum stellatifolium</i>	South Africa	FJ538368	KF206293	FJ538426	KF289254	JF343767
	CPC 14901	<i>Brabejum stellatifolium</i>	South Africa	JF261462	KF206303	JF261504	KF289243	JF343766
<i>P. pachysandricola</i>	MUCC 124 = NBRC 102276	<i>Pachysandra terminalis</i>	Japan	AB454317	AB454317	-	AB704232	-
<i>P. paxistimae</i>	CBS 112527	<i>Paxistima mysinites</i>	USA	KF206172	KF206320	KF289209	KF289239	KF289140
<i>P. philoprina</i>	CBS 587.69	<i>Ilex aquifolium</i>	Spain	KF154278	KF206297	KF289206	KF289250	KF289137
	CBS 616.72	<i>Ilex aquifolium</i>	Germany	KF154279	KF206296	KF289205	KF289251	KF289136
<i>P. podocarpicola</i>	CBS 728.79	<i>Podocarpus maki</i>	USA	KF206173	KF206295	KF289203	KF289252	KF289134

Table 2 *Phyllosticta* isolates from Wikee *et al.*, 2013 (Continued)

Species	Culture no. ¹	Host	Country	GenBank no. ²				
				ITS	LSU	TEF1	ACT	GPDH
<i>P. podocarp</i>	CBS 111646	<i>Podocarpus falcatus</i>	South Africa	AF312013	KF206323	KC357671	KC357670	KF289169
	CBS 111647	<i>Podocarpus lanceolata</i>	South Africa	KF154276	KF206322	KF289232	KF289235	KF268168
<i>P. pseudotsugae</i>	CBS 111649	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	USA	KF154277	KF206321	KF289231	KF289236	KF289167
<i>P. raphiolepidis</i>	MUCC 432	<i>Raphiolepis indica</i>	Japan	DQ632660	-	DQ632724	AB704242	-
<i>P. rubra</i>	CBS 111635	<i>Acer rubrum</i>	USA	KF206171	EU754194	KF289198	KF289233	KF289129
<i>P. sphaeropsoides</i>	CBS 756.70 = IFO 32905	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Germany	AY042934	KF206294	KF289202	KF289253	KF289133
<i>P. spinarum</i>	CBS 292.90	<i>Chamaecyparis pisifera</i>	France	JF343585	KF206301	JF343606	JF343669	JF343773
<i>P. styracicola</i>	CGMCC 3.14985	<i>Styrax gradiflorus</i>	China	JX052040	-	JX025045	JX025035	JX025030
	CGMCC 3.14989	<i>Styrax gradiflorus</i>	China	JX052041	-	JX025046	JX025036	JX025031
<i>P. telopeae</i>	CBS 777.97	<i>Telopea speciosissima</i>	Tasmania	KF206205	KF206285	KF289210	KF289255	KF289141
<i>P. vacciniicola</i>	CPC 18590	<i>Vaccinium macrocarpum</i>	USA	KF170312	KF206257	KF289229	KF289287	KF289165
<i>P. yuccae</i>	CBS 112065	<i>Yucca elephantipes</i>	USA	KF206175	-	-	KF289237	-
<i>Phyllosticta</i> sp.	CPC 11336	<i>Eucalyptus globulus</i>	Spain	KF206177	KF206284	KF289199	KF289258	KF289130
	MUCC 147	<i>Rhododendron keiskei</i>	Japan	AB454319	AB454319	-	AB704234	-
	CPC 17454	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	KF206206	KF206265	KF289192	KF289278	KF289123
	CPC 17455	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	KF206207	KF206264	KF289191	KF289279	KF289122

¹**CPC**: Culture collection of P.W. Crous, housed at CBS; IFO: Institute For Fermentation, Osaka, Japan; IMI: International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, Basingstoke, U.K.; LGMF: Culture collection of Laboratory of Genetics of Microorganisms, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil; CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands; ZJUCC: Zhejiang University Culture Collection, China; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection; CGMCC: China, General Microbiological Culture Collection, Beijing, China; MUCC: Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie prefecture, Japan. Type and ex-type cultures are in bold. ²**ITS**: Internal transcribed spacers 1 and 2 together with 5.8S nrDNA; LSU: large subunit 28S nrDNA; TEF1: partial translation elongation factor 1- α gene; ACT: partial actin gene; GPDH: partial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. (Wikee *et al.* 2013)

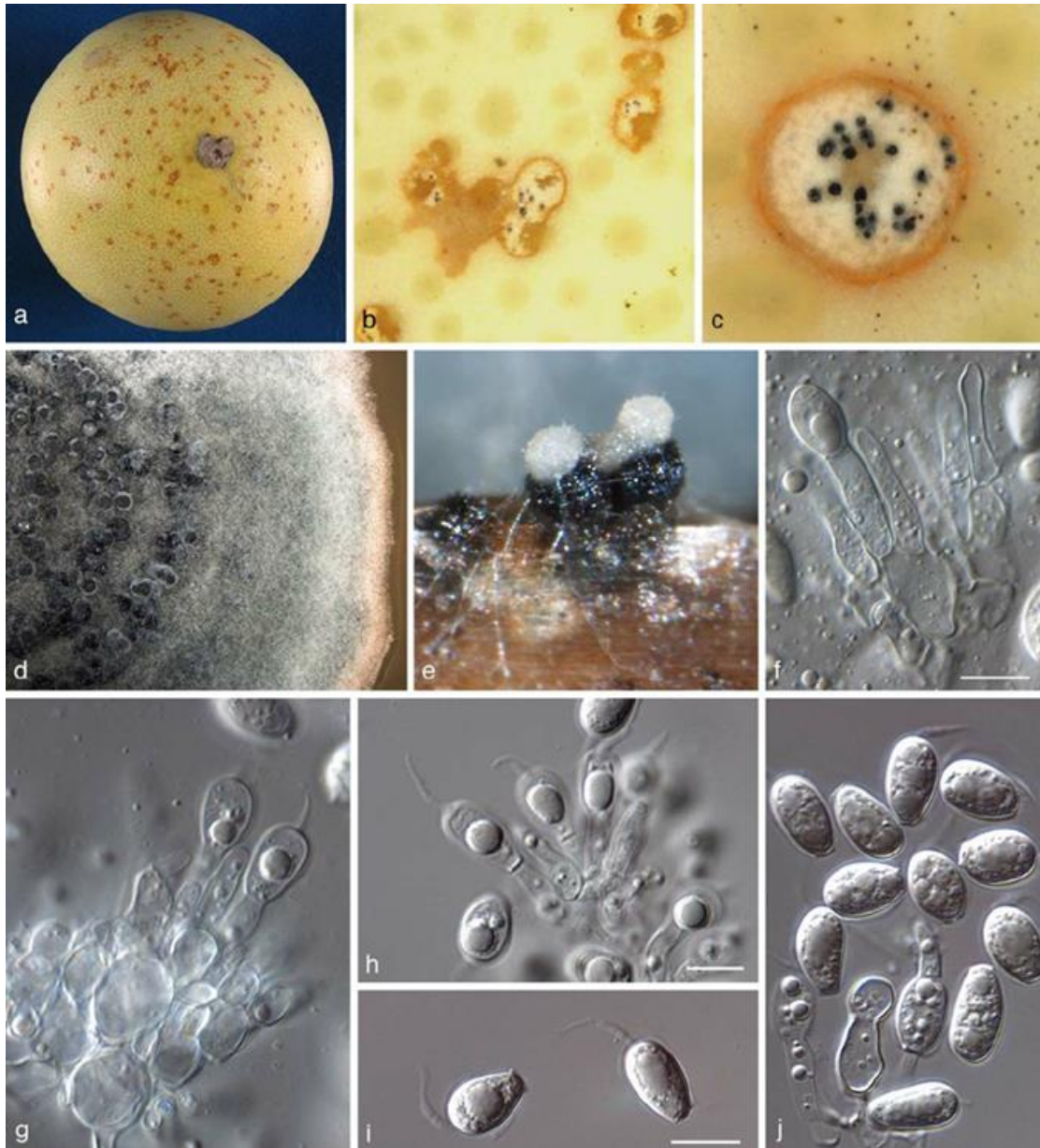


Figure 1 *Phyllosticta citriasiana*. (Photo by: Wulandari *et al.*, 2009)

- a-c) Symptoms on fruit of *Citrus maxima*.
- d) Colony on malt extract agar.
- e) Pycnidia sporulating on sterile pine needles on tap-water agar.
- f-h) Conidiogenous cells giving rise to solitary conidia.
- i, j) Conidia with mucoid sheath and apical mucilaginous appendage visible. Scale bars = 10 μ m

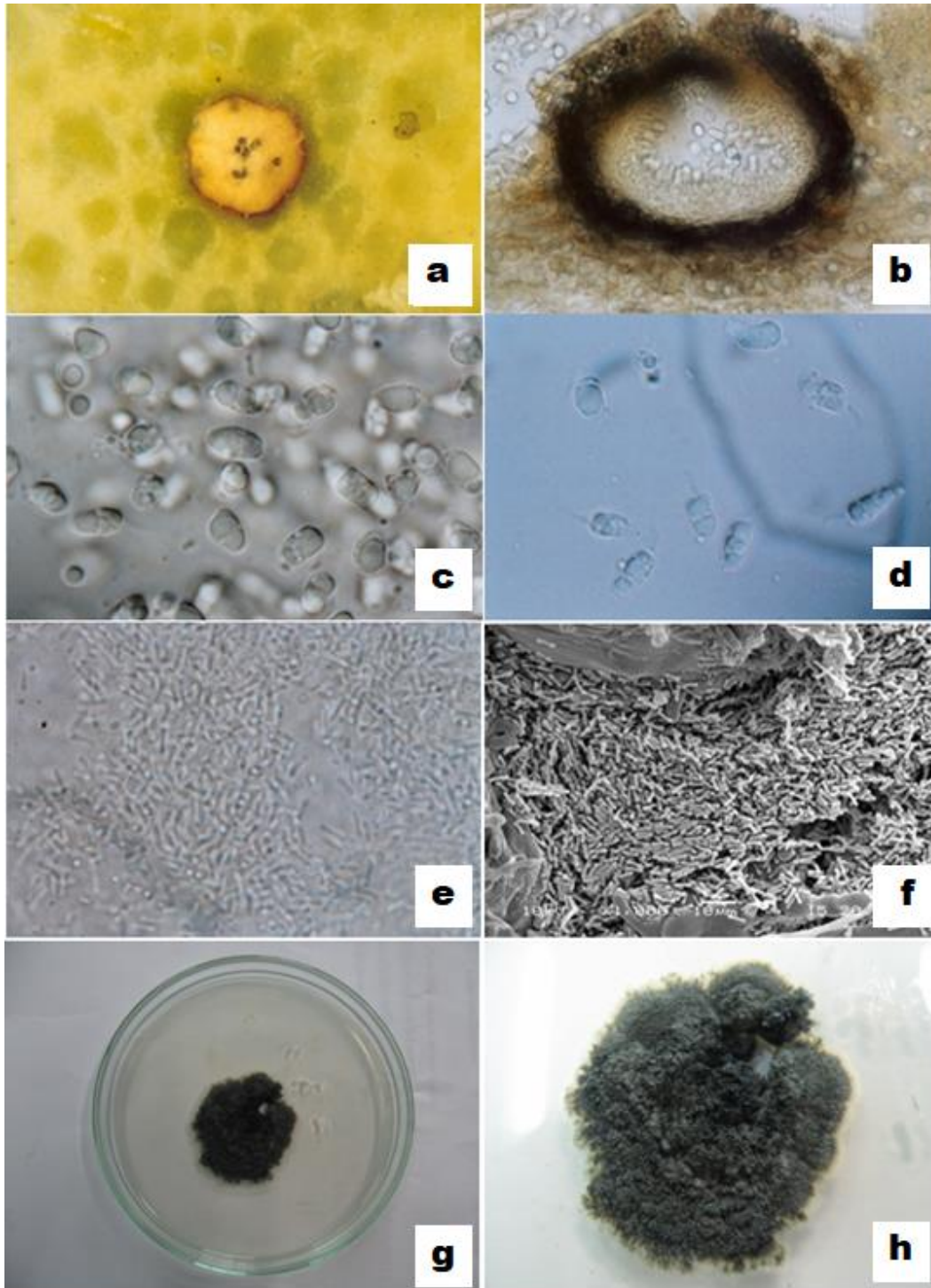


Figure 2 *Phyllosticta citriasiana* isolated from tan spot of Pummelo.

- a) Hard spot lesions with pycnidia in the center of the tissue
- b) Pycnidia (400X)
- c) Conidium (1000X)
- d) Conidium with mucoid sheath and apical mucilaginous appendages (1000X)
- e) Spermatial state, spermogonium 1000X
- f) SEM photomicrograph of spermatia 1000X
- g) Colony on PDA, 7 days at 30+2°C
- h) Colony with lobed margin

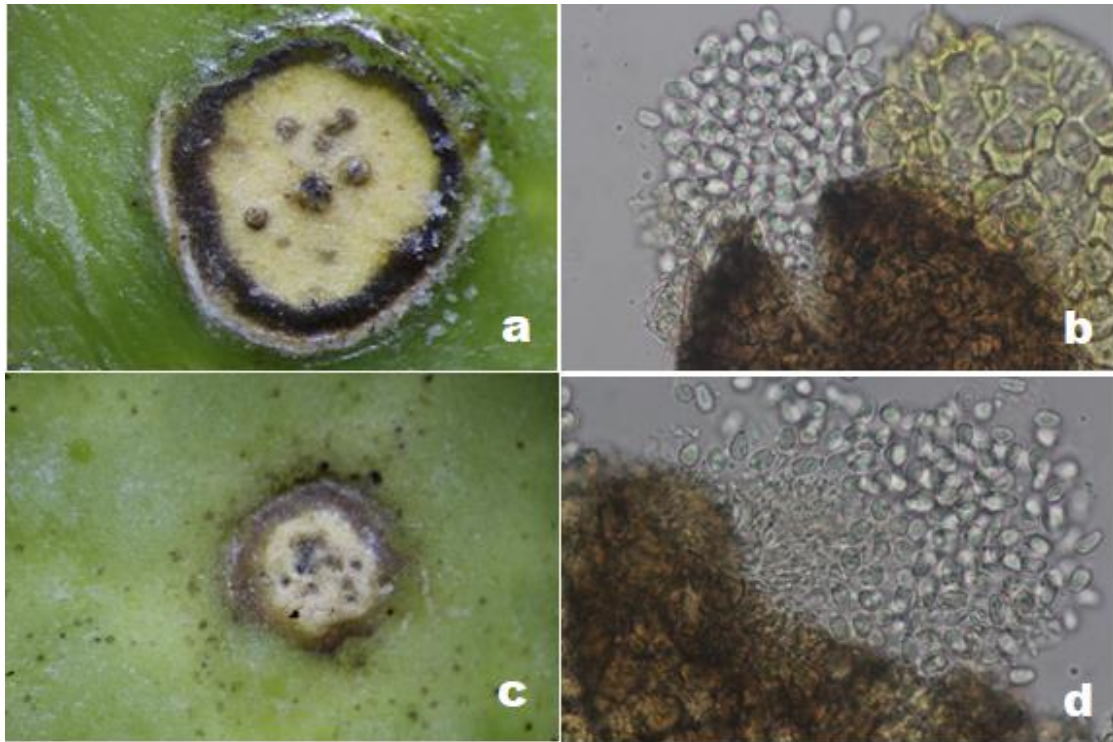


Figure 3 *Phyllosticta* sp. Isolated from fruit of pummelo at Nakhon Pathom province.

- a) Tan spot on pummelo fruit at Wae Rai-Khing, Nakhon Pathom province
- b) conidium
- c) Tan spot on pummelo fruit at Phutthamonthon, Nakhon Pathom province
- d) conidium

CBS120486_ *Phyllosticta citriasiana* ITS region from TYPE material

TCGTAAACAAGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAATACGTAATCCTGAAAGGTAAT
 GGAAGGGGAGGCCGTAAAAAGCCGCCAACCTACCTTACACCCCTTGTGTATCTACCACGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTTT
 TGACCCGGGCGGTGCGTGCCCCAGCCTAGTTTATGGGCCAGGACGCCTGGCTAAGTGCCCGCCAGTATACAAAACCTCAAGCGAT
 TATTTTGTGTAGTCCTGAGAATTCATTTAATGAAGTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
 GAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGG
 CATGCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGACGTCGCTGCCGGACGCGCCTGGAAGACCTCGG
 CGACGGCGCTCAGCCTCGAGCGTAGTAGTAAAATATCTCGCTTTGGAGGAGGGAGGCGCTGGCCGCCGACAATCGACCTTCGG
 TCACTATTTTTCCAAGGTTGACCT

M0086 *Phyllosticta citriasiana*

GAGTAAAGTCGTAACAAGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAATACGTAATCCTGAAAGGTAATGGAAGGG
 GAGGCCGTAAAAAGCCGCCAACCTACCTTACACCCCTTGTGTATCTACCACGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTTTGACCCG
 GGCGGTGCGTGCCCCAGCCTAGTTTATGGGCCAGGACGCCTGGCTAAGTGCCCGCCAGTATACAAAACCTCAAGCGATTATTTTGT
 GTAGTCCTGAGAATTCATTTAATGAAGTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
 GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCT
 GTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGACGTCGCTGCCGGACGCGCCTGGAAGACCTCGGCGACGG
 CGCTCAGCCTCGAGCGTAGTAGTAAAATATCTCGCTTTGGAGGAGGGAGGCGCTGGCCGCCGACAATCGACCTTCGGTCACTAT
 TTTTCCAAGGTTGACCTCGGATCAGG

Figure 4 Aligning sites of specific primers on ITS region of *Phyllosticta citriasiana*

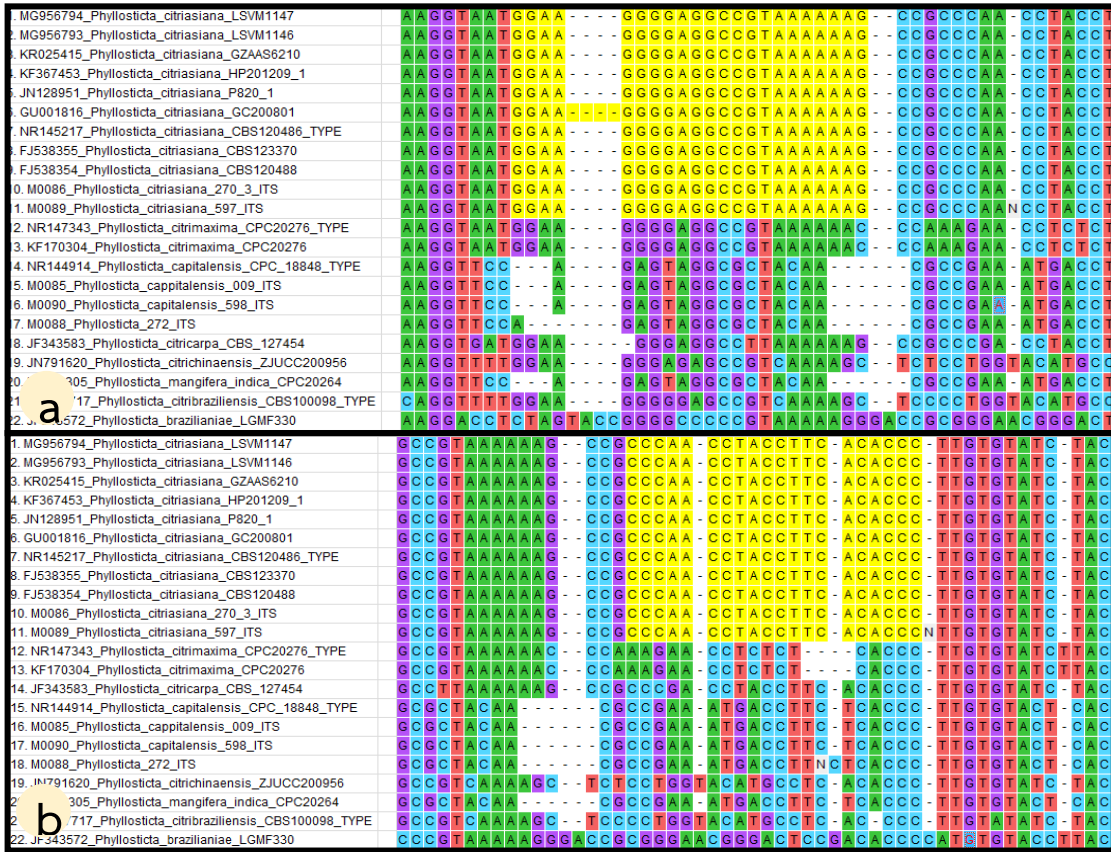


Figure 5 The specificity of primers to *Phyllosticta citriasiana*

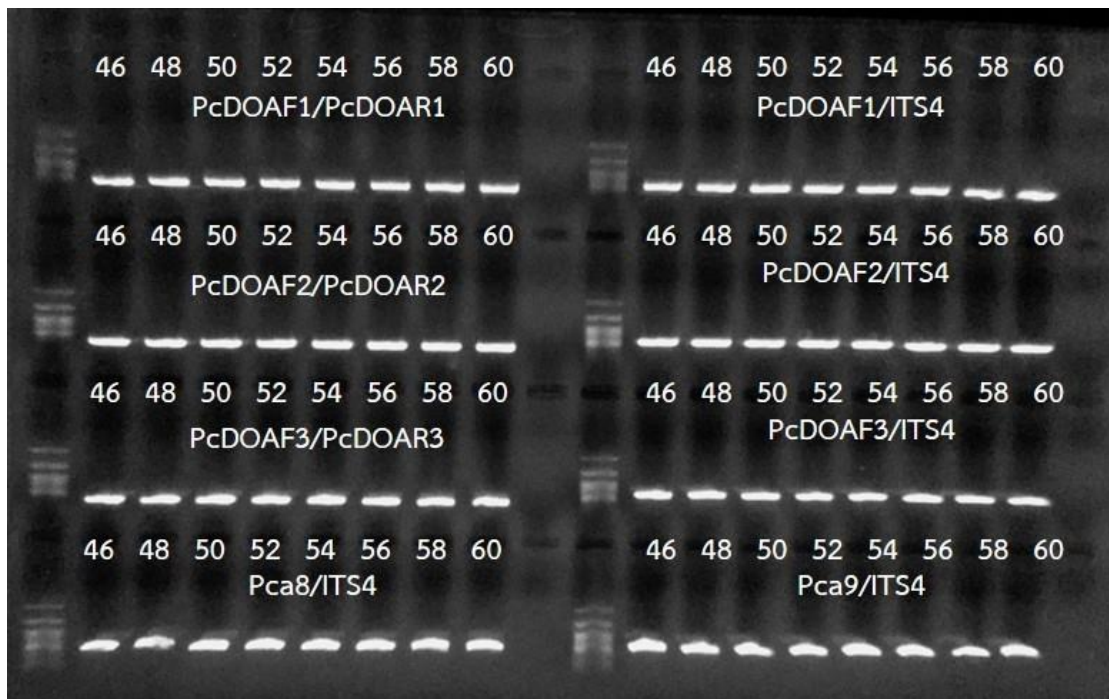


Figure 6 The PCR optimization of 8 pairs of primer

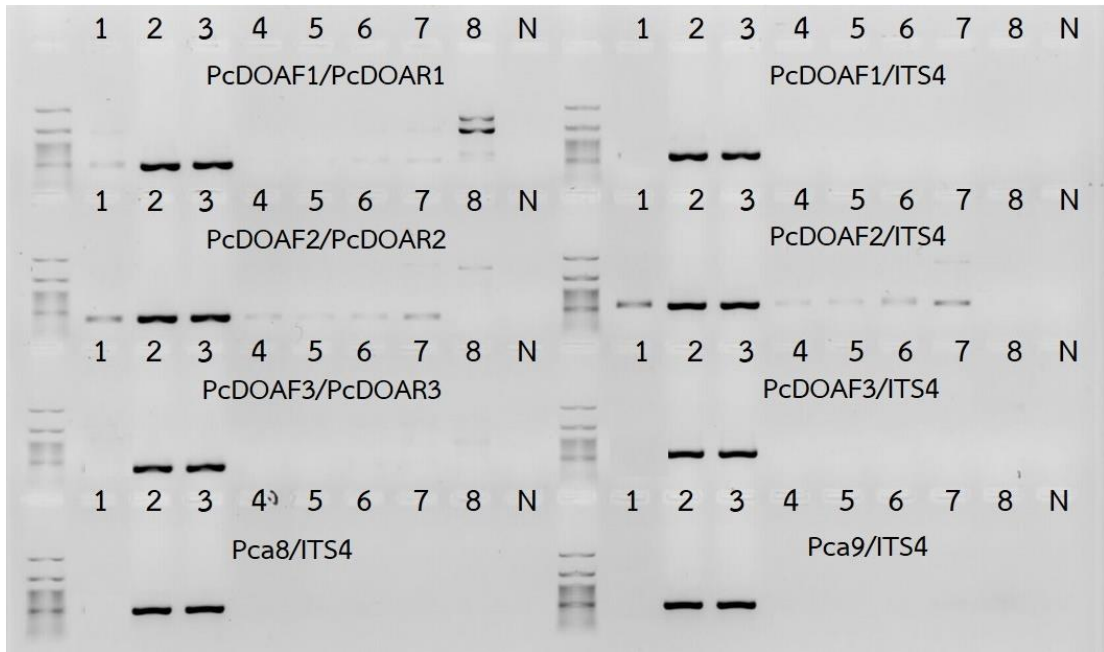


Figure 7 The specificities of primers to fungal taxa (1: *P. capitalensis*; 2-3: *P. citriasiana*; 4: *Phyllosticta* on *Punica granatum*; 5: *Phyllosticta* on guava; 6: *Phyllosticta* on *Dendrobium*; 7: *Phyllosticta* on *Musa* sp.; 8: *Colletotrichum*)

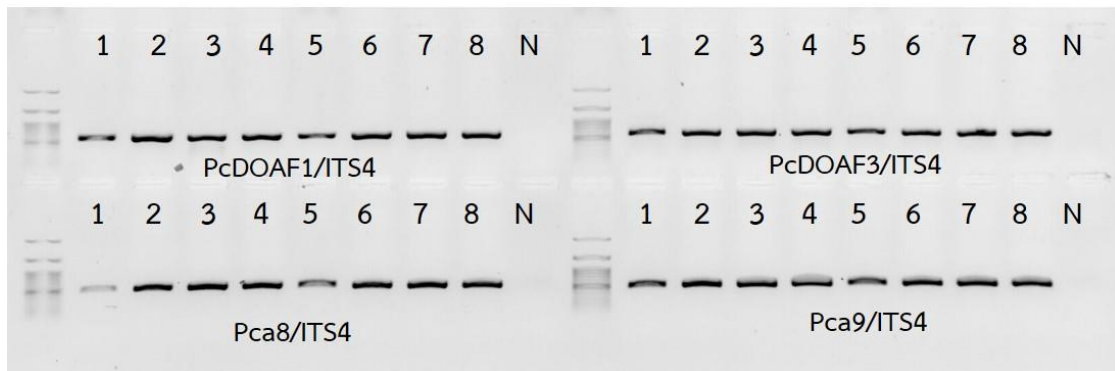


Figure 8 The specificity of primers to DNA of *P. citriasiana* obtained from brown spot symptom on Citrus fruits (1: No. 597/1-1; 2: No. 597/1-2; 3: No. 597/2-1; 4: No. 597/2-2; 5: No. 597/3-1; 6: No. 597/3-2; 7: No. 598-1; 8: No. 598-2)

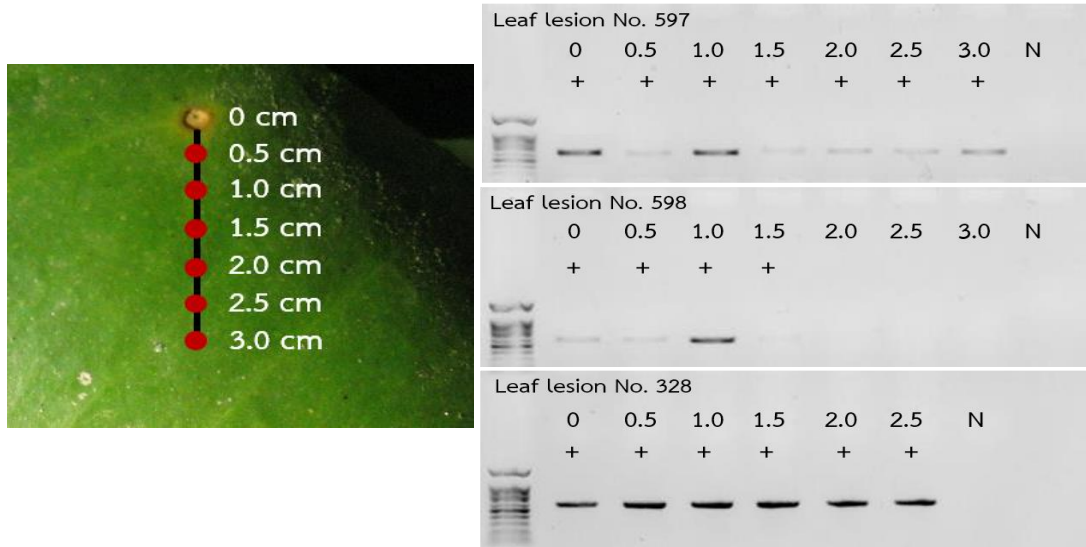


Figure 9 The sensitivity of PcDOAF1/ITS4 primers to *P. citriasiana* based on the difference of distances from original symptom

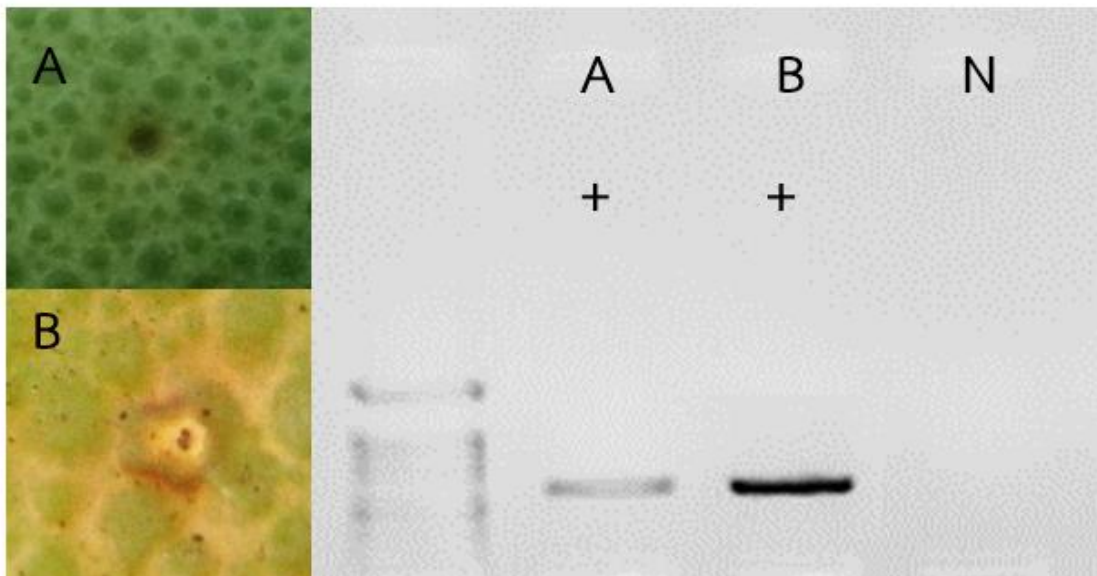


Figure 10 The specificity of primers PcDOAF1/ITS4 to DNA of *P. citriasiana* obtained from brown spot symptoms at different stages (A: initial stage, fruiting body of fungus absence; B: symptom with fruiting body of fungus)

การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) Antiserum Production of Leek Yellow Stripe Virus (LYSV)

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Protein synthesized *Leek yellow stripe virus* -coat protein gene (LYSV-CP gene) according to GenBank database (NCBI Reference Sequence: NP_734102.1) gene had 863 bp and was translated into 288 amino acid residue with molecular weight of 32.18 KDa. The LYSV-CP gene was cloned into pET 100/D-TOPO® (Invitrogen) expression vector and transferred to bacteria into the *E. coli* strain K12 DH10BTMT1R and induced for protein synthesis by IPTG. The protein was purified by Ni-NTA column using SDS-PAGE techniques find the protein size. The Result of detecting the protein strips is found approximately 32 KDa and the protein is used as an antigen injectable to rabbit and draw blood collection. Examination with indirect ELISA found that the titor of antiserum value 1:6400 and 1:102400 has 1.373 and 1.078 respectively.

Keywords : Garlic, Leek yellow stripe virus (LYSV), antiserum

บทคัดย่อ

การสังเคราะห์โปรตีน *Leek yellow stripe virus* -coat protein gene (LYSV-CP gene) โดยใช้ฐานข้อมูลของ GenBank: ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ coat protein (NCBI Reference Sequence: NP_734102.1) จำนวน 863 bp แปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 288 residues โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.18 KDa ทำการโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส LYSV-CP gene ที่ได้เข้าสู่ expression vector pET 100/D-TOPO® (Invitrogen) และถ่ายฝากเข้าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ K12 DH10BTMT1R จากนั้นแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย Ni-NTA column และหาขนาดโปรตีนที่ได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลการตรวจสอบหาแถบโปรตีนพบขนาดประมาณ 32 KDa และนำโปรตีนที่ได้ใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระต่ายและเจาะเลือดตรวจสอบค่าไตเตอร์ของ แอนติซีรัมที่ได้ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าค่าไตเตอร์ที่ 1:6400 และ 1:102400 ได้ 1.373 และ 1.078 ตามลำดับ

คำหลัก : กระเทียม, เชื้อไวรัส, แอนติซีรัม

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-05-61

คำนำ

ปัจจุบันมีการปลูกกระเทียมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งต้องประสบปัญหาการระบาดของแมลงและโรค ที่มีเชื้อสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไล่เดือนฝอย รวมทั้งไวรัส ส่งผลกระทบต่อผลผลิตและคุณภาพของกระเทียม ซึ่งโรคไวรัสที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ Leek yellow stripe virus (LYSV) เป็นเชื้อในกลุ่ม Potyviruses เมื่อติดเชื้อ LYSV ในแปลงสามารถเข้าทำลายต้นหอมได้ถึง 100% (Bos, 1983) ส่วนการสูญเสียผลผลิตในกระเทียมสูงถึง 60% และสูงถึง 84% เมื่อติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นในกลุ่ม potyvirus ร่วมกับ อัตราการงอกในกระเทียมได้รับผลกระทบและลดลงถึง 60% (Lot *et al.*, 1998) ซึ่งโรคนี้นี้มีเพลี้ยอ่อน *Myzus persicae* และ *Aphis fabae* เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ ทำให้เกิดการแพร่ระบาดในแปลงปลูกและเป็นแมลงปากดูดที่มีความสำคัญต่อการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส (Lunello *et al.*, 2002) ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีความต้องการผลิตแอนติซีรัมที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรัส LYSV เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส LYSV โดยต้องทำการแยกเชื้อไวรัส มาทำการผลิตแอนติซีรัมและทำให้แอนติซีรัมบริสุทธิ์ ก่อนนำไปทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรัส LYSV ก่อนนำแอนติซีรัมที่มีความเฉพาะเจาะจงนั้นไปใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธีการทางเซรุ่มวิทยาต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge
- ยีนสังเคราะห์ coat protein gene (CP) ของ Leek yellow stripe virus (LYSV)
- พลาสมิดพาหะ (cloning และ expression vectors)
- เครื่อง Spectrophotometer

วิธีการ

1. สํารวจและเก็บตัวอย่างกระเทียมจากแปลงปลูกของเกษตรกร

เก็บตัวอย่างกระเทียมที่มีอาการของเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เพื่อเตรียมแอนติเจนทำการเก็บตัวอย่างกระเทียมที่พบลักษณะอาการใบต่าง เป็นขีด จากแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ปลูกกระเทียม เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส LYSV และทำการเตรียมต้นพืชปลอดโรคและเป็นโรค รวมทั้งปลูกพืชทดสอบเพื่อเตรียมเพิ่มปริมาณเชื้อ

2. การเตรียมแอนติเจนด้วยการสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส LYSV จาก

ฐานข้อมูล GenBank

เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์โปรตีน จึงได้ทำการสังเคราะห์โปรตีน LYSV coat protein gene (LYSV-CP gene) โดยใช้ฐานข้อมูลของ GenBank : *Leek yellow stripe virus*, complete genome, NCBI Reference Sequence: NC_004011.1 ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ coat protein และจากนั้นจึงสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP) ที่ได้นั้นเข้าสู่ expression vector pET100/D-TOPO® (Invitrogen) โดยบริษัท Invitrogen หลังจากได้โคลนที่มี LYSV-CP gene แทรกอยู่ใน pET100/D-TOPO expression vector แล้วจึงนำพลาสมิดนั้นมาถ่ายฝากเข้าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ K12 DH10B™T1R ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russel, 1989) นำไปเลี้ยงบนอาหาร 2XYT agar ที่เติมสาร

ปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร คัดเลือกโคโลนีเพื่อตรวจหาส่วนของ LYSV-CP gene โดยวิธี PCR ก่อนนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

3. การชักนำการสังเคราะห์ recombinant protein ในเซลล์แบคทีเรียและ แยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* K12 DH10BTMT1R ที่มี LYSV-CP gene แทรกอยู่ใน pET 100/D-TOP expression vector ในอาหารเหลว 2XYT 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เชย้า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นแบ่งใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 1 ลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอัตราส่วนของเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร เชย้าต่ออีก 3 ชั่วโมง (เก็บตัวอย่างเซลล์ก่อนเติม IPTG) จากนั้นเติม Isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อชักนำให้เกิดการสร้างโปรตีน โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยการเขย่าบนเครื่อง shaker เป็นเวลา 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่เวลาต่างๆ โดยนำมาปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสและนำตะกอนมาผสมกับน้ำที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ตะกอน 1 กรัม/น้ำ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม lysozyme เพียงเล็กน้อยประมาณเท่าหัวไม้ขีดไฟ (ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร) และกวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20°C ซ้ำมคืน จากนั้นนำมาเติมด้วย lysis buffer (Buffer B: 50 mM NaH₂PO₄-H₂O, 10 mM Tris-HCl (MW=121.1) และ 8 M Urea, pH 8.0) ในอัตรา 50 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร และนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แบบ probe (power 45-50, cycle 50%) ครั้งละ 5 นาที จนกว่าเซลล์จะหายหนืดและใส แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บน้ำใสไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column (อัตรา 2 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร) เริ่มจากการล้าง column หลังแพ็คแล้วด้วย buffer B จากนั้นเทส่วนน้ำใสให้ผ่าน column และล้าง column ด้วย buffer C (pH 6.3) และ buffer D (pH 5.9) ก่อนที่จะใส่ buffer E (pH 3.9) เพื่อแยกโปรตีนออกจากเจลใน column เก็บเป็น fraction หลอดละ 500 ไมโครลิตร เพื่อนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนว่าอยู่ใน fraction ใด โดยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ผสมโปรตีนของเชื้อที่บริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันเป็น emulsion สำหรับการฉีดครั้งแรก และใช้ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 สำหรับการฉีดครั้งต่อไปอีก 4 ครั้ง การฉีดทุกครั้งเป็นการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณคอ ประมาณ 4-5 จุดต่อการฉีดแต่ละครั้ง ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหู หลังจากการฉีดครั้งที่ 2 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1 สัปดาห์อีก 6 ครั้ง น้ำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4°C อีก 24 ชั่วโมง รินส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 °C จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไทเทรต (titer) ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการหยอดแอนติเจน (recombinant protein 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T buffer (PBS+0.05% Tween 20) 3 ครั้ง แล้วนำมาเติมด้วย Blocking buffer (1% BSA ใน PBS-T) หลุมละ 100 ไมโครลิตร

บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างอีก 3 ครั้ง ใส่แอนติบอดีที่ได้จากการเจาะเลือดกระต่าย 7 ครั้ง โดยทำการเจือจางจาก 1:10 ถึง 1:204,800 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาหยอดด้วย Goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase เจือจาง 1:2,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมา ซับสเตรท p-nitrophenyl phosphatase หลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านผลด้วยเครื่องอ่าน ELISA ที่ค่าความดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

การตรวจสอบเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากนำ positive control ที่มีจำหน่ายจากบริษัท เคลือบหลุมของไมโครเพลท (microplate) ตามคำแนะนำของบริษัทโดยใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 4°C ซ้ำคืน แล้วนำไมโครเพลท มาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (PBS-Tween 20) 3 ครั้งๆละ 3 นาที หยอดแอนติซีรัมจากการเลือดครั้งที่ 5 ที่เจือจางใน conjugate buffer 1:100 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที แล้วหยอด Goat-Anti Rabbit อัตรา 1: 2,000 ใน conjugate buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง นำเพลทมาล้างอีก 3 ครั้งใน PBS-Tween 20 แล้วหยอด p-nitrophenyl phosphatase substrate (5 มิลลิกรัม/ substrate buffer 10 มิลลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และอ่านผลด้วยเครื่องอ่านอิลูซา (ELISA Reader) โดยใช้เพลทชนิด polysorp microplate

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างกระเทียมจากแปลงปลูกของเกษตรกร

เก็บตัวอย่างใบกระเทียมที่มีอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เป็นแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบและเป็นขีดๆ บนใบมีขนาดเล็กและทำให้เกิดแถบสีเหลือง ผิดปกติบนใบ จากแปลงปลูกกระเทียมของเกษตรกรในพื้นที่ อ.ฝาง อ.ไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ในเบื้องต้นได้ใช้ชุดตรวจสอบ POCY kit ของกล้วยไม้ทำการตรวจสอบตัวอย่างใบกระเทียมเนื่องจากเชื้อไวรัส LYSV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus ซึ่งผลการตรวจสอบพบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus กับตัวอย่างใบกระเทียม จึงได้นำตัวอย่างใบกระเทียมดังกล่าวมาทำศึกษาต่อไป

2. การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส BYMV จากฐานข้อมูล GenBank

การสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LYSV-CP gene โดยใช้ฐานข้อมูลของ GenBank : *Leek yellow stripe virus*, complete genome, NCBI Reference Sequence: NC_004011.1 ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ coat protein (NCBI Reference Sequence: NP_734102.1) ได้ลำดับ

นิวคลีโอไทด์จำนวน 863 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 288 เรสิดิวส์ คือ
 ageefdagag anknqksgad kaieqrnpst sqasthgknd ssselsmgk dkdvvnvgttg
 tfsvprikqi sqkgiaipmd gersilndh llhykpsqlc isnatratrtq fmawkarlqd
 eygvtasems iilnglmvwc iengtspnin gvwtmmdgee qvefplrpv ehaqptlrqi
 mahfsalaea yiemrnsega ympryglqrn ltdmslarya fdfyevtsrt pvrareahaq
 mkaaalnrs prlfgldgnv ttmdedterh tahdvnarmh hldgahmq

ซึ่งเมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ProtScale (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.18 KDa จากนั้นจึงสังเคราะห์โคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส LYSV-CP gene ที่ได้นั้นเข้าสู่ expression vector pET100/D-TOPO® (Invitrogen) โดยบริษัท Invitrogen

3. การชักนำการสังเคราะห์ recombinant protein ในเซลล์แบคทีเรีย และแยกโปรตีนของเชื้อ LYSV ให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

การชักนำให้มีการสังเคราะห์ recombinant protein ด้วยการเติม IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside เป็นเวลา 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์หาโปรตีนและขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าภายหลังจากการเติม IPTG 8 ชั่วโมง เซลล์แบคทีเรียสามารถสร้าง recombinant protein ได้ในปริมาณมาก จากการตรวจสอบขนาดโปรตีนหลังแยกให้บริสุทธิ์โดย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าในแต่ละ fraction ที่ทำการเก็บทั้งหมด จาก fraction ที่ F1-F9 พบว่ามีปริมาณโปรตีนใน fraction ที่ F2-F9 ที่สามารถพบแถบ recombinant protein CP-LYSV ที่มีขนาดประมาณ 32 KDa และจาก recombinant protein ที่ได้นั้นมีความบริสุทธิ์และได้ปริมาณโปรตีนเพียงพอสำหรับการนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดสัตว์ทดลองเพื่อสร้างแอนติบอดี เนื่องจากโปรตีน CP-LYSV เป็นโปรตีนที่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่ำและเมื่อนำโปรตีน CP-LYSV ที่แยกได้บริสุทธิ์ไปฉีดเข้าสัตว์ทดลองจะทำให้ antigenic determinant ของโปรตีน CP-LYSV ยังคงเหมือนเดิม (Pillai *et al.*, 1995) นำโปรตีนที่ได้ไปเป็นแอนติเจนนั้นต้องทำการตรวจคำนวณหาปริมาณของโปรตีนก่อน โดยทำการตรวจสอบและเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ตามวิธีวัดปริมาณโปรตีนของ Bradford (1976) โดยนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin, Sigma (BSA) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ตรวจสอบบน 15% SDS-PAGE และจากผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้พบว่า สารละลายโปรตีนที่ได้นั้นมีความเข้มข้นประมาณ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปผสมกับ Freund's adjuvant ครั้งละ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นแอนติเจนฉีดเข้ากระต่ายเพื่อให้มีการสร้างแอนติบอดีและนำแอนติบอดีที่ได้ไปศึกษาทางด้านเซรุ่มวิทยาต่อไป

4. การผลิตแอนติซีรัมด้วยการฉีดกระต่ายและการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

ดำเนินการฉีดกระต่ายที่สะโพกจำนวน 5 ครั้ง เริ่มเก็บแอนติซีรัมที่ใบหูกระต่ายในสัปดาห์ที่ 2 หลังฉีดแอนติเจนจนครบ ทำการเก็บเลือด (เก็บเลือดครั้งละประมาณ 10-15 มิลลิลิตร) และนำเลือดที่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วใช้เข็มกรีดตามขอบด้านในของปีกเกอร์นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน หลังจากนั้นจึงนำไปแยกส่วนใสจากก้อนเลือด บันเหวียงที่ 6720xg นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดง เก็บส่วนใสที่เป็นแอนติซีรัมที่ได้แบ่งเก็บแช่ที่ -20°C และผสม 0.02% โซเดียมเอไซด์ เก็บที่ 4°C

หลังจากที่ได้แอนติซีรัมมาแล้ว ทำการตรวจสอบไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ได้ด้วยวิธี indirect ELISA

โดยใช้โปรตีน CP-LYSV ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่เจือจางระดับต่างๆ ตั้งแต่ 1:100-1:102400 พบว่า ค่าไตเตอร์จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 และ 5 สูงกว่าครั้งที่ 1, 2 และ 3 โดยครั้งที่ 4 มีค่าไตเตอร์ 1:6400 ซึ่งวัดค่าด้วยเครื่องอ่าน ELISA reader (Thermo Fisher Scientific: Version 1.00.40, Finland) ที่ A₄₀₅ ได้ 1.373 และครั้งที่ 5 มีค่าไตเตอร์ 1:102400 ซึ่งวัดค่า ELISA ที่ A₄₀₅ ได้ 1.078

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สังเคราะห์โปรตีน LYSV coat protein gene (LYSV-CP gene) โดยใช้ฐานข้อมูลของ GenBank : Leek yellow stripe virus, complete genome, NCBI Reference Sequence: NC_004011.1 ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ coat protein (NCBI Reference Sequence: NP_734102.1) ได้ลำดับ นิวคลีโอไทด์จำนวน 863 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 288 เรสิดิวส์ พบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.18 KDa จากนั้นโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส LYSV-CP gene ที่ได้เข้าสู่ expression vector pET 100/D-TOPO® (Invitrogen) โดยบริษัท Invitrogen และนำมาถ่ายฝากเข้าเชื้อแบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ K12 DH10BTMT1R แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE จากการทดลองพบแถบโปรตีนขนาด 32.18 KDa และนำโปรตีนที่ได้เป็นแอนติเจนสำหรับการฉีดกระต่ายและเจาะเลือดเพื่อผลิตแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส โดยทำการฉีดจำนวน 5 ครั้ง ทำการตรวจสอบไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ได้ด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า ค่าไตเตอร์จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 และ 5 สูงกว่าครั้งที่ 1, 2 และ 3 โดยครั้งที่ 4 มีค่าไตเตอร์ 1:6400 ซึ่งวัดค่าด้วยเครื่องอ่าน ELISA reader ที่ A₄₀₅ ได้ 1.373 และครั้งที่ 5 มีค่าไตเตอร์ 1:102400 ซึ่งวัดค่า ELISA ที่ A₄₀₅ ได้ 1.078

ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการผลิตแอนติซีรัมสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส LYSV ได้อย่างมีความเฉพาะเจาะจงด้วยวิธีการทางเซรัมวิทยา นอกจากนั้นแอนติซีรัมที่ผลิตขึ้นได้นี้ยังสามารถเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ LYSV นอกเหนือจากแอนติบอดีที่มีจำหน่ายในท้องตลาดที่นำเข้ามาจากต่างประเทศและจำหน่ายในราคาที่สูง

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, 2554, โรคผักและการป้องกันกำจัด, หน้า 138.
- วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี (2557). กระเทียม สืบค้นเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2557 Web site: <http://th.wikipedia.org/wiki/กระเทียม>
- Bos, L. 1983. Viruses and virus diseases of Allium species. Acta Horticulturae 127:11-29.
- Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H., and Maat, D.Z. 1978. Leek yellow stripe virus and its relationships to Onion yellow dwarf virus - characterization, ecology, and possible control. Netherlands Journal of Plant Pathology 84(5): 185-204.
- Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., and Delecalle, B. 1998. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three

French garlic cultivars. *Plant Disease* 82(12): 1381-1385. Lunello, P., Ducasse, D.A., Heiguera, M., Nome, S.F., and Conci, V.C. 2002. An Argentinean isolate of Leek yellow stripe virus from leek can be transmitted to garlic. *Journal of Plant Pathology* 84(1): 11-17.



Figure 1 Symptoms of *Leek yellow stripe virus* (LYSV) on Garlic

Plasmid Map:

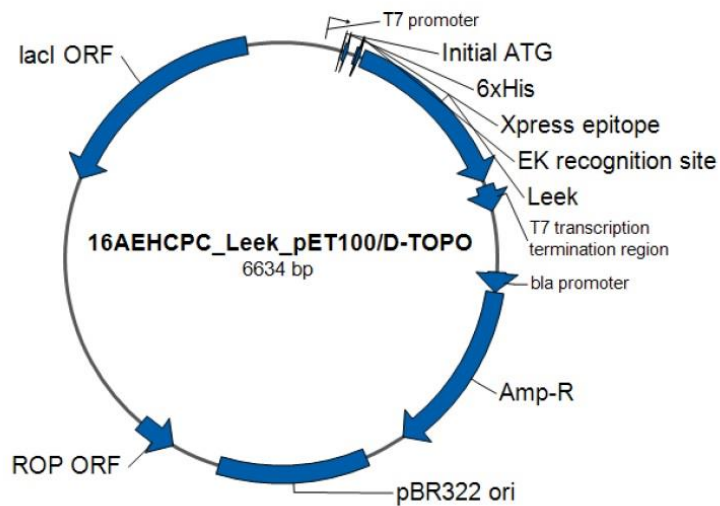


Figure 2 Transformation of LYSV CP gene (863 bp) into the plasmid pET 100/D-TOPO®

**การตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum*
ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction
Detection of *Neoscytalidium dimidiatum* by Polymerase Chain Reaction**

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

^{1/} ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

โรคที่สำคัญแก้มังกรคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem cancer) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล ทำให้เกิดความเสียหายกับเกษตรกรเป็นจำนวนมาก เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อวินิจฉัยโรคในขณะที่ยังไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งสามารถตรวจสอบโรคให้รวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้นก่อนการแสดงอาการของโรคจะปรากฏเพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม

สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด พืชอาศัย ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม และรวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 12 ไอโซเลต พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างโรคของแก้มังกร และเฟิร์นเขากวางมาแยกเชื้อ ผลจากการแยกเชื้อจากลำต้นและผลของแก้มังกรที่เป็นโรคแยกได้ราจำนวน 30 ไอโซเลต จากเฟิร์นเขากวางมังกกรที่เป็นโรคแยกได้ราจำนวน 2 ไอโซเลต แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ จากผลการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคของแก้มังกร 30 ไอโซเลตและต้นเขากวาง จำนวน 2 ไอโซเลต โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำแนกชนิดเป็นรา *Neoscytalidium dimidiatum* ทั้งหมด

คำหลัก : แก้มังกร โรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ *Neoscytalidium dimidiatum* Polymerase Chain Reaction (PCR)

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-06-61

คำนำ

แก้วมังกรเป็นพืชวงศ์กระบองเพชร (Cactaceae) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Hylocereus undatus* (Haworth) Britton & Rose มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกากลาง ประเทศเม็กซิโก บริเวณแปซิฟิก ประเทศกัวเตมาลา คอสตาริกา และเลซัลวาดอ และเรียกผลไม้ชนิดนี้ว่า pitaya (พีไทอา) หรือ pitahaya (พีทาไฮอา) หรือ strawberry pear ประเทศไทยเรียกผลไม้ชนิดนี้ว่าแก้วมังกร (dragon fruit) แก้วมังกรเป็นพืชไม้เลื้อยมีลำต้น 3 แฉก ๆ เป็นหยัก ๆ คล้ายครีบบัณเฑาะว์ ที่ตาข้างมีหนาม 1-5 หนาม แฉกนั้นอวบน้ำซึ่งเป็นใบที่เปลี่ยนรูป ลำต้นจริงอยู่กึ่งกลางของแฉก เมื่อต้นสมบูรณ์มีอายุประมาณ 2 ปี จากกิ่งปักชำ ฤดูกาลของผลแก้วมังกรมีช่วงยาวพอสมควร ตั้งแต่พฤษภาคมถึงตุลาคม (สุรพงษ์, 2544)

สำหรับในประเทศไทยนั้น โรคที่สำคัญคือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ (Brown spot or stem cancer) สาเหตุเกิดจากรา *Neoscytalidium dimidiatum* ราเข้าทำลายทั้งที่ดอก ลำต้นและผล (Athipunyakom *et al.*, 2015) ซึ่งในปัจจุบันพบการระบาดของโรคนี้นในหลายประเทศในเขตประเทศเอเชียนั้น ได้แก่ ประเทศไต้หวัน (Chuang *et al.* 2012; Lin *et al.*, 2015) จีน (Yi *et al.*, 2013; 2015). มาเลเซีย (Masratul *et al.*, 2015) และเวียดนาม (Hieu *et al.*, 2015) ดังนั้นปัญหาโรคของแก้วมังกรที่สำคัญที่สุดที่ระบาดในหลายประเทศในเขตเอเชีย คือโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลหรือโรคแคงเคอร์ มีการระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว และการป้องกันกำจัดค่อนข้างยาก ซึ่งแต่ละประเทศกำลังเร่งดำเนินการงานวิจัยศึกษาอยู่ รา *Neoscytalidium dimidiatum* เจริญเข้าไปในเนื้อเยื่อพืชและสามารถเข้าไปพักตัวอยู่ในพืชได้โดยยังไม่แสดงอาการ ถ้าแก้วมังกรแสดงอาการของโรคชัดเจนแล้ว แสดงว่าเชื้อราเข้าไปทำลายพืชและสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราและสปอร์ ทำให้การป้องกันกำจัดโรคนั้นยากมากขึ้น เพราะฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเพื่อวินิจฉัยโรคในขณะที่ยังไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งสามารถตรวจสอบโรคได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำยิ่งขึ้นก่อนการแสดงอาการของโรคจะปรากฏเพื่อเป็นข้อมูลของเชื้อในการศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก, ถุงกระดาษ, กรรไกรตัดแต่งกิ่ง, ไม้ทาบตัวอย่าง, กระดาษหนังสือพิมพ์, ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง
- อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR machine) เครื่องเขย่า (vortex) เครื่อง tissue lyser gel tank เครื่องกำเนิดกระแสไฟ gel plate comb เครื่องถ่ายภาพเจล microwave micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร กล้องจุลทรรศน์แบบ compound กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ water bath และ heat block
- วัสดุในห้องปฏิบัติการ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate

- สารเคมี ได้แก่ เอนไซม์สำหรับทำปฏิกิริยา Taq DNA Polymerase Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Proteinase K enzyme Lithium Borate buffer (LB) ชุดสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ Microbial DNA Isolation Kit Power Plant Isolation Kit ชุดสำหรับการสกัดเจล ชุดสำหรับทำความสะอาดดีเอ็นเอ Stain G loading dye agarose gel (PCR grade) PCR water DNA ladder อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA) และ ไพร์เมอร์ ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990)
- Sequence assemble programs ได้แก่ Bioedit และ Geneious version 8.1.9

วิธีการ

การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum*

1. สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum*

ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม

2. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium*

2.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2.1.1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน genus *Neoscytalidium*

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราในสกุล *Neoscytalidium* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอภิศรีศรีการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2.1.2 แยกราให้บริสุทธิ์

แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมานวดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายไฮโดรเจนเปอร์คลอไรท์ 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

2.1.3 จำแนกชนิดของรา *Neoscytalidium*

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Neoscytalidium* ศึกษาเกี่ยวกับคู่มือการจำแนกชนิดที่เกี่ยวข้อง

2.1.4 สกัดดีเอ็นเอของรา *Neoscytalidium* (DNA extraction) จากตัวอย่างราที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากราในสกุล *Neoscytalidium* และจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เขียนเส้นใยของรา *Neoscytalidium* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

2.1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง ITS กำหนดใช้ค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่คุณผลิตแนะนำ

2.1.6 การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 μ l 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

2.1.7 การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ 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

รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Neoscytalidium* จาก GenBank

รวบรวมข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Neoscytalidium* ที่มีใน GenBank ทั้งหมด เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากข้อ 2.1

3. การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Neoscytalidium*

นำข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Neoscytalidium* ทั้งหมดที่ได้จากข้อ 2.1 และ 2.2 มาจัดเรียง และบันทึกเป็นชุดข้อมูลในรูปแบบ fasta ไฟล์ โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar *et al.*, 2008) หรือใช้โปรแกรม online จากเว็บไซต์ www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/

4. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* โดยการพิจารณาชุดข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ ใช้โปรแกรม GPRIME

5. ทดสอบไพรเมอร์ (Primers validation)

ทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับดีเอ็นเอของรา *N. dimidiatum* และราใน สกุล *Neoscytalidium* โดยทำตามขั้นตอน 2.1.5 – 2.1.7

การตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum* ในตัวอย่างต่างๆ ของพืช โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *N. dimidiatum*

1. การเตรียมตัวอย่างต้นแบบดีเอ็นเอ (DNA templates) จากแหล่งตัวอย่างๆ พร้อมวิธีการสกัด ดังนี้

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจาก clean culture หรือ mixed cultures ของรา *Phyllosticta*

เชื้อเส้นใยของรา *Neoscytalidium* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความเร็ว 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างลำต้น

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชที่ไม่แสดงอาการของโรค มาล้างน้ำให้สะอาด นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีกครั้งหนึ่ง และนำตัวอย่างพืชมาแช่น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที รินน้ำออกแล้วซับด้วยกระดาษซับจนแห้ง นานประมาณ 5 นาที ย้ายชิ้นตัวอย่างพืชลงในถุงพลาสติก บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกมาผึ่งที่อุณหภูมิห้อง (22-26 องศาเซลเซียส) นานประมาณ 17 ชั่วโมง ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นประมาณ 4 วัน ทำการตรวจหาเส้นใยของราที่เจริญออกมา และอีกประมาณ 10 วัน ตรวจหา fruiting bodies ของราจากนั้นนำตัวอย่างไปพืชที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างมากทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015)

1.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างผลแก้วมังกร

นำตัวอย่างผลแก้วมังกรมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีก จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการลนไฟ เหนือเอาผิวผลแก้วมังกรบริเวณที่แสดงอาการจุดรวมถึงเนื้อเยื่อรอบแผล ขนาดประมาณ 2 x 2 mm ใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการสกัดตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015)

1.4 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินที่เก็บบริเวณรอบรากของต้นแก้วมังกร โดยแยกเอาส่วนของเศษซากพืชหรือใบพืชออกจากตัวอย่างดิน ประมาณ 0.1 กรัมใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ เขย่าด้วย TissueLyser ที่ความเร็ว 20 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที และทำการสกัดตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard, *et al.* (2015)

2. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง ITS (ITS1/ITS4) กำหนดค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำ PCR อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ รา *N. dimidiatum* ที่ออกแบบได้

3. 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

4. การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ 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

การบันทึกข้อมูล

แยกได้จากการเก็บตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2560 – กันยายน 2563

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum*

1. สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum*

สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด พืชอาศัย ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม

รายละเอียดของรา *Neoscytalidium* ดังนี้

Scientific name	<i>Neoscytalidium</i>
Kingdom	Fungi
Division	Ascomycota
Class	Dothideomycetes
Order	Botryosphaerales
Family	Botryosphaeriaceae
Genus	<i>Neoscytalidium</i>
Species	<i>N. dimidiatum</i>

พืชอาศัย

แก้วมังกร (*Hylocereus undatus*) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) องุ่น (*Vitis vinifera*) มะรุมป่า (*Albizia lebbek*) หางนกยูงฝรั่ง (*Delonix regia*) มะเดื่อฝรั่ง (*Ficus carica*) มะเดื่อ หรือ ไทร (*Ficus spp.*) นนทรี (*Peltophorum petrocarpum*) โพทะเล

(*Thespesia populena*) เบย์เบอร์รี่ (*Arbutus*) เกาลัด (*Castanea*) ส้ม (*Citrus*) วอลนัท (*Juglans*) กล้วย (*Musa*) พลัม เซอร์รี่ ลูกท้อ เอพริคอต ซากุระ และ อัลมอน (*Prunus*) และ มะม่วง (*Mangifera indica*) *Populus Rhus* และ *Sequoiadendron*

การเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา

ราสร้างเส้นใยลักษณะรูปร่างเป็นคลื่นและไม่แน่นอน โคลนีเจริญเติบโตเร็ว เส้นใยฟูเจริญบนอาหาร เส้นใยรวมกันเป็นก้อน เส้นใยเริ่มแรกมีสีอ่อนและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่ออายุมากขึ้น สร้างสปอร์เรียกว่า arthroconidia ภายในส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia มักพบทั้ง 2 ชนิด

ที่อยู่อาศัยและนิเวศวิทยาของรา

ราชนิดนี้พบในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน เช่น อเมริกาใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และแอฟริกาใต้ รวมทั้งเชื้อราชนิดนี้อยู่ในแอฟริกาตะวันตกและใต้ แลบคาริเบียน และเอเชีย แต่ก็มีบางชนิดพบเจริญประเทศในเขตหนาวซึ่งอาจจะเป็นการแพร่กระจายมาจากประเทศเขตร้อน ราชนิดนี้พบในดินและไม้ที่สลายตัว

สาเหตุโรคพืช

Neoscytalidium dimidiatum เป็นราสาเหตุโรคพืชทำให้พืชมีอาการจุดคล้ายแคงเกอร์ และอาการจุดบนลำต้นของพืช หรือบนผล รวมทั้งแผลเน่าดำในผล และแผลเน่าสีน้ำตาลในลำต้นของแก้วมังกรที่มีรายงานในประเทศจีน มาเลเซีย เวียดนาม และประเทศไทย และยังมีรายงานเป็นโรคแคงเกอร์ที่ลำต้นของงุ่นในเมืองแคลิฟอร์เนียในประเทศสหรัฐอเมริกาด้วย

2. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium*

2.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และฐานข้อมูลนานาชาติ

รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 12 ไอโซเลต

2.1.1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน genus *Neoscytalidium*

เก็บตัวอย่างโรคของแก้วมังกรและเฟิร์นเขากวางมาแยกเชื้อ ผลจากการแยกเชื้อจากลำต้นและผลของแก้วมังกรที่เป็นโรคแยกได้จำนวน 30 ไอโซเลต และผลจากการแยกเชื้อจากโรคของเฟิร์นเขากวางมังกรที่เป็นโรคแยกได้จำนวน 2 ไอโซเลต

2.1.2 แยกราให้บริสุทธิ์

แยกราจากข้อ 2.1.1 บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1.3 จำแนกชนิดของรา *Neoscytalidium*

จากผลการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคของแก้วมังกร 30 ไอโซเลตและเฟิร์นเขากวางจำนวน 2 ไอโซเลต จำแนกชนิดเป็นรา *Neoscytalidium dimidiatum* ทั้งหมด

2.1.4 สกัดดีเอ็นเอของรา *Phyllosticta* (DNA extraction) จากตัวอย่างราที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากราในสกุล *Phyllosticta* และจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2.1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1.6 การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

2.1.7 การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เลี้ยงรา *Neoscytalidium* บนอาหาร PDA สังเคราะห์ จำนวน 10 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากแก้วมังกร (8 ไอโซเลต) มันสำปะหลัง (1 ไอโซเลต) และเฟิร์นเขากวาง (1 ไอโซเลต) สกัดดีเอ็นเอของรา *Neoscytalidium* ทั้ง 10 ไอโซเลตๆ ละ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS และ TEF ส่ง sequencing จำนวน 40 reactions จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจัดทำ consensus sequences ของรา *Neoscytalidium* ทั้ง 10 ไอโซเลตๆ ละ 2 ตำแหน่ง เมื่อการวิเคราะห์ชนิดของราเปรียบเทียบกับชุดข้อมูลกับฐานข้อมูลต่าง ๆ และพบว่าเป็น รา *N.dimidiatum* และจากการวิเคราะห์และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* โดยเริ่มทดลองออกแบบโดยใช้ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ได้ไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ได้แก่ NdDOAF1/NdDOAR1 NdDOAF2/NdDOAR2 NdDOAF3/NdDOAR3 NdDOAF4/NdDOAR4 และ NdDOAF5/NdDOAR5 เพื่อดำเนินการทดสอบความจำเพาะต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N.dimidiatum* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด พืชอาศัย ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม และรวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 12 ไอโซเลต พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างโรคของแก้วมังกรและเฟิร์นเขากวางมาแยกเชื้อ ผลจากการแยกเชื้อจากลำต้นและผลของแก้วมังกรที่เป็นโรคแยกได้ราจำนวน 30 ไอโซเลต จากเฟิร์นเขากวางมังกรที่เป็นโรคแยกได้ราจำนวน 2 ไอโซเลต แยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ จากผลการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุโรคของแก้วมังกร 30 ไอโซเลตและต้นเขากวางจำนวน 2 ไอโซเลต โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำแนกชนิดเป็นรา *Neoscytalidium dimidiatum* ทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตมงคล พงณา ตระกูลสุวรรณ์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์
 บุรณี พัววงศ์แพทย์ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ณีภูริมา ไชยจิตเจริญกุล และอมรรรัตน์ ภูไพบูลย์.
 2550. การศึกษาชนิดของโรคแก้วมังกรและกวนอิมเพื่อการส่งออก. รายงานผลงานวิจัย
 ประจำปี 2550. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. จตุจักร กรุงเทพฯ
 หน้า 1024 – 1034

- พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเต็อ และ ชนินทร ดวงสอด. 2552. โรคผลเน่าของแก้วมังกร สาเหตุเกิดจาก *Bipolaris cactivora*. หน้า 216-223. ใน การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 9 “อารักขาพืชไทย เทิดไท้องค์ภูมิ ตามวิถีเศรษฐกิจพอเพียง” ณ โรงแรมสุนีย์แกรนด์ จังหวัดอุบลราชธานี . 24-26 พฤศจิกายน 2552.
- Athipunyakom, P, S. Likhitekaraj. 2010. Fruit Rot Diseases of Dragon fruit (*Hylocereus* spp.) in Thailand, pp. 1 5 6 . In 9 th 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, Frenghsan, Kaohsiung, Taiwan, 7-9 September 2015.
- Alcorn, J.L. 1 9 8 3 . Generic concepts in Drechslera, Bipolaris and Exserohilum. Mycotaxon 17: 1-86.
- 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. 1 9 9 3 . More Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, Surrey, England. 507pp.
- 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.
- 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, Frenghsan, 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.

- Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stroma. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. England. 695 p.
- 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 Fitopatología 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.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.), pp. 315-322. Academic Press.

ผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test) จากแอนติบอดี
ของโปรตีนลูกผสม SecA ต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย
Development of Test Kit for Detection SecA Protein of Sugarcane
White Leaf Diseases

กาญจนา วาระวิชนี แสนชัย คำหล้า
สิทธิศักดิ์ แสไพศาล นายภูวนารถ มณีโชติ
กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการวิเคราะห์ขนาด ปริมาณ และความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ไม่สามารถแยกแยะโปรตีนลูกผสม partial SecA recombinant protein ออกจากโปรตีนของแบคทีเรีย ดังนั้น ความเข้มข้นสารละลาย 20% L-(+)-Arabinose ปริมาตร 1 เท่า ไม่สามารถการกระตุ้นให้โปรตีนเป้าหมายให้แสดงออก จึงอยู่ระหว่างการปรับความเข้มข้นของสารละลาย 20% L (+) Arabinose ให้เหมาะสมเพื่อกระตุ้นให้แบคทีเรียสามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนเป้าหมายได้มากที่สุด

คำหลัก : อ้อย, ไฟโตพลาสมา, Sugarcane white leaf, expression protein, SecA recombinant protein, SecA gene, fusion protein, partial secA-adapter gene/6xHisTag, 20% L-(+)-Arabinose

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-09-61

คำนำ

ปัญหาการระบาดของโรคใบขาวอ้อยสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมาส่งผลกระทบต่อผลผลิตอ้อยในภาพรวมของประเทศอย่างมากตั้งแต่ปี 2495 จนถึงปัจจุบัน คิดพื้นที่ความเสียหายกว่า 200,000 ไร่ มูลค่าความเสียหายกว่า 1,000 ล้านบาท และถือเป็นโรคอุบัติซ้ำซากที่ทำให้คุณภาพของผลผลิตอ้อยลดลงและเพิ่มต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกรสูงขึ้นจากการรื้อแปลงเดิมทิ้งเพื่อปลูกใหม่ เชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวสามารถติดไปได้กับส่วนขยายพันธุ์หากเกษตรกรนำไปปลูกจึงเป็นการแพร่กระจายโรคในพื้นที่นั้นๆ และพื้นที่ใกล้เคียงได้อย่างดีเนื่องจากมีแมลงพาหะ คือ เพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาลช่วยถ่ายทอดโรค รวมทั้งปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีใดที่สามารถแก้ไขปัญหาโรคใบขาวได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ ในขณะที่มีการควบคุมการแพร่ระบาดเน้นการใช้ท่อนพันธุ์สะอาดปราศจากโรคควบคู่กับการจัดการแปลงที่ดีและเฝ้าระวังแมลงพาหะ ทั้งนี้ ระหว่างกระบวนการผลิตพืชปลอดโรคค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลาค่อนข้างนาน และค่าใช้จ่ายสูง แต่คุ้มค่าต่อการลงทุน ดังนั้น ก่อนผลิตพืชปลอดโรคควรมีวิธีตรวจสอบพืชเริ่มต้นว่าปลอดเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยาสามารถตรวจวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุได้ถึงระดับยีนและให้ผลการตรวจแม่นยำ แต่ข้อจำกัดที่สำคัญของเทคนิคนี้มีอยู่หลายประการ เช่น ผู้ปฏิบัติต้องมีความเชี่ยวชาญ ต้นทุนการตรวจสอบ เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่ใช้จำเพาะ เป็นต้น ดังนั้น จึงนำเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาเข้ามาช่วยตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุดังกล่าว ข้อดีคือ เป็นเทคนิคที่ไม่มีความซับซ้อนในการปฏิบัติงานเท่าเทคนิคทางด้านอณูชีววิทยา สามารถตรวจตัวอย่างต่อครั้งได้จำนวนมากและยังคงให้ผลการตรวจค่อนข้างแม่นยำ Shen and Lin (1993) หลักการของเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาอาศัยความเหมาะสมระหว่างโปรตีนโครงสร้างของเชื้อสาเหตุต่อแอนติบอดีของเชื้อสาเหตุชนิดนั้น ๆ เทคนิคที่นิยม คือ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) แต่เซลล์เชื้อไฟโตพลาสมาเองมีข้อจำกัดในเรื่องการแยกสกัดหากได้แอนติเจนที่ไม่บริสุทธิ์จะส่งผลให้แอนติบอดีที่ผลิตคุณภาพไม่ดี เมื่อนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของผลวิเคราะห์ได้ ทั้งนี้ จากรายงานของ Kakizawa *et. al.* (2001) สังเคราะห์ SecA protein ของเชื้อ Onion yellow phytoplasma จากการ expression protein โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* แก้ปัญหาเรื่องการแยกเชื้อไฟโตพลาสมาให้บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีได้

จึงเป็นที่มาของงานวิจัยทำการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม SecA (SecA recombinant protein) จาก *secA gene* โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อพัฒนาต่อยอดเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป ที่สามารถตรวจสอบได้ง่ายในทางปฏิบัติ ไม่จำกัดกลุ่มผู้ใช้ โดยเฉพาะเกษตรกร บริษัทเอกชน รวมถึงนักวิชาการที่เกี่ยวข้องนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในทางปฏิบัติ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคและตัวอย่างพืชปกติ
- อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ ได้แก่
 - เครื่องชั่งละเอียด (precision balance) 2 และ 4 ตำแหน่ง
 - ตู้แช่แข็ง -20, -40 องศาเซลเซียส (freezer)
 - เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
 - เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD)
 - เครื่อง Gel electrophoresis

- เครื่องวิเคราะห์เจลและบันทึกภาพ (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)
3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
- โกร่งบดตัวอย่าง (mortars and pestles)
 - หลอดไมโครทิวบ์ (Microtube) ขนาด 0.5, 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
 - ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tip) ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
 - เพลทเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)
 - วัสดุที่ใช้ประกอบชุดตรวจสอบ Immuno Strip ได้แก่ nitrocellulose membrane AE99, sample pad, conjugate pad, absorption pad, backing pad
 - ปากกาหมึกซึม (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร)
 - พู่กันเบอร์ 0
 - ไม้บรรทัด
4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่
- ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป FavorPreP Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN)
 - Agarose gel (SeaKem®)
 - Tryptone Powder
 - Yeast Extract Powder
 - BL21 Star DE3 One Shot Competent, 20 rxn (Invitrogen, USA)
 - *E. coli* สายพันธุ์ Top 10
 - T4 DNA ligase (HC), 500 u
 - พลาสมิดพาหะ pBAD/His A, B, and C vector (Invitrogen, USA)
 - โพรตีนมาตรฐาน BLUltra Prestained Protein Ladder (BIO-HELIIX, Cat#1 BHC-PM001-0500)
 - TGX Stain-Free FastCast Acrylamine Kit, 12 % (BIO-RAD, Cat#1610185)
 - สารปฏิชีวนะ (antibiotic, laboratory grade) แอมพิซิลลิน (ampicillin)
 - ชุดไพรเมอร์ (Primer set)
 - สารแขวนลอยอนุภาคทอง (Colloidal Gold)
 - Goat anti-rabbit IgG

วิธีการ

1. การเตรียม starter gene

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 จำนวน 1 โคโลนี ที่มีพลาสมิดสายผสมของชิ้นยีน partial secA-adapter gene/6xHisTag ถูกบรรจุใน pBAD/His A expression vector ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter gene ในขั้นตอนต่อไป

2. กระตุ้นการแสดงออกโปรตีนลูกผสมของ partial SecA recombinant protein

เติมสารละลายแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงเป็น starter gene ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง นำมาทดสอบวัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จนได้ค่าประมาณเท่ากับ 0.5-0.7 ทำการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสมของ

partial SecA recombinant protein ด้วยสารละลาย 20% L-Arabinose เพื่อหาความเข้มข้น และช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้โปรตีนลูกผสมแสดงออก

3. วิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

แยกวิเคราะห์ขนาดโปรตีนลูกผสมของ partial SecA recombinant protein ด้วยวิธี SDS-PAGE ด้วย TGX Stain-Free FastCast Acrylamine Kit, 12 % (BIO-RAD, Cat#1610185) ด้วยเครื่อง Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD, Cat#1658005) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 120 เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นย้อมสีเจล SDS ด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue เขย่าที่ อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยสารละลาย Destaining เขย่าที่ อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดโปรตีนลูกผสมกับแถบโปรตีนมาตรฐาน BLUltra Prestained Protein Ladder (BIO-HELIX, Cat#1BHC-PM001-0500) และแสดงผลด้วยเครื่อง วิเคราะห์เจล และบันทึกภาพ ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD

4. การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

เติมสารละลายแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงเป็น starter gene ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 500 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้น เหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสมของ partial SecA recombinant protein ด้วยสารละลาย 20% L-Arabinose ตามความเข้มข้นที่เลือกให้เหมาะสม เขย่าต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตาม ช่วงเวลาที่สามารถผลิตโปรตีนได้มากที่สุด จากนั้นทำการตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยการหมุน เหยียงที่ความเร็ว 7000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บตะกอนมาละลายด้วย lysis buffer A นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultra schall BANDELIN SONOPULS HD และแยก สกัด partial SecA recombinant protein ให้บริสุทธิ์ด้วย ProBond™ Nickel-Chelating Purification System ตามคู่มือแนะนำ (Novex, Catalog Numbers R801-01) ทำการวิเคราะห์ ขนาด ปริมาณ และความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (ตามวิธีการข้อ 3)

5. ทำการบันทึกข้อมูลและจัดทำรายงาน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2560-กันยายน 2563

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

หลังจากเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม partial SecA recombinant protein ด้วยสารละลาย 1 เท่าของ 20% L-(+)-Arabinose เพื่อเหนี่ยวนำให้สารละลายแขวนลอยเซลล์ แบคทีเรียที่รับพลาสมิดลูกผสมเกิดการสังเคราะห์โปรตีนเป้าหมาย แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย ProBond™ Nickel-Chelating Purification System และวิเคราะห์ขนาด ปริมาณ และความ บริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า ไม่สามารถแยกแถบโปรตีนลูกผสม partial SecA recombinant protein ออกจากโปรตีนอื่นๆ ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก

ความเข้มข้นของสารละลาย 20% L (+) Arabinose ยังไม่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้โปรตีนเป้าหมายแสดงออก

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ความเข้มข้นของสารละลาย 20% L-(+)-Arabinose ปริมาตร 1 เท่า พบว่า ไม่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นให้โปรตีนลูกผสม partial SecA recombinant protein แสดงออก เพราะไม่สามารถแยกแถบโปรตีนเป้าหมายดังกล่าวออกจากโปรตีนอื่นๆ ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ได้เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE ดังนั้น จึงควรปรับความเข้มข้นสารละลาย 20% L-(+)-Arabinose และหาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่โปรตีนเป้าหมายสังเคราะห์ได้มากที่สุด เพื่อไม่ให้กระทบต่อขั้นตอนการแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ และให้ได้ความเข้มข้นที่เพียงพอสำหรับใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้ผลิตโพลีโคลอนแอนติบอดีเพื่อนำไปผลิตเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปได้

เอกสารอ้างอิง

- Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung H.-Y., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S.-I., Ugaki, M., and S. Namba. 2001. Cloning and Expression Analysis of Phytoplasma Protein Translocation Genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14(9) : 1043-1050.
- Shen,W.C. and C.P. Lin. 1993. Production of monoclonal antibodies against a mycoplasma- like organisms associated with sweetpotato witches' broom. *Phytopathol.* 83 : 671-675.

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบแมลงวันแดง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillet)
(Diptera: Tephritidae) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง
Development Diagnostic Technique of the Economically Important Fruit
Fly, *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillet) (Diptera: Tephritidae)
Using Species Specific Primer

ยุวรินทร์ บุญทบ¹ ณัฐริมา โขจิตเจริญกุล² นพรัตน์ บัวหอม³

¹ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

² กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

³ กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร

รายงานความก้าวหน้า

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequences) ของยีน *Cox1* จากแมลงวันผลไม้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแมลงวันผลไม้ที่มีในประเทศไทย (native species) จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *B. carambolae*, *B. cilifera*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *Z. caudatus*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* และกลุ่มแมลงวันผลไม้ที่ไม่เคยสำรวจพบในประเทศไทย (exotic species) และเป็นแมลงกักกัน (quarantine pest) ของไทย จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *B. tryoni* และ *B. neohumeralis* และรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้บางส่วนจากฐานข้อมูลของ Genbank มาจัดลำดับและทำการตรวจหา ตำแหน่ง single nucleotide polymorphisms (SNPs) โดยใช้โปรแกรม Vector NIT (invitrogen) ซึ่งตำแหน่ง SNPs ที่พบนั้นจะเป็นตำแหน่งที่ใช้ระบุชนิดของแมลงแดง *Z. cucurbitae* เท่านั้น และเป็นตำแหน่งที่ไม่พบในแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ เพื่อหาตำแหน่งที่มีความเหมาะสมในการออกแบบ Forward primer และ Reverse primer และทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และทำ PCR โดยไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้โดยทดสอบกับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ในระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย และนำรหัสพันธุกรรมจาก PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* (Zcur-F1 กับ Zcur-R1) มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบไว้มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ซึ่งจะนำไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไปใช้กับตัวอย่างที่ตรวจพบจากด่านตรวจพืชต่าง ๆ ในปีงบประมาณถัดไป

คำหลัก: แมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ไพรเมอร์

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-11-61

คำนำ

ปัจจุบันการส่งออกผักและผลไม้เป็นรายได้ที่มีความสำคัญของเกษตรกรไทยและจากความสำเร็จในการนำเข้าผลไม้จากไทยไปสู่ตลาดโลกที่มีมาตรฐานสูงขึ้น อีกทั้งจากสภาวะการแข่งขัน การส่งออกพืช ผัก และผลไม้ของประเทศในภูมิภาคอาเซียนที่สูงขึ้นตามลำดับนั้น การจำแนกแมลงศัตรูพืชที่มีโอกาสติดไปกับการส่งออกหรือนำเข้านั้นมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งที่จะนำมาประกอบการเป็นข้อมูลยืนยันประกอบการส่งออกและนำเข้า ดังนั้นการจำแนกชนิดแมลงศัตรูพืชโดยเฉพาะแมลงวันผลไม้ซึ่งเป็นศัตรูที่สำคัญของผักและผลไม้ให้มีความถูกต้อง และรวดเร็ว จะสามารถช่วยประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย รวมทั้งสร้างมาตรฐานการตรวจวินิจฉัยให้เทียบเท่าระดับสากลจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง โดยการตรวจสอบชนิดศัตรูพืชแบบดั้งเดิม (traditional taxonomy) จะใช้เพียงลักษณะภายนอกของตัวเต็มวัยเท่านั้นในการตรวจวินิจฉัย และจากการจำแนกชนิดจากรูปร่างลักษณะของไข่ หรือตัวอ่อนนั้นเป็นเรื่องที่ทำการศึกษายาก เพราะไข่และตัวหนอนของแมลงวันผลไม้มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นในการศึกษานิตของแมลงวันผลไม้จึงนิยมจำแนกในระยะตัวเต็มวัยเท่านั้น และในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชที่พบในการส่งออกหรือนำเข้านั้น หากมีการสำรวจพบระยะไข่ หรือตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ที่ติดอยู่กับพืช ผัก และผลไม้ ก็จะทำให้ต้องเสียเวลาในการนำมาเลี้ยงเพื่อให้เป็นตัวเต็มวัย ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 1 เดือนในการเลี้ยง ดังนั้นเวลาที่ต้องเสียไปในการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ หรือตัวหนอนเพื่อให้เป็นตัวเต็มวัยนั้น เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นอย่างมาก เพราะความล่าช้าที่เกิดขึ้นนั้นจะส่งผลกระทบต่อการค้านำเข้าผักและผลไม้ระหว่างประเทศ (Armstrong *et al.*, 1997) ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งเป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นวิธีการที่แม่นยำ ถูกต้อง และมีประสิทธิภาพสูงในการนำไปใช้วินิจฉัยชนิดของแมลงวันผลไม้ ให้เกิดความสะดวกรวดเร็วในการจำแนกชนิดของแมลงวันผลไม้ในการส่งออกหรือนำเข้า และการทำงานด้านกักกันพืช จะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่ง ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อชนิดของศัตรูพืช (species - specific primer) จากยีน *cox1* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น DNA Barcode (ดีเอ็นเอมาตรฐานบริเวณสั้นๆ ที่มีศักยภาพในการใช้ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้) ของแมลงจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะนำมาพัฒนาเทคนิคที่จะสามารถนำมาใช้ในด้านตรวจพืชส่งออกและนำเข้า โดยเฉพาะในปัจจุบันนี้ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมและเฉพาะเจาะจงต่อชนิดของแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย

ในประเทศไทยพบแมลงวันผลไม้ tephritid หลายหลายชนิด แต่มีแมลงวันผลไม้ 2 ชนิดหลักที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ แมลงวันผลไม้กลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex และแมลงวันแดง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett) (Guamán, 2009) แมลงทั้งสองชนิดเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญต่อการผลิต ผัก ผลไม้ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายของผลผลิตเป็นอย่างมาก (กรมวิชาการเกษตร, 2012) โดยแมลงวันผลไม้ทั้งสองชนิดนั้นจัดเป็นศัตรูพืชที่มีภัยคุกคามที่สำคัญต่อพืชผักของประเทศไทยเป็นอย่างยิ่ง แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแมลงวันผลไม้ในกลุ่ม *Bactrocera dorsalis* complex มากมาย แต่สำหรับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* นั้นยังมีน้อยมาก โดยงานวิจัยส่วนมากมักจะเน้นเกี่ยวกับการศึกษาชีววิทยาและการศึกษานิตของแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* โดยใช้การศึกษาทางอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม นอกจากนี้ในพืชผักที่มีความสำคัญในการส่งออกของไทยนั้น พบว่าแมลงวันแดง *Z. cucurbitae*

จัดเป็นศัตรูพืชที่มีสำคัญอันดับหนึ่ง ซึ่งส่วนมากจะเป็นพืชตระกูลแตง (Family Cucurbitaceae) ได้แก่ ฟัก แตงกวา แตงโม เมล่อน และแตงไทย เป็นต้น ด้วยสาเหตุดังกล่าวจึงพบแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* สร้างความเสียหาย และมักติดไปกับพืช ผัก ที่ต้องการส่งออก (Piñero *et al.*, 2006; Koyama *et al.*, 2004) ส่งผลกระทบต่อเนื่องต่อการส่งออกพืช ผัก ผลไม้ของไทยไปยังต่างประเทศ รวมทั้งเป็นสาเหตุหลักในการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศอีกด้วย

และในปัจจุบันนี้ประเทศไทยใช้การตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของตัวเต็มวัย เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยเพียงเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการศึกษาแรกในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงกับแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* จากการประยุกต์หลักการพื้นฐานของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) กับ species specific DNA Barcode ซึ่งจะใช้เพียงขั้นตอนการทำ PCR และ electrophoresis เท่านั้น ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้จะสั้นมาก (ใช้ระยะเวลาเพียง 1 - 2 วัน) เท่านั้นก็สามารถตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงวันผลไม้ในทุกๆ การเจริญเติบโต ไม่ว่าจะ เป็นระยะไข่ หนอน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัย ก็จะพิสูจน์ได้ว่าแมลงวันผลไม้ที่ตรวจพบนั้นเป็นแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* หรือไม่ จากประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง ความรวดเร็ว และประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย จะก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2561)

วิธีดำเนินการวิจัยเก็บตัวอย่างทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเพื่อนำมาสกัดและศึกษารหัสพันธุกรรม

1.1 การศึกษาครั้งนี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมลงวันทองจากพื้นที่การเกษตร และพื้นที่ป่าธรรมชาติ โดยจะเก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) ซึ่งคาดว่าภายในหนึ่งปีจะสามารถเก็บตัวอย่างได้ 3 ภาค ภาคละ 3 -5 จังหวัด และในแต่ละจังหวัดจะเก็บสามจุดสำรวจ และใช้กับดักฟีโรโมน 2 ประเภทได้แก่ CUE lure และ Methyl Eugenol โดยติดตั้งใน พื้นที่เก็บตัวอย่างละ 5 อัน/ต่อจุดสำรวจ บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) โดยแบ่งเป็น พื้นที่ต่างๆ ได้แก่ แปลงพืชผักสวนครัว เช่น แตงกวา ฟักทอง ถั่วฝักยาว บวบ ฟักและอื่นๆ แปลงผลไม้ เช่น มะเฟือง ชมพู ฝรั่ง มะม่วง พุทราและอื่นๆ

1.2 นำส่วนของพืชที่พบร่องรอยการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้มายังห้องปฏิบัติการ แยกชนิดของตัวหนอนและทำการดองด้วยแอลกอฮอล์ 95-100% (เพื่อให้นำไปศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของตัวอ่อน) นำตัวอ่อนที่เหลือใส่กล่องพลาสติกที่มีตะแกรงรอกันซึ่งด้านล่างใส่ขี้เลื่อย และนำกล่องพลาสติกใส่ในกรงผ้าเพื่อให้ตัวเต็มวัยเจริญออกมาให้อาหาร คือ น้ำตาลผสม บริเวอรี่สตีในอัตรา 1:4 เพื่อให้สืบพันธุ์พัฒนาได้ดี

1.3 นำตัวเต็มวัยบางส่วนดองไว้ในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอและนำไปใช้ในการออกแบบ ไพรมเมอร์ที่มีความเจาะจงต่อแมลงวันตาง *Z. cucurbitae*

1.4 เตรียมตัวอย่างตัวเต็มวัยบางส่วนเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและเป็นข้อมูลอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์ โดยใช้ตัวอย่างตัวเต็มวัยที่อบแห้งหรือฆ่าด้วยเอทิลออลซีเตด หรือเก็บแมลงใส่หลอดแก้วแช่ในช่องน้ำแข็ง 4 - 5 ชั่วโมง วิธีนี้จะทำให้สีไม่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อได้ตัวอย่างแล้วใช้เข็มขนาดเล็ก (micropin) แทงบริเวณด้านข้างของส่วนอกใต้ปีก ให้ไปทางด้านหน้าของลำตัว แล้วจึงเสียบ micropin กับโฟมหรือค็อกขนาดเล็กที่มีเข็มปักแมลงเสียบอยู่ โดยมีป้ายเล็ก ๆ บันทึกกำกับ บอกสถานที่ วันเดือนปี และชื่อผู้เก็บ และมีป้ายบันทึก แยกบันทึกชื่อพืช ที่เก็บมา และชื่อแมลงที่จำแนกได้อีก 1 ป้าย

2. วิธีการดำเนินการวิจัยสำหรับการศึกษาลำดับรหัสพันธุกรรม (ดำเนินการปี 2561)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตาม Boontop *et al.*, 2017 ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bionline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้านขวาจำนวนสามข้างของแมลงวันผลไม้ (25 mg) มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (ตัวอย่างแมลงที่เหลือเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen)) จากนั้นเติม Lysis BufferGL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Protinase K Solution ปริมาณ 25 ไมโครลิตรปิดหลอดให้สนิท 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 เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการปั่นเหวี่ยง) เติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง 11,000x g เป็นเวลา 1 นาที (ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน) จากนั้นเติม Wash Buffer GW2 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้น ทิ้งของเหลวที่เหลือจากการตกตะกอน 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 นาที จากนั้นนำ DNA ที่ได้เก็บในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อให้ในวิธีการต่อไป

2.2 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่มือต่อไปนี้

Primer Name	Sequence	Base
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	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

2.3 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

2.4 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่าง PCR product ของแมลงวันผลไม้ที่ได้ไปทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์โดย Molecular Genetics Research Facility ของ Queensland University of Technology, Australia

2.5 นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน Cox1 ที่ผ่านการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5

2.6 บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ มาตรวจสอบชนิด กับ Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมจากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

3. ออกแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* (ดำเนินการปี 2562)

3.1 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cox1 จากแมลงที่ทำการสำรวจ และแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ ที่เป็นแมลงกักกัน จากข้อมูลของ Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) มาจัดลำดับและทำการตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม chromas (เวอร์ชัน 2.33) และ BioEdit (เวอร์ชัน 7.0.9.0) เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* เท่านั้น ซึ่งมีความยาวประมาณ 500-800 คู่เบส โดยเลือกตำแหน่ง single-nucleotide polymorphism (SNP) ซึ่งจะใช้ระบุชนิดของแมลง *Z. cucurbitae* เท่านั้น ซึ่งไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแมลงวันชนิดอื่นๆ ได้

3.2 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงทั้งแบบฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สโดยอาศัยโปรแกรมที่ให้บริการฟรีแบบออนไลน์ เช่น GeneFisher (<http://www.bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher/>) โดยความยาวของไพรเมอร์มีขนาด 18-25 คู่เบส

3.3 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จากข้อ 3.2 มาวิเคราะห์ primer, dimer hairpin และ false priming sites โดยใช้โปรแกรม Oligo (version 6.0) software

3.4 วิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของ specific primer ที่ออกแบบไว้จากข้อ 3.2 โดยการเปรียบเทียบ (BLAST) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI database เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและความจำเพาะเจาะจง

3.5 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สที่จำเพาะเจาะจงสำหรับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ที่ออกแบบได้ มาเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ในระยะต่างๆ เช่น ไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย จากตัวอย่างแมลงวันแดงที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการและจากแมลงวันที่สำรวจพบในพืช ผัก และผลไม้ที่พบในภูมิภาคต่างๆ ของไทย รวมทั้งจากผัก ผลไม้ที่ส่งออกจากด่านตรวจพืชที่มีการส่งออก

3.6 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแมลงแดง *Z. cucurbitae* ที่สังเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ด้วยวิธีการเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วย 2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer โดยอาศัยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าและประจุไฟฟ้า

3.6 ทำบริสุทธิ์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen (Germany)

3.7 ส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

3.8 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>)

4. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* (ดำเนินการปี 2563)

4.1 นำไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบาร์โค้ดในแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* กับตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ ในระยะต่างๆ เช่น ไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย ด้วยวิธี PCR

4.2 ทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบาร์โค้ดกับแมลงวันที่พบในพืชผัก และผลไม้ที่พบบริเวณด้านตรวจพืชที่มีการส่งออกด้วยวิธี PCR

4.3 ทำการบันทึกข้อมูล และจัดทำรายงาน

การบันทึกข้อมูล

1. ตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ได้จากการเลี้ยงและรวบรวมจากกับดักล่อแมลง บันทึกข้อมูลโดยมีป้ายเล็ก ๆ บันทึกกำกับ บอก สถานที่ วันเดือนปี และชื่อผู้เก็บ และมีป้ายบันทึก แยกบันทึกชื่อพืช ที่เก็บมา และชื่อแมลงที่จำแนกได้อีก 1 ป้าย
2. ตัวอย่างดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequences) ของยีน *Cox1* จากแมลงวันผลไม้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแมลงวันผลไม้ที่มีในประเทศไทย (native species) จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *B. carambolae*, *B. cilifera*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *Z. caudatus*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* และกลุ่มแมลงวันผลไม้ที่ไม่เคยสำรวจพบในประเทศไทย (exotic species) และเป็นแมลงกักกัน (quarantine pest) ของไทยจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *B. tryoni* และ *B. neohumeralis* และรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้บางส่วนจากฐานข้อมูลของ Genbank มาจัดลำดับและทำการตรวจหา ตำแหน่ง single nucleotide polymorphisms (SNPs) โดยใช้โปรแกรม Vector NIT (invitrogen) ซึ่งตำแหน่ง SNPs ที่พบนั้นจะเป็นตำแหน่งที่ใช้ระบุชนิดของแมลงแดง *Z. cucurbitae* เท่านั้น และเป็นตำแหน่งที่ไม่พบในแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ เพื่อหาตำแหน่งที่มีความเหมาะสมในการออกแบบ Forward primer (Figure 1) และ Reverse primer (Figure 2)

จากนั้นใช้โปรแกรม Oligo cal และใส่ sequences ที่ได้มาเพื่อหาความเหมาะสมของไพรเมอร์ที่จะออกแบบซึ่งควรมีคุณสมบัติดังนี้- มีขนาด 18 -23 คู่เบส

- ห้ามมีเบสซ้ำ เช่น AA เพราะจะไม่มี ความ specific
- อุณหภูมิระหว่าง 55 – 60 องศาเซลเซียส
- ปลาย 3 ของ forward และ reverse ควรเป็น C หรือ G
- GC content ควรอยู่ระหว่าง 40 -50% แต่ไม่ควรเกิน 70%

และจากการการออกแบบพบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงได้ 2 คู่ (Table 1)

และวิเคราะห์ตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ด้วยโปรแกรม Primer map พบว่าทุกไพรเมอร์มีตำแหน่งอยู่บนยีน *Cox1* ของแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* เท่านั้น (Figure 3) และเมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ทั้งหมด คือ COIZcu-F1, COIZcu-F2 และ COIZcu-R1 โดยโปรแกรม BlastN ของฐานข้อมูล NCBI พบว่าไพรเมอร์ทุกเส้นมีความจำเพาะเจาะจงกับยีน *Cox1* ของแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* เท่านั้น (Figure 4 - 6) จากนั้นทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และทำ PCR โดยไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้ ซึ่งพบว่า ไพรเมอร์คู่ที่ 1 (Zcur-F1 กับ Zcur-R1 โดยทดสอบกับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ในระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย (Figure 7) และนำรหัสพันธุกรรมจาก PCR product ที่ได้จากการ

เพิ่มปริมาณตัวบัพไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* (Zcur-F1 กับ Zcur-R1) มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบไว้มีประสิทธิภาพและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ซึ่งจะนำไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไปใช้กับตัวอย่างที่ตรวจพบจากด่านตรวจพืชต่าง ๆ ในปีงบประมาณถัดไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ในระหว่างตุลาคม 2561 – กันยายน 2562 นี้ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแมลงวันผลไม้ที่มีในประเทศไทย (native species) จำนวน 8 ชนิด และกลุ่มแมลงวันผลไม้ที่ไม่เคยสำรวจพบในประเทศไทย ซึ่งเป็นแมลงกักกันของไทยจำนวน 2 ชนิด และรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้จากฐานข้อมูลของ Genbank มาหาตำแหน่ง single nucleotide polymorphisms (SNPs) ที่ใช้ระบุชนิดของแมลงแดง *Z. cucurbitae* เท่านั้น และเป็นตำแหน่งที่ไม่พบในแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ มาออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง และทำการทดสอบด้วย PCR พบว่าไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้มีประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ทุกระยะการเจริญเติบโต ซึ่งจะนำไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไปใช้กับตัวอย่างที่ตรวจพบจากด่านตรวจพืชต่าง ๆ ในปีงบประมาณ 2563 ต่อไป

คำขอบคุณ

ข้าราชการ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมาบริการ ของกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงในการช่วยเหลือเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ จึงทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จ และลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Armstrong, K. F., and 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.
- 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.
- Guamán Sarango (2009). Monitoring and pest control of Fruit flies in Thailand. Retrieved from <http://stud.epsilon.slu.se/699/>
- Koyama, J., Kakinohana, H., & Miyatake, T. (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., Jácome, I., Vargas, R., & Prokopy, R. J. (2006). Response of female melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, to host-associated visual and olfactory stimuli. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121, 261-269.

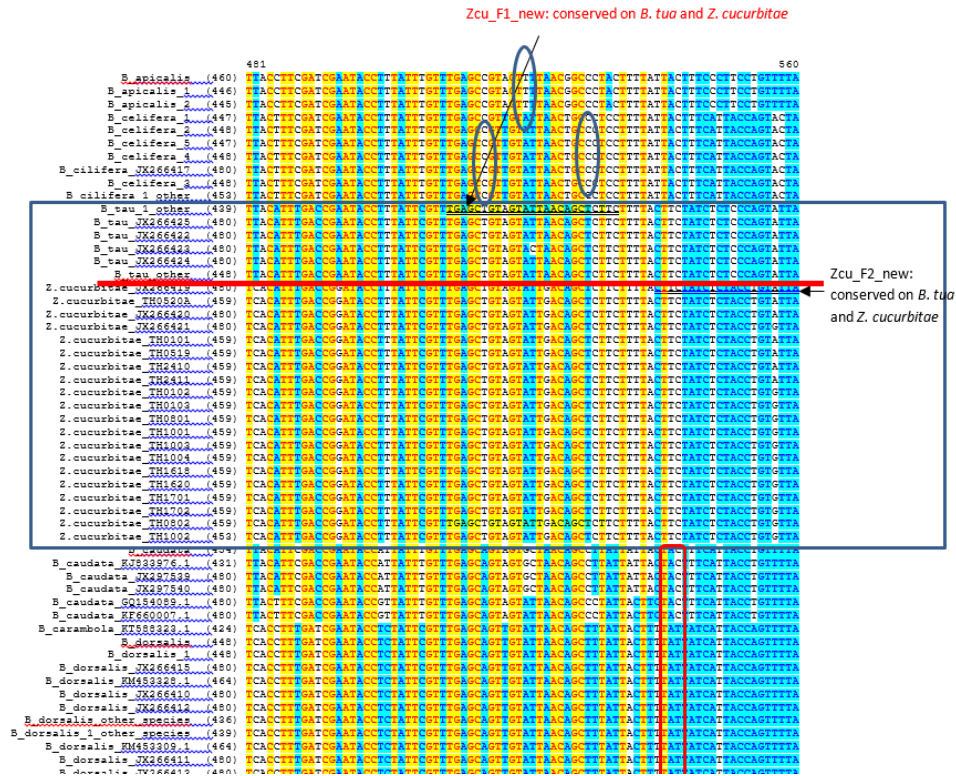


Figure 1 Species specific primer designing (forward primer) for *Zeugodacus cucurbitae*

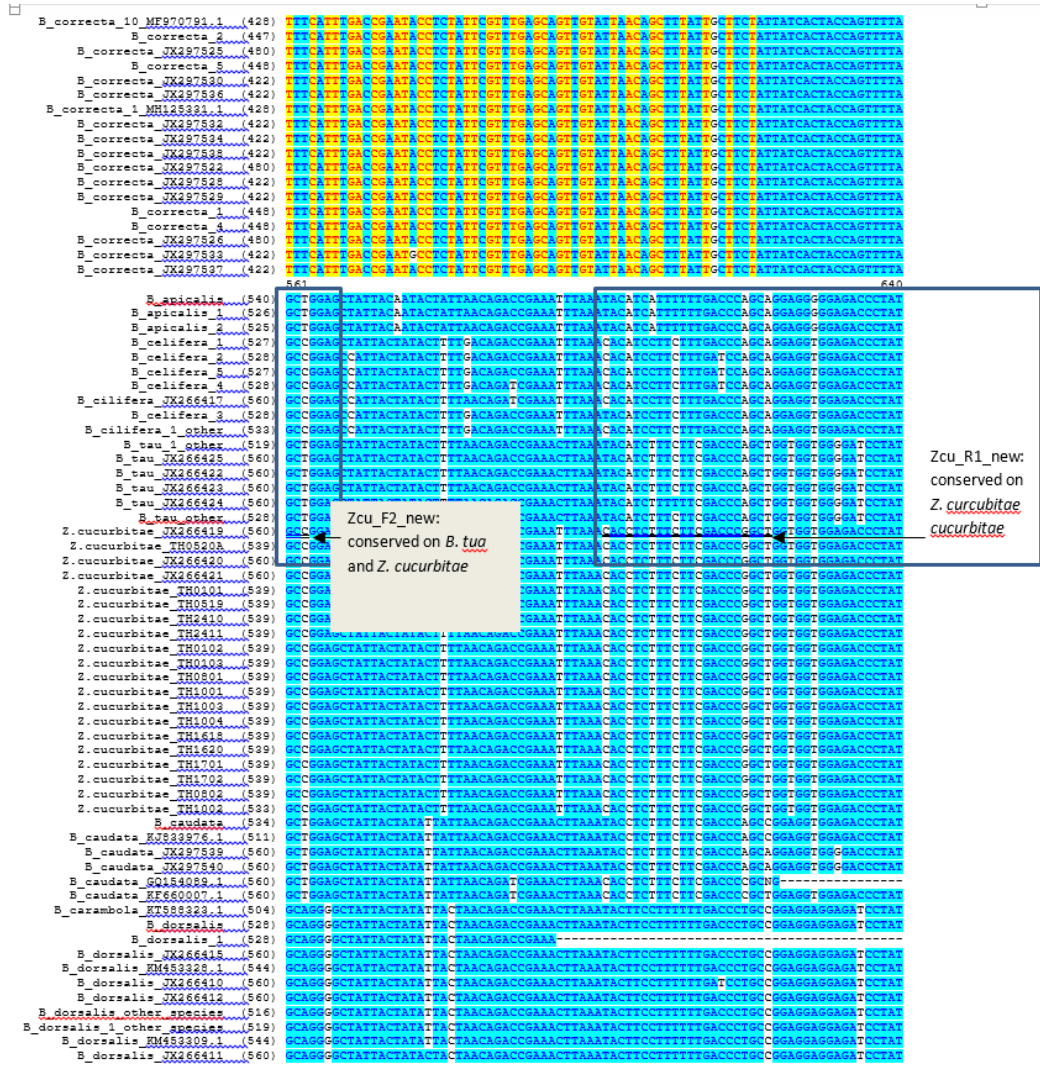


Figure 2 Species specific primer designing (reverse primer) for *Zeugodacus cucurbitae*


```

1 AGCTTGAGCAGGTATAGTGGGAACATCTCTTAGAATCTTAGTCCGGGCAGAACTGGGTCA
1 TCGAACTCGTCCATATCACCCCTTGTAGAGAATCTTAGAATCAGGCCCGTCTTGACCCAGT
61 CCCAGGAGCTTTAATCGGAGATGATCAAATCTATAATGTCATCGTAACAGCTCATGCATT
61 GGGTCCTCGAAATTAGCCTCTACTAGTTTAGATATTACAGTAGCATTGTCGAGTACGTAA
    >>>COIZcur-F1>>> 42 to 58
121 TGTTATGATTTTTTTCATAGTGATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGACTAGT
121 ACAATACTAAAAAAGTATCACTATGGATAATATTAACCTCCTAAACCTTTAACTGATCA
181 ACCCCTAATACTAGGAGCGCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAAGATTTTG
181 TGGGGATTATGATCCTCGCGGTCTATATCGTAAGGGAGCTTACTTATTATATTTCTAAAAC
241 ATTATTACCTCCCTCTTACATTACTTTTAGTGAGCAGTATAGTAGAAAACGGAGCTGG
241 TAATAATGGAGGGAGAGAATGTAATGAAAATCACTCGTCATATCATCTTTTGCCTCGACC
301 TACAGGTTGAACTGTTTATCCTCCCTTTCATCAATTATCGCTCATGGTGGAGCCTCAGT
301 ATGTCCAACCTTGACAAATAGGAGGGGAAAGTAGTTAATAGCGAGTACCACCTCGGAGTCA
361 TGATTTAGCTATTTTTTCTCTACATTTAGCTGGTATTTTCATCAATTTTAGGGCCGTAAA
361 ACTAAATCGATAAAAAAGAGATGTAAATCGACCATAAAGTAGTTAAAATCCCCGGCATT
421 TTTCATTACTACAGTAATTAATATGCGATCAACAGGAATCACATTTGACCGGATACCTTT
421 AAAGTAATGATGTCATTAATTATACGCTAGTTGTCCTTAGTGTAACCTGGCCTATGGAAA
    >>>F2>>> 518 to 542
    >>>F1>>> 488 to 512
481 ATTCGTTTGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTTCTTTTACTTCTATCTCTACCTGTGTTAGC
481 TAAGCAAACCTCGACATCATAACTGTGAGAGAAGAAAATGAAGATAGAGATGGACACAATCG
    <<<R1<<< 580 to 601
    <<<COIZcur-R1<<< 564 to 586
541 CGGAGCTATTACTATACTTTTAAACAGACCGAAATTTAAACACCTCTTTCTTCGACCCGGC
541 GCCTCGATAATGATATGAAAATTGTCTGGCTTTAAATTTGTGGAGAAAGAAGCTGGGCCG
601 TGGTGGTGGAGACCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGGATTTTTTGGTCAC
601 ACCACCACCTCTGGGATAAAAATATGGTTGTAATAAACTAAAAAACCAGTG

```

Figure 3 Species specific primer position (forward and reverse primer) for *Zeugodacus cucurbitae*

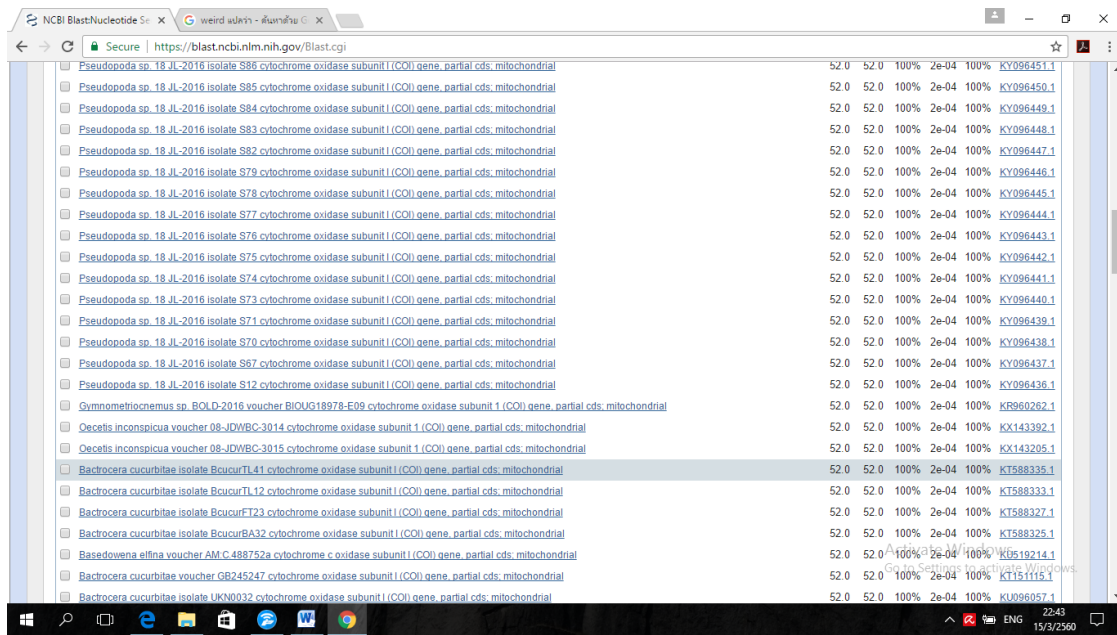


Figure 4 BlastN results of species specific primer (COIZcu-F1)

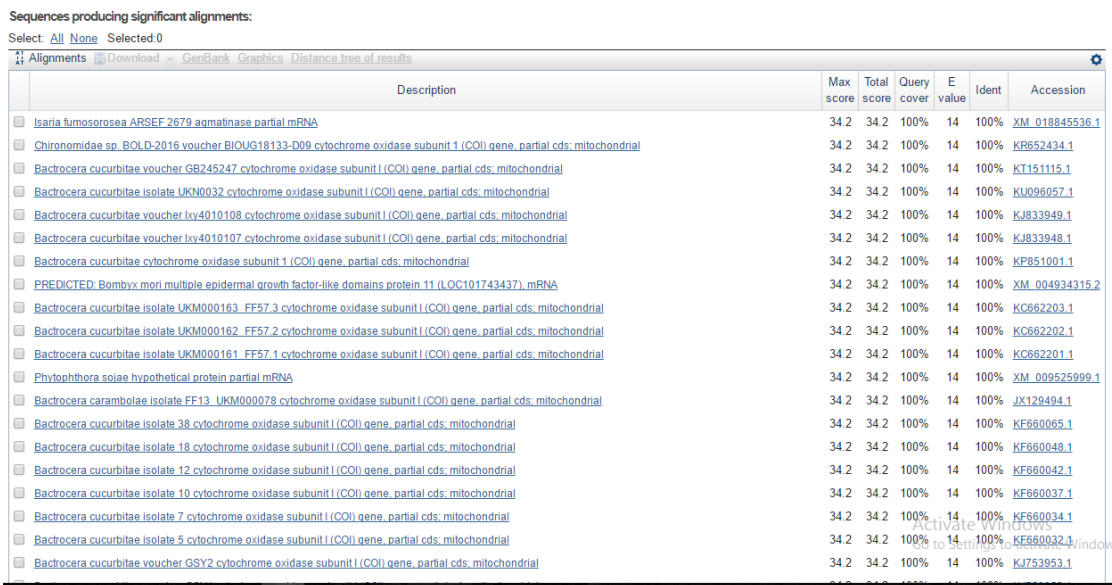


Figure 5 BlastN results of species specific primer (COIZcu-F2)



Figure 6 BlastN results of species specific primer (COI Zcu-R1)

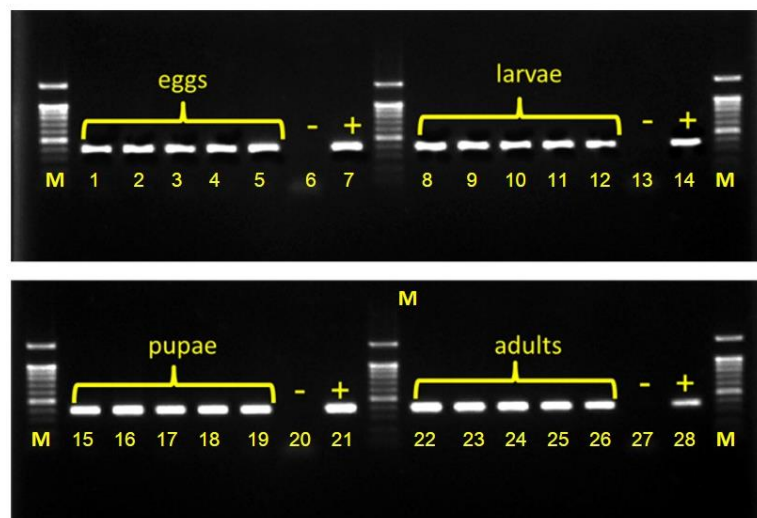


Figure 7 PCR results using species specific primer (Zcur-F1 and Zcur-R1) from different stages of *Zeugodacus cucurbitae*.

Lane 1 - 4 = egg of *Z. cucurbitae*

Lane 8 - 12 = larvae of *Z. cucurbitae*

Lane 15 - 19 = pupae of *Z. cucurbitae*

Lane 22 - 26 = adults of *Z. cucurbitae*

Lane 6, 13, 20 and 27 = negative control (ddH₂O)

Lane 7, 14, 21 and 28 = positive control (adults of *Z. cucurbitae*)

Table 1 Primer name, sequences, position, base pair, temperature (Tm), %GC and pcr product

No.	Primer name	Sequences	position	base pair	Tm	% GC	PCR product size
1	Zcur-F1	TGAGCTGTAGTATTGACAGCTCTTC	518-542	25	52	44	83
	Zcur-R1	AGCCGGGTCGAAGAAAGAGGTG	580-601	22	60	59	
2	Zcur-F2	CTTCTATCTCTACCTGTGTTAGCCG	488-512	25	53	48	113
	Zcur-R1	AGCCGGGTCGAAGAAAGAGGTG	580-601	22	60	59	

การผลิตโปรตีนและแอนติบอดีที่จำเพาะ ต่อ immunodominant membrane protein (Imp) ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย

Imp Protein and Antibody Production against Phytoplasma causing Sugarcane White Leaf Diseases in Bacterial Cell System

กาญจนา วาระวิชนี แสนชัย คำหล้า
กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ปี 2562 ได้โคลนนิ่งแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมของชิ้น *imp gene/6xHisTag* สำหรับใช้ทดสอบขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรียเพื่อผลิตแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อ *imp gene* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ในปี 2563 ต่อไป

คำหลัก : ไฟโตพลาสมา, โรคใบขาวอ้อย, sugarcane white leaf, Immunodominant membrane protein genes (IDPs), *imp gene*

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-12-62

คำนำ

Immunodominant membrane protein genes (IDPs) เป็นกลุ่มยีนอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงสามารถนำมาพัฒนางานวิจัยด้านการตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาได้ จากรายงานพบว่าสามารถตรวจพบกลุ่มยีน IDPs ได้ง่ายภายใน cytoplasm ของพืชที่ถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย (Barbara *et al.*, 2002; Konnerth *et al.*, 2016) ซึ่งกลุ่มยีน IDPs หลังแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้วพบอยู่ 3 ชนิด คือ (1) immunodominant membrane protein (Imp) (Morton *et al.*, 2003) ; (2) immunodominant membrane protein A (IcpA) (Blomquist *et al.*, 2001) ; (3) antigenic membrane protein (Amp) (Kakizawa *et al.*, 2009) รายงานพบเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม 16Sr-II เป็นสาเหตุโรคพุ่มแจ้มะนาว (lime withes' broom, LWB) ได้ทดสอบนำ *imp* gene มาผลิต Imp recombinant protein ในระบบเซลล์แบคทีเรียได้แอนติเจนบริสุทธิ์ใช้ผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลองเมื่อนำมาตรวจด้วยเทคนิค western blot พบว่าจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้มะนาว (Siampour *et al.*, 2012) และจากรายงานโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ถูกผลิตจาก *imp* gene และ expression ในระบบแบคทีเรียสามารถนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้มะนาวด้วยเทคนิค DAS-ELISA และ DIBA (dot immunosorbent assay) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Shahriyari *et al.*, 2011) (Shahriyari *et al.*, 2013) และจากรายงานในเซลล์พืชที่ถูกเชื้อไฟโตพลาสมา Rice yellow dwarf group เข้าทำลายสามารถตรวจพบการสะสม Imp protein ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตำแหน่งการสะสมบ่งบอกถึงลักษณะความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดของโรคพืชกับเชื้อไฟโตพลาสมา (Kakizawa *et al.*, 2009) และที่สำคัญอีกหนึ่งอย่าง Sugarcane white leaf จัดอยู่ในกลุ่ม 16Sr-XI และอยู่ใน Poaceae (หรือ Gramineae) เช่นเดียวกับกับ Rice yellow dwarf (Seemüller *et al.*, 1998) ดังนั้น ถ้าสามารถทำการผลิตโปรตีนจาก *imp* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรียได้ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ดีสำหรับเตรียมแอนติเจนให้บริสุทธิ์ซึ่งอาจแก้ปัญหาเรื่องการปะปนของโปรตีนพืชก่อนนำไปใช้ในกระบวนการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลองเพื่อนำมาใช้ตรวจสอบหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวโดยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยาในรูปแบบของเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ได้แม่นยำยิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค และตัวอย่างพืชปกติ
2. อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ ได้แก่
 - เครื่องชั่งละเอียด (precision balance) 2 และ 4 ตำแหน่ง
 - ตู้แช่แข็ง -20, -40 องศาเซลเซียส (freezer)
 - ตู้ดูดควัน / ตู้ดูดไอสารเคมี (Fume Hood)
 - อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
 - เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
 - เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD)
 - เครื่อง Gel electrophoresis
 - เครื่องวิเคราะห์เจลและบันทึกภาพ (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)
3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
 - โกร่งบดตัวอย่าง (mortars and pestles)
 - หลอดไมโครทิวบ์ (Microtube) ขนาด 0.5, 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
 - ไมโครปิเปตต์ทิวบ์ (Micropipette tip) ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่
 - ชุดสกัดเจลและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPreP GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN)
 - ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป FavorPreP Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN)
 - SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNAPolymerase (Invitrogen)
 - ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp, 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)
 - โปรตีนมาตรฐาน BLUltra Prestained Protein Ladder (BIO-HELIX, Cat#1BHC-PM001-0500)
 - Agarose gel (SeaKem®)
 - Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Gels, 1.0 mm, 10 well (Invitrogen)
 - สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin, laboratory grade)
 - ชุดไพรเมอร์ (Primer set)
 - พลาสมิดพาหะ pBAD/His A, B, and C vector (Invitrogen)
 - competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ Top 10) (Invitrogen)
 - ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen)

วิธีการ

1. ออกแบบไพรเมอร์ให้มีบริเวณจดจำของ restriction enzyme site

ออกแบบไพรเมอร์โดยเพิ่มบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบ double digest restriction enzyme (adapter) ที่บริเวณ 5' และบริเวณ 3' ของคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ imp gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาและเพิ่มตำแหน่ง stop codon (TAA) บริเวณ 3' เพื่อใช้ประกอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ imp gene-adapter ด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000TM Thermal Cycler, BIO-RAD)

2. การสังเคราะห์ imp gene-adapter เชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการสังเคราะห์ imp gene-adapter เชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยเทคนิค PCR ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH₂O) จำนวน 21 ไมโครลิตร DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific™) จำนวน 25 ไมโครลิตร (0.1 unit/μl) ไพรเมอร์ forward- PstI และ reverse-EcoRI อย่างละ 1 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบจำนวน 2 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาที่เตรียมเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000TM Thermal Cycler, BIO-RAD) ตั้งโปรแกรม ดังนี้ ขั้นที่ 1: Pre-denature 94°C นาน 5 นาที ขั้นที่ 2: denature 94°C นาน 30 วินาที ขั้นที่ 3: annealing 55°C นาน 30 วินาที ขั้นที่ 4: Extension 72°C นาน 1 นาที (วนซ้ำขั้นที่ 2 – 4 จำนวน 30 รอบ) ขั้นที่ 5: Post-extension 68°C นาน 10 นาที และขั้นที่ 6: Hold ที่ 15°C และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder แสดงผลและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

3. ตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและโคลนยีนเข้า Expression vector

นำชิ้นยีน imp gene-adapter และพลาสมิดพาหะ pBad/HisA Expression vector ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ PstI และ EcoRI แบบ Double digestion (FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) ปฏิกิริยารวม 20 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา

- | | |
|--|--------------------|
| 1. น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH ₂ O) | จำนวน 15 ไมโครลิตร |
| 2. 10X FastDigest™ Green Buffer | จำนวน 2 ไมโครลิตร |
| 3. ดีเอ็นเอเป้าหมาย (up to 1 μg) | จำนวน 2 ไมโครลิตร |
| 4. FastDigest enzyme (PstI) | จำนวน 1 ไมโครลิตร |
| 5. FastDigest enzyme (EcoRI) | จำนวน 1 ไมโครลิตร |

ผสมส่วนประกอบปฏิกิริยาให้เข้ากันดี แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) นาน 5 นาที และตรวจสอบผลของปฏิกิริยา Double digestion ด้วยเทคนิค gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder แสดงผลและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

4. การโคลนยีน digested imp gene-adapter กับ digested pBad/HisA Expression vector

สกัดชิ้นยีน digested imp gene-adapter ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดเจลและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPreP GEL/PCR Purification Mini Kit (ตามคู่มือแนะนำ, FAVORGEN) นำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ digested pBad/HisA Expression vector ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase(Promega)

ปฏิกิริยารวม 10 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบปฏิกิริยา

- | | |
|--|-------------------|
| 1. น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH ₂ O) | จำนวน 5 ไมโครลิตร |
| 2. 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase | จำนวน 2 ไมโครลิตร |
| 3. digested imp gene-adapter (8.3 ng) | จำนวน 1 ไมโครลิตร |
| 4. digested pBad/HisA Expression vector (50 ng) | จำนวน 1 ไมโครลิตร |
| 5. T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ μ l) | จำนวน 1 ไมโครลิตร |

หมายเหตุ สูตรคำนวณความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาอัตรา 1:1 ของ insert : vector ดังนี้

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert:vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

ผสมส่วนประกอบปฏิกิริยาให้เข้ากันดี แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่คอมพีเท็นเซลล์ (competent cell) แบบที่เรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) และตรวจสอบโคลนแบบที่เรียที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR โดยคูไพรเมอร์ pBAD-F/pBAD-R (ตารางที่ 1) และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder แสดงผลและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

เวลาและสถานที่

- | | |
|----------|---|
| ระยะเวลา | ตุลาคม 2561-กันยายน 2564 |
| สถานที่ | ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร |


ผลการทดลองและวิจารณ์

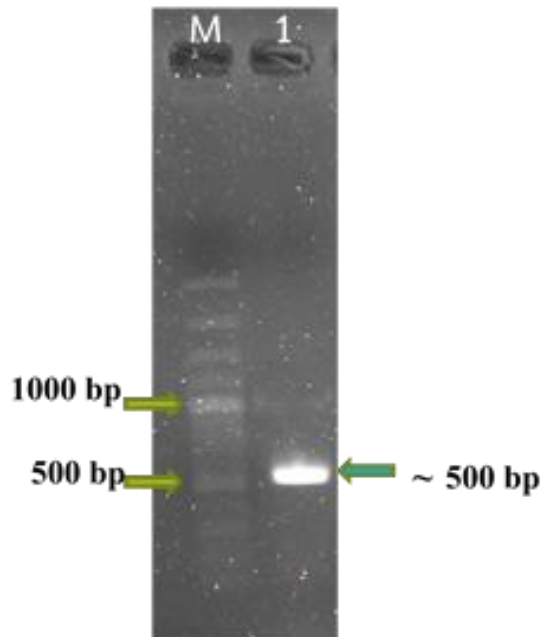
ได้ออกแบบไพรเมอร์ใหม่จำนวน 1 คู่ ที่มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (double digest restriction enzyme) บริเวณ 5' และ 3' คือ PstI (5'-CTGCA□G-3' 3'-G□ACGTC -5') และ EcoRI (5'-G□AATTC-3' 3'-CTTAA□G-5') ตามลำดับ และเพิ่มตำแหน่ง ATG (start codon) บริเวณ 5' และ TAA (stop codon) บริเวณ 3' ของคู่ไพรเมอร์ และนำคู่ไพรเมอร์ IMP3-F (PstI) และ IMP3-R (EcoRI) มาสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอ *imp* gene PstI/EcoRI (*imp* gene adapter) ที่ขนาดประมาณ 500 bp (ภาพที่ 1) เมื่อทำการ Double digest gene ด้วย PstI restriction enzyme และ EcoRI restriction enzyme ทั้งส่วน *imp* gene-adapter และ pBad/HisA Expression vector (Invitrogen) แล้วเชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase ถ่ายดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 (competent cell) ด้วยวิธีการ heat shock transformation เมื่อคัดเลือกด้วยเทคนิค colony PCR โดยคู่ไพรเมอร์ pBAD-F/pBAD-R พบว่า โคลนีแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมของชิ้น *imp* gene/6xHisTag แสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 800 bp เมื่อเทียบกับโคลนีแบคทีเรียปกติที่ได้รับเฉพาะพลาสมิด Expression vector จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 300 bp ซึ่งเป็นขนาดของลำดับเบสบางส่วนของ pBAD/His A expression vector เมื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ FIRST BASE LABORATORIES SDN BHD ประเทศมาเลเซีย พบว่า แพลลรหัสโปรตีนได้ถูกต้องตามกรอบการอ่านรหัส (Frameshift)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ในปี 2562 ได้โคลนีแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมของชิ้น *imp* gene/6xHisTag แสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ ~ 800 เบส และแพลลรหัสโปรตีนได้ถูกต้องตามกรอบการอ่านรหัส (Frameshift) สามารถนำไปทดสอบการสังเคราะห์โปรตีนสายผสมในระบบเซลล์แบคทีเรียเพื่อผลิตแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้ผลิตโพลีคอนอลแอนติบอดีต่อ *imp* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ในปี 2563 ต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสคู่ไพร์เมอร์ pBAD-F/pBAD-R

Primer Name	Primer Sequences 5'  3'	bp	Tm °C
pBAD forward primer	5' ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC 3'	20	50
pBAD reverse primer	5'GAT TTA ATC TGT ATC AGG 3'	18	



ภาพที่ 1 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของ *imp* gene PstI/EcoRI (*imp* gene adapter) ด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ไพร์เมอร์ IMP3-F (PstI)/IMP3-R (EcoRI)

M = 100 bps DNA Ladder (fermentas®)

1 = แสดงแถบดีเอ็นเอ *imp* gene PstI/EcoRI (*imp* gene-adapter) ที่ขนาดประมาณ 500 bp

เอกสารอ้างอิง

- Barbara, D. J., Mortor, A., Clark, M. F., and Davies, D. L. 2002. Immunodominant membrane proteins from two phytoplasma in the aster yellows clade (chlorante aster yellow and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology*. 148 : 157-167.
- Blomquist, C. L., Barbara, D. J., Davies, D. L., Clark, M. F., and Kirkpatrick, B. C. 2001. An immunodominant membrane protein gene from the Western X- disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology*. 147 : 571-580.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Ishii, Y., Hosh, A., Maejima. K., Jung H.-Y., Yamaji, Y., and Namba, S. 2009. Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiol Lett*. 293 : 92-101.
- Konnerth, A., Krczal, G., and Boonrod, K. 2016. Immunodominant membrane proteins of phytoplasmas. *Microbiology*. 162 : 1267–1273.
- Morton, A., Davies, D. L., Blomquist, C. L., and Barbara D. J. 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Microbiology*. 4(2) : 109–114.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 545 p.
- Siampour, M., Izadpanah, K., Galetto, L., Salehi, M. and Marzachi, C. 2012. Molecular characterization, phylogenetic, comparison and serological relationship of the Imp protein of several ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’ strain. *Plant Pathology*. 1-8.
- Seemuller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A. and Goschl, M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol*. 80 : 224-225.
- Shahriyari, F., Safarnejad, M. R., Shamsbkhsh, M. and Ataiee S. 2011. Use of a recombinant protein for development of a DAS-ELISA serological kit for sensitive detection of witches’ broom disease of lime. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S43-S44, ISSN 1721-8861.
- Shahriyari, F., Shams-Bakhsh, M., Safarnejad, M.R., Safaie, N., and Kachoeie, S.A. 2013. Preparation of Antibody Against Immunodominant Membrane Protein (IMP) of *Candidatus Phytoplasma*. *Iran J Biotech*. 11(1).

การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่ติดมากับ
เมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR

Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Seeds
Using Real-time PCR technique

รุ่งนภา ทองเครื่อง ณิชฎิมา โฆษิตเจริญกุล
บุรณี พัววงศ์แพทย์ ทิพวรรณ กันหาญาติ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

นำเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์
จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ของกรมวิชาการเกษตร แยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ และนำไปตรวจสอบ
ด้วยเทคนิค 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'-GTTTTGCGTGTAGCCCTTGC-3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่
จำเพาะต่อ *Brassica* spp. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ ITS ผลการตรวจด้วยคู่ไพรเมอร์
DLH120/DLH125 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 619 คู่เบส และผลการตรวจด้วยคู่ไพร
เมอร์DLH109/DLH112 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 1,400 คู่เบส ทำการสืบค้นข้อมูลไพรเมอร์
สำหรับใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ด้วยเทคนิค Real-time PCR คัดเลือกไพรเมอร์และนำลำดับเบส
ของไพรเมอร์ไปส่งเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ Xcc ดังนี้ ตรวจ Xcc (*hrpF*) โดยใช้คู่ไพรเมอร์
DLH153 : GTAATTGATACCGCACTGCAA กับ DLH154 : CACCGCTCCAG CCATATT และตรวจ
Brassica spp. (ITS) ด้วยคู่ไพรเมอร์ DLH155 : CAACGGATATCT CGGCTCTC กับ DLH156 :
TTGCGTTCAAAGACTCGATG อยู่ระหว่างการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา
Real-time PCR

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-13-62

คำนำ

โรคขอบใบทองหรือเน่าดำมีสาเหตุจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* เป็นโรคที่พบได้ทั่วไปและเป็นปัญหามากกับพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งประกอบด้วย บล็อกโคลี่ (broccoli) กะหล่ำดาว (Brussels sprouts) กะหล่ำปลี (cabbage) กะหล่ำดอก (cauliflower) collards คะน่ำ (kale) กะหล่ำปม (kohlrabi) มัสตาร์ด (mustard) radish rutabaga และ turnip โรคเน่าดำทำให้ผลผลิตเสียหายค่อนข้างมาก โดยเฉพาะในช่วงที่สภาวะแวดล้อมเหมาะสม พืชจะเริ่มแสดงอาการโรคให้เห็นในส่วนใบ โดยใบจะเริ่มเหลืองจากขอบใบแล้วลามลึกเข้ามาในเนื้อใบจนจรดแกนกลางของใบเป็นรูปตัววี (V) เส้นใบบริเวณนี้จะมีสีน้ำตาลดำ ต่อมาจะเกิดอาการแห้งจากขอบใบ ใบเหี่ยวเฉาและหลุดจากต้น เมื่อตัดลำต้นตามขวางจะพบว่าส่วนที่เป็นท่อน้ำ (xylem) เน่ามีสีดำ ในระยะกล้าที่งอกใหม่ๆ จะเกิดอาการเน่าดำที่ขอบใบเลี้ยง ต่อมาใบเลี้ยงจะเหี่ยวและต้นกล้าตาย นอกจากอาการดังกล่าวแล้ว บางครั้งพบอาการแผลจุดบนใบกับพืชตระกูลกะหล่ำบางชนิด เช่น ผักคะน่ำ โดยจะเริ่มเกิดจุดแผลขนาดเล็กๆ ต่อมาจุดขนาดใหญ่ขึ้นมีสีน้ำตาล ขนาดประมาณ ๑ มิลลิเมตร และถ้าความชื้นสูงจะปรากฏลักษณะฉ่ำน้ำรอบจุดแผลสีน้ำตาล เมื่อจุดแผลเกิดใกล้ชิดกันทำให้เกิดลักษณะใหม่ ห้างตายเป็นหย่อมๆ เนื้อใบที่เป็นแผลขาดทะลุเป็นรู การแพร่ระบาดของโรคนี้ที่สำคัญและไปได้ไกลที่สุด คือการติดไปกับเมล็ดพันธุ์และแพร่ไปยังต้นกล้าอื่นในแปลงเพาะกล้า ส่วนการเกิดโรคในแปลงเกิดจากต้นกล้าที่ได้รับเชื้อในแปลงเพาะ หรือจากเชื้อที่ติดค้างอยู่ในเศษซากพืชในดิน หรือในพืชอาศัยที่ติดค้างอยู่ในแปลง (volunteer plants) แล้วแพร่กระจายโดยน้ำฝน หรือน้ำที่ใช้รดต้นพืช เชื้อเข้าสู่พืชทางระบบรากทางปากใบ (stomata) ต่อมาคายน้ำ (hydathodes) หรือทางแผลแล้วกระจายไปสู่ส่วนต่างๆ ทาง xylem เชื้อแพร่กระจายจากต้นเป็นโรคไปยังต้นข้างเคียงโดยไปกับลม ฝน น้ำ ชลประทาน เป็นต้น การระบาดของโรคจะเกิดได้ดีเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม และพืชเกิดบาดแผลโดยแมลงกัดกิน หรือแผลจากการเขตรกรรม

การแพร่ระบาดของโรคนี้ที่สำคัญและไปได้ไกลที่สุด คือการติดไปกับเมล็ดพันธุ์และแพร่ไปยังต้นกล้าอื่นในแปลงเพาะกล้า จากการระบาดที่พบในปัจจุบันทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรอย่างมาก (ศศิธร, 2545) Berg et. al. (2006) ได้พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของผักกาดโดยใช้เทคนิค multiplex real-time PCR พบว่าเทคนิคนี้มีความรวดเร็วใช้เวลาน้อยกว่าการตรวจด้วยเทคนิค PCR มีความเฉพาะเจาะจง และสามารถตรวจเชื้อในปริมาณต่ำได้ จากการพัฒนาเทคนิค real-time PCR ให้สามารถตรวจเชื้อจากเมล็ดได้ เป็นประโยชน์แก่บริษัทที่ผลิตเมล็ดพันธุ์มาก สามารถนำเทคนิคนี้ไปใช้ตรวจสอบเพื่อคัดเลือกเมล็ดพันธุ์และหาวิธีการควบคุมโรค รวมถึงหาวิธีการฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ดได้

เทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาจากข้อจำกัดของเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ (Quantitative)

เห็นผลได้แบบทันที (real time & on line) บนหน้าจอคอมพิวเตอร์ (Higuchi et. al., 1992) ในขณะที่เทคนิค PCR ไม่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ และการวิเคราะห์ผลต้องทำในแผ่นวุ้น ใช้เวลานานและย้อมด้วยสาร ethidium bromide ที่อันตราย (Reischl and Kochanowski, 1999) เทคนิค Real-time PCR เป็นการพัฒนานำเทคโนโลยี 2 ส่วน ได้แก่ การพัฒนาเทคโนโลยี การตรวจหาดีเอ็นเอในสารละลายโดยใช้สารเรืองแสง (Fluorescence reporters) ต่างๆ และการใช้เครื่อง thermal cycler ซึ่งเป็นเครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มารวมเป็นเครื่อง Real-time PCR โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิด การเรืองแสงของซินดีเอ็นเอ และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้น ณ เวลานั้น (Higuchi et. al., 1992) Mavrodieva et.al. (2004) พัฒนาเทคนิค real-time PCR ในการตรวจสอบโรคแคแคงเกอร์ ทุกสายพันธุ์ ที่มีความไว รวดเร็ว และวิเคราะห์ตามเวลาจริงที่เกิดขึ้นในหลอด PCR โดยสามารถ นำไปใช้เครื่อง RAPID machine ที่สามารถพกพาไปใช้ในแปลงปลูกได้ นำไปใช้ตรวจสอบ โรคแคแคงเกอร์ในแปลงปลูกโดยสามารถตรวจสอบใบส้มที่เป็นโรคเพียงจุดแผลเล็กๆ แผลเดียว โดยมีความไวในการตรวจจับความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อ *X.axonopodis* pv. citri 10 หน่วย โคโลนี/แผล และเป็นการรายงานผลครั้งแรกในการใช้วิธีนี้ไปตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. citri บนตัวอย่างแห้งโรคพืช ที่เก็บไว้ตั้งแต่ปี 1912 ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ฌ็องกูร์มา และคณะ (2556) ได้พัฒนาการตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. citri สาเหตุโรคแคแคงเกอร์ ของพืชตระกูลส้มด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ออกแบบมาจาก ยีน avirulence/pathogenicity (pthA gene) ผลการทดสอบพบว่า primer D1/D2 และ primer 2/3 มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. citri สายพันธุ์ canker A โดยสามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X axonopodis* pv. citri ที่พบในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท มีความไว (sensitivity) ในการตรวจเชื้อที่ ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA เท่ากับ 5 พิโคกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจ ได้คือ 81 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ผลการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. citri จากตัวอย่างโรคแคแคงเกอร์ที่เก็บมาจากแปลงปลูกส้มโอที่ 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) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ Xcc สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA (nutrient agar) ใช้ลูปฆ่าเชื้อและเชื้อแบคทีเรียให้เต็มลูป 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 ทิ้งส่วนใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องปั่น (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 จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนเพื่อเก็บตะกอน 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'-GTTTTGCGTGTAGCCCTTGC-3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Brassica* spp. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ ITS ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (19 ul reaction mixture + 1 ul genomic DNA) โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส นำ PCR product ที่ได้ไปรันเจลอีแอกโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที

4. การเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา real-time PCR

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR ได้ผลดี มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย Xcc คัดเลือกไพรเมอร์จากนั้นนำลำดับเบสของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดโดยวิธี Real-time PCR โดย Berg et al. (2006) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *X. campestris* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hrpF* และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *X. campestris* from brassica จากส่วนของยีน ITS นำไพรเมอร์มาทดสอบทำปฏิกิริยา real-time PCR

Xcc (*hrpF*)

DLH153 GTAATTGATACCGCACTGCAA

DLH154 CACCGCTCCAGCCATATT

Brassica spp. (ITS)

DLH155 CAACGGATATCTCGGCTCTC

DLH156 TTGCGTTCAAAGACTCGATG

เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น ตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2564
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานбакเตรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

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'-GTTTTGCGTGATGCCCTTGC-3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Brassica* spp. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน 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 ที่ได้ไปรันเจล อิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ผลการตรวจด้วยคู่มือ DLH120/DLH125 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 619 คู่เบส (ภาพที่ 1) และผลการตรวจด้วยคู่มือ DLH109/DLH112 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 1,400 คู่เบส (ภาพที่ 2)

4. การเลือกคู่มือที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

สืบค้นข้อมูลคู่มือที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR ได้ผลดี มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย Xcc คัดเลือกคู่มือและนำลำดับเบสของคู่มือไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ Xcc ดังนี้

Xcc (*hrpF*)

DLH153 GTAATTGATACCGCACTGCAA
DLH154 CACCGCTCCAGCCATATT

Brassica spp. (ITS)

DLH155 CAACGGATATCTCGGCTCTC
DLH156 TTGCGTTCAAAGACTCGATG

การทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ทำในภาตพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler®480 Multiwell Plate 96, Roche) ใช้ปริมาณรวมของปฏิกิริยา จำนวน 20 ul ประกอบไปด้วย 1X LightCycler 480 SYBR 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) ความเข้มข้นของคู่มือ 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 โดยทดสอบปฏิกิริยาตามโปรแกรมดังนี้

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
		63	00:00:20	2.20	none
		72	00:00:15	4.40	none
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

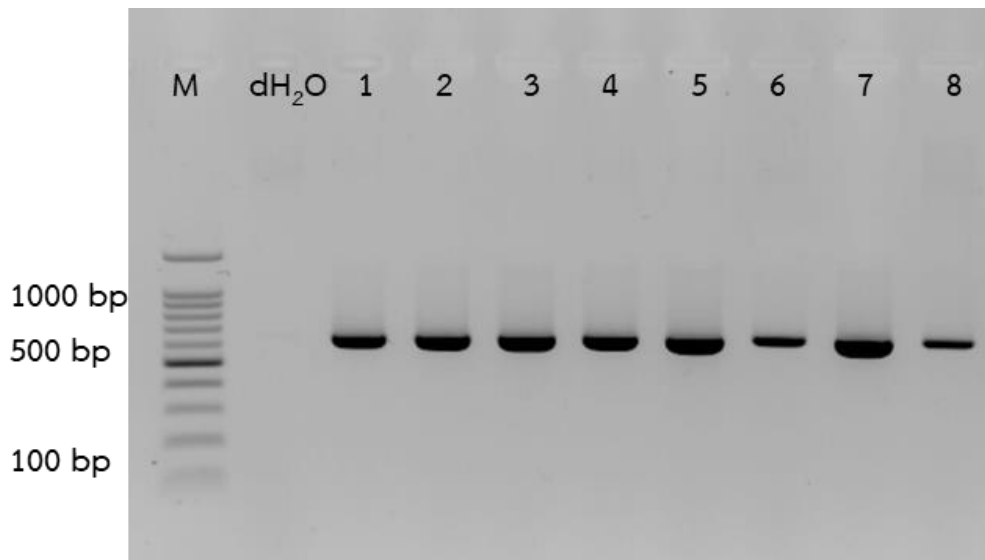
ซึ่งจากผลการทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ของคู่ไพรเมอร์ DLH153 : GTAATTGATACC GCACTGCAA, DLH154 : CACCGCTCCAGCCATATT, P7: ATGCCGG CGAGTTTCCACG พบว่าต้องปรับโปรแกรมเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

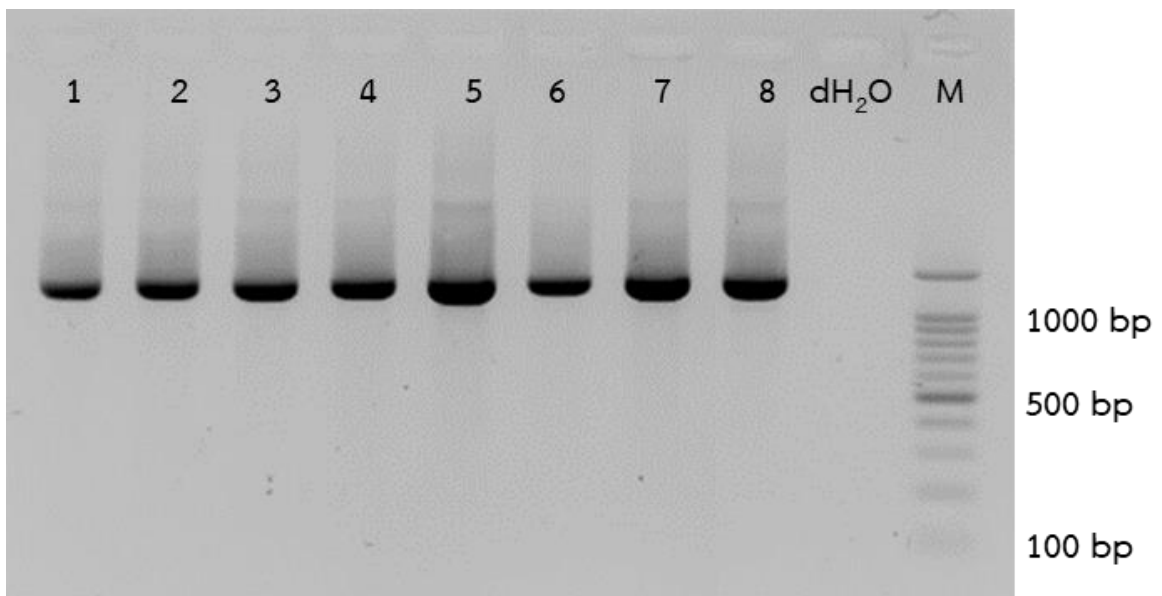
นำเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ของกรมวิชาการเกษตร แยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ และนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ผลการตรวจด้วยคู่ไพรเมอร์ DLH120/DLH125 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 619 คู่เบส และผลการตรวจด้วยคู่ไพรเมอร์ DLH109/DLH112 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 1,400 คู่เบส ทำการสืบค้นข้อมูลไพรเมอร์สำหรับใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ด้วยเทคนิค Real-time PCR คัดเลือกไพรเมอร์และนำลำดับเบสของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ Xcc อยู่ระหว่างการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

เอกสารอ้างอิง

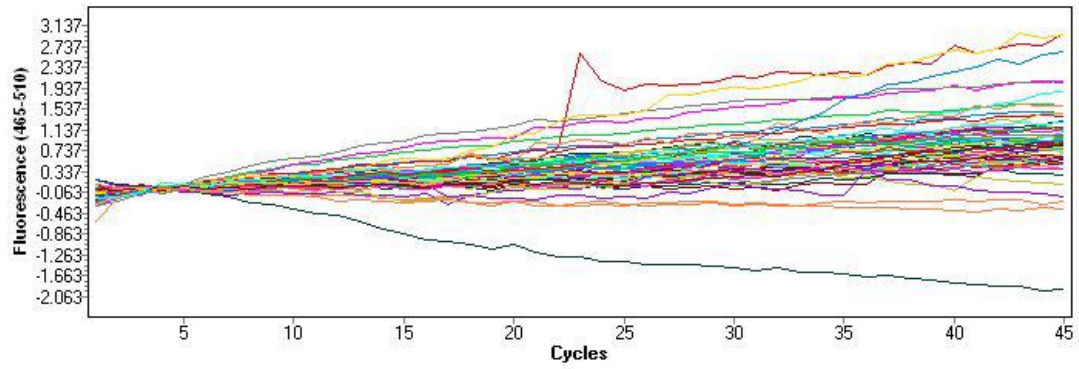
- ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2545. โรคของผักและการควบคุมโรค. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. จตุจักรกรุงเทพฯ. 173 น.
- ณัฐธิมา โฆษิตเจริญกุล ทิพวรรณ กันหาญาติ บุรณี พัวพงษ์แพทย์ และรุ่งนภา ทองเครื่อง. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real-time PCR. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2556 เล่มที่ 4 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 2863 – 2879.
- 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 Molecuar Medicine : Quantitative PCR Protocol. Totowa Press, New Jersey. 3-30.



ภาพที่ 1 ผลิตรหัสจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ DLH120/DLH125 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ส่วน *hrpF* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 619 คู่เบส



ภาพที่ 2 ผลิตรหัสจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ DLH109/DLH112 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ส่วน *Brassica* spp. ITS ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.4 kb คู่เบส



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบคู่ไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hrpF* ด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR

การตรวจไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* ด้วยเทคนิคแลมปี
 Detection of Root-knot Nematode *Meloidogyne enterolobii* using Loop
 Mediated Isothermal Amplification PCR Technique

ไตรเดช ข่ายทอง ธิติยา สารพัฒน์ ทิพวรรณ กันหาญาติ
 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การดำเนินงานในปี 2561 เก็บตัวอย่างดินจากสวนฝรั่ง จ. นครปฐม และสมุทรสาคร รวม 24 ตัวอย่าง แยกไล่เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและตรวจพบไล่เดือนฝอยรากปม 16 ตัวอย่าง เลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ประชากรที่บริสุทธิ์ 9 ตัวอย่าง ตรวจสอบชนิดของไล่เดือนฝอยรากปมทางสัณฐานวิทยา โดยใช้ลักษณะ perineal pattern ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ลักษณะของตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สอง และตรวจยืนยันด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ Me-F/Me-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 236 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์จำเพาะ MK7-F/MK7-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 520 คู่เบส ซึ่งยืนยันว่าเป็นไล่เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii*

คำหลัก: ไล่เดือนฝอยศัตรูพืช การตรวจวินิจฉัย โรครากปมฝรั่ง ศัตรูพืชอุบัติใหม่

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-14-62

คำนำ

เทคนิคแลมป (Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)) พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ *Bst* DNA polymerase ที่อุณหภูมิคงที่ 60 ถึง 65 องศาเซลเซียส และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบอย่างจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการถึง 4 เส้น ประกอบด้วย 6 ตำแหน่ง ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการเพิ่มปริมาณนั้น ทำให้วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง (Notomi *et al.*, 2000) วิธีนี้จะใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาสั้นมากไม่เกิน 1 ชั่วโมง โดยตรวจผลการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอได้จากความขุ่น (turbidity) ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการจับกันของ pyrophosphate ions กับ magnesium ions เกิดเป็นตะกอน magnesium pyrophosphate สีขาวขึ้นในสารละลายซึ่งสังเกตได้ด้วยตาเปล่า โดยเทคนิคแลมปนี้ใช้เพียงตู้บ่มเชื้อที่ตั้งอุณหภูมิ 60 ถึง 65 องศาเซลเซียส ไม่ต้องการผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ ขั้นตอนในการทดสอบไม่ยุ่งยาก และให้ผลการทดสอบภายในเวลา 1-2 ชั่วโมง เทคนิคแลมปพีซีอาร์มีการนำไปผลิตเป็นชุด kits ในเชิงการค้าเพื่อตรวจสอบเชื้อหลายชนิด เช่น ไวรัส แบคทีเรีย รา และปรสิตที่ก่อโรคในมนุษย์ (Moriand Notomi, 2009) สำหรับการนำมาใช้ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีรายงานการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่สำคัญบางชนิด เช่น ไส้เดือนฝอยศัตรูต้นสน (pinewood nematode) *Bursaphelenchus xylophilus* (Kikuchi *et al.*, 2009) ไส้เดือนฝอยรากโพรง *Radopholus similis* (Peng *et al.*, 2012) ไส้เดือนฝอยศัตรูส้ม *Tylenchulus semipenetrans* (Lin *et al.*, 2016) ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. (Niu *et al.*, 2011), ไส้เดือนฝอยรากปม *M. hapla* (Peng *et al.*, 2017) สำหรับไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* นั้น Niu *et al.* (2012) ได้ประเมินประสิทธิภาพของเทคนิคแลมปในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ที่แยกจากตัวอย่างรากและตัวอย่างดิน โดยตรวจบริเวณของ 5s rDNA-IGS2 พบว่า มีความจำเพาะต่อประชากรของ *M. enterolobii* สามารถตรวจติดตามได้ที่ปริมาณดีเอ็นเอต่ำสุด 10 fg และ He *et al.* (2013) ใช้เทคนิคแลมป ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอย *M. enterolobii* จากตัวอย่างพืช โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS ระหว่าง *M. enterolobii* และไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ

ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. มีประมาณ 100 ชนิด (species) (Hunt and Handoo, 2009) แต่ชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมีประมาณ 10 ชนิด และมี 4 ชนิด คือ *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. hapla* ไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* (syn. *M. mayaguensis*) (Karssen *et al.*, 2012) พบครั้งแรกที่มณฑลไห่หนาน ประเทศจีน ต่อมา มีรายงานการพบในหลายประเทศในทวีปแอฟริกา เอเชีย อเมริกา และยุโรป ในประเทศไทยมีรายงานการพบ *M. enterolobii* ในสวนฝรั่ง จ. นครปฐม ในปี พ.ศ. 2555 ซึ่งตรวจยืนยันโดยใช้ esterase phenotype และ PCR ในยีนส่วนไมโทคอนเดรีย (Jindapunnapat, 2012) ไส้เดือนฝอยรากปมชนิดนี้มีความสำคัญเนื่องจากสามารถทำความเสียหายรุนแรงในพืชหลายชนิด และที่สำคัญคือสามารถเข้าทำลายพืชหลายชนิดที่มียืนต้นทานไส้เดือนฝอยรากปม (Castagnone-Sereno, 2012; Kiewnick *et al.*, 2009) ในปี ค.ศ. 2010 *M. enterolobii* อยู่ในบัญชีรายชื่อศัตรูพืชประเภท A2 ของ European Plant Protection Organization ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่พบในสหภาพยุโรป แต่มีการควบคุมเช่นเดียวกับศัตรูพืชกักกัน (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

อุปกรณ์และวิธีการ

- สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช สารฆ่าแมลง ปุ๋ยเคมี กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ สไลด์ ถ้วยนับตัวอย่าง อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยา เช่น เครื่องปั่นเหวี่ยง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เครื่องอิเล็กทรอนิกส์

- แบบและวิธีการทดลอง

ไม่วางแผนการทดลอง

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างและจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้สัณฐานวิทยา

การเก็บตัวอย่างดิน และรากพืช

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยรากปม โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตร โดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดิน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว คลุกเคล้าเข้าด้วยกันให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ และชนิดพืชปลูก รวมทั้งเก็บตัวอย่างราก หรือส่วนของพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม

การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและพืช

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน 250 กรัมโดยวิธีการกวนตัวอย่างดินในน้ำปริมาตร 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงในลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แยกไส้เดือนฝอยรากปมจากพืชโดยการคืบกลุ่มไข่จากรากหรือส่วนของพืชโดยตรง

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมในกระถาง หลังจากนั้น 45 วัน ล้างรากมะเขือเทศด้วยน้ำสะอาด เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคืบกลุ่มไข่ 1 กลุ่มจากรากด้วยปากคืบ นำไปแช่ในน้ำสะอาดในถ้วยนับตัวอย่าง ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้

ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์ หากเป็นตัวอย่างรากที่มีกลุ่มไข่ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคืบกลุ่มไข่มาแช่ในน้ำกลั่น ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนระยะที่สอง แล้วนำไปเทใส่ในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบฆ่าเชื้อ

การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

ตรวจลักษณะรูปร่างส่วนกัน โดยแยกตัวเต็มวัยไส้เดือนฝอยรากปมเพศเมียจากรากมะเขือเทศ แช่ใน lactic acid 45% นาน 30 นาที ตัดส่วนของผนังลำตัว (cuticle) บริเวณส่วนกันวางบนสไลด์ในหยดกลีเซอรอล ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง เตรียมไส้เดือนฝอยเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐาน โดยคงสภาพไส้เดือนฝอยตามวิธีการของ Seinhorst (1959) ตรวจสอบรูปร่างลักษณะทางสัณฐาน วัดขนาดส่วนต่างๆ เปรียบเทียบกับลักษณะของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ในเอกสารวิชาการ (Yang and Eisenback, 1983; Rammah and Hirschmann, 1988) โดยตรวจสอบลักษณะต่างๆ เช่น ลักษณะส่วนหัวของตัวเต็มวัยเพศเมีย ส่วน hyaline region บริเวณหางของตัวอ่อนระยะที่สอง (EPPO, 2011)

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง และตรวจสอบชนิดด้วยเทคนิค PCR การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เชื้อไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช้ส่วนปลายของ pipette tip ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 6 นาที ถ้าเตาไมโครเวฟเป็นชนิด 750 วัตต์ (สามารถปรับเวลาตามกำลังไฟของเตาไมโครเวฟให้ได้ 4,500 วัตต์-นาที ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม)

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 โดยใส่ 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 ,และ อุณหภูมิ 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 และหยุดปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจด้วยเจลอีแอกโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที

3. การทดสอบเทคนิคแลมป์พีซีอาร์

การทดสอบสถานะที่เหมาะสม

ทำปฏิกิริยาแลมป์ตามวิธีการของ Notomi *et al.* (2000) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Niu *et al.* (2012) ซึ่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 5S rDNA-IGS2 ในปฏิกิริยาปริมาตร 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 หาสถานะที่เหมาะสมโดยทำปฏิกิริยาที่ 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 (ใช้ไพรเมอร์ MeF3/B3) โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์พีซีอาร์ โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่นๆ เช่น *Radopholus Pratylenchus Hirschmaniella Rotylenchulus Tylenchorhynchus Helicotylenchus* รวมทั้งไส้เดือนฝอยที่ไม่ใช่ศัตรูพืชชนิดต่างๆ ที่มักพบในตัวอย่างดิน ซึ่งเป็นตัวอย่างไส้เดือนฝอยจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์ เปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR ที่ใช้ universal primers สำหรับไส้เดือนฝอย เช่น VRF1/F2 และไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* เช่น SCAR marker Mk7-F/R ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคแลมป์ในการตรวจตัวอย่าง

ทดสอบการตรวจตัวอย่างปมรากพืชจากเรือนทดลอง

ปลูกเชื้อลงในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ 14 วัน โดยใช้ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ระยะที่สอง เก็บตัวอย่างปมรากพืชมาสกัดดีเอ็นเอ หลังปลูกเชื้อ 7 14 21 และ 30 วัน ครั้งละ 20 ปม โดยล้างรากให้สะอาด แช่ใน 0.52% NaClO นาน 10 นาที ล้างรากด้วยน้ำสะอาด 3 รอบ ตัดปมรากมะเขือเทศ 1 ปมใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ Extracta DNA Prep for PCR – Tissue (Quantabio) วิธีการตามเอกสารที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ โดยบดตัวอย่างปมรากพืชในหลอด microcentrifuge เติมน้ำยา extraction reagent ให้ท่วมตัวอย่าง บ่มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น เติม stabilization buffer ปริมาตรเท่ากับ extraction buffer ที่ใช้ นำตัวอย่างดีเอ็นเอไปทดสอบด้วยแลมป์พีซีอาร์ เปรียบเทียบกับ conventional PCR ใช้ปมรากพืชที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* และรากพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อเป็นกรรมวิธีควบคุม ตรวจการเข้าทำลายรากของไส้เดือนฝอยรากปมโดยการย้อมสีรากด้วย Acid Fuchsin

ทดสอบการตรวจตัวอย่างปมรากพืชจากแปลงปลูกพืช

เก็บตัวอย่างรากพืชที่มีการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่ที่มีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* เช่น จ.นครปฐม และ จ.ราชบุรี บันทึกชนิดพืช พืชทางภูมิศาสตร์ นำรากมาล้างรากให้สะอาด แช่ใน 0.52% NaClO นาน 10 นาที ล้างรากด้วยน้ำสะอาด 3 รอบ สกัดดีเอ็นเอจากรากพืชโดยตาม Hu *et al.* (2011) ซึ่งดัดแปลงจาก Stanton *et al.* (1998) นำปมรากพืช 1 ปม ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ 50 mM NaOH 45 ไมโครลิตร บดตัวอย่างแล้วบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมน้ำ 1 M Tris-HCl (pH 8.0) 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันปั่นเหวี่ยงที่ 10000 x g นาน 1 นาที ดูดส่วนใสใส่ในหลอด microcentrifuge เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทดสอบต่อไป เปรียบเทียบวิธีการตรวจวินิจฉัยโดยเทคนิคแลมพ์กับ conventional PCR

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลของปฏิกิริยาแลมพ์ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมพ์เปรียบเทียบกับ conventional PCR ผลการตรวจปมรากมะเขือเทศด้วยเทคนิคแลมพ์เปรียบเทียบกับ conventional PCR ผลการตรวจปมรากพืชจากแปลงปลูกของเกษตรกรด้วยเทคนิคแลมพ์เปรียบเทียบกับ conventional PCR

- การวิเคราะห์ผลการทดลอง
 - เปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ กัน
 - เปรียบเทียบความไวของเทคนิคแลมพ์กับ conventional PCR โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่าง ๆ
 - เปรียบเทียบผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมพ์กับ conventional PCR โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ของปฏิกิริยาที่เป็นบวก
 - เปรียบเทียบผลการตรวจปมรากพืชจากแปลงปลูกของเกษตรกรด้วยเทคนิคแลมพ์กับ conventional PCR

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2563

กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

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 แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 16 ตัวอย่าง ปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ ในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ครบวงจรชีวิตและสร้างกลุ่มไข่ เพื่อใช้เตรียมประชากรไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์โดยการเลี้ยงจาก 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 (ตารางที่ 1)

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้ จาก perineal pattern ของตัวเต็มวัยเพศเมีย ลักษณะของตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สอง เปรียบเทียบกับ OEPP/EPPO Bulletin (2016) 46 (2), 190-201 พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* (ภาพที่ 2)

ตัวเต็มวัยเพศเมีย

Perineal pattern มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ส่วน dorsal arch ค่อนข้างสูงส่วนใหญ่ มีลักษณะโค้งมน

ตัวเต็มวัยเพศผู้

มี labial disk ลักษณะกลมมีขนาดใหญ่ซึ่งรวมเข้ากับ medial lips กลายเป็น dorsoventrally elongate lip region ส่วน labial disk นูนขึ้นเล็กน้อย 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 หางแหลม ปลายหางมน ส่วน hyaline tail terminus ชัดเจน

การตรวจสอบด้วยวิธี PCR

ตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปมด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *M. enterolobii* โดยคู่ไพรเมอร์ Me-F/Me-R ได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาขนาด 236 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ MK7-F/MK7-R ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาขนาด 520 คู่เบส ซึ่งตรงกับ *M. enterolobii* (ภาพที่ 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างดินจากสวนฝรั่ง จ. นครปฐม และสมุทรสาคร รวม 24 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 16 ตัวอย่าง เลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ประชากรที่บริสุทธิ์ 9 ตัวอย่าง ตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปมทางสัณฐานวิทยาและวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ พบว่าเป็น *M. enterolobii*

เอกสารอ้างอิง

- ไตรเดช ข่ายทอง ธิตติยา สารพัฒน์ มนตรี เอี่ยมวิม้งสา และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2558. *Pasteuria penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม. หน้า 193-200. ใน: การประชุมวิชาการอรัญญาพิชแห่งชาติ ครั้งที่ 12 20-22 ตุลาคม 2558 ณ โรงแรมดุสิต ไฮส์แลนด์ รีสอร์ท จังหวัดเชียงราย
- Adiko, A. and S.R. Gowen. 1999. Effects of Spores of *Pasteuria penetrans* on the Motility of Second- stage Juveniles of *Meloidogyne incognita*. Russian Journal of Nematology 7:5-6.

- Ali D.D., P.M. Ali, B.A. Ghaffar and M.S. Ahmed. 2005. The Effect of Different Initial Densities of Nematode (*Meloidogyne javanica*) on the Build-up of *Pasteuria penetrans* Population. Journal of Zhejiang University Science 6B:113-118.
- Alves, F.R., L.G. de Freitas, P.R.P. Martinelli, S. Ferras and L.A. Maffia. 2008. Influence of Inoculum Densities of *Meloidogyne* spp. and Host Plant Age on the Mass Production of *Pasteuria penetrans*. Nematologia Brasileira 32: 13-19.
- Cetintas, R. and D. W. Dickson. 2004. Persistence and Suppressiveness of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne arenaria* Race 1. Journal of Nematology 36: 540-549.
- Chaudhary K. K. and R. K. Kaul. 2013. Efficacy of *Pasteuria penetrans* and Various Oil Seed Cakes in Management of *Meloidogyne incognita* in Chilli pepper (*Capsicum annum* L.). Journal of Agricultural Science and Technology 15: 617-626.
- Chen, Z.X., D.W. Dickson, R. McSorley, D.J. Mitchell, and T.E. Hewlett. 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by Soil Application of Endospores of *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology 28:159-168.
- Chen, Z.X. and D.W. Dickson. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology, and Biological Control Potential. Journal of Nematology 30:313-340.
- Daudi, A.T. and S.R. Gowen. 1992. The Potential for Managing Root-knot Nematodes by Use of *Pasteuria penetrans* and Oxamyl Nematologia Mediterranea 20: 241-244.
- Frans, A. A., M. De Leij, K. G. Davies and B. R. Kerry. 1992. The Use of *Verticillium chlamydosporium* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr Alone and in Combination to Control Plant Parasitic Root-knot Nematodes: *Meloidogyne* spp. Fundamental and Applied Nematology 15; 235-242.
- Gowen, S, K.G. Davies and B. Pembroke. 2008. Potential Use of *Pasteuria* spp. in the Management of Plant Parasitic Nematodes. Pp. 205-219 in Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes. Ciancio, A. and K.G. Mukerji, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Hewlett, T.E. and D.W. Dickson. 1993. A Centrifugation Method for Attaching Endospores of *Pasteuria* spp. to Nematodes. Supplement to Journal of Nematology 25(4S): 785-788.
- Hussey, R. S., and K. R. Barker. 1973. A Comparison of Methods of Collecting Inocula of *Meloidogyne* spp., Including a New Technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028.

- Khaithong, T., M. Iemwimangsa, T. Sarapat, and P. Thammakijjawat. 2012. Collection of *Pasteuria penetrans* in Thailand. Page 133. In: The International Conference on Tropical and Sub-tropical Plant Diseases. Feb. 7-10, 2012. Chiang Mai, Thailand.
- Melki, K.C., I.O. Giannakou, R. Pembroke and S.R. Gowen. 1998. The cumulative build-up of *Pasteuria penetrans* spores in root-knot nematode infested soil and the effect of soil applied fungicides on its infectivity. *Fundamental and Applied Nematology* 21: 679-683.
- Oostendrop, M., D.W. Dickson and D.J. Mitchell. 1991. Population Development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 23:58-64.
- Rodrigues, A.K., L.G. Freitas, A.A. Azevedo and S. FERRAZ. 2003. Development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne* spp. Parasitizing Different Host Plants. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 267-272.
- Sano, Z. and J.T. Gaspard. 1995. Differences in Mortality and Reproduction of *Meloidogyne incognita* Infected with Varied Amounts of *Pasteuria penetrans*. *Japanese Journal of Nematology* 25:129.
- Stirling G.R. and M.F. Wachtel. 1980. Mass Production of *Bacillus penetrans* for the Biological Control of Root-knot Nematodes. *Nematologica* 26:308-312.
- Stirling, G.R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Phytopathology* 74: 55-60.
- Tzortzakakis, E. A. and S.R. Gowen. 1994. Resistance of a Population of *Meloidogyne* spp. to Parasitism by the Obligate Parasite *Pasteuria penetrans*. *Nematologica* 40:258-266.
- Tzortzakakis, E. A., A. G. D. R. Channer, S. R. Gowen and R. Ahmed. 1997. Studies on the Potential Use of *Pasteuria penetrans* as a Biocontrol Agent of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology* 46:44-55.
- Weibelzahl-Fulton, E., D.W. Dickson and E.B. Whitty. 1996. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in Field Soil. *Journal of Nematology* 28:43-49.

Table 1 Number of samples and locations

No.	Location			RKN detection	Me Morpho logical ID	Me PCR ID
	Sub District	District	Province			
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	✗	✗	✗

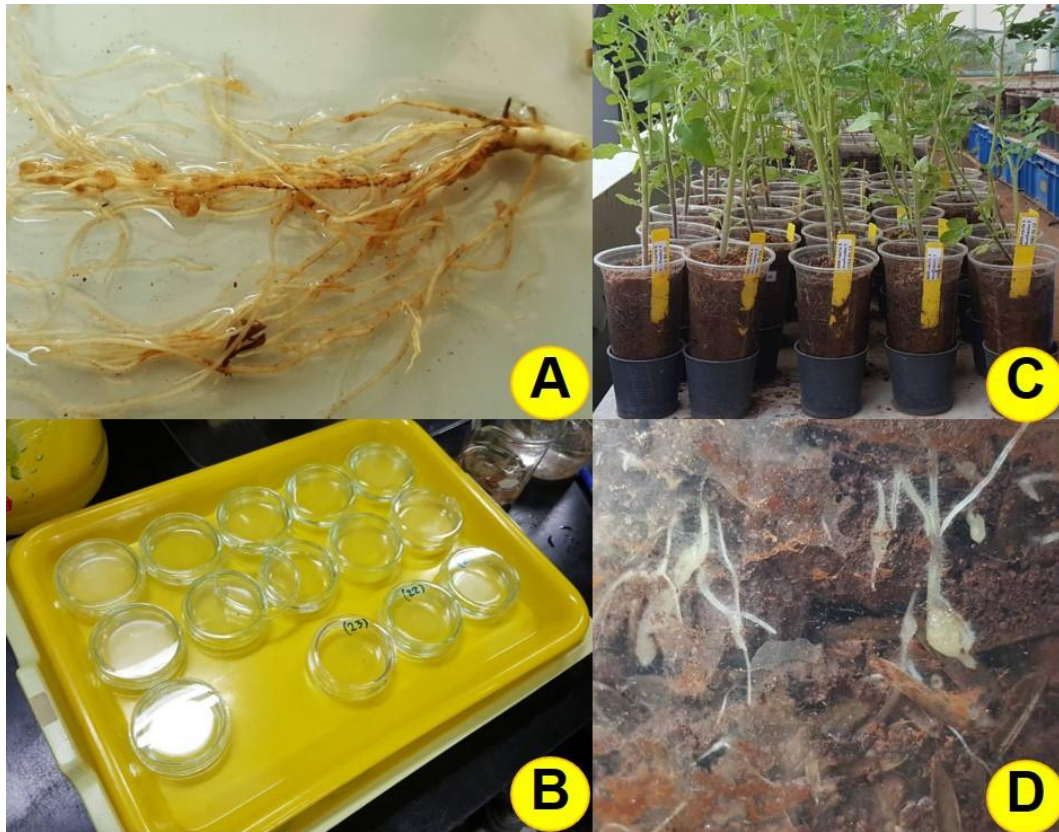


Figure 1 (A) Galled tomato root from tomato plant grown in soil samples from fields infested with root-knot nematodes. (B) Single eggmass was detached from the root and placed in sterile water (C) Hatched juveniles were inoculated into tomato plants grown in sterile soil (D) pure nematode population were obtained and used for further study

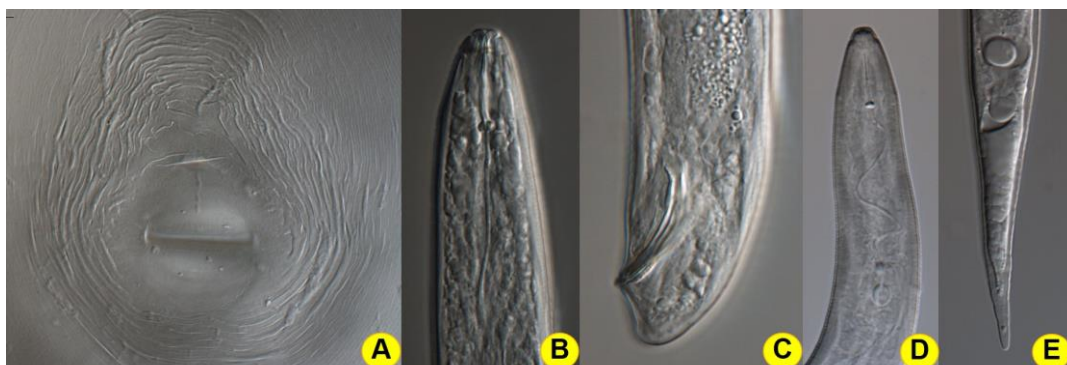


Figure 2 (A) Female perineal pattern (B,C) head and tail region of male and (D,E) head and tail of second stage juvenile of *M. enterolbii*

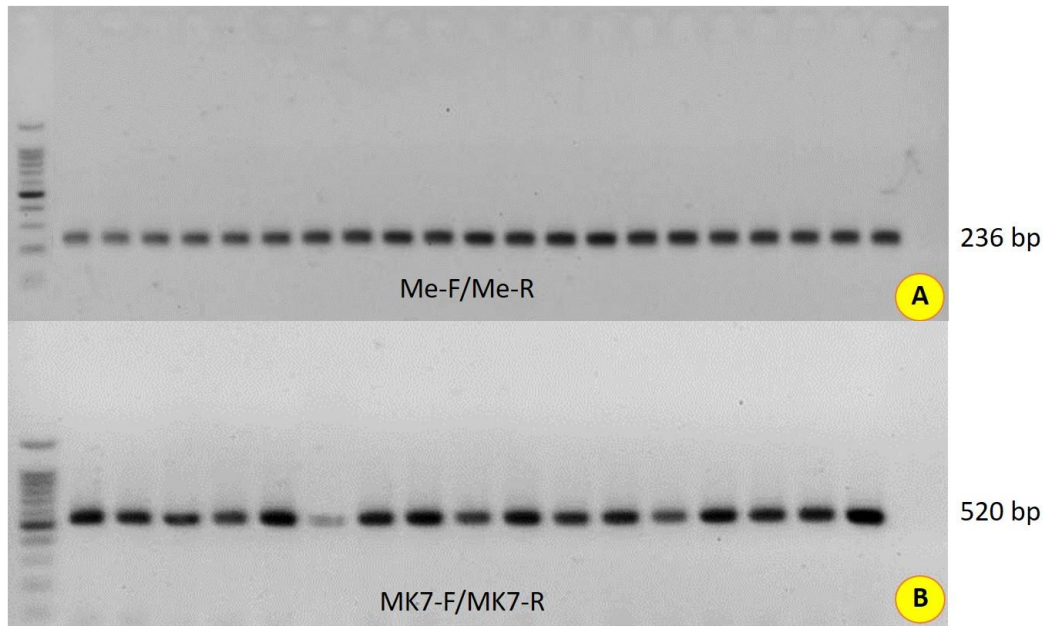


Figure 3 (A) Detection of *M. enterolobii* with Me-F/Me-R primers yielded 236 bp fragment and (B) Detection of *M. enterolobii* with MK7-F/MK7-R primers yielded 520 bp fragment.

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 บุญทบ^{1/} ณัฐจิมา โฆษิตเจริญกุล^{2/}

นพรัตน์ จันทรหอม^{3/} ชุตติกาญจน์ ใจแล^{4/}

^{1/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/}กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

^{3/}กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมวัสดุทางการเกษตร

^{4/}ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ สำนักควบคุมวัสดุทางการเกษตร

รายงานความก้าวหน้า

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความทันสมัยมากที่สุด และรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้เพิ่มเติม โดยการเก็บรวบรวมแมลงวันผลไม้จากพื้นที่ทำการเกษตรภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ทำการสกัด DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยยีน *cox1* เพื่อยืนยันชนิดของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และ แมลงวันผลไม้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีก 10 ชนิดได้แก่ *B. carambolae*, *B. cilifera*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *B. zonata*, *Z. caudata*, *Z. cucurbitae*, *Z. isolata* และ *Z. tau* เก็บรักษา DNA ทั้งหมดไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการออกแบบออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ต่อไป

คำหลัก : แมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* ไพรเมอร์ เฉพาะเจาะจง

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 และกักตัวอยู่ภายในผล ยากต่อการสังเกตเห็น ทำให้มีโอกาสดูดไปภายใน ผัก และผลไม้ได้สูง ส่งผลเสียหายเป็นอย่างยิ่งในการส่งออก ก่อให้เกิดการกีดกันทางการค้าตามมาอีกด้วย

ทั่วโลกพบแมลงวันผลไม้มากกว่า 5,000 ชนิด แต่ในประเทศไทยนั้นพบว่า แมลงวันผลไม้ในสกุล *Bactrocera* และสกุล *Zeugodacus* นั้นสามารถทำลายผลผลิตทางการเกษตรได้หลากหลายไม่ว่าจะเป็น ผักหรือ ผลไม้ แต่สำหรับผลไม้ที่เกษตรกรนิยมปลูกกันอย่างกว้างขวาง สำหรับการการบริโภคภายในประเทศ รวมทั้งส่งออกไปยังตลาดโลกเป็นจำนวนมาก เช่น ฝรั่ง มะม่วง และชมพู นั้นพบว่าแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* และแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เป็นศัตรูที่ก่อให้เกิดความเสียหายและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอย่างยิ่ง (ยูวรินทร์ และคณะ 2554) แต่ในปัจจุบันนี้มีงานวิจัยมากมายเกี่ยวกับแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* แต่สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับ แมลงทองฝรั่ง *B. correcta* นั้นยังมีน้อยมาก และจากงานวิจัยด้านนิเวศวิทยาที่ผ่านมาพบว่าแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* นั้น สามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 30 วงศ์ (Family) ใน 60 ชนิด (species) เช่น ชมพู่มะม่วง ฝรั่ง เชอรี่ พุทรา และพริก

ดังนั้นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จัดเป็นหนึ่งในแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญต่อการนำเข้าและส่งออก แต่ปัจจุบันนี้ประเทศไทยใช้การตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของตัวเต็มวัย (Traditional taxonomy) เป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยเพียงเท่านั้น ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยแต่หากมีการสำรวจพบแมลงวันผลไม้ ในระยะไข่ หนอน หรือดักแด้ นำมาตรวจวินิจฉัยนั้นยังไม่เป็นที่นิยม และขาดความน่าเชื่อถือ เนื่องจากลักษณะไข่ และตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ นั้น มีความคล้ายคลึงกันมาก และหากต้องการศึกษาชนิดแมลงวันผลไม้จากตัวอ่อน จะต้องนำตัวอ่อนมาทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษารายละเอียดจากสัณฐานวิทยาภายนอกในส่วนต่างๆ เช่น ส่วนปาก (mouth hook) และรูหายใจด้านหน้า (anterior spiracles) และปลายท้อง (posterior spiracles) นอกจากนี้หากมีการตรวจพบตัวอ่อนในการส่งออกหรือนำเข้าผลผลิตทางการเกษตรนั้น ผู้ที่ทำการตรวจวินิจฉัยจะต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้ตัวอ่อน หรือดักแด้ นั้นเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยเพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ชนิดซึ่งค่อนข้างใช้เวลานานและเป็นผลเสียต่อการค้าผักผลไม้ตามมา (Armstrong et al., 1997)

ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจะเป็นครั้งแรกในการทดสอบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงต่อ แมลงทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ประเทศจีนได้นำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ตรวจพบจากชมพูที่ส่งออกไปจากประเทศไทย (Jiang et al., 2013) ว่าไพรเมอร์ดังกล่าวนี้มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพเพียงพอในการนำมาใช้หรือไม่ นอกจากนี้จะทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงกับแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* ให้มีความเหมาะสมและสามารถนำมาใช้ตรวจ

วินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในประเทศไทย โดยการออกแบบแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงกับแมลงทองฝรั่ง *B. correcta* ในครั้งนี้จะเป็นการประยุกต์หลักการพื้นฐานของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR กับ species - specific primer จาก DNA Barcode และจะใช้เพียงขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA จากการทำ PCR และ electrophoresis ซึ่งจะสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดได้ภายในวันเดียว และสามารถตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่งได้ทุกระยะไม่ว่าจะเป็นระยะ ไข่ หนอน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัย ซึ่งประโยชน์จากการศึกษานี้จะทำให้เกิดความรู้เร็ว ประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย และเป็นการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทย และสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์กับการตรวจวินิจฉัยแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นๆ อีกด้วย

วิธีดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2562)

วิธีดำเนินการวิจัยเก็บตัวอย่างทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยเพื่อนำมาสกัด DNA

1.1 การศึกษานี้มีแผนการปฏิบัติการเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้จากพื้นที่การเกษตร และพื้นที่ป่าธรรมชาติ โดยจะเก็บรวบรวมตัวอย่างจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) ซึ่งคาดว่าจะภายในหนึ่งปีจะสามารถเก็บตัวอย่างได้ครบทั้ง 6 ภาค ภาคละ 3 -5 จังหวัด และในแต่ละจังหวัดจะเก็บสามจุดสำรวจในพื้นที่การปลูกผัก ผลไม้ชนิดต่าง เช่น ฝรั่ง ชมพู่ มะม่วง พุทราและอื่นๆ และใช้กับดักฟีโรโมน 2 ประเภทได้แก่ CUE lure และ Methyl Eugenol โดยติดตั้งในพื้นที่เก็บตัวอย่างละ 5 อัน/ต่อจุดสำรวจ บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ (GPS) โดยแบ่งเป็น

1.2 นำส่วนของพืชที่พร้อมรอยการเข้าทำลายของแมลงวันผลไม้มาล้างห้องปฏิบัติการ แยกชนิดของตัวหนอนและทำการดองด้วยแอลกอฮอล์ 95-100% (เพื่อใช้นำไปทดสอบกับไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*) นำตัวอ่อนที่เหลือใส่กล่องพลาสติกที่มีตะแกรงรองกันซึ่งด้านล่างใส่ขี้เลื่อย และนำกล่องพลาสติกใส่ในกรงผ้าเพื่อให้ตัวเต็มวัยเจริญออกมาให้อาหารคือ น้ำตาลผสมเบียร์ยีสต์ในอัตรา 1:4 เพื่อให้สืบพันธุ์พัฒนาได้ดี และนำตัวเต็มวัยบางส่วนดองไว้ในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บรักษาตัวอย่างไว้ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรักษาคุณภาพของดีเอ็นเอและนำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

1.3 เตรียมตัวอย่างตัวเต็มวัยบางส่วนเพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและเป็นข้อมูลอ้างอิงในพิพิธภัณฑ์ โดยใช้ตัวอย่างตัวเต็มวัยที่อบแห้งหรือฆ่าด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ หรือเก็บแมลงใส่หลอดแก้ว แช่ในช่องน้ำแข็ง 4 - 5 ชั่วโมง วิธีนี้จะทำให้สีไม่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อได้ตัวอย่างแล้วใช้เข็มขนาดเล็ก (micropin) แทงบริเวณด้านข้างของส่วนอกใต้ปีก ให้ไปทางด้านหน้าของลำตัว แล้วจึงเสียบ micropin กับโพมหรือค็อกขนาดเล็กที่มีเข็มปักแมลงเสียบอยู่ โดยมีป้ายเล็กๆ บันทึกกำกับ บอกสถานที่ วันเดือนปี และชื่อผู้เก็บ และมีป้ายบันทึก แยกบันทึกชื่อพืช ที่เก็บมา และชื่อแมลงที่จำแนกได้อีก 1 ป้าย

1.4 ตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิดจากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ ขนาด และสี เป็นต้น โดยตรวจสอบ

ลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดของแมลงวันผลไม้ ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อยืนยันชนิดของแมลงวันผลไม้ พร้อมทั้ง แยกตัวอย่างแมลงวันผลไม้เพื่อการสกัดดีเอ็นเอ

2. วิธีการดำเนินการวิจัยสำหรับการศึกษาลำดับรหัสพันธุกรรม (ดำเนินการปี 2562)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ทำการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาทำการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction) โดยใช้วิธีการตาม Boontop *et al.*, 2017 ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาตื้นขาวจำนวนสามข้างของแมลงวันผลไม้ (25 mg) มาใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml (ตัวอย่างแมลงที่เหลื่อเก็บไว้เพื่อเป็นตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์ (Voucher specimen)) จากนั้นเติม Lysis BufferGL ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และ Protinase 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 เป็นเวลา 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

2.2 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้คู่มือต่อไปนี้

Primer Name	Sequence	Base
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	25
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	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

2.3 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

2.4 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่าง PCR product ของแมลงวันผลไม้ที่ได้ไปทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์โดย Molecular Genetics Research Facility ของ Queensland University of Technology, Australia

2.5 นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน Cox1 ที่ผ่านการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาทำการวิเคราะห์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด (Sequence assembly) โดยโปรแกรมที่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลและจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ (assemble) เช่น Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5

2.6 บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์ มาตรวจสอบชนิด กับ Gene Bank ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมฐานข้อมูล ทางพันธุกรรมจากทั่วโลกอีกครั้ง เพื่อยืนยันความถูกต้องข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

3. ทดสอบและออกแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* (ดำเนินการปี 2563)

3.1 ทดสอบ species - specific primer ที่ได้จากการสืบค้นข้อมูลจาก Jiang และคณะ (2013) ว่ามีความเหมาะสมในการนำมาตรวจสอบกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในประเทศไทยหรือไม่ โดยอ้างอิงไพรเมอร์จาก Jiang และคณะ (2013)

Primer Name	Sequence	SIZE
BCOR-F	COR-F 5'-TGACTTGTCCCCCTAATACTG-3'	281
BCOR-R	BCOR-R 5'-GTCGATCGCATGTTAATAACG-3'	281

โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยกรรมวิธีดังนี้
เตรียมสารเคมี (Master Mixed) และ DNA template ดังนี้

		1 reaction (µl)
Buffer	5X Buffer	6
dNTPs	dNTPs	2
Tag	MyTag; Cat No. BIO-21114	2.5
Water	H ₂ O	35.6
Primer Forward	BCOR-F	3
Primer Reverse	BCOR-R	3
DNA		2
Total		52

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

3.2 ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธีการเจลอิลีคโตรโฟรีซิส ด้วย 1.5 % agarose gel ในสารละลาย 1X TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์, 400 mp (Voltage) เป็นเวลา 45 นาที

4. ออกแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* (ดำเนินการปี 2563 - 2564)

4.1 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cox1 จากแมลงที่ทำการสำรวจ และแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ ที่เป็นแมลงกักกัน จากข้อมูลของ Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) มาจัดลำดับและทำการตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม chromas (เวอร์ชัน 2.33) และ BioEdit (เวอร์ชัน 7.0.9.0) เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เท่านั้น ซึ่งมีความยาวประมาณ 500-800 คู่เบส โดยเลือกตำแหน่ง single - nucleotide polymorphism (SNP) ซึ่งจะใช้ระบุชนิดของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เท่านั้น ซึ่งไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในแมลงวันชนิดอื่นๆ ได้

4.2 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงทั้งแบบฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สโดยอาศัยโปรแกรมที่ให้บริการฟรีแบบออนไลน์ เช่น GeneFisher (<http://www.bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher/>) โดยความยาวของไพรเมอร์มีขนาด 18-25 คู่เบส

4.3 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จากข้อ 3.2 มาวิเคราะห์ primer, dimer hairpin และ false priming sites โดยใช้โปรแกรม Oligo (version 6.0) software

4.4 วิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงของ specific primer ที่ออกแบบไว้จากข้อ 3.2 โดยการเปรียบเทียบ (BLAST) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI database เพื่อตรวจสอบความถูกต้องและความจำเพาะเจาะจง

4.5 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สที่จำเพาะเจาะจงสำหรับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ออกแบบได้ มาเพิ่มปริมาณ PCR product ในตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะต่างๆ เช่น ไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย จากตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการและจากแมลงวันที่สำรวจพบในพืช ผัก และผลไม้ที่พบในภูมิภาคต่างๆ ของไทยรวมทั้งจากผัก ผลไม้ที่ส่งออกจากด่านตรวจพืชที่มีการส่งออก

4.6 ตรวจสอบ PCR product ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่สังเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ด้วยวิธีการเจลอิลีคโตรโฟรีซิส ด้วย 1.5% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer โดยอาศัยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าและประจุไฟฟ้า

4.7 ทำบริสุทธิ์ PCR product ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลสำเร็จรูป QIAquickGel Extraction Kit, Qiagen (Germany)

4.8 ส่ง PCR product ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเครื่องวิเคราะห์หัตถ์โนมัติ

4.9 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>)

5. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* (ดำเนินการปี 2563 - 2564)

5.1 นำไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบมาทดสอบโดยทดสอบความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ และกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่พบในพืช ผัก และผลไม้ที่พบจากด่านตรวจพืชที่มีการส่งออกในระยะต่างๆ เช่น ไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย

5.2 ทำการบันทึกข้อมูล และจัดทำรายงาน
การบันทึกข้อมูล

1. ตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่ได้จากการเลี้ยงและรวบรวมจากกับดักล่อแมลง บันทึกข้อมูลโดยมีป้ายเล็ก ๆ บันทึกกำกับ บอก สถานที่ วันเดือนปี และชื่อผู้เก็บ และมีป้ายบันทึก แยกบันทึกชื่อพืช ที่เก็บมา และชื่อแมลงที่จำแนกได้อีก 1 ป้าย

2. ตัวอย่างดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้บันทึกในรูปแบบของ FASTA ไฟล์

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สืบค้นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความทันสมัยมากที่สุด และรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้เพิ่มเติม โดยการเก็บ

รวบรวมแมลงวันผลไม้จากพื้นที่ทำการเกษตรภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ทำการแยกชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* (Figure 1) และสกัด DNA แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จำนวน 20 ตัวอย่าง นอกจากนี้ทำการจำแนกชนิดและสกัด DNA แมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้อีก 10 ชนิดได้แก่ *B. carambolae*, *B. cilifera*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *B. zonata*, *Z. caudata*, *Z. cucurbitae*, *Z. isolata* และ *Z. tau* (Figure 2) โดยทำการสกัด DNA ชนิดละ 5 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยยีน *cox1* เพื่อยืนยันชนิดของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะการส่งออกทั้ง 10 ชนิด (Figure 3) จากนั้นเก็บรักษา DNA ทั้งหมดไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการออกแบบ ออกแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการศึกษาระหว่างเดือนตุลาคม 2562 - กันยายน 2563 นั้นได้ทำการสกัด DNA และทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยยีน *cox1* ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะการส่งออกทั้ง 10 ชนิด เก็บรักษา DNA ทั้งหมดไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการออกแบบออกแบบไพรเมอร์ที่มีเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ต่อไป

คำขอบคุณ

ข้าราชการ พนักงานราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานจ้างเหมาบริการ ของกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลงในการช่วยเหลือเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้ จึงทำให้งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จ และลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ยิวรินทร์ บุญทบ, ศิริณี พูนไชยศรี, ชลิตา อุณหุฒิ, ลักขณา บำรุงศรี และสิทธิศิโรตม แก้วสวัสดิ์. 2554ก. อนุกรมวิธานแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera* จากสารล่อในเขตภาคใต้ของประเทศไทย. หน้า 1742-1758. ใน รายงานผลงานประจำปี 2554. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- 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.
- 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.
- 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.



Figure 1 *Bactrocera correcta* (Bezzi)

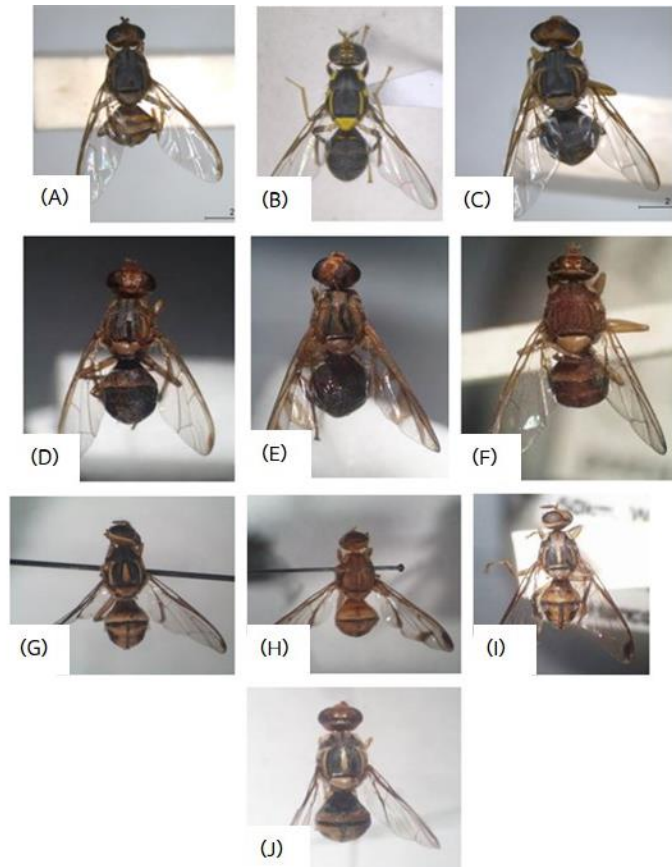


Figure 2 Economic importance fruit flies for species specific primer designing

- | | | |
|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| (A) <i>B. carambolae</i> | (B) <i>B. cilifera</i> | (C) <i>B. dorsalis</i> |
| (D) <i>B. latifrons</i> | (E) <i>B. umbrosa</i> | (F) <i>B. zonata</i> |
| (G) <i>Z. caudate</i> | (H) <i>Z. cucurbitae</i> | (I) <i>Z. isolate</i> |
| (J) <i>Z. tau</i> | | |

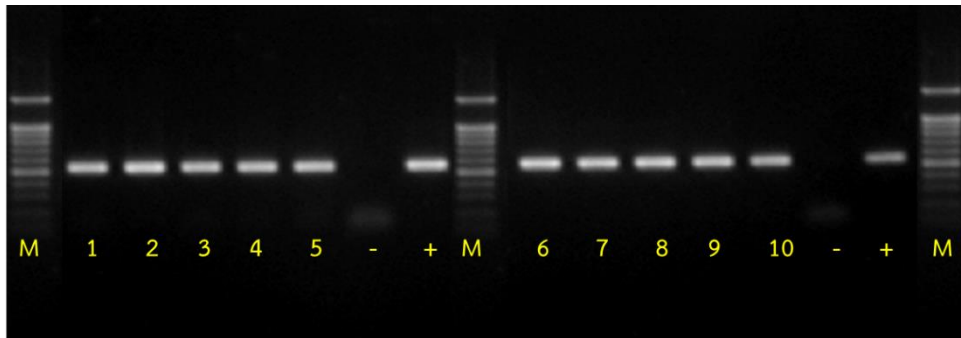


Figure 3 PCR results using the *cox1* (LCO1490/HCO2198) universal primer pair.

Lane 1: *B. carambolae*

Lane 2: *B. cilifera*

Lane 3: *B. dorsalis*

Lane 4: *B. latifrons*

Lane 5: *B. umbrosa*

Lane 6: *B. zonata*

Lane 7: *Z. caudatus*

Lane 8: *Z. cucurbitae*

Lane 9: *Z. isolata*

Lane 10: *Z. tau*

(-) = negative control (ddH₂O) (+) = positive control (*B. correcta*)

M = Marker

การศึกษาพืชอาศัย และเขตการแพร่กระจายของเชื้อรา *Fusarium oxysporum*
สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชในประเทศไทย
Hosts and Distribution areas of Pathogenic *Fusarium oxysporum*
causing Wilt Disease of Crops in Thailand

อภิรัชต์ สมฤทธิ์

ธารทิพย์ ภาสบุตร อมรรักษ์ คัดใจเดียว
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Plants showing wilt symptom were collected from plantation areas of Thailand during October 2016 - September 2019. Sixty isolates of plant pathogenic *F. oxysporum* from 17 provinces were derived from tissue transplanting isolation method. A pathogenicity test of each collected isolates was conducted by Koch's postulate procedure. Species identification of pure culture obtained from single spore method was studied by their morphological characteristic growing on CLA (Corn Leaf Agar) and a slide culture method, in a laboratory of Mycology group, Plant Disease Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, which revealed 9 different host plants referring to different 9 formae speciales (f. sp.) of *F. oxysporum*. Collected diseases were banana wilt disease. (Panama disease of banana; Kluai Nam Wa and Kluai Khai) withered wilt disease of basil Coriander wilt disease, wilt disease of chili, wilt disease of tomato, wilt disease of chrysanthemums, wilt disease of tobacco, wilt disease of pes and wilt disease of Pak Wan ban from 17 provinces, including Kanchanaburi, Chanthaburi, Chiang Mai, Chiang Rai, Nakhon Phanom, Nakhon Ratchasima, Bueng Kan, Phitsanulok, Mukdahan, Lamphun, Loei, Nong Khai, Sukhothai, Suphan Buri, Songkhla, Udon Thani and Ubon Ratchathani. When assessing the disease in areas with Panama disease, it was found that on average the tree number of wilt diseased Kluai Nam Wa found was approximately 5-10 percent per surveyed area, while average the tree number of wilt diseased Kluai Khai found was approximately 30-40 percent per surveyed area. An average the tree number of wilt diseased Pea found was approximately 20 percent per surveyed area, including wilt of chrysanthemums found

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-02-60

approximately 10 percent per surveyed area, wilt of coriander found approximately 5 percent per surveyed area, wilt of Pakhwan Ban was found approximately 15-20 percent per surveyed area, wilt disease of chili found approximately 5 percent per surveyed area, wilt disease of tomato found approximately 5 percent per surveyed area, wilt disease of tobacco found approximately 5 percent per surveyed area and wilt disease of basil found approximately 5 percent per surveyed area.

บทคัดย่อ

การรวบรวมและเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคเหี่ยวที่คาดว่ามีส่วนสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในพื้นที่เพาะปลูกพืชตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2562 เมื่อนำตัวอย่างพืชเป็นโรคมายกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potaro Dextrose Agar) และแยกเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร WA (Water Agar) แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคโดยวิธีการ Koch's postulate รวมทั้งศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร CLA (Corn Leaf Agar) และการทำ Slide Culture ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจัดจำแนกได้เป็นเชื้อรา *F.oxysporum* จำนวน 60 ไอโซเลท จากอาการโรคเหี่ยวของพืช 9 ชนิด ได้แก่ โรคเหี่ยวของกล้วย (โรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า และกล้วยไข่) โรคเหี่ยวของโหระพา โรคเหี่ยวของผักชี โรคเหี่ยวของพริก โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ โรคเหี่ยวของเบญจมาศ โรคเหี่ยวของยาสูบ โรคเหี่ยวของถั่วลิสนเตา และ โรคเหี่ยวของผักหวานบ้าน จาก 17 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี, จันทบุรี, เชียงใหม่, เชียงราย, นครพนม, นครราชสีมา, บึงกาฬ, พิษณุโลก, มุกดาหาร, ลำพูน, เลย, หนองคาย, สุโขทัย, สุพรรณบุรี, สงขลา, อุตรธานี และ อุบลราชธานี เมื่อประเมินการเกิดโรคในพื้นที่ที่พบโรคตายพราย (Panama disease) พบว่า โดยเฉลี่ยจำนวนต้นที่พบโรคคือ 5-10 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคตายพราย (panams disease) ของกล้วยไข่ พบว่า มีต้นกล้วยไข่เป็นโรคประมาณ 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของถั่วลิสนเตา พบว่า เป็นโรคประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของเบญจมาศ พบว่า เป็นโรคประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของผักชี พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของผักหวานบ้าน พบว่า เป็นโรคประมาณ 15 - 20 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของพริก พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของยาสูบ พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ และโรคเหี่ยวของโหระพา พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ

คำหลัก : โรคตายพราย, โรคเหี่ยว, Wilt, *F. oxysporum*

คำนำ

เชื้อราสาเหตุโรคพืชในสกุล *Fusarium* ที่รู้จักกันดีว่าเป็นสาเหตุของโรคพืชที่ทำความเสียหายต่อพืชที่ปลูกอย่างรุนแรง คือเชื้อรา *F. oxysporum* (เชื้อราชนิด (species) นี้ส่วนใหญ่ทำให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่นพืชไร่, พืชหัว, ผัก, ไม้ประดับและไม้ผล ทั้งในระยะเวลาก่อนเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว ปัญหาโรคที่เกิดขึ้นนี้ทำให้เกษตรกรเกิดการสูญเสียมูลค่าและกำไรของผลผลิตที่พวกเขาคาดว่าจะได้รับ เชื้อรา *F. oxysporum* เริ่มต้นบุกรุกเข้าทำลายพืชจากดินที่ปนเปื้อนหรือเป็นที่

อาศัยอยู่ของเชื้อราสาเหตุ ผ่านทางช่องเปิดของรากเข้าไปยังระบบลำเลียงของพืช หรือผ่านทางบาดแผล เชื้อราเข้าไปเจริญทางเส้นใยและขยายพันธุ์อยู่ในระบบลำเลียงน้ำและอาหารของพืชได้แล้ว ทำให้ระบบท่อลำเลียงอุดตัน ส่งผลให้ของสารอาหารและน้ำผ่านไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชที่อยู่เหนือพื้นดินได้ ดังนั้นอาการเหี่ยวหรือสีเหลืองเหี่ยวจึงปรากฏให้เห็นกับต้นพืช ในขณะที่เดียวกันพืชที่เป็นโรคนั้นก็จะแสดงอาการเน่าของเนื้อเยื่อท่อลำเลียง เนื้อเยื่อบริเวณติดกัน บริเวณหัวหรือเหง้า โคนต้น รวมถึงราก โดยทั่วไป เชื้อรา *F. oxysporum* เป็นที่รู้จักกันดีในประเทศไทย ว่าเป็นเชื้อราโรคพืชที่ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงกับพืชบ่อย ๆ ทั้งพืชที่ปลูก ถึงแม้ว่าอาการของโรคที่เกิดขึ้นกับพืชจะสังเกตเห็นหรือจดจำได้ง่ายว่าแสดงอาการเหี่ยวของต้นพืช แต่อาการที่แสดงออกดังกล่าวนี้ เป็นลักษณะของต้นพืชที่ติดเชื้อหรือเชื้อราเข้าไปทำลายจนไม่สามารถแก้ไขหรือเยียวยาไปแล้ว การขยายพื้นที่ปลูกพืชไปยังพื้นที่ใหม่ที่มีเชื้อราโรคพืชชนิดนี้อยู่แล้ว หรือการนำสวนขยายพันธุ์ของพืชที่ติดเชื้อไปขยายปลูกในพื้นที่ใหม่ เป็นสาเหตุทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคต่อไปได้เรื่อย ๆ บางสถานการณ์ ถึงแม้เกษตรกรจะไม่ได้ขยายพื้นที่ปลูก แต่ได้ปลูกพืชชนิดเดียวกันอย่างต่อเนื่องในพื้นที่เดียวกัน ก็เป็นสาเหตุทำให้เชื้อรา *F. oxysporum* มีอาหาร มีชีวิตอยู่รอดบนเศษซากพืช และเพิ่มจำนวนมากขึ้น เมื่อจำนวนประชากรของเชื้อราสาเหตุโรคเพิ่มมากขึ้น ก็เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคที่ชัดเจน และทำความเสียหายต่อพืชที่ปลูกอย่างรุนแรงมากขึ้นได้ การศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบชนิดและวงศ์พืชอาศัยของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับพืชในประเทศไทย และเพื่อทราบข้อมูลความเสียหาย และขอบเขตการแพร่กระจายของเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับพืชในประเทศไทย จึงได้วางขอบเขตของการวิจัยครอบคลุมด้านการรวบรวมข้อมูลชนิด (hosts) และวงศ์พืชอาศัย (Family) ของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวของพืชที่ผลิตเป็นการค้า รวมถึงพื้นที่การเกิดโรค แหล่งแพร่กระจาย และได้ culture ของ isolate ต่างๆ ที่จัดจำแนกชื่อชนิดแล้วพร้อมข้อมูลเก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกรมวิชาการเกษตร ผลหรือข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ คาดว่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญอย่างยิ่งในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราชนิดนี้ต่อไปในอนาคต ทั้งการศึกษาเพื่อหาวิธีการป้องกันกำจัดโรค การศึกษาระบบนิเวศน์และระดับประชากรของเชื้อราในพื้นที่เพาะปลูกพืช การศึกษาความหลากหลายของเชื้อราในระดับท้องถิ่นหรือในระดับประเทศ การศึกษาในระดับโมเลกุลเพื่อให้จัดจำแนกชนิดของเชื้อราอย่างถูกต้อง การศึกษาการจัดชั้นที่ถูกต้องของเชื้อราในระดับ formae specialis รวมถึงการศึกษารูปการตรวจหาเชื้อราที่อาจจะติดไปกับพืชส่งออกที่สำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่ตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นของโลก อีกทั้งสถานการณ์การเปลี่ยนแปลงของโลกที่ร้อนขึ้นในทุกวันนี้ ซึ่งคาดว่าทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราโรคพืชชนิดนี้ รวมถึงความสามารถที่จำเพาะเจาะจงในการก่อให้โรครกับพืชอย่างจำเพาะเจาะจง จึงทำให้การศึกษาที่ดำเนินไปพร้อมการสำรวจหาเชื้อราและสำรวจการเกิดโรค จะเป็นแนวทางที่สำคัญอย่างยิ่งสำหรับการพยากรณ์การระบาดของโรค และการเตรียมพร้อมในการป้องกันการเกิดโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในประเทศไทย

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ WA (Water Agar), PDA (Potato Dextrose Agar) และ CLA (Corn Leaf Agar)
3. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
4. อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ
5. วัสดุอุปกรณ์สำหรับปลูกต้นไม้ในโรงเรือนทดลอง เช่น กระจกปลูกต้นไม้ขนาดความจุ 10 ลิตร ดิน พลับ บัวรดน้ำ ฯลฯ
6. เมล็ดพันธุ์ หรือต้นกล้าพืช สำหรับทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค (pathogenicity)

วิธีการ

กรรมวิธีและวิธีการทดลอง :

1. การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อราที่พบในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย บันทึกข้อมูลในแปลงปลูก บันทึกและถ่ายภาพลักษณะอาการของโรค

2. การแยกเชื้อ *F.oxysporum* จากพืชที่เป็นโรค

2.1 วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (tissue transplanting method) โดยตัดชิ้นส่วนพืชระหว่างส่วนเป็นโรคและส่วนปกติ หรือบริเวณท่อน้ำท่ออาหารของลำต้น และส่วนโคนของพืชที่แสดงอาการโรคเหี่ยว หรือ บริเวณผลที่มีอาการเน่า ให้มีขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชด้วยคลอโร็กซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (chlorox 10%) นาน 3-4 นาที แล้วแช่ขนาดของชิ้นส่วนพืช ย้ายลงวางบนอาหาร WA บ่มเชื้อ 24-36 ชั่วโมง ที่ 28 °ซ. เมื่อเส้นใยเจริญออกมา จึงแยกเส้นใยเชื้อลงเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. การศึกษาและการจำแนกชนิด

3.1 ทำเชื้อบริสุทธิ์โดยการใช้ single-spore technique

แยกกลุ่มสปอร์ลงใน vial ที่มีน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ทำสปอร์แขวนลอยให้มีปริมาณสปอร์ประมาณ 10 สปอร์ ต่อ 1 ลูป (loop; ห่วงลวด) ภายใต้เลนส์ objective กำลังขยายต่ำ ใช้ลูปที่ปลอดเชื้อแตะสปอร์แขวนลอย แล้วขีด (streak) ลงบนผิวหน้าของอาหาร WA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยตักสปอร์เดี่ยวที่ออก มาเลี้ยงบนอาหาร PDA

3.2 การจำแนกชนิด: ทำการศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

- ศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Fusarium* และศึกษาการสร้าง pigment, sclerotium และ sporodochium บนอาหาร PDA และศึกษาลักษณะและวัดขนาดของ conidium, conidiophore บนอาหาร CLA อายุ 10-14 วัน ที่อุณหภูมิ 26-28 °ซ. ภายใต้แสง NUV (near ultraviolet)

- ทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของ sporogenous cell, phialide, microconidium, macroconidium

3.3 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลในแปลงปลูก ระดับความเสียหายของโรค บันทึกและถ่ายภาพ ลักษณะอาการของโรค ลักษณะโคโลนีที่เจริญของเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ลักษณะสัณฐานและขนาดของเชื้อ ได้แก่ sporogenous cell, phialide, microconidium, macroconidium

4. การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค

1. เตรียมต้นพืชสำหรับทดสอบ: โดยเตรียมดินร่วน ใส่กระถางปลูกต้นไม้ขนาดความจุ 10 ลิตร นำเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้าพืช มาปลูกในกระถางที่บรรจุดินแล้ว วางกระถางปลูกพืชไว้ในโรงเรือน ที่แสงแดดส่องถึง ดูแลรดน้ำและให้ปุ๋ย

2. เตรียม inoculum: เลี้ยงเชื้อรา *F. oxysporum* ที่แยกได้จากพืชเป็นโรคเหี่ยวบนอาหาร PDA ประมาณ 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว บ่มเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้น ชั่งเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อราเจริญอยู่จำนวน 30 กรัม แบ่งเป็น 3 ส่วน ๆ ละ 10 กรัม ผึ่งไว้ที่โคนต้นพืชที่ต้องการทดสอบ ตรวจสอบการเกิดโรคและลักษณะอาการที่เกิดขึ้น หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 1 สัปดาห์เป็นต้นไป

3. ดำเนินการตามวิธีการ Koch's postulate: นำเนื้อเยื่อพืชที่พบโรค มาแยกเชื้อ และจำแนกชนิดตามวิธีการที่ได้ดำเนินการมาในหัวข้อ การศึกษาและการจำแนกชนิด เมื่อได้เชื้อรา *F. oxysporum* ชนิดเดียวกับที่ใช้ปลูกเชื้อแล้ว ก็นำมาปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้งในพืชชนิดเดิม ตรวจสอบและบันทึกผลการเกิดโรคและลักษณะอาการที่เกิดขึ้น

5. การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับพืชที่อยู่ในวงศ์ (Family) เดียวกัน

ทำการทดสอบเหมือนการทดสอบในข้อที่ 4 โดยนำเชื้อรา *F.oxysporum* ที่แยกได้ มาปลูกลงในพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกันกับพืชที่พบและได้เก็บตัวอย่างโรค

1. เตรียมต้นพืชสำหรับทดสอบ: โดยเตรียมดินร่วน ใส่กระถางปลูกต้นไม้ขนาดความจุ 10 ลิตร นำเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้าพืช มาปลูกในกระถางที่บรรจุดินแล้ว วางกระถางปลูกพืชไว้ในโรงเรือน ที่แสงแดดส่องถึง ดูแลรดน้ำและให้ปุ๋ย

2. เตรียม inoculum: เลี้ยงเชื้อรา *F. oxysporum* ที่แยกได้จากพืชเป็นโรคเหี่ยวบนอาหาร PDA ประมาณ 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว บ่มเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้น ชั่งเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อราเจริญอยู่จำนวน 30 กรัม แบ่งเป็น 3 ส่วน ๆ ละ 10 กรัม ผึ่งไว้ที่โคนต้นพืชที่ต้องการทดสอบ ตรวจสอบการเกิดโรคและลักษณะอาการที่เกิดขึ้น หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 1 สัปดาห์เป็นต้นไป

3. ดำเนินการตามวิธีการ Koch's postulate: นำเนื้อเยื่อพืชที่พบโรค มาแยกเชื้อ และจำแนกชนิดตามวิธีการที่ได้ดำเนินการมาในหัวข้อ การศึกษาและการจำแนกชนิด เมื่อได้เชื้อรา *F. oxysporum* ชนิดเดียวกับที่ใช้ปลูกเชื้อแล้ว ก็นำมาปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้งในพืชชนิดเดิม ตรวจสอบและบันทึกผลการเกิดโรคและลักษณะอาการที่เกิดขึ้น

เวลาและสถานที่

เวลา : ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562 ระยะเวลา 3 ปี

สถานที่ : กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
แปลงปลูกพืชของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อราที่พบในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ในช่วงเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 รวมระยะเวลา 3 ปี แล้วนำมาแยกหาเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDA และ เลี้ยงเชื้อราให้ได้เชื้อราบริสุทรี นำมาจำแนก ชนิดของเชื้อราโดยตรวจดูลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา พบว่า ได้เชื้อราบริสุทรีที่เป็นสาเหตุ ของโรคเหี่ยวพืช จำนวน 60 ไอโซเลท (isolates) จากพืช 9 ชนิด ได้แก่ กั้ว (โรคตายพรายของ กั้วน้ำว่า และกั้วไข่) โหระพา ผักชี พริก มะเขือเทศ เบญจมาศ ยาสูบ ถั่วลิ้นเต่า และ ผักหวานบ้าน จาก 17 จังหวัดพื้นที่ที่พบโรคตายพรายของกั้วน้ำว่า ได้แก่ จ.กาญจนบุรี (อ.ไทรโยค 3 ไอโซเลท), จ.เชียงใหม่ (อ.เชียงดาว 1 ไอโซเลท, อ.เมือง 1 ไอโซเลท, อ.แมริม 2 ไอโซเลท, อ.สะเมิง 1 ไอโซเลท), จ.เชียงใหม่ (อ.เชียงของ 1 ไอโซเลท, อ.เชียงแสน 1 ไอโซเลท, อ.พญาเม็งราย 1 ไอโซเลท , อ.แม่สาย 2 ไอโซเลท), จ.นครพนม (อ.ท่าอุเทน 3 ไอโซเลท), จ.นครราชสีมา (อ.ปากช่อง 1 ไอโซ เลท), จ.บึงกาฬ (อ.บึงโขงหลง 1 ไอโซเลท), จ.ลำพูน (อ.เมือง 1 ไอโซเลท), จ.สุพรรณบุรี (อ.ศรี ประจันต์ 2 ไอโซเลท), จ.สงขลา (อ.หาดใหญ่ 2 ไอโซเลท), จ.พิษณุโลก (อ.บางกระทุ่ม 5 ไอโซเลท), จ. สุโขทัย (อ.ศรีสำโรง 3 ไอโซเลท), จ.มุกดาหาร (อ.เมือง 1 ไอโซเลท), จ.เลย (อ.เชียงคาน 4 ไอโซเลท, อ.ด่านซ้าย 1 ไอโซเลท, อ.ภูเรือ 3 ไอโซเลท), จ.อุดรธานี (อ.นายาง 3 ไอโซเลท) สำหรับเปอร์เซ็นต์ ความรุนแรงของโรคตายพรายของกั้วน้ำว่าในพื้นที่เก็บตัวอย่างโรคนั้น เมื่อประเมินการเกิดโรคจาก การนับคร่าว ๆ ของจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่นั้น ๆ พื้นที่ที่พบโรคตายพราย (Panama disease) พบว่า พื้นที่ปลูกกั้วน้ำว่าส่วนใหญ่เป็นพื้นที่ว่างของสวนผลไม้ ปลายไร่ หรือปลายนา มี จำนวนต้นประมาณ 50 – 100 ต้น พบว่า โดยเฉลี่ยจำนวนต้นที่พบโรคคือ 5-10 เปอร์เซ็นต์ บางแห่ง เป็นพื้นที่ปลูกริมแม่น้ำ หรือชายเขาหรือมีจำนวนต้นที่ปลูกส่วนใหญ่ จำนวน 200 – 400 ต้น มีจำนวน ต้นที่พบโรคเฉลี่ย 10 - 20 เปอร์เซ็นต์เช่น ที่ จ.พิษณุโลก และ จ.เลย และ สำหรับการสำรวจโรคตาย พรายที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ในกั้วอื่น ได้พบ โรคตายพราย (panams disease) ของกั้วไข่ (Kluai Khai; lady finger, AA) ที่ อ.ขลุง จ.จันทบุรี (อ.ขลุง 3 ไอโซเลท) เมื่อ ประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่นั้น ๆ พบว่า มีต้นกั้วไข่เป็นโรคประมาณ 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ (Table 1) โรคตายพรายของกั้วไข่ พบครั้งแรกที่ อ.ขลุง จ.จันทบุรี และ แพร่กระจายไปสู่แหล่งปลูกกั้วไข่เป็นการค้าและส่งออกในอำเภออื่น ๆ แต่ยังไม่มีการรายงานความ เสียหายอย่างชัดเจน จากการสำรวจ ได้พบ โรคเหี่ยวของถั่วลิ้นเต่าที่ จ.เชียงใหม่ (อ.สันทราย 1 ไอโซ เลท) ในพื้นที่ปลูกประมาณ 200 ตารางวา หรือ 2 งานเมื่อประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูก ทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ โรคเหี่ยวของเบญจมาศ ที่ จ.เชียงใหม่ (อ. จอมทอง 1 ไอโซเลท) ในพื้นที่ปลูกประมาณ 800 ตารางวา หรือ 2 ไร่ เมื่อประเมินการเกิดโรคจาก จำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ โรคเหี่ยวของผักชี ที่ จ. นครราชสีมา (อ.ปากช่อง 1 ไอโซเลท) ในพื้นที่ปลูกประมาณ 100 ตารางวา หรือ 1 งาน เมื่อประเมิน การเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ โรคเหี่ยวของ ผักหวานบ้าน ที่ จ.อุบลราชธานี (อ.สว่างวีระวงศ์ 2 ไอโซเลท) ในพื้นที่ปลูกประมาณ 400 ตารางวา หรือ 1 ไร่ เมื่อประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 15 - 20 เปอร์เซ็นต์ โรคเหี่ยวของพริก ที่ จ.สุโขทัย (อ.ศรีสำโรง 1 ไอโซเลท) จ.เชียงราย (อ.เชียงแสน 1 ไอ โซเลท) และ จ.หนองคาย (จ.ศรีเชียงใหม่ 1 ไอโซเลท) ในพื้นที่ปลูกแต่ละแห่งประมาณ 400 ตารางวา หรือ 1 ไร่ เมื่อประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 5

เปอร์เซ็นต์ โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ที่ จ.สุพรรณบุรี (อ.อุทุมพร 1 ไอโซเลท) จ.กาญจนบุรี (อ.ไทรโยค 1 ไอโซเลท) และ จ.เชียงใหม่ (อ.แม่แตง 1 ไอโซเลท) ในพื้นที่ปลูกแต่ละแห่งประมาณ 400 ตารางวา หรือ 1 ไร่ เมื่อประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ โรคเหี่ยวของยาสูบ ที่ จ.เชียงใหม่ (อ.แม่แตง 1 ไอโซเลท) ในพื้นที่ปลูกแต่ละแห่งประมาณ 800 ตารางวา หรือ 2 ไร่ เมื่อประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ และโรคเหี่ยวของโหระพา ที่ จ.กาญจนบุรี (อ.ท่าม่วง 1 ไอโซเลท) ในพื้นที่ปลูกแต่ละแห่งประมาณ 200 ตารางวา หรือ 2 งาน เมื่อประเมินการเกิดโรคจากจำนวนต้นที่ปลูกทั้งหมดในพื้นที่ พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

เชื้อราทั้ง 60 ไอโซเลทเป็นเชื้อรา *F. oxysporum* ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการเข้าทำลายพืชอาศัย หรือ Formae speciales (f. sp.) ที่แตกต่างกัน จำนวน 9 Formae speciales (f. sp.) อย่างไรก็ตามเชื้อราทุกไอโซเลทมีลักษณะการเจริญบนอาหาร และลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน ดังนี้

ลักษณะโคโลนิบนอาหาร PDA : เชื้อราสร้างเส้นใยฟู ละเอียด สีขาว สีขาวขมม่วง สีชมพู ม่วง สีม่วงอ่อน จนถึงสีม่วงเข้ม เจริญอย่างรวดเร็ว สร้าง sporodochium สีส้มจำนวนมาก โคลนிட้านใต้ผิวอาหารมีสีม่วงอ่อน ม่วงเข้ม หรือน้ำเงินเข้ม และสร้างเม็ด sclerotium สีน้ำเงิน (Figure 1)

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA : เชื้อราสร้าง microconidium จำนวนมากเกาะเป็นกลุ่มแบบ false head บน monophialide ซึ่งเกิดจากด้านข้างของเส้นใย phialide รูปร่างคล้ายขวดหรือพินโบว์ลิง ไม่มีสี มีขนาดสั้นกว่า phialide ของ *F. moniliforme* และ *F. solani* microconidia รูปไข่ ยาวรี สั้นป้อม จนถึงรูปทรงกระบอก ไม่มีสี มี 1-2 เซลล์ ส่วนใหญ่มี 1 เซลล์ macroconidia รูปร่างโค้งแบบ fusoid-subculate เซลล์ที่ฐานมีลักษณะคล้ายเท้า (foot-shaped) เซลล์ที่ปลายเรียวยาวแหลม หรือทู่มน ผนังบาง ไม่มีสี มี septum 3-5 ขนาด 24-26 x 3-4.5 ไมครอน เกิดบน conidiophore ที่แตกกิ่งก้านมากหรือเกิดบน sporodochium ที่มีลักษณะเป็นก้อน (tubercularia-like) เชื้อราชนิดนี้สร้าง chlamydospore รูปไข่ หรือทรงกลม ผนังเรียบหรือผนังขรุขระ เกิดที่บริเวณส่วนปลายเส้นใย (terminal) และส่วนกลางเส้นใย (intercalary) มักเกิดเดี่ยว แต่บางครั้งเกิดเป็นคู่หรือเป็นลูกโซ่ (Figure 1)

ลักษณะอาการทั่วไป : ต้นพืชมีลักษณะเหลือง แคระแกรน หรือเหี่ยวเฉา คล้ายขาดน้ำ เมื่อตัดโคนต้นตามขวาง พบจุดสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม จนถึงสีน้ำตาลดำ บริเวณท่อน้ำท่ออาหาร หรือผ่าตามยาว พบบริเวณท่อน้ำท่ออาหารมีสีน้ำตาลอ่อนสลับกับน้ำตาลดำเป็นทางยาว

การศึกษาข้อมูลของเชื้อชนิดนี้ พบว่าเชื้อราทำให้เกิดโรคเหี่ยว (vascular wilt) กับพืชหลายชนิด เป็นราที่มีพืชอาศัยกว้างมาก ทำความเสียหายกับพืชมากที่สุด และมีความสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะกับพืช โดยลักษณะของสัณฐานวิทยาคลายคลึงกัน ดังนั้น นักอนุกรมวิธานราที่ได้ศึกษาและจัดระบบการจำแนก จึงได้ให้ชื่อเป็น form-species เฉพาะพืชอาศัยแต่ละชนิด เช่น โรคเหี่ยวของแตงเกิดจาก *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, โรคเหี่ยวของฝ้ายเกิดจาก *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* และ โรคต้นเหี่ยวของถั่วเหลืองเกิดจาก *F. oxysporum* f. sp. *glycines* ซึ่งขนาดและรูปร่างของ macroconidia มีความผันแปรบ้างในระหว่าง form-species (Booth, 1971)

จากการศึกษาตัวอย่างโรคเหี่ยวของพืชที่เก็บรวบรวมได้จากพืชเป็นโรคในหลาย ๆ พื้นที่ของประเทศไทย เมื่อนำมาแยกเชื้อราบริสุทธิ์ แล้วทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคตามวิธี Koch's postulate ทำให้ได้เชื้อรา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชดังนี้

1. โรคเหี่ยวหรือโรคตายพรายของกล้วย (Banana, *Musa sapientum* Linn.):

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc).

ลักษณะอาการ: อาการโรคตายพรายที่พบในต้นกล้วย เริ่มจากเชื้อราเข้าสู่ราก เหง้า หรือ บริเวณล่างของต้นกล้วย อาการของโรคเหี่ยวยังไม่แสดงให้เห็นที่ต้นอย่างชัดเจนภายในเวลา 1 สัปดาห์ แต่จะเริ่มแสดงออกให้สังเกตเห็นได้ในอีกหลายเดือนต่อมา ลักษณะของต้นกล้วยที่เป็นโรคจะมีอาการหักพับของก้านใบที่อยู่ด้านบนของลำต้นเทียม (pseudostem) จากนั้นก้านใบเริ่มหักพับหลายใบมากขึ้น ใบกล้วยที่หักพับเริ่มเหลือง แล้วเหี่ยวแห้งเป็นสีเหลืองน้ำตาล บางครั้งใบกล้วยที่ยังอ่อนอาจไม่หักพับแต่จะแสดงอาการเหลือง เมื่อเชื้อราเข้าสู่ต้นกล้วยแล้ว ก็จะกระจายไปตามท่อน้ำท่ออาหารของต้น เจริญและเพิ่มจำนวนจนอุดตันท่อลำเลียง ทำให้การไหลของน้ำและอาหารไม่เป็นไปตามปกติ เมื่อผ่าดูภายในลำต้นด้านขนานท่อน้ำท่ออาหาร พบว่าเนื้อเยื่อเน่าเป็นสีน้ำตาลจนถึงดำ กระจายไปตามความยาวของท่อน้ำท่ออาหาร เมื่ออาการเน่ากระจายทั่วทั้งต้น หรือเข้าสู่เหง้า ก็จะทำให้ต้นกล้วยเหี่ยว และแห้งตายไปในที่สุด ในต้นกล้วยที่ยังอายุน้อย จะพบอาการใบเหลือง เหี่ยวแห้ง ยืนต้นตายในที่สุด แต่โดยทั่วไปแล้ว ความอาการที่รุนแรงของโรคมักแสดงออกอย่างชัดเจนหลังจากที่ต้นกล้วยมีอายุ 4 เดือนเป็นต้นไป ในระหว่างการออกดอกหรือแทงปลีกล้วย อาการเหี่ยวของโรคจะแสดงออกอย่างชัดเจนและบางครั้งเกิดอย่างรุนแรงและตายไป ก่อนที่กล้วยจะผลิตผลของกล้วย

จากการสำรวจได้พบโรคตายพรายเกิดกับทั้งกล้วยน้ำว้า และกล้วยไข่ ซึ่งอาการโรคที่เห็นภายนอกของกล้วยไข่นั้น ใบที่เหี่ยวเหลือง มักจะไม่หักพับ เหมือนโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า ส่วนอาการโรครภายในลำต้นเทียมของกล้วยไข่นั้น มีลักษณะคล้ายกับที่เกิดกับลำต้นเทียมของกล้วยน้ำว้า (Figure 2 and 3)

โรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า แพร่ระบาดได้ดีในช่วงฤดูฝน โดยส่วนใหญ่เชื้อสาเหตุโรคติดไปกับหน่อพันธุ์ที่ไชขยายพันธุ์ จากต้นหรือแปลงปลูกที่มีการเกิดโรคมามาก่อน

จากการสำรวจได้พบโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าเกิดกระจายทั่วไปแทบทุกพื้นที่ในการปลูกกล้วยน้ำว้า ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความเสียหายที่พบนั้น มีมากหรือน้อยแตกต่างกันไป ตั้งแต่ 5-10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโรคตายพรายของกล้วยไข่ พบที่ อ.ขลุง จ.จันทบุรี พบทำความเสียหายเป็นจำนวนมากในพื้นที่ปลูกกล้วยไข่ เพื่อการค้า (Figure 4) ระดับความเสียหาย มีตั้งแต่ 30-40 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

2. โรคเหี่ยวของโหระพา (Basil, *Ocimum basilicum* L.)

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum*

ลักษณะอาการ: อาการของโรคเริ่มต้นจาก ส่วนยอดของต้นเริ่มแสดงอาการ แล้วใบเหลือง จากนั้นก็จะเหี่ยวเป็นสีน้ำตาล อาการเหี่ยวเริ่มจากส่วนยอดของต้นลงมา จากนั้นอาการเนื้อเยื่อท่อน้ำท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาลเริ่มพบเห็นชัดเจนบริเวณส่วนโคนต้น และรากเน่าเสียหายเป็นสีน้ำตาลดำ อาการโรคเหี่ยวที่รุนแรงทำให้ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยวแห้ง และยืนต้นตายไปในที่สุด สภาพแวดล้อมที่ อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์สูง เป็นสิ่งส่งเสริมให้การพัฒนาของอาการโรคเกิดมากอย่างชัดเจน (figure 5) โรคเหี่ยวของต้นโหระพาที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* พบจำนวน 1 ไอโซเลท (ตัวอย่าง) จาก อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี เปอร์เซ็นต์ความเสียหายที่พบในแปลงปลูกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

โรคเหี่ยวของโหระพา มีรายงานการพบโรคนี้ครั้งแรกที่ สหรัฐอเมริกา ในปี 1991 จากนั้นได้มีการพบโรคนี้กับพืชตระกูลกระเพราโหระพา ได้ทั่วไปใน แคนาดา และสหรัฐอเมริกา คาดว่าโรคนี้ได้แพร่ไปทั่วอเมริกาเหนือเนื่องจากติดมากับเมล็ดพันธุ์ที่นำมาจากประเทศอิตาลี เชื้อราฟิวซาเรียมที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยว และตายของพืชตระกูลกระเพราโหระพา คือเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

f. sp. *basilicum* เชื้อราแพร่กระจายโดยผ่านทางเมล็ดที่ติดเชื้อ และเชื้อที่อยู่อาศัยในดินมาหลายปี เชื้อราเข้าทำลายท่อลำเลียงน้ำในลำต้นพืช แล้วขวางกั้นการดูดน้ำขึ้นสู่ต้นพืช ทำให้ใบพืชเหี่ยวอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการขาดน้ำ ลักษณะอาการที่พบโดยทั่วไปคือ พบรอยเส้นขีดสีน้ำตาลอ่อน ที่โคนต้น (http://www.pestnet.org/fact_sheets/ginger_fusarium_yellows_292.htm)

3. โรคเหี่ยวของผักชี (*Coriander, Coriandrum sativum* L.)

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum*

ลักษณะอาการ: อาการของโรคเริ่มต้นจาก ส่วนยอดของต้นเริ่มแสดงอาการ แล้วใบเหลือง จากนั้นก็จะเหี่ยวเป็นสีน้ำตาล อาการเหี่ยวเริ่มจากส่วนยอดของต้นลงมา จากนั้นอาการเนื้อเยื่อท่อลำเลียงน้ำเป็นสีน้ำตาลเริ่มพบเห็นชัดเจนบริเวณส่วนโคนต้น และรากเน่าเสียหายเป็นสีน้ำตาลดำ อาการโรคเหี่ยวที่รุนแรงทำให้ต้นพืชแสดงอาการเหี่ยวแห้ง และยืนต้นตายไปในที่สุด สภาพแวดล้อมที่ อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์สูง เป็นสิ่งส่งเสริมให้การพัฒนาของอาการโรคเกิดมากอย่างชัดเจน (figure 6) โรคเหี่ยวของผักชี พบที่ อ.เมือง จ.นครราชสีมาจำนวน 1 ไอโซเลท (ตัวอย่าง) เปอร์เซ็นต์ความเสียหายที่พบในแปลงปลูกประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

มีรายงานการพบโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อราฟิวซาเรียมครั้งแรก ในรัฐแคลิฟอร์เนีย สหรัฐอเมริกา เมื่อปี 2005 ผักชีหรือผักชี (*Coriandrum sativum*) เป็นผักใบใน Apiaceae และปลูกในเชิงพาณิชย์ในแคลิฟอร์เนียเป็นหลักสำหรับใช้เป็นสมุนไพรสด ในช่วงปี 2002 -2003 ในชายฝั่งแคลิฟอร์เนีย (เขตซานต้าบาร์บารา) พุ่มผักชีเชิงพาณิชย์แสดงอาการของโรคเหี่ยว มีผลกระทบทำให้เจริญเติบโตช้า และมีลักษณะแคระแกรน ใบที่อยู่ด้านล่างของต้นกลายเป็นสีเหลืองถึงน้ำตาลแดง และใบพืชเหี่ยวเฉามากในช่วงกลางวันที่ร้อนจัด โคนลำต้นจนถึงส่วนปลายราก แสดงอาการท่อลำเลียงน้ำเป็นสีน้ำตาลอ่อน ถึงน้ำตาลแดง เมื่ออาการโรคเกิดรุนแรงมากขึ้น พืชก็ตายในที่สุด (Koike, S.T., 2005)

4. โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ (*Tomato, Lycopersicon esculentum* Mill.)

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum* (could be *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)).

การจัดกลุ่มในระดับ race ของเชื้อรากลุ่ม formae specialis นี้ ในประเทศไทย ผู้วิจัยได้เริ่มวางแผนเพื่อดำเนินการศึกษาแล้วเนื่องจากยังขาดความกระจ่างชัดเจนของกลุ่ม race ของเชื้อรา *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวในประเทศไทย

ลักษณะอาการ: ส่วนใหญ่อาการของโรคมักจะพบในระยะที่ต้นมะเขือเทศเจริญเต็มที่ ช่วงหลังออกดอกและเริ่มสร้างผล อาการเริ่มแรกของโรคคือใบที่อยู่ด้านล่างของลำต้นเริ่มเหลือง และยอดเริ่มเหี่ยว อาการเหลืองของใบจะเริ่มที่เนื้อเยื่อบางส่วนของใบ ต่อมาเมื่ออาการลุกลามอาการเหลืองเหี่ยวจะเกิดขึ้นทั่วทั้งพื้นที่ใบ การพัฒนาของอาการโรคจะเริ่มจากบางส่วนของต้นพืชก่อน จากนั้นอาการเหี่ยวเหลืองกระจายไปทั่วทั้งต้น ต้นมะเขือเทศมักยืนต้นตายก่อนที่จะสร้างดอกและสร้างผลอย่างสมบูรณ์ ความเสียหายของโรคเหี่ยวนี้พบได้ทั่วไปในพื้นที่ปลูกมะเขือเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่ปลูกมะเขือเทศขนาดใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งพื้นที่ดังกล่าวเป็น

พื้นปลูกมะเขือเทศเพื่อจำหน่ายผลสด และผลิตเมล็ดพันธุ์ของมะเขือเทศเพื่อจำหน่ายเป็นการค้าไปยังแหล่งปลูกมะเขือเทศพื้นที่อื่น ๆ ของประเทศ จาก อ.อุทอง จ.สุพรรณบุรี และ อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี แยกเชื้อบริสุทธิ์ (figure 7)

5. โรคเหี่ยวของถั่วลันเตา (Green pea, *Pisum sativum* L.)

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum*

ลักษณะอาการ: อาการของโรคเริ่มต้นจากสีเขียวของใบจางกว่าใบของต้นปกติ และเหี่ยวจากส่วนยอดของต้น จากนั้นอาการเนื้อเยื่อที่ลำเลียงน้ำเป็นสีน้ำตาลจะเริ่มพบเห็นชัดเจน บริเวณส่วนโคนต้น อาการโรคเหี่ยวที่รุนแรงทำให้ต้นพืชแสดงอาการเหลือง จากนั้นเหี่ยวแห้ง และยืนต้นตายไปในที่สุด สภาพแวดล้อมที่ อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์สูง เป็นสิ่งส่งเสริมให้การพัฒนาของอาการโรคเกิดมาอย่างชัดเจน อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ แยกเชื้อบริสุทธิ์ ได้ (figure 8)

6. โรคเหี่ยวของพริก (Chilli and Pepper; *Capsicum annum* L.)

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum*

ลักษณะอาการ: อาการของโรคเริ่มต้นจากสีเขียวของใบจางกว่าใบของต้นปกติ และเหี่ยวจากส่วนยอดของต้น จากนั้นอาการเนื้อเยื่อที่ลำเลียงน้ำเป็นสีน้ำตาลจะเริ่มพบเห็นชัดเจน บริเวณส่วนโคนต้น อาการโรคเหี่ยวที่รุนแรงทำให้ต้นพืชแสดงอาการเหลือง จากนั้นเหี่ยวแห้ง และยืนต้นตายไปในที่สุด สภาพแวดล้อมที่ อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์สูง เป็นสิ่งส่งเสริมให้การพัฒนาของอาการโรคเกิดมาอย่างชัดเจน ที่ อ.เมือง จ.สุโขทัย อ.เชียงใหม่ จ.เชียงราย และ อ.ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย แยกเชื้อราได้เชื้อรา *F. oxysporum* 3 ไอโซเลท (figure 9)

7. โรคเหี่ยวของยาสูบ (Tobacco, *Nicotiana tabacum*)

เชื้อราสาเหตุ: *F. oxysporum*.

ลักษณะอาการ: เชื้อราเมื่อเข้าสู่พืชจะทำให้พืชเกิดอาการใบส่วนที่อยู่ด้านล่างของลำต้นเหลืองและเหี่ยวแห้งตาย ลักษณะอาการที่เด่นชัดของโรคเหี่ยวยาสูบคือ มักพบอาการต้นเหี่ยวด้านใดด้านหนึ่งของต้นก่อน บางครั้งใบของต้นที่เป็นโรคอาจยังไม่เหี่ยว แต่ก็มักแสดงอาการแกรนอย่างชัดเจน เมื่ออาการเหี่ยวพัฒนาขึ้นยอดจะเหี่ยวและโน้มงอลง ใบยอดเหลืองและเหี่ยวในที่สุดที่ลำเลียงในลำต้นด้านที่แสดงอาการเหี่ยวมักเน่าเป็นสีน้ำตาลตลอดทางยาวของระบบท่อลำเลียงอาการท่อลำเลียงเน่าตายนี้สามารถพบได้บนเส้นใบและรากของต้นที่เป็นโรคด้วย (figure 10)

8. โรคเหี่ยวของเบญจมาศ (*Chrysanthemum, Chrysanthemum morifolium*)

เชื้อราสาเหตุ: *F. oxysporum*.

ลักษณะอาการ: อาการเริ่มแรกพบใบเหลืองเหี่ยว หรือบางครั้งอาจจะเหี่ยวโดยที่ยังเขียวอยู่ ต้นแกรน และส่วนของต้นด้านใดด้านหนึ่งเหี่ยวและลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ บางครั้งอาการเหี่ยวเกิดขึ้นคล้ายต้นพืชขาดน้ำ แต่ในที่สุดก็เหี่ยวไม่ฟื้น และต้นแห้งตายในที่สุด เนื้อเยื่อภายในท่อลำเลียงของต้นที่เป็นโรคมักเน่าเป็นสีน้ำตาลตลอดแนวยาวของท่อ โดยปกติเชื้อราสามารถแพร่กระจายได้โดยติดไปกับดิน และยอดที่นำไปขยายพันธุ์ เชื้อสาเหตุของโรคเจริญและแพร่กระจายได้ดีในสภาพที่อากาศอบอุ่น มีความชื้นในอากาศสูง การให้น้ำมากหรือต้นแช่น้ำในแปลงปลูกที่ระบบการระบายน้ำไม่ดี การเตรียมหรืออบไอร้อนฆ่าเชื้อในวัสดุปลูกเป็นสิ่งที่ช่วยไม่ให้เกิดโรคหรือแพร่กระจายของโรคได้วิธีหนึ่ง (figure 11)

9. โรคเหี่ยวของผักหวานบ้าน (Pak Wan Ban, Sweet leaf ; *Sauropus androgynus*)

เชื้อราสาเหตุ : *F. oxysporum* จากการศึกษาความสามารถในการก่อให้เกิดโรค พบความชัดเจนว่า เชื้อราชนิดนี้เป็นสาเหตุที่แท้จริงของโรคเหี่ยวที่เกิดกับผักหวานบ้าน และขณะนี้อยู่ระหว่างการศึกษาระบาดวิทยาและการแพร่กระจายและความรุนแรงของเชื้อราที่ทำให้เกิดอาการของโรคกับต้นผักหวานบ้านในจังหวัดอุบลราชธานี

ลักษณะอาการ: อาการของโรคมักพบในระยะที่ต้นผักหวานบ้านเป็นต้นกล้าตั้งแต่ต้นเล็กที่เกิดจากการปักชำ อาการเริ่มแรกของโรคคือใบที่อยู่ด้านล่างของลำต้นเริ่มเหลือง ที่เนื้อเยื่อบางส่วนของใบ ต่อมาเมื่ออาการลุกลามอาการเหลืองเหี่ยวจะเกิดขึ้นทั่วทั้งพื้นที่ใบ และร่วงหล่น การพัฒนาของอาการโรคจะเริ่มจากบางส่วนของต้นพืชก่อน จากนั้นอาการเหี่ยวเหลืองกระจายไปทั่วทั้งต้น ต้นผักหวานบ้านเมื่อใบร่วงเกือบหมด มักเหี่ยวแล้วยืนต้นตาย ความเสียหายของโรคเหี่ยวนี้พบได้ทั่วไปในพื้นที่ปลูกผักหวานบ้าน โดยเฉพาะแปลงเพาะชำต้นผักหวานบ้าน เมื่ออาการของโรครุนแรงมากขึ้น โคนต้นจะปริแตก เนื้อเยื่อที่ออลำเสี้ยนเน่าเป็นสีน้ำตาลตามความยาวของท่อน จากโคนต้นด้านล่างสุดขึ้นไปสู่ส่วนที่อยู่ยอดเรื่อย ๆ (figure 12)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การรวบรวมและเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคเหี่ยวที่คาดว่ามีความเสียหายจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในพื้นที่เพาะปลูกพืชตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – กันยายน 2562 เมื่อนำตัวอย่างพืชเป็นโรคมานำแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potaro Dextrose Agar) และแยกเชื้อราบนวัสดุอาหาร WA (Water Agar) แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคโดยวิธีการ Koch's postulate รวมทั้งศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่เจริญบนอาหาร CLA (Corn Leaf Agar) และการทำ Slide Culture ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สามารถจัดจำแนกได้เป็นเชื้อรา *F.oxysporum* จำนวน 60 ไอโซเลท จากอาการโรคเหี่ยวของพืช 9 ชนิด ได้แก่ โรคเหี่ยวของกล้วย (โรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า และกล้วยไข่) โรคเหี่ยวของโหระพา โรคเหี่ยวของผักชี โรคเหี่ยวของพริก โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ โรคเหี่ยวของเบญจมาศ โรคเหี่ยวของยาสูบ โรคเหี่ยวของถั่วลิสนเตา และ โรคเหี่ยวของผักหวานบ้าน จาก 17 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี, จันทบุรี, เชียงใหม่, เชียงราย, นครพนม, นครราชสีมา, บึงกาฬ, พิษณุโลก, มุกดาหาร, ลำพูน, เลย, หนองคาย, สุโขทัย, สุพรรณบุรี, สงขลา, อุตรดิตถ์ และอุบลราชธานี เมื่อประเมินการเกิดโรคในพื้นที่ที่พบโรคตายพราย (Panama disease) พบว่า โดยเฉลี่ยจำนวนต้นที่พบโรคคือ 5-10 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคตายพราย (panams disease) ของกล้วยไข่ พบว่า มีต้นกล้วยไข่เป็นโรคประมาณ 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของถั่วลิสนเตา พบว่า เป็นโรคประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของเบญจมาศ พบว่า เป็นโรคประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของผักชี พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของผักหวานบ้าน พบว่า เป็นโรคประมาณ 15 - 20 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของพริก พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ โรคเหี่ยวของยาสูบ พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ และโรคเหี่ยวของโหระพา พบว่า เป็นโรคประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ที่สำรวจ

แม้ในงานวิจัยนี้ ได้สำรวจพบโรคเหี่ยวของพืช ที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* ในประเทศไทยเพียงไม่กี่ชนิดของฟอร์มสปีชีส์ (*formae speciales*; f. sp.) แต่ในปัจจุบัน จากการค้นเอกสาร

ข้อมูลเกี่ยวกับ *F. oxysporum* พบว่า得有มีรายงานในต่างประเทศทั่วโลกกว่าพบโรคเหี่ยวของพืชต่าง ๆ ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* ที่แตกต่างกันชนิดของฟอร์มสปีชีส์ (formae speciales; f. sp.) โดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของพืชอาศัย (kinds and varieties of hosts) ได้ถึง 58 ฟอร์มสปีชีส์ (formae speciales) ดังนี้ *F. oxysporum* f. sp. *basilicum* โรคเหี่ยวของพืชตระกูลกระเพรา โหระพา (basil and sweet basil), *F. oxysporum* f. sp. *narcissi* โรคหัวเน่าของดอกนาร์ซิสซัส (narcissus) หรือดอกแดฟโฟดิล (daffodil), *F. oxysporum* f. sp. *cubense* โรคตายพรายของกล้วยและเฮลิโคเนีย (bananas and heliconia), *F. oxysporum* f. sp. *melonis* โรคเหี่ยวของแตง (melon), *F. oxysporum* f. sp. *erythroxyli* โรคเหี่ยวของโคคา (coca), *F. oxysporum* f. sp. *betae* โรคเหี่ยวเหลืองของต้นบีท หรือชูการ์บีท (sugar beet), *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* โรคเหี่ยวของคาโนลา หรือผักกาดคาโนลา (canola), *F. oxysporum* f. sp. *corianderii* โรคเหี่ยวของผักชี (coriander), *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* โรคเหี่ยวของต้นดอกผีเสื้อ (dianthus), *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* โรคโคนและรากเน่าของมะเขือเทศ (tomato), *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* โรครากและลำต้นเน่าของแตงกวา (cucumber), *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* โรคเหี่ยวของเบญจมาศ (chrysanthemum), *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* โรคเหี่ยวของผักกาดหอม (lettuce), *F. oxysporum* f. sp. *apii* โรคเหี่ยวของคื่นฉ่าย (celery), *F. oxysporum* f. sp. *niveum* โรคเหี่ยวของแตงโม (watermelon), *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* โรคเหี่ยวของฝ้าย (cotton), *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* โรคเหี่ยวของถั่วลูกไก่ (chickpea), *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* โรคเหี่ยวดอกไซคลาเมน (cyclamen), *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ (tomato), *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* โรคเหี่ยวของถั่ว (bean), *F. oxysporum* f. sp. *batatas* โรคเหี่ยวของมันเทศ (sweet potato), *F. oxysporum* f. sp. *nicotianae* โรคเหี่ยวของยาสูบ (tobacco), *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* โรคเหี่ยวของแตงกวา (*Cucumis sativus*), *F. oxysporum* f. sp. *cepaе* โรคเหี่ยวของหอม (onion), *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* โรคเหี่ยวของอินทผลัม (date palm), *F. oxysporum* f. sp. *callistephi* โรคเหี่ยวของแอสเตอร์ (aster), *F. oxysporum* f. sp. *cannabis* โรคเหี่ยวของกัญชา (hemp), *F. oxysporum* f. sp. *carthami* โรคเหี่ยวของดอกคำฝอย (safflower), *F. oxysporum* f. sp. *citri* โรคเหี่ยวของส้ม, พืชตระกูลส้ม (citrus), *F. oxysporum* f. sp. *coffeaе* โรคเหี่ยวของกาแฟ (coffee), *F. oxysporum* f. sp. *cumini* โรคเหี่ยวของยี่ห่วย (cumin), *F. oxysporum* f. sp. *elaeidis* โรคเหี่ยวของปาล์มน้ำมัน (oil palm), *F. oxysporum* f. sp. *fabae* โรคเหี่ยวของถั่วปากอ้า (broad bean; faba), *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* โรคเหี่ยวของสตรอเบอร์รี่ (strawberry), *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* โรคเหี่ยวของแกลดีโอลัส (gladiolus), *F. oxysporum* f. sp. *glycines* โรคเหี่ยวของถั่วเหลือง (glycine or soybean), *F. oxysporum* f. sp. *heliotropae* โรคเหี่ยวของเฮลิโอโทรปี (heliotrope), *F. oxysporum* f. sp. *lagenariae* โรคเหี่ยวของน้ำเต้า (bottle gourd), *F. oxysporum* f. sp. *lentis* โรคเหี่ยวของถั่วเลนทิล (lentil), *F. oxysporum* f. sp. *lili* โรคเหี่ยวของลิลี่ (lily), *F. oxysporum* f. sp. *lini* โรคเหี่ยวของป่านลินิน (flax), *F. oxysporum* f. sp. *lupine* โรคเหี่ยวของลูพิน (lupin), *F. oxysporum* f. sp. *medicagiris* โรคเหี่ยวของถั่วอัลฟัลฟา (alfalfa), *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* โรคเหี่ยวของมะเขือม่วง (eggplant), *F. oxysporum* f. sp. *orthoceras* โรคเหี่ยวของพืชวงศ์ดาวดิน (broomrape; *Orobanchе spp.*), *F. oxysporum* f. sp.

passiflorae โรคเหี่ยวหรือโรคโคนเน่าของแพสชันฟรุต (passion fruit), *F. oxysporum* f. sp. *pisi* โรคเหี่ยวถั่วลันเตา (green pea; pea), *F. oxysporum* f. sp. *psidii* โรคเหี่ยวของฝรั่ง (guava), *F. oxysporum* f. sp. *ranunculi* โรคเหี่ยวของต้นดอกบัตเตอร์คัพ (buttercups, spearworts, and water crowfoots), *F. oxysporum* f. sp. *raphani* โรคเหี่ยวของแรดิช (radish), *F. oxysporum* f. sp. *seasmi* โรคเหี่ยวของงา (sesame), *F. oxysporum* f. sp. *spinaciae* โรคเหี่ยวของผักโขม (spinach), *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* โรคเหี่ยวของถั่วพุ่ม (cowpea), *F. oxysporum* f. sp. *tuberosae* โรคเหี่ยวของช่อนกลั่นไทย (tuberosae), *F. oxysporum* f. sp. *udum* โรคเหี่ยวของถั่วมะแฮะ (pigeon pea), *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* โรคเหี่ยวของวานิลลา (vanilla) และ *F. oxysporum* f. sp. *zingiberi* โรคเหี่ยวของขิง (ginger) (http://www.pestnet.org/fact_sheets/ginger_fusarium_yellows_292.htm) หรืออาจจะมีมากกว่านี้ หากมีรายงานการพบใหม่เรื่อย ๆ

เอกสารอ้างอิง

- พัฒนา สนธิรัตน์, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ และวิรัช ชูบำรุง. 2529. รวบรวมและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium* ในดินจากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจของเกษตรกร. รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2529 กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- อภิรัชต์ สมฤทธิ์. 2544. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* สาเหตุโรคตายพรายของกล้วยในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 133 หน้า.
- Barron, G.L. 1977. The Genera of Hyphomycetes from Soil. 3rd ed. Noble offset printers, Inc., New York. 364 p.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. C.M.I., Kew, Surrey, England. 237 p.
- Brayford, L. R. 1985. The genus *Fusarium*. C.M.I. International course on the identification of fungi and bacteria of agriculture importance. 4 p.
- Bruto, B. D., and J. A. Duthie. 2006. Fusarium rot. <http://www.apsnet.org/online/feature/pumpkin/fusrot.html>.
- Domsch, K.H., W. Gams, and T.H. Anderson. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London. 859 p.
- Gravesen, S., J. C. Frisvad and R. A. Samson. 1994. Microfungi, 1st ed. Munksgaard. 168 p.
- Koike, S.T. 2005. First Report of Fusarium Wilt of Cilantro Caused by *Fusarium oxysporum* in California. The American Phytopathological Society. 89 (10);1,130.1 - 1,130.1. <https://www2.ipm.ucanr.edu/agriculture/cilantro-and-parsley/Fusarium-Wilt/>
- Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. H. O. Marasas. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London. 193 p.

- Ploetz, R.C., A. Vazquez, J. Nagel, D. Benscher, P. Sianglew, S. Srikul, S. Kooariyakul, W. Wattanachaicharoen, P. Lertrat and D. Wattanachaicharoen. 1996. Current status of Panama disease in Thailand. *Fruits*. 51(6): 387-395.
- Punja, Z.K., M. Parker, and J.F. Elmhirst. 2001. *Fusarium* wilt of field-grown muskmelon in British Columbia. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 403-410.

Table 1 Sixty isolates of pathogenic *F. oxysporum* were collected from the fields, classified by morphology and preserved in the fungal pathogen culture collection laboratory, Mycology Working Group, Plant Disease Research Group, Plant Protection Research and Development Office , Department of Agriculture

No. of Isolate	Species (and formae speciales; f. sp.)	Host	Disease/Symptom	Collected location (Province/ District)	Severity percentage in average (%)
1-3	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Kanchanaburi/ Sai Yok (3 isolates)	5 -10
4-8	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Chiang Mai/ Chiang Dao (1 isolate), Muang (1 isolate), Mae Rim (2	5 -10

9-13	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	isolates), Samoeng (1 isolate) Chiang Rai/ Chiang Khong (1 isolate), Chiang Saen (1 isolate), Mae Sai (2 isolates), Phaya Mengrai (1 isolate)	10-15
14-16	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Nakorn Phanom/ Tha Uthen (3 isolates)	5 -10
17	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Nakorn Rachasima/ Pak Chong (1 isolates)	10
18	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Bueng Kan/ Bueng Khong Long (1 isolate)	10
19	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Lam Phun/ Muang (1 isolate)	10

Table 1 Sixty isolates of pathogenic *F. oxysporum* were collected from the fields, classified by morphology and preserved in the fungal pathogen culture collection laboratory, Mycology Working Group, Plant Disease Research Group, Plant Protection Research and Development Office , Department of Agriculture (continue)

No. of Isolate	Species (and formae speciales; f. sp.)	Host	Disease/ Symptom	Collected Location (Province/ District)	Severity percentage in average (%)
20-21	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Suphan Buri/ Si Prachan (2 isolates)	5 -10
22-23	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	SongKhla/ Had Yai (2 isolates)	5 -10

24-28	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Phitsanulok/ Bang Krathum (5 isolates)	10- 20
29-31	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Sukhothai/ Si Samrong (3 isolates)	5 -10
32	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Mukdahan/ Muang (1 isolate)	5 -10
33-42	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Loei/ Chaing Khan (4 isoltes), Dan Sai (3 isoltes), Phu Ruea (3 isolates)	10-20
43-45	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i>	Kluai Nam Wa (ABB)	Panama disease/ wilt	Udon Thani/ Na Yung (3 isoltes)	10-20
46-48	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i>	Kluai Khai (Lady Finger; AA)	Panama disease/ wilt	Chanthaburi/ Khlung (3 isoltes)	30-40
49	<i>F. oxysporum</i>	Green pea	Wilt	Chiang Mai/ San Sai (1 isolate)	20

Table 1 Sixty isolates of pathogenic *F. oxysporum* were collected from the fields, classified by morphology and preserved in the fungal pathogen culture collection laboratory, Mycology Working Group, Plant Disease Research Group, Plant Protection Research and Development Office , Department of Agriculture (continue)

No. of Isolate	Species (and formae speciales; f. sp.)	Host	Disease/ Symptom	Collected Location (Province/ District)	Severity percentage in average (%)
50	<i>F. oxysporum</i>	Chrysanthemum	Wilt	Chiang Mai/ Chom Thong (1 isolate)	10
51	<i>F. oxysporum</i>	Coriander	Wilt	Nakorn Rachasima/ Muang (1 isolate)	5

52-53	<i>F. oxysporum</i>	Pak Wan Ban, Sweet leaf	Wilt	Ubon Rachathani/ Sawang Wirawong (2 isolates)	10-15
54	<i>F. oxysporum</i>	Chilli	Wilt	Sukhothai/ Si Samrong (1 isolate)	5
55	<i>F. oxysporum</i>	Chilli	Wilt	Chiang Rai/ Chiang Saen (1 isolate)	5
56	<i>F. oxysporum</i>	Chilli	wilt	Nong Khai/ Sri Chiang Mai (1 isolate)	5
57	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomato	Wilt	Suphan Buri/ U Thong (1 isolate)	5
58	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Tomato	wilt	Kanchanaburi/ Sai Yok (1 isolate)	5
59	<i>F. oxysporum</i>	Tobacco	Wilt	Chiang Mai/ Mae Tang (1 isolate)	5
60	<i>F. oxysporum</i>	Basil	Wilt	Kanchanaburi/ Tha Muang (1 isolate)	5
Totals				60 isolates	

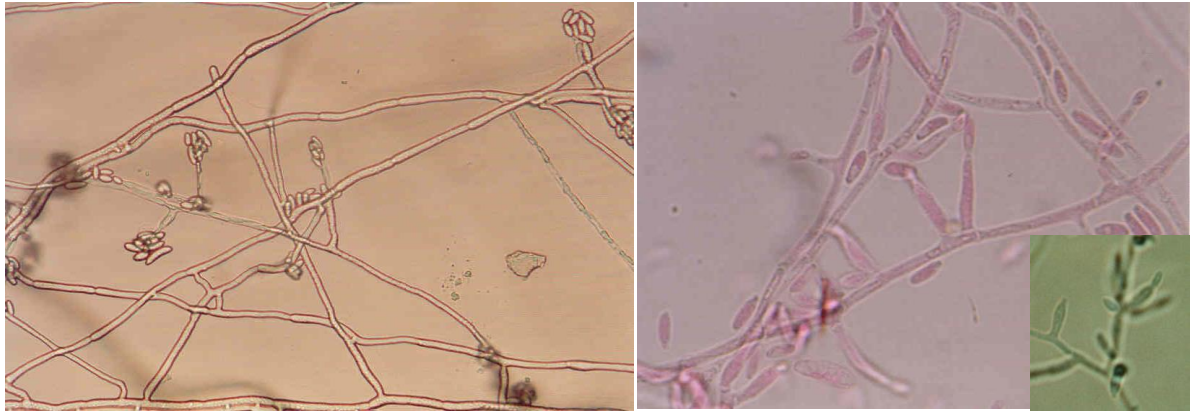


โคโลนีบน PDA เชื้อรา *F. oxysporum*
สาเหตุโรครดตายพรวายของกล้วยน้ำว้า

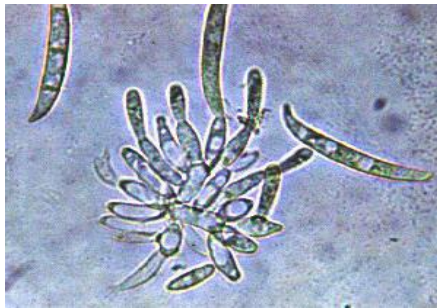
โคโลนีบน PDA เชื้อรา
F. oxysporum สาเหตุ
โรคเหี่ยวของโหลระหา

โคโลนีบน PDA เชื้อรา
F. oxysporum สาเหตุ
โรคเหี่ยวของผักชี

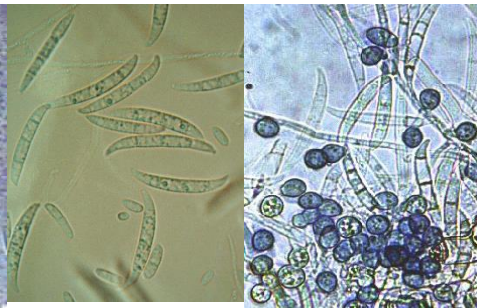
Figure 1 Colony Characteristic of *F. oxysporum* isolates on PDA



Monophialides สร้าง microconidia เป็นกลุ่มแบบ false heads.



Monophialides สร้าง macroconidia



Chlamydospores



Culture บนอาหาร PDA

Figure 2 Morphology of *F. oxysporum* Schlecht ex Fries, emend. Snyder & Hansen



โรคตายพรายหรือโรคปานามา (Panama disease) ของกล้วยน้ำว้า

Figure 3 Symptom of Panama disease in Kluai Nam Wa (ABB) caused by *F. oxysporum* f.sp. *cubense*



Figure 4 Symptom of Panama disease in Kluai Khai (lady finger; AA) caused by *F. oxysporum* f.sp. *cubense*



Figure 5 Symptom of Wilt disease in basil caused by *F. oxysporum*



Figure 6 Symptom of Wilt disease in coriander caused by *F. oxysporum*



Figure 7 Symptom of Wilt disease in tomato caused by *F. oxysporum* (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*)



Figure 8 Symptom of Wilt disease in green pea caused by *F. oxysporum*



Figure 9 Symptom of Wilt disease in chilli caused by *F. oxysporum*



Figure 10 Symptom of Wilt disease in tobacco caused by *F. oxysporum*



Figure 11 Symptom of Wilt disease in chrysanthemum caused by *F. oxysporum*



Figure 12 Symptom of Wilt disease in Pak Wan Ban (Sweet leaf; *Sauropus androgynus*) caused by *F. oxysporum*

อนุกรมวิธานของแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ในประเทศไทย
Taxonomy of Green Lacewings (Family Chrysopidae) in Thailand

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

Abstract

This study on taxonomy of green lacewings (Family Chrysopidae) is based on collections from plantation areas in all parts of Thailand between October 2017 – September 2019, and examination of specimens in the Insect Museum, Department of Agriculture. As a result, 8 species of green lacewings were identified in 2 subfamilies and 4 tribes: *Nobelinus albardae* (MacLachlan, 1875), *Ankylopteryx octopunctata* (Fabricius, 1793), *Ankylopteryx anomala* Brauer, 1864, *Evanochrysa evanescens* (MacLachlan, 1869), *Italochrysa aequalis* (Walker, 1853), *Italochrysa japonica* (MacLachlan, 1875), *Mallada basalis* (Walker, 1853) and *Plesiochrysa ramburi* (Schneider, 1851). Three species, *A. anomala*, *M. basalis* and *P. ramburi*, can be found in all parts of Thailand. *M. basalis* and *P. ramburi* are agriculturally important species which can be used in biological pest control, especially to control pests with sucking-mouthparts nowadays.

บทคัดย่อ

การศึกษานุกรมวิธานของแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae โดยการสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 และจากตัวอย่างแมลงข้างปีกใส ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถวินิจฉัยได้จำนวน 8 ชนิด ใน 2 วงศ์ย่อย และ 4 เผ่า คือ *Nobelinus albardae* (MacLachlan, 1875) *Ankylopteryx octopunctata* (Fabricius, 1793) *Ankylopteryx anomala* Brauer, 1864 *Evanochrysa evanescens* (MacLachlan, 1869) *Italochrysa aequalis* (Walker, 1853) *Italochrysa japonica* (MacLachlan, 1875) *Mallada basalis* (Walker, 1853) และ *Plesiochrysa ramburi* (Schneider, 1851) โดยชนิดที่สามารถพบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย มีจำนวน 3 ชนิด คือ *A. anomala*, *M. basalis* และ *P. ramburi* ทั้งนี้ชนิด *M. basalis* และ *P. ramburi* มีความสำคัญทางการเกษตร โดยนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปากดูด ในปัจจุบัน

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-10-60

คำนำ

แมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae เป็นแมลงขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ลำตัวเรียวยาวและบอบบาง หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) มีตา รวม 1 คู่ มักมีสีเหลืองทอง ไม่มีตาเดี่ยว ปากกัดกินแบบ orthognathous ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมักมีสีเขียวอ่อน ขาเป็นแบบขาเดิน (walking leg) มีจำนวน 3 คู่ ปีกมี 2 คู่ แบบเยื่อบาง (membranous) (คานิต, 2550; ไสว, 2544) แมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดและมีจำนวนชนิดมากที่สุดในอันดับ Neuroptera โดยมีสมาชิกในวงศ์นี้ทั่วโลกประมาณ 1,250 ชนิด ซึ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบประมาณ 105 ชนิด (Brooks & Barnard, 1990; New, 2003)

แมลงข้างปีกใสหลายชนิดเป็นศัตรูธรรมชาติของศัตรูพืชที่มีความสำคัญ โดยตัวอ่อนเป็นแมลงตัวห้ำของแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะแมลงปากดูด ได้แก่ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยแป้ง และแมลงหวี่ขาว เป็นต้น ในปัจจุบันมีการนำแมลงข้างปีกใสบางชนิดมาใช้ควบคุมการระบาดของแมลงศัตรูพืชปากดูดที่ทำความเสียหายพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ได้ผลการป้องกันกำจัดที่ดี โดยเฉพาะในสวนไม้ผล รวมถึงพืชไร่หลายชนิด (พิมลพร และคณะ, 2544; พิมลพร, 2545; รัตนา, 2544; รัตนา และประภัสสร, 2554)

เนื่องจากการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี มีความสำคัญมากในการอารักขาพืชผลทางการเกษตร โดยเฉพาะในประเทศไทย ดังนั้น การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ในประเทศไทยนี้จึงมีความสำคัญที่ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐาน และทราบชนิดของแมลงข้างปีกใสที่อาศัยในระบบนิเวศเกษตรของประเทศไทย เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี หรือคัดเลือกชนิดแมลงข้างปีกใสชนิดใหม่ๆ จากธรรมชาติของประเทศไทย มาใช้ควบคุมการระบาดของแมลงศัตรูพืชได้ดียิ่งขึ้น ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- 1) ตัวอย่างแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ที่รวบรวมได้จากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจ และตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร
- 2) อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ขวดฆ่า ขวดดอง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ซองกระดาษใส่ตัวอย่างแมลง ถังรักษาความเย็นและเครื่องวัดค่าพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS)
- 3) สารเคมีต่างที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง เช่น เอทิลอะซีเตท แอลกอฮอล์ 80%
- 4) อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง ได้แก่ เข็มไร้สนิม เข็มหมุดหัวกลม ไม้จัดรูปร่างแมลง ปากคีบ โหลขึ้น ตู้อบแมลง ฯลฯ
- 5) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น น้ำกลั่น Ethyl alcohol 50 - 100%, sodium hydroxide 10%, clove oil และ canabalsam เข็มเขี่ย แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล่องสไลด์ถาวร ตู้อบสไลด์ถาวร
- 6) กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope, Compound microscope และกล้องถ่ายภาพ
- 7) อุปกรณ์วาดภาพ ได้แก่ Camera lucida ปากกา rotting และกระดาษเขียนแบบ
- 8) เอกสารประกอบการจำแนกชนิดของแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ได้แก่ Brooks & Barnard (1990), New (1980: 2003) และ Winterton (1995)

วิธีการ

1) เก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae โดยสำรวจจากแหล่งปลูกพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ มันสำปะหลัง ข้าวโพด ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มะนาว เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ และพืชผักต่างๆ เป็นต้น

2) การเก็บตัวอย่างแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae แบ่งเป็น 3 วิธี ดังนี้

- การเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงโดยใช้สวิงจับแมลง (insect net) โฉบเพื่อเก็บตัวอย่างแมลงข้างปีกใสจากแปลงปลูกพืชในช่วงเวลากลางวัน ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า (killing jar) ซึ่งบรรจุน้ำยาเอทิล อะซิเตต (Ethyl acetate) หลังจากแมลงข้างปีกใสตายแล้ว เก็บลงในซองกระดาษสามเหลี่ยมแยกใส่ไว้ในกล่องใส่ตัวอย่างแมลง นำกล่องใส่ตัวอย่างใส่ไว้ในกล่องรักษาความเย็นอีกชั้นเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างเน่าเสีย

- การใช้กับดักแสงไฟ (light trap) ติดตั้งในแปลงเกษตร เพื่อดึงดูดแมลงข้างปีกใสในช่วงกลางคืน คัดเลือกแมลงข้างปีกใสที่ต้องการศึกษา ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่าซึ่งบรรจุน้ำยาเอทิล อะซิเตต และเก็บตัวอย่างโดยใช้ซองกระดาษสามเหลี่ยมเช่นเดียวกัน

- การสำรวจและเก็บตัวอย่างระยะตัวอ่อนแมลงข้างปีกใส โดยการเดินสุ่มสำรวจทั่วแปลงเก็บตัวอย่างแมลงข้างปีกใสทุกระยะใส่กล่องพลาสติกพร้อมเหยื่อศัตรูพืชที่พบ และส่วนของพืชที่พบ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการทั้งตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสและศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อ เพื่อศึกษาชีวประวัติ เปลี่ยนเหยื่ออาหารและทำความสะอาดกล่องเลี้ยงตัวอ่อนแมลงข้างปีกใสเมื่อกล่องเลี้ยงเริ่มสกปรก บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตโดยดูจากการลอกคราบของตัวอ่อนแต่ละระยะ บันทึกขนาด สี รูปร่าง หรือรายละเอียดอื่นๆ ที่สังเกตได้ เลี้ยงจนเป็นตัวเต็มวัยรอจนปีกและสีของตัวเต็มวัยพัฒนาเต็มที่จึง ฆ่าโดยใช้ขวดฆ่า นำตัวอย่างที่ได้ไปจัดรูปร่างเพื่อรอการจำแนกชนิด

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

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

5) การตรวจจำแนกวิเคราะห์ชนิด โดยใช้แนวทางการวินิจฉัยของ Brooks & Barnard (1990), New (1980: 2003) และ Winterton (1995) ดูลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo แล้วบันทึกรายละเอียดต่างๆ เช่น ขนาดลำตัว รูปร่าง ลักษณะ และสี ฯลฯ โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ด้วยการใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิด ประกอบกับการเปรียบเทียบตัวอย่างแมลงที่ได้จำแนกแล้วในพิพิธภัณฑ์ กรมวิชาการเกษตร สำหรับแมลงข้างปีกใสบางชนิดซึ่งมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกันมากจำเป็นต้องใช้อวัยวะสืบพันธุ์ประกอบในการจำแนก ซึ่งมีขั้นตอนการทำสไลด์อวัยวะสืบพันธุ์ดังนี้

- ตัดส่วนท้องของแมลงข้างปีกใสแช่ในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% ที่อุณหภูมิ 24 ชั่วโมง หรือต้มในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 – 20 นาที

- ดูดสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ออก เติมน้ำกลั่นเพื่อล้างโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ที่ยังหลงเหลืออยู่ออกให้หมด ทำซ้ำอีก 1-2 ครั้ง ย้อมสีด้วยเกจส์สแตน (Gage's stain) ซึ่งเป็นสารละลายของแอซิดฟuchsine 0.5 กรัม กรดเกลือ 10% 25 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้นาน 2 - 3 นาที หรือนานถึง 12 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวอย่างแมลงข้างปีกใสที่จะติดสีได้ง่ายหรือยาก

- ย้ายตัวอย่างลงในน้ำกลั่นเพื่อทำการผ่าเอาอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้อง ถ้าเป็นเพศผู้ใช้ปากคีบปลายแหลมดึงอวัยวะสืบพันธุ์ออกจากท้องปล้องสุดท้ายได้เลย แต่ถ้าเป็นเพศเมียใช้มีดผ่าตัดผ่าผนังลำตัวด้านข้างออกเพื่อป้องกันการเสียหายของอวัยวะสืบพันธุ์ใช้ปากคีบปลายแหลมค่อยๆ แยกผนังลำตัวออกจากอวัยวะสืบพันธุ์ จากนั้นใช้ฟู่กันเบอร์ 00 หรือเบอร์ 0 และทำความสะอาดไขมันส่วนเกินออกให้หมด

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

- ย้ายอวัยวะสืบพันธุ์ วางบนสไลด์ที่หยดน้ำยาคานาดา บาลซัม (canada balsam) แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์นำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50 °C นาน 4 - 6 สัปดาห์ จึงนำออกมาศึกษา

6) บันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาพร้อมทั้งถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound วาดรูปโดยใช้เครื่องมือ camera lucida บันทึกรายละเอียดบนแผ่นป้ายบันทึกของแมลงข้างปีกใสแต่ละตัว ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ที่จำแนกได้ ปีที่จำแนกชนิด ชื่อผู้จำแนกชนิด และรหัสกำกับตัวแมลง พิภพภูมิศาสตร์ สถานที่ วัน/เดือน/ปี ชื่อผู้เก็บพืชที่พบ ศัตรูพืชที่เป็นเหยื่อ และวิธีการเก็บตัวอย่าง

7) จัดทำแนวทางวินิจฉัย (key) สกุลและชนิดของแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ที่รวบรวมได้พร้อมภาพประกอบ

8) จัดเก็บตัวอย่างแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ทุกชนิดที่จำแนกเรียบร้อยแล้วไว้ในพิพิธภัณฑ์ โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของการเก็บรักษาตัวอย่างแมลง เพื่อการตรวจสอบ สืบค้น และอ้างอิงในภายหลัง

เวลาและสถานที่

1) แหล่งปลูกพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ มันสำปะหลัง ข้าวโพด ส้มโอ ส้มเขียวหวาน มะนาว เงาะ ลำไย ลิ้นจี่ และพืชผักต่างๆ เป็นต้น ตามภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากตัวอย่างแมลงข้างปีกใส ที่เก็บรวบรวมได้จากการสำรวจในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 และตัวอย่างแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถวินิจฉัยได้จำนวน 8 ชนิด ใน 2 วงศ์ย่อย และ 4 เผ่า

ทั้งนี้สามารถวินิจฉัยชนิด โดยใช้รูปวิธาน (key) ที่ปรับปรุงจากแนวทางการวินิจฉัยของ Brooks & Barnard (1990), New (1980: 2003) และ Winterton (1995) ดังนี้

1. ที่ฐานปีกคู่หน้าไม่พบเส้นขวางปีก basal subcostal crossvein (bsx) ปรากฏอยู่ (Figure 2) ในแต่ละปล้องหนวด มีกลุ่มของเส้นขนเรียงตัวเป็นวงรอบปล้องหนวด จำนวน 5 ชุด (Subfamily Apochrysinæ).....*Nobilinus albardae* (MacLachlan, 1875)
- 1'. ที่ฐานปีกคู่หน้าพบเส้นขวางปีก basal subcostal crossvein (bsx) ปรากฏอยู่ (Figure 1) ในแต่ละปล้องหนวด มีกลุ่มของเส้นขนเรียงตัวเป็นวงรอบปล้องหนวด จำนวน 4 ชุด..... (Subfamily Chrysopinae).....2
2. ที่บริเวณปลายปีกคู่หน้าพบเส้นขวางปีก ระหว่างเส้นปีก subcosta (Sc) และ radial vein ที่ 1 (R1) จำนวนไม่มากกว่า 2 เส้น ส่วนฐานของ costal area มักจะขยายกว้างออก (Figure 3,4) (Tribe Ankylopterygini).....3
- 2'. ที่บริเวณปลายปีกคู่หน้าพบเส้นขวางปีก ระหว่างเส้นปีก subcosta (Sc) และ radial vein ที่ 1 (R1) จำนวนมากกว่า 2 เส้น (Figure 1) ส่วนฐานของ costal area มักจะไม่ขยายกว้างออก4
3. ที่ฐานปีกพบ intramedian cell (im-cell) ปรากฏอยู่ (Figure 3).....*Ankylopteryx octopunctata* (Fabricius, 1793)
- 3'. ที่ฐานปีกไม่พบ intramedian cell (im-cell) ปรากฏอยู่ (Figure 4).....*Ankylopteryx anomala* Brauer, 1864
4. im-cell รูปสี่เหลี่ยม (Figure 5,6)..... (Tribe Belonopterygini).....5
- 4'. im-cell รูปสามเหลี่ยม (Figure 1,7,8) (Tribe Chrysopini).....7
5. im-cell มีความยาวสั้นกว่า 2nd median cell (m2-cell) (Figure 5).....*Evanochrysa evanescens* (MacLachlan, 1869)
- 5'. im-cell มีความยาวใกล้เคียงกับ 2nd median cell (m2-cell) (Figure 6).....6
6. มีแถบสีดำพาดทางด้านหลังและด้านล่างของส่วนท้องเป็นลายสลับเหลืองและดำ*Italochrysa japonica* (MacLachlan, 1875)
- 6'. ส่วนท้องไม่มีลวดลายสลับเหลืองและดำ*Italochrysa aequalis* (Walker, 1853)
7. มีแถบสีเหลืองพาดตามความยาวลำตัว จากอกปล้องแรกถึงปลายส่วนท้อง เห็นได้ชัดเจน เส้นขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด (og และ ig) และมีความยาวใกล้เคียงกัน (Figure 7) ตัวแมลงข้างมีขนาดค่อนข้างเล็ก*Mallada basalis* (Walker, 1853)

7'. ไม่มีแถบสีเหลืองพาดตามความยาวลำตัว เส้นขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด (og และ ig) และมีความยาวไม่เท่ากัน โดย inner gradate crossveins (ig) สั้นกว่า outer gradate crossveins (og) (Figure 8) ตัวแมลงข้างมีขนาดค่อนข้างใหญ่

***Plesiochrysa ramburi* (Schneider, 1851)**

โดยมีรายละเอียดของชนิดที่วินิจฉัยได้ ดังนี้

Order Neuroptera

Suborder Hemerobiiformia

Superfamily Hemerobioidea Latreille, 1802

Family Chrysopidae Schneider, 1851

Subfamily APOCHRYSINAE (Handlirsch, 1908)

Tribe APOCHRYSINI (Handlirsch, 1908)

Genus *Nobilinus* Navás, 1913

***Nobilinus albardae* (MacLachlan, 1875) (Figure 9.)**

Subfamily Chrysopinae Schneider, 1851

Tribe ANKYLOPTERYGINI Navás, 1910

Genus *Ankylopteryx* Brauer, 1864

Subgenus *Ankylopteryx* Brauer, 1864

***Ankylopteryx (Ankylopteryx) octopunctata* (Fabricius, 1793) (Figure 10.)**

Subgenus *Sencera* Navás, 1925

***Ankylopteryx (Sencera) anomala* Brauer, 1864 (Figure 11.)**

Tribe Belonopterygini Navás, 1913

Genus *Evanochrysa* Brooks & Barnard, 1990

***Evanochrysa evanescens* (MacLachlan, 1869) (Figure 12.)**

Genus *Italochrysa* Principi, 1946

***Italochrysa aequalis* (Walker, 1853) (Figure 13.)**

***Italochrysa japonica* (MacLachlan, 1875) (Figure 14.)**

Tribe Chrysopini Schneider, 1851

Genus *Mallada* Navás, [1925]

***Mallada basalis* (Walker, 1853) (Figure 15.)**

Genus *Plesiochrysa* Adams, 1982

***Plesiochrysa ramburi* (Schneider, 1851) (Figure 16.)**

1. *Nobilinus albardae* (MacLachlan, 1875) (Figure 9.)

Apochrysa albardae MacLachlan, 1875: *Tijdschrift voor Entomologie* 18: 3.

Apochrysa phantoma Gerstaecker, 1894: *Mitt[h]eilungen aus dem Naturwissenschaftlichen Verein für Neu-Vorpommern und Rugen* 25: 153.

Nobilinus insignitus Navás, 1913: *Annales de la Société Scientifique de Bruxelles* 37(pt. 2): 296.

Nobilinus albardae insignitus Navás: Winterton and Brooks (2002) *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95(1): 25.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงข้างขนาดใหญ่ ความยาวลำตัว ประมาณ 18 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลอ่อนยาวประมาณ 20 มิลลิเมตร ในแต่ละปล้องหนวด มีกลุ่มของเส้นขนเรียงตัวเป็นวงรอบปล้องหนวด จำนวน 5 ชุด ตารวม 1 คู่ สีเหลืองทอง ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง รวมถึงขา มีสีเขียวอ่อน ทางด้านหลังของปล้องอกมีแถบสีดำขนาดใหญ่พาดจรดฐานปีก ปีกไม่มี pterostigma ความยาวของปีกหน้า ประมาณ 30 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลัง โดยเฉพาะส่วนฐานของ costal area จะขยายกว้างออก ที่ฐานปีกคู่หน้าไม่พบเส้นขวางปีก basal subcostal crossvein ปรากฏอยู่ที่บริเวณปลายปีกพบเส้นขวางปีก ระหว่างเส้นปีก subcosta และ radial vein ที่ 1 จำนวนมาก ที่บริเวณปีก พบจุดสีดำในปีกคู่หน้าแต่ละข้าง จำนวน 1 จุด บริเวณกลางปีก

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย (New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดกรุงเทพมหานครฯ

ฤดูกาลที่พบ: เดือนกุมภาพันธ์

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ศึกษา จำนวน 1 ตัวอย่าง ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร จับในปี พ.ศ. 2497

2. *Ankylopteryx octopunctata* (Fabricius, 1793) (Figure 10.)

Hemerobius octopunctatus Fabricius, 1793: *Ent. Syst.* II p. 85, 16.

Hemerobius candidus Fabricius, 1798: *Ent. Suppl.*: 202.

Chrysopa candida Schneider, 1851: *Mon. Chrysop.*: 161.

Hemerobius trimaculatus Girard, 1853: *Ann. Soc. Ent. Fr.*, 3 (87): 163.

Chrysopa punctata Hagen, 1858: *Syn. Neur. Ceyl.*, 1: 483.

Ankylopteryx candida Brauer, 1864: *Verh. Zool. Bot. Ges. Wien*, 14: 901.

Ankylopteryx punctata Brauer, 1864: *Verh. Zool. Bot. Ges. Wien*, 14: 901.

Ankylopteryx trimaculata Brauer, 1864: *Verh. Zool. Bot. Ges. Wien*, 14: 901.

Ankylopteryx sigillaris Gerstaecker, 1893: *Mitt. Naturw. Ver. Neu-vorpomm. U. Rugen.*, 25: 162.

Ankylopteryx octopunctata Weele, 1909: *Notes Leyden Mus.*, 31: 57.

Ankylopteryx octopunctata Handschin, 1935: *Revue Suisse Zool.*, 42: 695.

Ankylopteryx octopunctata Ghosh, 1980: *Rec. Zool. Sev. India*, 77: 251.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงข้างขนาดเล็กถึงขนาดกลาง ความยาวลำตัว ประมาณ 12 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลอ่อนยาวประมาณ 15 มิลลิเมตร ตารวม 1 คู่ สีเหลืองทอง ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง รวมถึงขา มีสีเขียวอ่อน มีแถบสีเหลืองพาดตามความยาวลำตัว จากอกปล้องแรกถึงปลายส่วนท้อง ความยาวของปีกหน้า ประมาณ 15 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลัง โดยเฉพาะส่วนฐานของ costal area จะขยายกว้างออก ที่ฐานปีกพบ im-cell ปรากฏอยู่ที่บริเวณปลายปีกไม่พบเส้นขวางปีก ระหว่างเส้นปีก subcosta และ radial vein ที่ 1 ที่บริเวณปีก พบจุดสีดำในปีกคู่หน้าแต่ละข้าง จำนวน 3 จุด ในตำแหน่งดังนี้ บริเวณก่อนเส้นปีก subcosta จะบรรจบกับเส้นปีก costa (pterostigma) ที่ basal inner gradate crossvein และที่ basal cubital cell ส่วนในปีกคู่หลัง พบจุดสีดำในปีกแต่ละข้าง จำนวน 1 จุด ที่ตำแหน่ง pterostigma

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย ศรีลังกา จีน ญี่ปุ่น เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย (New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน น่าน สุพรรณบุรี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมีนาคม มิถุนายน กันยายน และพฤศจิกายน

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ได้รวบรวมจากกับดักแสงไฟ แต่จากการสืบค้นเอกสาร พบว่าเหยื่อของแมลงข้างปีกใสชนิดนี้ ได้แก่ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยแป้ง แมลงหวี่ขาว (New, 2003) รวมถึงไข่และหนอนวัยอ่อนของ หนอนหัวดำศัตรูมะพร้าว (Wei, C.S. *et al.*, 1985)

3. *Ankylopteryx anomala* Brauer, 1864 (Figure 11.)

Ankylopteryx anomala Brauer 1864: 901. Lectotype □, NHMW (visum).

=*Sencera scioneura* Navás 1924 [1925]: 27. Holotype □, ZMB (visum).

=*Sencera feae* Navás 1929: 371. Holotype □, MCSN (visum).

=*Sencera feai* Navás 1930: 23 [lapsus calami pro *S. feae* Navás 1929].

=*Sencera exquisita* Nakahara 1955: 143. Holotype □, NMNS (visum).

Ankylopteryx (Sencera) anomala Brauer: Brooks and Barnard 1990: 157 [combination implied].

Ankylopteryx (Sencera) scioneura (Navás): Brooks and Barnard 1990: 157 [combination implied].

Ankylopteryx (Sencera) feae (Navás): Brooks and Barnard 1990: 157 [combination implied].

Ankylopteryx (Sencera) exquisita (Nakahara): Brooks and Barnard 1990: 157 [combination implied];

Yang *et al.* 2005: 56.

Ankylopteryx exquisita (Nakahara): Tsukaguchi 1995: 131.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงข้างขนาดเล็ก ความยาวลำตัว ประมาณ 10 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีขาวยาวประมาณ 12 มิลลิเมตร ตารวม 1 คู่ สีเหลืองทอง ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง รวมทั้งขา มีสีเขียวยอ่อน ทางด้านหลังของปล้องอกมีแถบสีดำขนาดใหญ่พาดจรดฐานปีก ความยาวของปีกหน้า ประมาณ 10 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย โดยเฉพาะส่วนฐานของ costal area จะขยายกว้างออก ที่ฐานปีกไม่พบ im-cell ปรากฏอยู่ที่บริเวณปลายปีกพบเส้นขวางปีก ระหว่างเส้นปีก subcosta และ radial vein ที่ 1 จำนวน 1 เส้น ที่บริเวณปีก พบจุดสีดำในปีกคู่หน้า แต่ละข้าง จำนวน 3 จุด ในตำแหน่งดังนี้ บริเวณก่อนเส้นปีก subcosta จะบรรจบกับเส้นปีก costa (pterostigma) ที่ basal inner gradate crossvein และที่ basal cubital cell ส่วนในปีกคู่หลัง พบจุดสีดำในปีกแต่ละข้าง จำนวน 2 จุด ที่ตำแหน่ง pterostigma และบริเวณ distal cubital cell

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย ศรีลังกา เนปาล จีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น เมียนมาร์ เวียดนาม มาเลเซีย บรูไน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย วานูอาตู และไทย (Breitkreuz *et al.*, 2015: Brooks & Barnard, 1990: Leblanc *et al.*, 2015: New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดขอนแก่น นครราชสีมา เพชรบูรณ์ นครปฐม กาญจนบุรี พัทลุง

และสุราษฎร์ธานี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมกราคม กุมภาพันธ์ มีนาคม พฤษภาคม มิถุนายน สิงหาคม และพฤศจิกายน

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ได้รวบรวมจากกบดักแมลงวันผลไม้ จากการสืบค้นเอกสาร พบว่าแมลงข้างชนิดนี้เพศผู้ ตอบสนองต่อสาร methyl eugenol จึงมักพบแมลงข้างชนิดนี้ในกบดักแมลงวันผลไม้ที่ใช้สารนี้เป็นสารดึงดูดแมลงวันผลไม้ และในดอกไม้บางชนิดที่สร้างสารชนิดนี้ (Breitkreuz *et al.*, 2015)

4. *Evanochrysa evanescens* (MacLachlan, 1869) (Figure 12.)

Nothochrysa evanescens McLachlan, 1869: *Entomologist's Monthly Magazine* 6: 25.

Nothochrysa evanescens javanica van der Weele, 1909: *Notes from the Leyden Museum* 31: 78.

Evanochrysa evanescens (MacLachlan): Brooks and Barnard (1990) *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology Series* 59: 173-174.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงข้างขนาดใหญ่ ความยาวลำตัว ประมาณ 18 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลเข้มยาวประมาณ 25 มิลลิเมตร ตารวม 1 คู่ สีเหลืองทอง ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง รวมทั้งขา มีสีเหลืองอมเขียว ความยาวของปีกหน้า ประมาณ 27 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้าไม่มี pterostigma ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย ที่ฐานปีกพบ im-cell รูปทรงสี่เหลี่ยมปรากฏอยู่ และมีความยาวสั้นกว่า m2-cell ที่บริเวณปลายปีกพบเส้นขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด (og และ ig) ปีกคู่หลังมี pterostigma ไม่มีลวดลายบนปีกทั้ง 2 คู่

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: มาเลเซีย และอินโดนีเซีย (New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเพชรบุรี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนเมษายน

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ศึกษา ได้จากกบดักแสงไฟ

5. *Italochrysa aequalis* (Walker, 1853) (Figure 13.)

Chrysopa aequalis Walker, 1853: List of the specimens of neuropterous insects in the collection of the British Museum. Part II.: 266.

Nothochrysa sumatrana Albarda, 1881: Neuroptera. Pp. 1-22 in Veth, P. J. (ed.). Midden-Sumatra. Reizen en Onderzoekingen der Sumatra-Expeditie, Uitgerust door het Aardrijkskundig Genootschap, 1877- 1879, beschreven door de Leden der Expeditie, onder toezicht van Prof. P. J. Veth. Vierde [4th] Deel (Natuurlijke Historie), Eerste [1st] Gedeelte (Fauna), Vijfde [5th] Afdeeling: 15.

Nothochrysa polychroa Gerstaecker, 1894: *Mitt[h]eilungen aus dem Naturwissenschaftlichen Verein für Neu-Vorpommern und Rugen* 25: 163.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงข้างขนาดกลาง ความยาวลำตัว ประมาณ 13 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลอมแดงยาวประมาณ 15 มิลลิเมตร ตารวม 1 คู่ สีฟ้า ส่วนหัวสีเหลือง ส่วนอก และส่วนท้องมีสีเหลืองอ่อนและมีลายสีแดงกระจายทั่วไป ขามีสีเหลือง ปีกทั้ง 2 คู่มี pterostigma ความยาวของปีกหน้า ประมาณ 15 มิลลิเมตร ปีกคู่หน้ามีขนาดใหญ่กว่าคู่หลังเล็กน้อย ที่ฐานปีกพบ im-cell รูปทรงสี่เหลี่ยมปรากฏอยู่ และมีความยาวใกล้เคียงกันกับ m2-cell ที่บริเวณปลายปีกพบเส้นขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด (og และ ig) ไม่มีลวดลายบนปีกทั้ง 2 คู่

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: อินเดีย จีน มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย (New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ และจันทบุรี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนพฤษภาคม กรกฎาคม สิงหาคม และกันยายน

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ศึกษา ได้จากกับดักแสงไฟ และตัวอย่างในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร

6. *Italochrysa japonica* (MacLachlan, 1875) (Figure 14.)

Nothochrysa japonica McLachlan, 1875: A sketch of our present knowledge of the neuropterous fauna of Japan (excluding Odonata and Trichoptera). Transactions of the [Royal] Entomological Society of London 23: 182.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงช่วงขนาดกลาง ความยาวลำตัว ประมาณ 13 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลเข้มยาวประมาณ 15 มิลลิเมตร ตารวม 1 คู่ สีเหลืองทองอมเขียว ส่วนหัวและส่วนอกปล้องแรก มีสีขาและมีแถบสีแดงพาดทางด้านหลัง ส่วนอกปล้องที่ 2 จนถึงส่วนท้องมีสีเหลืองอ่อน มีแถบสีดำพาดทางด้านหลังและด้านล่างของส่วนท้องเป็นลายสลับเหลืองและดำ ขามีสีเหลืองอ่อน ปีกทั้ง 2 คู่มี pterostigma ความยาวของปีกหน้า ประมาณ 15 มิลลิเมตร ที่ฐานปีกพบ im-cell รูปทรงสี่เหลี่ยมปรากฏอยู่ และมีความยาวใกล้เคียงกันกับ m2-cell ที่บริเวณปลายปีกพบเส้นขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด (og และ ig) ไม่มีลวดลายบนปีกทั้ง 2 คู่

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: จีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน ศรีลังกา สิงคโปร์ และมาเลเซีย (New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดอุบลราชธานี

ฤดูกาลที่พบ: เดือนมิถุนายน

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ศึกษา ได้จากกับดักแสงไฟ

7. *Mallada basalis* (Walker, 1853) (Figure 15.)

Chrysopa basalis Walker, 1853: List of the specimens of neuropterous insects in the collection of the British Museum. Part II.: 239.

Chrysopa microphyta McLachlan, 1883: *Annals and Magazine of Natural History* 12 (5): 300.

Chrysopa jolyana Navás, 1910: *Revue Russe d'Entomologie* 10: 194.

Chrysopa latotalis Banks, 1910: *Psyche* 17: 101.

Chrysopa olatatis Banks, 1910: *Psyche* 17: 101.

Chrysopa formosana Esben-Petersen, 1913: *Entomologische Mitteilungen* 2: 257.

Chrysopa tagalica Banks, 1914: *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 15: 174.

Chrysopa peterseni Okamoto, 1919: *Entomological Magazine, Kyoto* 4: 10.

Chrysopa skottsbergi Esben-Petersen, 1924: More Neuroptera from Juan Fernandez and Easter Island. Pp. 309-313 in Skottsberg, C. (ed.). *The Natural History of Juan Fernandez and Easter Island*. Vol. 3 (Zoology), Part III. : 310.

Mallada stigmatus Navás, 1925: *Revista de la [Real] Academia de Ciencias Exactas Fisico-Quimicas y Naturales de Zaragoza* 9 (1): 24.

Chrysopa delmasi Navás, 1927: *Memorie dell'Accademia Pontifica dei Nuovi Lincei, Rome* 10 (2): 20.

Chrysopa delmasi var. *densata* Navás, 1927: *Memorie dell'Accademia Pontifica dei Nuovi Lincei, Rome* 10 (2): 21.

Mallada delmasinus Navás, 1935: *Memorias de la Real Academia de Ciencias y Artes de Barcelona* 25 (3): 56.

Anisochrysa paradoxa Nakahara, 1955: *Kontyû* 23: 146.

Mallada basalis (Walker): Brooks and Barnard (1990) *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology Series* 59: 224.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงข้างขนาดค่อนข้างเล็ก ความยาวลำตัว ประมาณ 10 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาวแบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลอ่อนยาวประมาณ 15 มิลลิเมตร ตารวม 1 คู่ สีเหลืองทองอมเขียว ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง รวมถึงขา มีสีเขียวอ่อน มีแถบสีเหลืองพาดตามความยาวลำตัว จากอกปล้องแรกถึงปลายส่วนท้อง ปีกทั้ง 2 คู่มี pterostigma สังกัดได้ชัดในเพศผู้ และจางลงในเพศเมีย ความยาวของปีกหน้า ประมาณ 10 มิลลิเมตร ที่ฐานปีกพบ im-cell รูปทรงสามเหลี่ยมปรากฏอยู่ที่บริเวณปลายปีกพบเส้นขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด (og และ ig) และมีความยาวใกล้เคียงกัน ไม่มีลวดลายบนปีกทั้ง 2 คู่

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: พบเขตการแพร่กระจายกว้างทางภูมิภาคตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิก ได้แก่ จีน ไต้หวัน ศรีลังกา สิงคโปร์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย และไทย (New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย น่าน อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ ขอนแก่น นครราชสีมา นครสวรรค์ ชัยนาท สิงห์บุรี อ่างทอง ปราจีนบุรี ระยอง จันทบุรี นครปฐม กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร นครศรีธรรมราช และกรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: พบได้ตลอดทั้งปี

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ศึกษา ได้ตัวเต็มวัยจากกับดักแสงไฟ และตัวอ่อนจากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจ โดยส่วนมากมักพบในแปลงไม้ผลที่มีความร่มเงาและความชื้นสูง ได้แก่ ส้ม เงาะ ลำไย และมะม่วง โดยพบว่าเหยื่อของแมลงข้างปีกใสชนิดนี้ ได้แก่ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยแป้ง และแมลงหวี่ขาว

8. *Plesiochrysa ramburi* (Schneider, 1851) (Figure 16.)

Chrysopa ramburi Schneider, 1851: *Symbolae ad monographiam generis Chrysopae*, Leach. Vratislaviae.: 107.

Chrysopa jaluitana Kempny in Schnee, 1904: *Zoologische Jahrbücher* 20: 403.

Chrysopa vicina Kempny, 1904: *Verhandlungen der Kaiserlich-Königlichen Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien* 54: 354.

Chrysopa neutra Navás, 1910: *Brotéria (Zoológica)* 9: 47.

Chrysopa deuthera Navás, 1914: *Annales de la Société Scientifique de Bruxelles* 38 (pt. 2): 106.

Chrysopa notosticta Navás, 1914: *Annales de la Société Scientifique de Bruxelles* 38 (pt. 2): 104.

Chrysopa reaumuri Navás, 1914: *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas Fisicas y Naturales de Madrid* 12: 646.

Chrysopa controversa Lacroix, 1920: *Bulletin de la Société Entomologique de France* 1920: 104.

Plesiochrysa ramburi (Schneider): Brooks and Barnard (1990) *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomology Series* 59: 233.

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมลงข้างขนาดกลางถึงค่อนข้างใหญ่ ความยาวลำตัว ประมาณ 12 มิลลิเมตร หนวดเรียวยาว แบบเส้นด้าย (filiform) สีน้ำตาลอ่อนยาวประมาณ 15 มิลลิเมตร ตารวม 1 คู่ สีเหลืองทองอมเขียว ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง รวมถึงขา มีสีเขียว ปีกทั้ง 2 คู่มี pterostigma ความยาวของปีกหน้า ประมาณ 15 มิลลิเมตร ที่ฐานปีกพบ im-cell รูปทรงสามเหลี่ยมปรากฏอยู่ที่บริเวณปลายปีกพบเส้น ขวางปีก gradate crossveins จำนวน 2 ชุด (og และ ig) และมีความยาวไม่เท่ากัน โดย inner gradate crossveins (ig) สั้นกว่า outer gradate crossveins (og) ไม่มีสวดลายบนปีกทั้ง 2 คู่

การกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์: พบเขตการแพร่กระจายกว้างทางภูมิภาคตะวันตกของมหาสมุทร แปซิฟิก ได้แก่ จีน ไต้หวัน ศรีลังกา สิงคโปร์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย และไทย (New, 2003)

การกระจายพันธุ์ในประเทศไทย: จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย น่าน อุตรดิตถ์ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ขอนแก่น นครราชสีมา นครสวรรค์ ชัยนาท สิงห์บุรี อ่างทอง ปราชญ์บุรี ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี นครปฐม กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และ กรุงเทพมหานคร

ฤดูกาลที่พบ: พบได้ตลอดทั้งปี

หมายเหตุ: ตัวอย่างที่ศึกษา ได้ตัวเต็มวัยจากกับดักแสงไฟ และตัวอ่อนจากแปลงปลูกพืชเศรษฐกิจ โดยส่วนมากมักพบในแปลงพืชไร่และพืชผัก ที่มีแสงแดดจัด ได้แก่ มันสำปะหลัง มะเขือ และกระเจี๊ยบ มอญ โดยพบว่าเหยื่อของแมลงข้างปีกใสชนิดนี้ ได้แก่ เพลี้ยจักจั่น เพลี้ยหอย เพลี้ยแป้ง และแมลงหิว ขาว

จากการสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae ในแปลงพืช เศรษฐกิจของประเทศไทย สามารถพบแมลงข้างปีกใสจำนวน 8 ชนิด ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะในสภาพ แปลงเกษตร มักมีการปลูกพืชเศรษฐกิจเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ไม่มีความหลากหลายของพืชและแมลง เหยื่อ อีกทั้งมีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช อาจเป็นเหตุให้พบจำนวนชนิดแมลงข้างปีกใสไม่มากนัก

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาอนุกรมวิธานของแมลงข้างปีกใส วงศ์ Chrysopidae โดยการสำรวจเก็บรวบรวม ตัวอย่างในแปลงพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2562 และจากตัวอย่างแมลงข้างปีกใส ที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง กรมวิชาการเกษตร พบว่าสามารถ วินิจฉัยได้จำนวน 8 ชนิด ใน 2 วงศ์ย่อย และ 4 เผ่า คือ *N. albarda* *A. octopunctata* *A. anomala* *E. evanescens* *I. aequalis* *I. japonica* *M. basalis* และ *P. ramburi* โดยชนิดเด่นที่ สามารถพบได้ทุกภูมิภาคของประเทศไทย และพบได้เกือบตลอดทั้งปี มีจำนวน 3 ชนิด คือ *A. anomala* *M. basalis* และ *P. ramburi* ทั้งนี้ชนิด *M. basalis* และ *P. ramburi* เป็นแมลงตัวห้ำที่มีความสำคัญทางการเกษตร โดยมีการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยเฉพาะกลุ่มแมลงปาก ดูด เช่น เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยแป้ง และแมลงหิวขาว ได้ในปัจจุบัน นอกจากนี้หากมีการสำรวจ แมลงข้างปีกใส ในพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากกว่าในพื้นที่เกษตรกรรมซึ่งมักพบความ หลากหลายทางชีวภาพน้อย อีกทั้งการศึกษาชีววิทยาของแมลงข้างปีกใสชนิดอื่นๆ ควบคู่กันกับการ สำรอง อาจทำให้สามารถค้นหาชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีได้ใน อนาคต

คำขอบคุณ

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

เอกสารอ้างอิง

- พิมลพร นันทะ อัมพร วิโนทัย สติถย์ ปฐมรัตน์ รัตนา นชะพงษ์ รุจ มรกต และประภัสสร เขยคำแหง. 2544. รายชื่อแมลงศัตรูธรรมชาติของพืชเศรษฐกิจบางชนิดในประเทศไทย. หน้า 245-272. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- พิมลพร นันทะ. 2545. ศัตรูธรรมชาติ หัวใจของ IPM. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 215 หน้า.
- รัตนา นชะพงษ์. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงห้ำ. หน้า 87-89. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- รัตนา นชะพงษ์ และประภัสสร เขยคำแหง. 2554. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงตัวห้ำ. หน้า 11-15. ใน เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตร แมลง-สัตว์ศัตรูพืช และการป้องกันกำจัด ครั้งที่ 15. กลุ่มกัญและสัตววิทยา 25-29 กรกฎาคม 2554 ณ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- ศานิต รัตนภุมมะ. 2550. กัญวิทยาแม่บท. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ดีพรีน และแทนก้อปปีเซนเตอร์, เชียงใหม่. 571 หน้า.
- ไสว บุรณพานิชพันธ์. 2544. อนุกรมวิธานแมลง. ภาควิชากัญวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 441 หน้า.
- Breitkreuz, L.C.V., S.L. Winterton and S.E. Micheal. 2015. Revision of the Green Lacewing Subgenus *Ankylopteryx* (*Sencera*) (Neuroptera: Chrysopidae). *ZooKeys* 543: 111-127.
- Brooks, S.J. & P.C. Barnard. 1990. The green lacewings of the world: a generic review (Neuroptera: Chrysopidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Ent.)* 59(2): 117-286.
- Hutacharen, C., N. Tubtim and C. Dokmai. 2007. Checklists of Insects and Mites in Thailand. Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Bangkok. 319 p.
- Leblanc, L., S.J. Micheal, B.P. Bhandari, C.A. Tauber and D. Rubinoff. 2015. Attraction of Lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) to Methyl Eugenol in Asia. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* (2015) 47: 67-70.
- New, T.R. 1980. A Revision of the Australian Chrysopidae (Insecta: Neuroptera). *Aust. J. Zool. Suppl. Ser.* 77: 1-143.
- New, T.R. 2003. Fauna Malesiana Handbook 4: The Neuroptera of Malesia. Fauna Malesiana Foundation, Leiden. 204 p.

- Wei, C. S., B. Z. Huang and C. H. Guo. 1985. A Preliminary Study on *Ankylopteryx octopunctata* (Fabricius). *Chinese Journal of Biological Control* 1(2): 55.
- Winterton, S.L. 1995. A New Species of *Mallada* Navás (Neuroptera: Chrysopidae) from Australia with a Key to Species. *J. Aust. ent. Soc.* 34: 23-27.
- Winterton, S.L. & S.J. Brooks. 2002. Phylogeny of the Apochryesine Green Lacewings (Neuroptera: Chrysopidae: Apochrysinæ). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 95(1): 16-28.

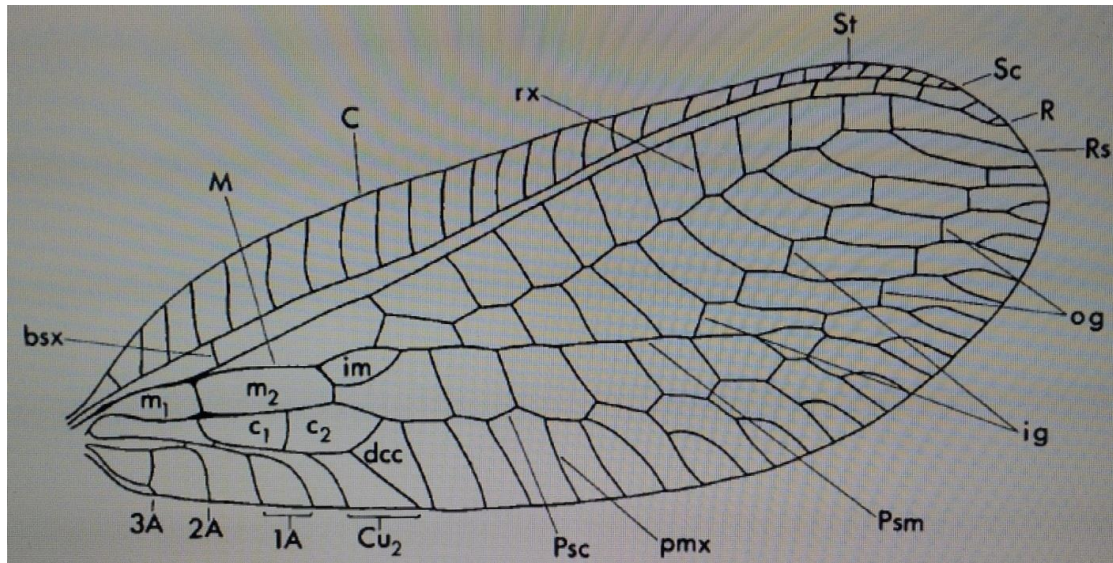


Figure 1 Wing venation pattern in fore wing of the green lacewings (Tribe Chrysopini). bsx; basal subcostal crossvein, ig; inner gradate crossveins, im; intramedian cell, m_1 and m_2 ; 1st and 2nd median cell, og; outer gradate crossveins, R; radius, Rs; radial sector, Sc; subcosta, St; pterostigma. (From: Brooks & Barnard, 1990)

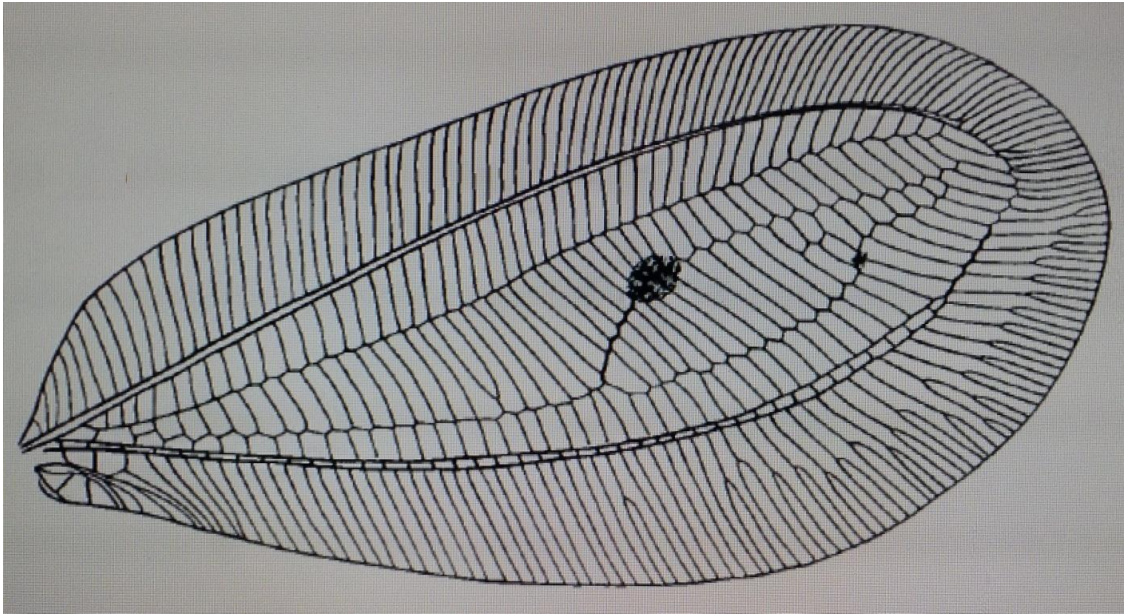


Figure 2 Wing venation pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Nobiletus*.
(From: Brooks & Barnard, 1990)

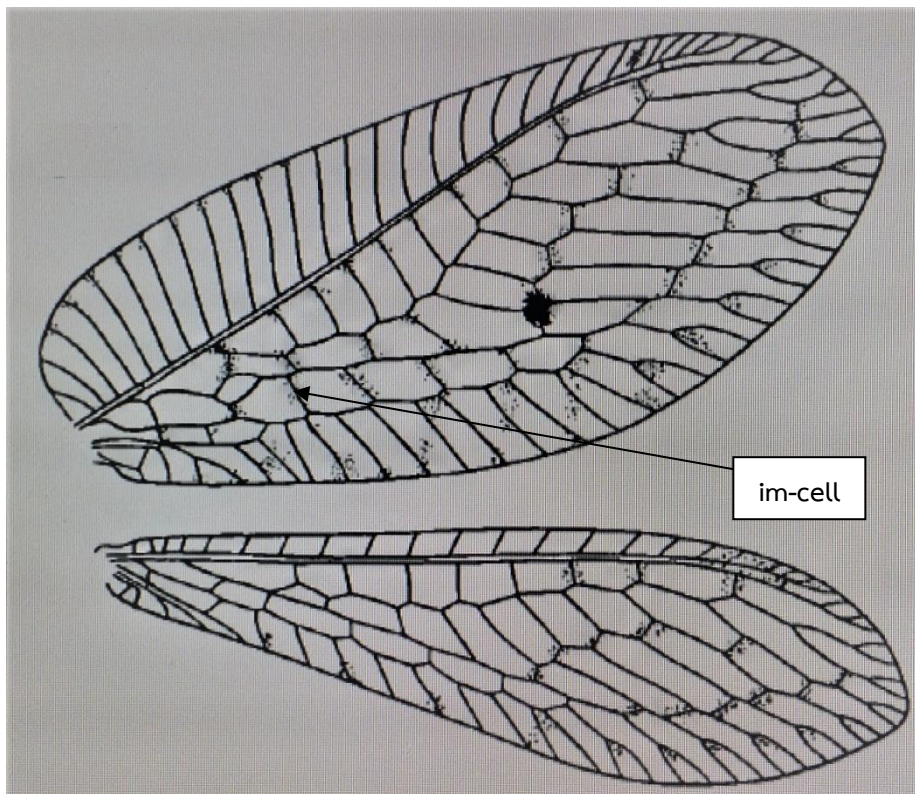


Figure 3 Wing venation pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Ankylopteryx*, subgenus *Ankylopteryx*. (From: Brooks & Barnard, 1990)

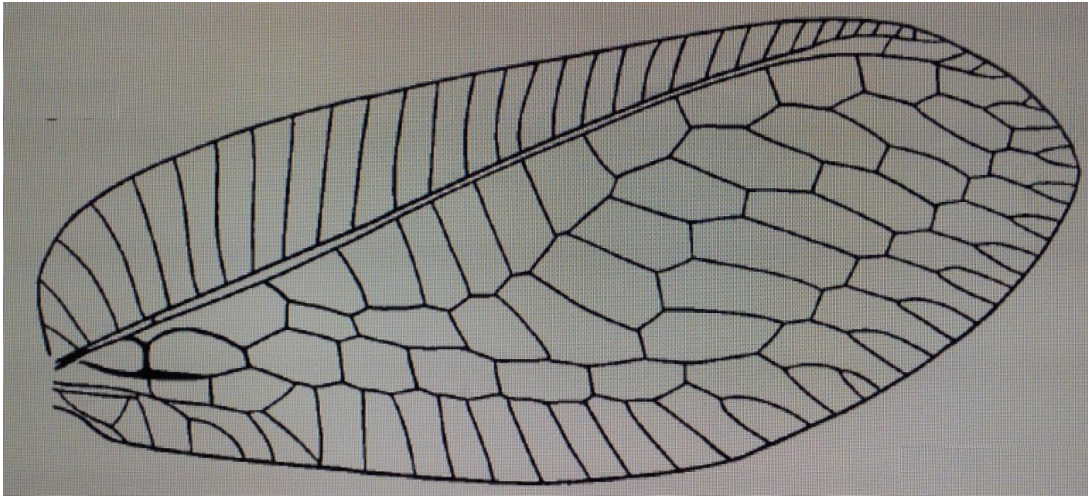


Figure 4 Wing venation pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Ankylopteryx*, subgenus *Sencera*. (From: Brooks & Barnard, 1990)

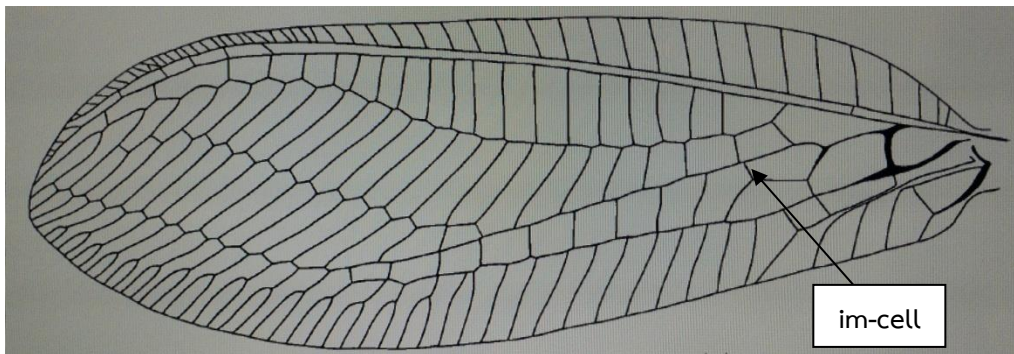


Figure 5 Wing venation pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Evanochrysa*. (From: Brooks & Barnard, 1990)

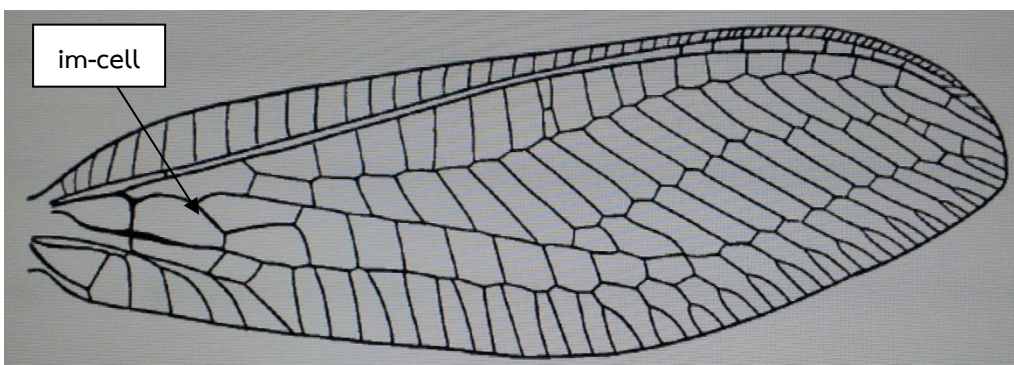


Figure 6 Wing venation pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Italochrysa*. (From: Brooks & Barnard, 1990)

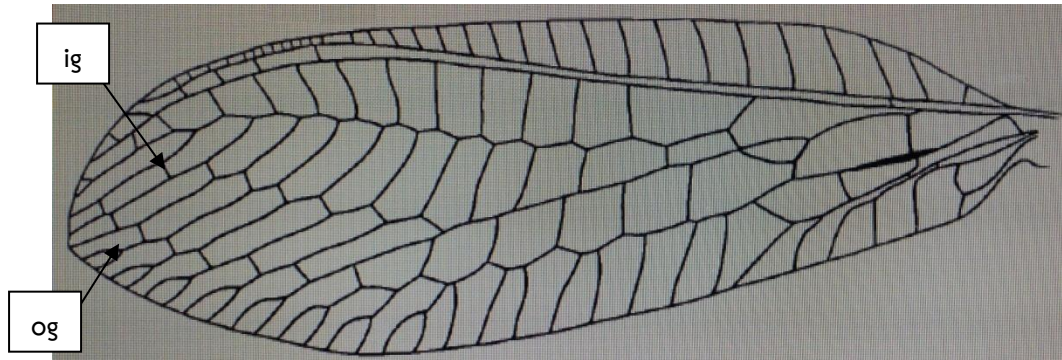


Figure 7 Wing venation pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Mallada*.
(From: Brooks & Barnard, 1990)

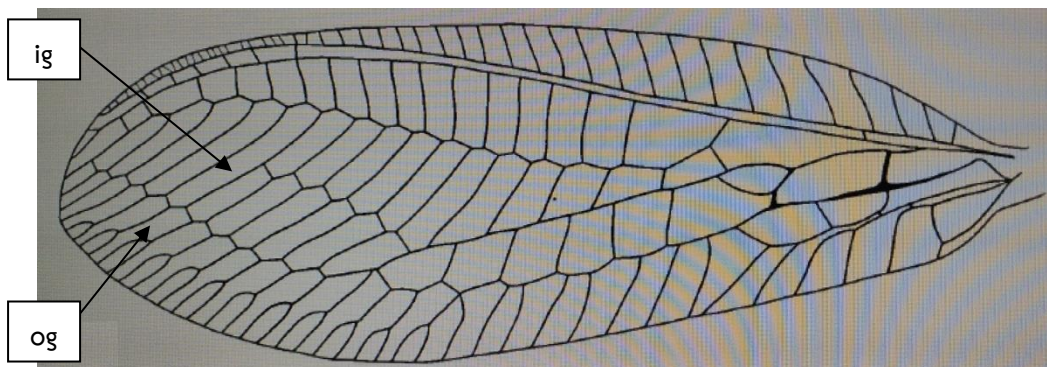


Figure 8 Wing venation pattern in fore wing of the green lacewings; genus *Plesiochrysa*.
(From: Brooks & Barnard, 1990)



Figure 9 *Nobilinus albardae* (MacLachlan, 1875) male



Figure 10 *Ankylopteryx (Ankylopteryx) octopunctata* (Fabricius, 1793) male



Figure 11 *Ankylopteryx (Sencera) anomala* Brauer, 1864 male



Figure 12 *Evanochrysa evanescens* (MacLachlan, 1869) male (left) female (right)



Figure 13 *Italochrysa aequalis* (Walker, 1853) male (left) female (right)



Figure 14 *Italochrysa japonica* (MacLachlan, 1875) male



Figure 15 *Mallada basalis* (Walker, 1853) male (left) female (right)



Figure 16 *Plesiochrysa ramburi* (Schneider, 1851) male (left) female (right)

การทดสอบอัตราที่เหมาะสมของสารปฏิชีวนะบางชนิดในการควบคุมโรคกรีนนิ่ง
ในต้นกล้าและกิ่งตอนส้ม

Efficacy of some antibiotics for controlling greening disease in
citrus seedling and marcotting

แสนชัย คำหล้า กาญจนา วาระวิชนี
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Greening disease is caused by the gram- negative bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, which lives within the phloem cells. Citrus greening infects all citrus commercially grown and there is no suitable method to address the problem that is agreeable among growers, government agencies and consumers. Greening disease in Thailand is spread via citrus vegetative propagations and insect vector; citrus psyllid (*Diaphorina citri*). Elimination of bacterial pathogens from infected citrus seedlings is a promising approach to alleviate spreading disease. In this experiment, the infected mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) seedling roots were immersed in tetracycline and ampicillin solutions at 500, 1,500 and 10,000 ppm, respectively. Four months after root treatment, no greening pathogen detected. However citrus greening disease reappears from the fifth month onwards.

Keywords: citrus greening, Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, antibiotics

บทคัดย่อ

โรคกรีนนิ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Candidatus Liberibacter asiaticus* ซึ่งอาศัยอยู่ในเซลล์ท่ออาหารของพืชและสามารถทำให้เกิดโรคร่วมกับพืชตระกูลส้มทุกชนิดที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันและไม่มีวิธีการที่เหมาะสมในการจัดการปัญหาโรคกรีนนิ่งที่เป็นที่ยอมรับทั้งในส่วนของเกษตรกรผู้ปลูก หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง และผู้บริโภคทั่วไป โรคกรีนนิ่งในประเทศไทยแพร่ระบาดโดยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคติดไปกับกิ่งตอนหรือต้นกล้าส้มและการถ่ายทอดโดยเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (*Diaphorina citri*) ดังนั้นการกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคที่ติดไปกับกิ่งตอนหรือต้นกล้าส้มจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยบรรเทาปัญหาการแพร่ระบาดของโรคกรีนนิ่งได้ การทดลองนี้ได้ทำการทดสอบการกำจัดเชื้อในต้นกล้าส้มเขียวหวานโดยใช้สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินและสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน อัตรา 500, 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม ตามลำดับ พบว่าหลังการแช่สารปฏิชีวนะ 4 เดือนตรวจไม่พบเชื้อโรคกรีนนิ่ง แต่สามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่เดือนที่ 5 เป็นต้นไป

คำหลัก : โรคกรีนนิ่ง, โรคฮวงหลงบิง, สารปฏิชีวนะ, แอมพิซิลลิน, เตตราไซคลิน

รหัสการทดลอง 03-05-59-01-02-00-03-60

คำนำ

โรคกรีนนิ่ง (Greening disease) มีรายงานครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2472 โดย Oberholzer และคณะในประเทศแอฟริกาใต้ จากการศึกษาในระยะต่อมาพบว่าได้เคยมีรายงานการศึกษาโรคกรีนนิ่งในประเทศจีนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2462 โดย Reinking กล่าวว่าพบโรคนี้ครั้งแรกในเขตจังหวัด กวางสี โดยเรียกชื่อตามอาการที่ปรากฏว่า โรคยอดเหลือง (yellow shoot) ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปแล้วให้เรียกโรคดังกล่าวว่า ฮวงลิ่งบิง (ฮวงหลงบิง) หรือ Yellow Shoot แทน โรคกรีนนิ่ง แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังนิยมเรียก โรคกรีนนิ่ง ควบคู่กันไป สำหรับประเทศไทยมีรายงานเกี่ยวกับโรคกรีนนิ่งครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2516 โดยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร (ไมตรีและคณะ) ในกลุ่มสัมปเลือกก่อนเช่นเดียวกันกับที่มีรายงานในประเทศแอฟริกาและประเทศจีน ซึ่งในขณะนั้นยังไม่ทราบว่าเกิดจากเชื้อโรคชนิดใดจึงเรียกชื่อที่ตรวจพบซึ่งจำกัดอยู่เฉพาะภายในท่ออาหารพืชว่า เชื้อคล้ายแบคทีเรีย (Bacteria-like organism) ต่อมาในปี 1984 Garnier and Bovè (Bovè, 2006) สามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมลบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100 – 800 นาโนเมตร จึงเสนอชื่อในครั้งแรกว่า *Candidatus Liberobacter africanus* และในปัจจุบันเปลี่ยนเป็น *Candidatus Liberibacter africanus* และจากการศึกษาต่อมาพบเพิ่มอีก 2 ชนิดคือ *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter americanus* , ต่อมาพบการระบาดในประเทศบราซิลและสหรัฐอเมริกาในปี 2004 และ 2005 ตามลำดับ แม้จะมีการศึกษาวิจัยจากทั่วโลกปัญหาโรคกรีนนิ่งก็ยังคงมีเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในปัจจุบัน จึงทำให้ผลผลิตสัมลดลง ขณะเดียวกันก็ทำให้ราคาสัมเพิ่มขึ้นอย่างมากเช่นเดียวกัน เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคยังไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ได้เหมือนแบคทีเรียทั่วไป อาศัยอยู่เฉพาะในท่ออาหารพืช และยังมีแมลงพาหะคือเพลี้ยไก่แจ้สัม ทำให้แพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้โรคกรีนนิ่งเป็นปัญหาที่ยังไม่ได้รับการแก้ไขหรือมีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพให้การป้องกันกำจัดโรคได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับการใช้สารปฏิชีวนะทรีทตาสัมก่อนนำไปติดบนต้นต่อทำให้กิ่งที่แตกออกมาใหม่ปราศจากเชื้อโรคกรีนนิ่ง (Zhang *et al.*, 2012) แต่สำหรับการฉีดสารปฏิชีวนะเพนนิซิลินและเตตราไซคลินเข้าลำต้นสัมที่ให้ผลผลิตแล้วโดยตรง ในระยะแรกต้นสัมจะมีอาการดีขึ้น แต่ในระยะต่อมาต้นสัมจะแสดงอาการโรคอีกหลังจากการเลิกใช้สารปฏิชีวนะ (Bovè *et al.*, 1980, ไมตรี, 2516, Hong-Ji Su, 2002) ดังนั้นการนำสารปฏิชีวนะมาใช้กับต้นกล้าหรือกิ่งตอนสัมเพื่อกำจัดหรือลดปริมาณเชื้อจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยบรรเทาหรือลดความรุนแรงของโรคกรีนนิ่งได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค และตัวอย่างพืชปกติ
 - ต้นตอสัมพันธุ์แรงเพอโลม
 - ตาสัมเขียวหวานปลอดโรค
 - ตาสัมพันธุ์มาตามไวน์ส (madam vinous) เป็นโรคกรีนนิ่ง
2. วัสดุวิทยาศาสตร์
 - หลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร (appendorft®)
 - โกร่งและบดตัวอย่าง (mortar and pestle)
 - หลอดพีซีอาร์ (PCR microtube)

- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 (balance)
 - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
 - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง(Centrifuge)
 - เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (GeneAmp® PCR System 9700, PE Applied BioSystem, USA)
 - ชุดอุปกรณ์รันเจล (Agarose gel electrophoresis equipment)
 - เครื่องวิเคราะห์เจลและบันทึกภาพ (ChemiDoc™ Touch Imaging System Bio-RAD, USA)
3. สารเคมีวิทยาศาสตร์
- ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรครินนิง
 - สารปฏิชีวนะ(Laboratory grade); แอมพิซิลลิน(Ampicillin), เตตราไซคลิน (Tetracycline)
 - ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
 - GeneJET Plant DNA Purification Mini Kit
 - TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
 - GoTaq® Green Master mix (Promega, USA)
 - GeneRuler 1kb /100 bp DNA Ladder (Fermentas®)
 - Agarose gel
4. วัสดุเกษตร
- ดินปลูกพีช ถูเพาะชำ ปุ๋ยเคมี 16-16-16 สารป้องกันกำจัดแมลง
 - มีดตัดตา, กรรไกรตัดกิ่ง, เทปพันกิ่ง

วิธีการ

1. เตรียมต้นกล้าส้มเขียวหวานสำหรับทดสอบ

1.1 เพาะเมล็ดส้มพันธุ์แรงเพอร์ไลม์ (Rangpur lime) สำหรับใช้เป็นต้นตอ ในวัสดุปลูกสูตรผสมไทย-เยอรมัน เมื่อต้นกล้าส้มมีอายุ 3 เดือน ทำการย้ายลงถูเพาะชำ เมื่อต้นกล้าส้มมีอายุ 8 – 10 เดือน หรือมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8 – 10 มม. ทำการติดตามส้มเขียวหวาน(*Citrus reticulata* Blanco)ปลอดโรค หลังจากนั้น 4 เดือน ทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการปลอดโรครินนิงด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1.2 ติดตามส้มพันธุ์มาตามไว้นสที่เป็นโรครินนิงจำนวน 2 ตา/ต้น หลังจากนั้น 3 เดือน ทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการเกิดโรครินนิงด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อยืนยันว่าต้นกล้าส้มเขียวหวานได้รับการถ่ายทอดเชื้อ *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรครินนิง และใช้เป็นต้นกล้าส้มสำหรับนำไปทดสอบการกำจัดเชื้อด้วยสารปฏิชีวนะ

2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการควบคุมโรครินนิง

เตรียมสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและสารละลายปฏิชีวนะเตตราไซคลิน 3 ระดับ คือ 500, 1,500, 10,000 พีพีเอ็ม และใช้น้ำสะอาดเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ นำต้นกล้าส้มเขียวหวานล้างรากให้สะอาด แล้วทำการแช่รากต้นกล้าส้มเขียวหวานด้วยสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin) และเตตราไซคลิน (Tetracycline) ที่ ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 5 ต้นต่อกรรมวิธี

นาน 24 ชั่วโมง และแช่ในน้ำสะอาดเป็นกรรมวิธีควบคุม จากนั้นจึงย้ายลงปลูกในกระถางและเก็บรักษาไว้ในโรงเรือนกันแมลง เพื่อตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรครินนึ่ง ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเริ่มตรวจเชื้อหลังจากแช่สารปลูกชีวนะแล้ว 3 เดือน

3. การตรวจสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำตัวอย่างใบส้มเขียวหวานมาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยชั่งตัวอย่างใบส้ม ประมาณ 0.1 กรัม นำใส่โกร่งแล้วเติมไนโตรเจนเหลวบดให้เป็นผงละเอียด สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany) และเติม AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรที่เติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำใส่หลอด microcentrifuge tube ไปแช่ที่ 65 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำมาเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทั้งหมดใส่ลงใน QIAshredder Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนน้ำใส มาเติม absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่า แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้าง column ด้วย RW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วชะล้าง DNA ออกจาก column โดยเติม AE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ OI1/ OI2c (Jagoueix *et al.*, 1996) เป็นตัวเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย จากปฏิกิริยา PCR จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,160 เบส ลำดับเบสคู่ไพรเมอร์ OI1 และ OI2c ดังนี้

OI1 : 5' GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA 3'

OI2c : 5' GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT 3'

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ได้แก่

- น้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH2O)	7.0	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ forward (OI1) (10 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ reverse (OI2c) (10 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
- Green master mix	10.0	ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอต้นแบบ	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 60 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 60 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 36 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 7 นาที	1 รอบ

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% gel agarose เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 10 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบกับขนาดกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่าง

ศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที และนำแผ่น agarose gel มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD) ทำการบันทึกภาพและสรุปผลที่เกิดขึ้น

การบันทึกข้อมูล

1. การรอดชีวิตของต้นกล้าส้มเขียวหวานหลังการแช่ในสารละลายปฏิชีวนะ
2. การตรวจหาเชื้อโรคกรีนนิ่งของต้นกล้าส้มเขียวหวานก่อนและหลังการแช่ในสารละลายปฏิชีวนะ

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2562
ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เตรียมต้นกล้าส้มเขียวหวานสำหรับทดสอบ

ต้นกล้าส้มเขียวหวานจำนวน 35 ต้น หลังการติดด้วยตาส้มพันธุ์มาตามไว้นัสที่เป็นโรคกรีนนิ่งจำนวน 2 ตา (figure 1) พบว่าต้นกล้าส้มเขียวหวานแสดงการโรคกรีนนิ่งมีอาการใบต่างเป็นจุดจ้ำ ต่างลายไม่สม่ำเสมอหนาแข็ง (figure 2) และเมื่อนำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ IO1/OI2c พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,160 bp ซึ่งแสดงว่าทุกต้นเป็นโรคกรีนนิ่ง (figure 3)

2. การรอดชีวิตของต้นกล้าส้มเขียวหวานหลังการแช่ในสารละลายปฏิชีวนะ

หลังนำต้นกล้าส้มทั้ง 35 ต้น แช่สารละลายปฏิชีวนะและแช่ในน้ำสะอาดแล้วย้ายลงปลูกในถุงปลูกและเก็บไว้ในโรงเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีที่แช่ในสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่อัตรา 500, 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม และกรรมวิธีที่แช่ในน้ำสะอาดต้นกล้าส้มรอดชีวิตทุกต้น ส่วนกรรมวิธีที่แช่ในสารละลายปฏิชีวนะเตตราไซคลินอัตราความเข้มข้น 500 พีพีเอ็ม ต้นกล้าส้มมีอาการเหลือง ใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและหลุดร่วง แต่ต้นกล้าส้มยังมีชีวิตและมีการแตกยอดใหม่ ส่วนกรรมวิธีที่แช่ต้นกล้าส้มในสารละลายปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่อัตรา 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม พบว่าภายในสัปดาห์แรกแสดงอาการใบเหี่ยวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองชัดเจน แห่งติดต้นก่อนที่ต้นกล้าส้มจะตายในที่สุด (figure 4)

3. ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการควบคุมโรคกรีนนิ่ง

ตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* ในต้นกล้าส้มที่ได้รับการแช่ในสารละลายปฏิชีวนะและน้ำสะอาดด้วยเทคนิคพีซีอาร์พบว่า กรรมวิธีที่แช่ด้วยสารละลายปฏิชีวนะเตตราไซคลินอัตราความเข้มข้น 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม ต้นกล้าส้มแสดงอาการใบเหี่ยวเปลี่ยนเป็นสีส่งผลให้ทุกต้นตายภายใน 1 เดือน จึงไม่สามารถนำมาตรวจหาเชื้อโรคกรีนนิ่งได้ ส่วนอีก 5 กรรมวิธีที่เหลือประกอบด้วย กรรมวิธีที่แช่ในสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่อัตรา 500, 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม กรรมวิธีที่แช่สารละลายปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่อัตรา 500 พีพีเอ็ม และกรรมวิธี

ควบคุมแช่น้ำสะอาด ตามลำดับ จากการตรวจติดตามเชื้อโรครินนิ่งครั้งที่ 1 หลังการแช่สารปฏิชีวนะแล้ว 3 เดือน ตรวจไม่พบเชื้อโรครินนิ่ง แต่สามารถตรวจพบเชื้อโรครินนิ่งหลังแช่สารปฏิชีวนะแล้ว 5 เดือนและต้นกล้าส้มแสดงอาการของโรครินนิ่งชัดเจนขึ้น ส่วนกรรมวิธีที่แช่ด้วยน้ำสะอาดสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ 1 เดือนหลังการทดสอบและต้นกล้าส้มแคระแกร็นแสดงอาการของโรครินนิ่งรุนแรง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การแช่รากต้นกล้าส้มในสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่อัตราความเข้มข้น 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* สาเหตุของโรครินนิ่งได้ทำให้ต้นกล้าส้มมีการเจริญเติบโตดีกว่าการแช่สารปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่อัตราความเข้มข้น 500 พีพีเอ็ม ซึ่งสามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Candidatus Liberibacter asiaticus* ได้ใกล้เคียงกับสารละลายปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน แต่มีผลกระทบกับต้นกล้าส้มค่อนข้างมากคือแสดงอาการใบเหลืองและหลุดร่วง จึงทำให้ต้นกล้าส้มชะงักการเจริญเติบโต และสารละลายปฏิชีวนะเตตราไซคลินที่อัตราสูง 1,500 และ 10,000 พีพีเอ็ม มีผลทำให้ต้นกล้าส้มตาย และไม่พบอาการดังกล่าวในต้นกล้าส้มที่แช่สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินและน้ำสะอาด ดังนั้นการใช้สารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินมีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้กำจัดเชื้อโรครินนิ่งในต้นกล้าส้มมากกว่าสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน

เอกสารอ้างอิง

- ไมตรี พรหมมินทร์.2548.เอกสารวิชาการ โรคทรูคโตรมของส้มและแนวทางการฟื้นฟูการทำสวนส้มในประเทศไทย.กรม วิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย.
- Bovè J.M.2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus (invited review).Journal of Plant pathology 88(1),7-37.
- Hong- Ji Su.2002. The International Workshop on Rehabilitation of Citrus orchard in Tropical Asian Countries. Vietnam. P15 -23.
- Jagoueix S, Bove JM, Garnier M. 1996. PCR detection of two candidatus Liberibacter species associated with greening disease of citrus. Molecular and Cellular Probes 10, 43-50.
- Zhang Muqing, Charles A Powell, Ying Guo, Lesley Benyon and Yongping Duan.2013.Characterization of the microbial community structure in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-infected citrus plant treated with antibiotics in the field. BMC Microbiology.13:112.
- Zhang Muqing, Charles A. Powell, Ying Guo, Melissa S. Doud and Yougping Duan.2012. A graft- Based Chemotherapy Method for Screening Effective Molecules and Rescuing Huanlongbing-Affected Citrus plants.phytopathology 102:567-574.



Figure 1 Rangpur lime stocks grafted with disease-free Som Keaw wan (*Citrus reticulata* Blanco) bud and two buds of HLB-infected Madam vinous (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)



Figure 2 Som Keaw wan (*Citrus reticulata* Blanco) seedlings exhibits citrus greening disease symptoms after 3 months of disease transmission by bud-grafting, yellowish- mosaic, blotchy symptoms on citrus leaves (inset)

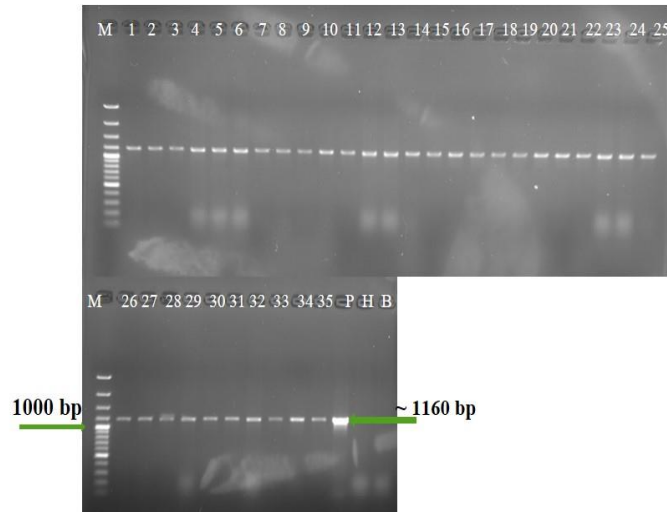


Figure 3 Gel electrophoresis of citrus seeding (*Citrus reculata* Blanco) 3 months after grafted with two HLB infected buds from Madam vinous variety. Electrophoresis is on 1.2% agarose gel of DNA amplified using OI1/OI2c primers. Lane M = 100 bp DNA ladder, lane 1 -35 samples from citrus seedlings, p = positive control



Figure 4 Citrus seeding grafted with HLB positive treated with 1,500 ppm tetracycline solution died within one month

การศึกษาสาเหตุและการถ่ายทอดอาการใบหงิกของส้มโอ Causal Agent and Transmission of Pummelo Crinkly Leaf Symptom

แสนชัย คำหล้า กาญจนา วาระวิชนี
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

From the study of the crinkly leaf symptoms in the pummelo orchards in different areas of Thailand, it was confirmed that samples of pummelos, lime and lemons showing crinkly leaves, twisting, blotches along midrib. Concave into one side of the leaf (notch) is noticeable. Symptoms is more observable during the young leaves stage. Based on symptoms, transmission through budding and PCR detection revealed that *Citrus chlorotic dwarf associated virus* (CCDav) belonging to Geminiviridae is the causal agent of disease. Currently CCDav reported in Turkey (2012) and China (2015). Virus spread primarily due to the use of vegetative propagation (bud, shoot, marcotting). There is no evidence of disease spread by seeds or mechanical methods. The disease mainly found in pummelo and lime orchards across Thailand.

Keywords : Pummelo, pomelo, Crinkly leaves, CCDav, Citrus chlorotic dwarf association virus, Gemminivirus

บทคัดย่อ

จากผลการศึกษาอาการใบหงิกในพืชตระกูลส้มที่ปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยพบว่า ตัวอย่างส้มโอและมะนาวที่แสดงอาการลักษณะใบหงิกงอ บิด ต่างเป็นจุดจ้ำด้านหลังตามแนวเส้นใบ และมีลักษณะเป็นรอยบาก (notch) เว้าเข้ามาด้านใดด้านหนึ่งของใบ ซึ่งอาการจะเห็นได้ชัดเจนในช่วงแตกใบอ่อน เกิดจากเชื้อไวรัส *Citrus chlorotic dwarf associated virus* (CCDav) จัดอยู่ในวงศ์ *Gemiviridae* ปัจจุบันมีรายงานในประเทศตุรกี (2012) และประเทศจีน (2015) เชื้อไวรัส CCDav แพร่ระบาดจากการใช้ส่วนขยายพันธุ์ เช่น ตา, กิ่ง, การตอนกิ่ง ไม่พบการถ่ายทอดโรคทางเมล็ดพันธุ์ และการถ่ายทอดโรคจากการกรีดสร้างบาดแผล พบระบาดในสวนส้มโอและมะนาวในแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทย

คำหลัก : ส้มโอ, อาการใบหงิก, อาการยอดหงิก, ไวรัสพืช

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-02-02-04-60

คำนำ

จากผลการศึกษาและสำรวจโรคกรีนนิงของส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายปี 2555 ในโครงการศึกษาการจัดการปุ๋ยและการระบาดของโรคกรีนนิงของส้มโอในแหล่งปลูกพื้นที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายนอกจากจะพบความเสียหายที่เกิดจากโรคกรีนนิงซึ่งมีผลกระทบทำให้ผลส้มโอ ร่วงก่อนอายุการเก็บเกี่ยวและผลผลิตไม่มีคุณภาพ สร้างปัญหาอย่างให้กับเกษตรกรชาวสวนส้มในพื้นที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายแล้ว ยังพบโรคของส้มโออีกโรคหนึ่งคือโรคใบหงิก (crinkly leaf disease) และเกษตรกรชาวสวนส้มได้กล่าวว่าเมื่อ 2 – 3 ปี ที่ผ่านมาพบโรคระบาดเพียงเล็กน้อย ประมาณ 5 – 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ปัจจุบันโรคระบาดมากถึง 70 – 80 เปอร์เซ็นต์และนับวันยิ่งจะเพิ่มมากขึ้นทุก ๆ ปี บางสวนพบโรคเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลผลิตลดลงและต้นที่แสดงอาการใบหงิก รุนแรง ผลส้มโอจะเกิดอาการแข็งด้าน ไม่มีคุณภาพและไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ทางกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้ทำการพิสูจน์เบื้องต้น ตามกรรมวิธีทางไวรัสวิทยา พบเพียงบางตัวอย่างประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่เป็นโรคไวรัสทริสเทซ่า แสดงว่าอาการใบหงิกของส้มโอไม่ได้มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสทริสเทซ่า แต่อาจเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น แม้ว่าไมตรีและคณะ (2529) ได้รายงานว่าอาการใบหงิกที่เกิดบนมะนาวเป็นอาการชนิดหนึ่ง (strain) ของโรคทริสเทซ่า อาจจะเป็นเพราะมะนาวเป็นพืชตระกูลส้มที่อ่อนแอ (susceptible) ต่อไวรัสทริสเทซ่า โดยการนำโรคของแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน จึงตรวจพบเชื้อไวรัสทริสเทซ่าทุกครั้ง ซึ่งตรงกันข้ามกับส้มโอที่ค่อนข้างทนทาน (tolerant) ต่อเชื้อไวรัสทริสเทซ่า (mixed infection) ในธรรมชาติ และอาการโรคใบหงิกดังกล่าวมีอาการคล้ายกับโรค Citrus variegation ที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส Citrus variegation virus (CVV) ที่เกิดกับพันธุ์ส้ม Pleatine sweet lime ประเทศ Costarica (Moreira *et al.*, 2011) ทำให้ส้มเกิดอาการใบหงิก (Crinkly leaf) บิดเบี้ยวและต่าง (Chlorotic mottle) ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ สำหรับประเทศไทยโรคนี้อย่างไม่มีรายงานมาก่อน นอกจากจะพบเป็นกับส้มโอในพื้นที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายแล้ว ยังพบเกิดกับส้มโอในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี พิจิตร สุโขทัย นครนายกและปราจีนบุรี และคงจะแพร่ระบาดไปยังจังหวัดอื่น ๆ อีก โดยนำกิ่งพันธุ์เป็นโรคขยายปลูก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาและพิสูจน์ว่าอาการใบหงิกที่เกิดบนส้มโอโดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ทองดีว่ามีสาเหตุจากเชื้ออะไรและสามารถถ่ายทอดแพร่ระบาดได้อย่างไร เพื่อจะได้หาแนวทางอย่างมีประสิทธิภาพในการป้องกันและควบคุมโรคต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค และตัวอย่างพืชปกติ
 - ส้มโอ ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน และมะนาว ที่มีอาการหงิกหรือบิดเบี้ยวและต้นกล้าส้มโอพันธุ์ทองดี ส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ส้มเขียวหวาน มะนาว และมะกรูด

2. วัสดุวิทยาศาสตร์
 - หลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร (appendorf®)
 - โกร่งและบดตัวอย่าง (mortar and pestle)
 - หลอดพีซีอาร์
 - เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 (balance)
 - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
 - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
 - เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (GeneAmp® PCR System 9700, PE Applied BioSystem, USA)
 - ชุดอุปกรณ์รันเจล (Agarose gel electrophoresis equipment)
 - เครื่องวิเคราะห์เจล (Gel documentation, ChemiDoc™ Touch Imaging System Bio-RAD, USA)
3. สารเคมีวิทยาศาสตร์
 - ไพร์เมอร์สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัส
 - ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
 - GeneJET Plant DNA Purification Mini Kit
 - พลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega®)
 - TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
 - GoTaq® Green Master mix (Promega, USA)
 - GeneRuler 1kb /100 bp DNA Ladder (Fermentas®)
 - Agarose gel
4. วัสดุเกษตร
 - ดินปลูกพีช ถูเพาะชำ ปุ๋ยเคมี 16-16-16 สารป้องกันกำจัดแมลง

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างใบและกิ่งส้มโอ

เก็บตัวอย่างในแหล่งปลูกส้มโอที่มีอาการใบหงิกหรือบิดเบี้ยวคล้ายอาการจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายจากแหล่งปลูกในภาคเหนือ กลาง อีสาน และ ภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย พิจิตร ชัยนาท ชัยภูมิ ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐมชัยภูมิ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ภูเก็ต นำตัวอย่างกิ่งพันธุ์ที่เก็บมาทำการเสียยอดหรือตัดตาไว้บนต้นกล้าส้มโอทองดีที่ใช้เป็นต้นต่ออายุประมาณ 6 – 8 เดือน ซึ่งเพาะจากเมล็ดส้มโอทองดีซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ทำการเพาะเมล็ดโดยใช้วัสดุปลูกสูตรไทย-เยอรมัน เพื่อป้องกันปัญหาโรครากเน่าโคนเน่าเมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 2 - 3 เดือน ทำการย้ายต้นกล้าใส่ในถุงพลาสติกขนาด 6 x 12 นิ้ว แล้วเก็บรักษาไว้ในโรงเรือนกันแมลงของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ให้น้ำและปุ๋ยอย่างสม่ำเสมอ และตัวอย่างใบไปสกัดสารพันธุกรรมเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิกและระบุชนิดเชื้อไวรัสต่อไป

2. การตรวจสอบและระบุเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิกในส้มโอ

2.1 ทำการสกัดสารพันธุกรรม

นำตัวอย่างใบส้มโอที่เก็บมาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยซังตัวอย่างใบส้มโอ ประมาณ 0.2 กรัม นำใส่โกร่งแล้วเติมไนโตรเจนเหลวบดให้เป็นผงละเอียด สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany) และเติม AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรที่เติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำใส่หลอด microcentrifuge tube ไปแช่ที่ 65 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำมาเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทั้งหมดใส่ลงใน QIAshredder Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนน้ำใส มาเติม absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่า แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้าง column ด้วย RW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วชะล้าง DNA ออกจาก column โดยเติม AE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ทำการเก็บดีเอ็นเอที่สกัดไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ในขั้นต่อไป

2.2 การตรวจสอบสาเหตุไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ 3202fw/6rev (Loconsole *et al.*, 2012) เป็นตัวเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย จากปฏิกิริยา PCR จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 444 เบส

ลำดับเบสคู่โพรเมอร์ 3202fw และ 6rev ดังนี้

3202fw : 5'-GTTCTGTGTTTCGACCCGTT-3'

6rev : 5'-GGGATTCGCATGGATAGCTCATCCAA-3'

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ได้แก่

- น้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH ₂ O)	7.0	ไมโครลิตร
- โพรเมอร์ forward (3202fw) (10 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
- โพรเมอร์ reverse (6rev) (10 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
- Green master mix	10.0	ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอต้นแบบ	1.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

นำส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR มาผสมกันแล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 5 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 30 วินาที	
ขั้นที่ 3:	54°C	นาน 30 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 30 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 30 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 7 นาที	1 รอบ

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% gel agarose เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 10 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide

นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที และนำแผ่น agarose gel มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD) ทำการบันทึกภาพและสรุปผลที่เกิดขึ้น

2.3 การโคลนยีนเพื่อระบุเชื้อสาเหตุอาการใบหงิกในส้มโอ

โคลน insert DNA จากข้อ 2.2 เข้าในพลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Figure 1) ตามระบบของ TA cloning system ที่แสดงไว้ในคู่มือโดยผสมส่วนประกอบต่างๆ ในหลอดปฏิกิริยา PCR ขนาด 0.5 ml ดังนี้ Ligation buffer (2x) 5 µl, pGEM-T easy vector 1 µl, PCR product (template) 2 µl, DEPC treated water 1 µl, T4 DNA ligase 1 µl ปริมาตรรวมเท่ากับ 10 µl โดยในระหว่างการเติมสารต่างๆ ต้องทำในกระตักน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่อง thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมคกที่ 4 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง การส่งถ่าย recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ ปริมาตร 10 µl ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มล. จากนั้นจึงเติม competent cell ปริมาตร 50 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต กวนเบาๆ นำไปวางบนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นย้ายลงในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 45 วินาที และนำไปวางบนน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที จากนั้นจึงเติม SOC medium ปริมาตร 950 มล.นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็วประมาณ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง, นำสารละลายมา spread บนอาหาร LB+ampicillin ความเข้มข้น 50 ppm บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 14 – 17 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนี *E. coli* บนอาหาร LB+ampicillin ลักษณะโคโลนี กลม, สี, ขนาดเล็ก ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีที่คัดเลือกมาแตะบนจานอาหาร LB+ampicillin ที่มีช่องตารางหมายเลขกำกับ นำไม้จิ้มฟันที่แตะเชื้อหย่อนลงบนอาหาร LB ปริมาตร 4 ml + ampicillin ความเข้มข้น 50 ppm (เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ) เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน ใช้ลูปเขี่ยเชื้อ *E. coli* โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกอยู่บนอาหาร LB + ampicillin ความเข้มข้น 50 ppm บ่มไว้ 37 °C ข้ามคืน จากนั้นจึงคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในหลอด ขนาด 1.5 ml ที่มีอาหาร LB + ampicillin ความเข้มข้น 50 ppm เอียง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืนจากนั้นจึงส่งไปทำการหาลำดับเบสที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัสที่มีรายงานใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

3. การถ่ายทอดเชื้อไวรัส *Citrus chlorotic dwarf associated virus*

3.1 การถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยวิธีกรีดแผลบนต้นกล้า

นำตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าส้มโอทองดีที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็นโรคใบหงิกแล้วด้วยเทคนิคพีซีอาร์และแสดงอาการใบหงิก บิดงอ และด้านหลังใบมีอาการจุดซ้ำตามแนวเส้นใบมาบดให้ละเอียดใน Phosphate buffer pH 7.2 และแช่สารละลายไว้ในกระตักน้ำแข็ง หลังจากนั้นใช้มิดิติตดาจุ่มในสารละลายแล้วนำไปกรีดบนต้นกล้าส้ม 7 ชนิด ได้แก่ ส้มโอทองดี ส้มโอขาวแตงกวา ส้มทับทิมสยาม ส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน มะนาว มะกรูด จำนวน ชนิดละ 3 ต้น จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในเรือนเพื่อสังเกตอาการและนำมาตรวจหาใช้ไวรัสในระ 3 เดือน และ 6 เดือน ต่อไป

3.2 การถ่ายทอดเชื้อไวรัสทางเมล็ดพันธุ์

เพาะเมล็ดจากผลส้มโอจากต้นส้มโอทองดีที่เป็นโรคใบหงิก (Figure 7) ทำการย้ายต้นกล้าจำนวน 200 ต้น หลังจากเพาะเมล็ด 60 วัน แล้วเก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง เพื่อสังเกตอาการโรคและนำตัวอย่างใบไปสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 2.1 สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PCR เพื่อยืนยันการเกิดโรคใบหงิกในต้นกล้าส้มโอทองดี จำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 เมื่อต้นกล้าส้มโอทองดีอายุ 6 เดือน และ ครั้งที่ 2 เมื่อต้นกล้าส้มโอทองดี 12 เดือน ตามลำดับ

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2562

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนปลูกพืชทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, แปลงปลูกส้มโอในประเทศไทย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างใบและกิ่งส้มโอที่มีอาการใบหงิก

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่มีอาการใบหงิก บิดเบี้ยว ม้วนงอ รูปร่างผิดปกติคล้ายกับอาการที่เกิดจากการถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายในแปลงปลูกส้มโอ, มะนาวและส้มเขียวหวาน (Figure 2) ในภาคเหนือ กลาง อีสาน และ ภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย จำนวน 5 ตัวอย่าง สุโขทัย 3 ตัวอย่าง จังหวัดชัยนาท 7 จังหวัดนนทบุรี 1 ตัวอย่าง นครปฐมชัยภูมิ 3 ตัวอย่าง จังหวัดชุมพร 1 ตัวอย่าง จังหวัดนครศรีธรรมราช 4 ตัวอย่าง จังหวัดภูเก็ต 2 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 35 ตัวอย่าง (Table 1) นำตัวอย่างกิ่งพันธุ์ที่เก็บมาทำการเสียบยอดไว้บนต้นกล้าส้มส้มโอ (Figure 3) และตัวอย่างในนำไปสกัดสารพันธุกรรมเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิก

2. การตรวจสอบและระบุเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิกในส้มโอ

2.1. การตรวจเชื้อสาเหตุโรคใบหงิกในส้มโอและมะนาว

ตัวอย่างส้มโอทองดี ส้มโอขาวแตงกวา ส้มโอทับทิมสยาม มะนาวแป้น และ มะนาวตาฮิติ ที่เก็บมาจากแปลงเกษตรกร (ตารางที่ 1) รวม จำนวน 35 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอและทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสด้วยไพรเมอร์ 3202fw/6rev (Giuliana Loconsole *et al.*, 2012) ด้วยเทคนิค PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 444 bp (Figure 4)

2.2. การระบุสาเหตุสาเหตุโรคใบหงิกในส้มโอ

สกัดดีเอ็นเอจากต้นส้มโอที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อโรคใบหงิก (Figure 3) ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GenUP™ Plant DNA kit ด้วย Lysis buffer จะได้สารละลายดีเอ็นเอของโรคใบหงิกไว้สำหรับตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาตรวจสอบอาการใบหงิกในส้มโอด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ใช้ไพรเมอร์ 3202fw/6rev (Loconsole *et al.*, 2012) และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่า ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 444 bp (Figure 4) ทำการโคลนยีนนำขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 444 bp มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป QIAquickGel Extraction Kit (Qiagen, Germany) และนำมาเชื่อมเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) (Figure 1) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่

คาดว่ามีการโคลนนิ่งของพลาสมิดลูกผสมสอดแทรกด้วยเทคนิค colony PCR แล้วทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany) และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่า แสดงแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดสายผสมของชิ้นดีเอ็นเอจากคูโพรเมอร์ 3202fw/6rev มีขนาดประมาณ 400 bp (Figure 4) แล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 2 โคลน ด้วยเครื่องวิเคราะห์ automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้น นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ซึ่งมีความยาว 444 เบส (Figure 5) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) ด้วยโปรแกรม Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) พบว่ามีความเหมือนกับ Citrus chlorotic dwarf associated virus isolate YN-EL4 (Sequence ID: KX840470.1) ที่ระดับความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่มีรายงานจากประเทศจีน (Zhou et al, 2017)

3. การถ่ายทอดสาเหตุโรคใบหงิกในส้มโอ

3.1. การถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยวิธีกล

ต้นกล้าส้มโอทองดี ส้มโอขาวแตงกวา ส้มทับทิมสยาม ส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน มะนาว มะกรูด จำนวน ชนิดละ 3 ต้น ที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส *Citrus chlorotic dwarf associated virus* สาเหตุของโรคใบหงิกส้มโอ โดยวิธีกลด้วยการกรีดสร้างแผลบนต้นกล้า (Figure 6) พบว่าหลังการถ่ายทอดเชื้อไวรสนาน 3 เดือน และ 6 เดือน ไม่พบต้นกล้าส้มทั้ง 7 ชนิดแสดงอาการของโรคใบหงิกส้มโอและเมื่อนำตัวอย่างใบมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกในทุกตัวอย่าง

3.2. การถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์

ต้นกล้าส้มโอทองดีจำนวน 200 ต้น ซึ่งเพาะเมล็ดจากผลส้มโอของต้นส้มโอทองดีที่เป็นโรคใบหงิก ที่เก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง พบต้นกล้าส้มโอแสดงอาการใบบิดเล็กน้อยในบางตัวอย่าง ลักษณะคล้ายอาการรอยบาก(notch) ซึ่งเป็นอาการอย่างหนึ่งที่พบในต้นส้มโอหรือมะนาวที่เป็นโรคใบหงิก แต่เมื่อนำมาตรวจยืนยันด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 2 ครั้ง เมื่อกำลังส้มโอ อายุ 6 เดือน และ 12 เดือน ไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อไวรัส *Citrus chlorotic dwarf associated virus* สาเหตุของโรคใบหงิกส้มโอ (Figure 8)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

อาการใบหงิกในพืชตระกูลส้มที่ปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยพบว่าตัวอย่างส้มโอและมะนาวที่แสดงอาการลักษณะใบหงิกงอ บิด ต่างเป็นจุดจ้ำตามด้านหลังตามแนวเส้นใบและมีลักษณะเป็นรอยบาก (notch) เว้าเข้ามาด้านใดด้านหนึ่งของใบ ซึ่งอาการจะเห็นได้ชัดเจนในช่วงแตกใบอ่อน ส่วนในใบที่โตเต็มที่แล้วไปจนถึงใบแก่สังเกตเห็นอาการโรคได้ยาก เกิดจากเชื้อไวรัส *Citrus chlorotic dwarf associated virus* (CCDaV) ปัจจุบันมีรายงานในประเทศตุรกี (2012) และประเทศจีน (2015) เชื้อไวรัส CCDaV สันนิษฐานว่ามีแมลงหริขาว 2 ชนิด คือ ในประเทศตุรกี *Parabemisia myricae* Kuwana (Bayberry whitefly) ส่วนในประเทศจีนตรวจพบเชื้อไวรัสในแมลงหริขาว *Dialeurodes*

citris Ashmead (Citrus whitefly) แต่ปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดจากแพร่ระบาดคือการใช้ส่วนขยายพันธุ์ เช่น ตา, กิ่ง, การตอนกิ่ง จากต้นที่มีเชื้อไวรัสแล้วนำไปขยายพันธุ์ในสวนหรือแหล่งปลูกใหม่ ๆ โดยเฉพาะการซื้อกิ่งตอนครั้งละมาก ๆ ทำให้มีโอกาสสูงที่เชื้อไวรัสจะติดไปกับกิ่งตอนเนื่องจากไม่ปรากฏอาการหรือสับสนกับอาการที่เกิดจากแมลงเข้าทำลาย และจากการตรวจต้นกล้าส้มโอทองดี 200 ต้น ที่เพาะจากต้นส้มโอที่เป็นโรคใบหงิกเมื่อ อายุ 6 เดือน และ 12 เดือน ไม่พบแถบตีเอ็น เป้าหมายของเชื้อไวรัส CCDaV สาเหตุของโรคใบหงิกส้มโอ และไม่พบการเกิดโรคใบหงิกส้มโอ จาก ต้นกล้าส้มโอทองดี ส้มโอขาวแตงกวา ส้มโอทับทิมสยาม ส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน มะนาว มะกรูด ที่ ได้รับการถ่ายทอดโรคโดยการกรีดสร้างบาดแผล ดังนั้นเกษตรกรที่จะทำการสร้างสวนใหม่หรือนำกิ่ง พันธ์ส้มโอและมะนาวไปปลูกในพื้นที่ใหม่ควรจะต้องทำการเลือกกิ่งพันธ์จากต้นแม่พันธ์ที่ไม่มีอาการใบ หงิก ใบต่าง ข้อหดสั้น ของเชื้อไวรัส CCDaV โดยการเดินสังเกตอาการรอบ ๆ ต้นแม่พันธ์ในช่วงที่มี การแตกยอดอ่อนจะเห็นอาการได้ชัดเจน และเมื่อนำไปปลูกแล้วให้หมั่นตรวจสอบเมื่อต้นกล้าส้มโอ หรือมะนาวมีการแตกยอดใหม่ หากพบอาการอาการใบหงิก ใบต่างให้ทำการกำจัดทิ้งทันทีโดยการ ถอนแล้วฝังกลบและเนื่องจากเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสจึงไม่มีสารเคมีในการป้องกันกำจัดในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

- ไมตรี พรหมมินทร์, กิตติศักดิ์ กิริยะอังกูร, เครือพันธ์ กิตติปกรณ์และนวลจันทร์ ตีมา.2529.ความ แตกต่างของลักษณะอาการโรคทริสเทซาในมะนาวที่เกิดจาก isolate ที่ต่างกัน. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 4 เล่มที่ 2 หน้า 143-148.
- Davino M., Areddia R. and Garney S.M.1998. Distribution of Citrus variegation virus within citrus hosts. In : Proc. 10th Conf. IOCV, 322-326. IOCV, Riverside, CA
- Guo J., Lai X. P., Li J. X., Yue J. Q., Zhang S. Y., Li Y. Y., Gao J. Y., Wang Z. R., Duan H. F. and Yang J. D. 2015. DISEASE NOTES : First Report on Citrus Chlorotic Dwarf Associated Virus on Lemon in Dehong Prefecture, Yunnan, China. Plant Disease, 99(9) , 1287. Retrived from : <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-01-15-0011-PDN>
- Loconsole G., Saldarelli P., Doddapaneni H., Savino V., Martelli G. P. and Saponari M. 2012. Indentification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family Geminiviridae. J. Virology (432) 162-172.
- Moreira L., Albertazzi F. J., Garita L., Ortiz B. and Villalobos W. 2011. First report of Citrus variegation virus in Palestine Sweet lime, as Coffee Shade in Costa Rica. In: Proc. 18th Conf. IOCV. Page
- Roistacher C.N.1991. Graft-Transmission of Citrus Handbook for detection and diagnosis. IOCV.FAO.286p.

Roy A., Fayad A., Barthe G., and Brlansky R.H. 2005. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple virus in citrus tree. *J. Virol. Meth.* 129: 47-55.

Whiteside J.O., Garney S.M. and Timmer L.M. 1998. *Compendium of Citrus Disease*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 80p.

Table 1 Crinkly leaf samples from pummelo and lime

Provinces	Plant	No.
Chiang rai	Pummelo (Thong Dee cultivar)	5
Sukhothai	Pummelo (Thong Dee cultivar)	3
Chainat	Pummelo (Thong Dee cultivar)	3
Chainat	Pummelo (Khao Tang Kwa cultivar)	4
Chainat	Tahiti lime	2
Pathum Thani	Lime (Manao pan cultivar)	1
Nakhon Pathom	Pummelo (Thong Dee cultivar)	3
Nonthaburi	Pummelo (Thong Dee cultivar)	1
Chaiyaphum	Pummelo (Thong Dee cultivar)	5
Chumphon	Pummelo (Thong Dee cultivar)	1
Nakhon Si Thammarat	Pummelo (Tubtim Siam cultivar)	3
Nakhon Si Thammarat	Pummelo (Thong Dee cultivar)	1
Nakhon Si Thammarat	Lime (Manao pan cultivar)	1
Phuket	Pummelo (Tubtim Siam cultivar)	1
Phuket	Lime (Manao pan cultivar)	1

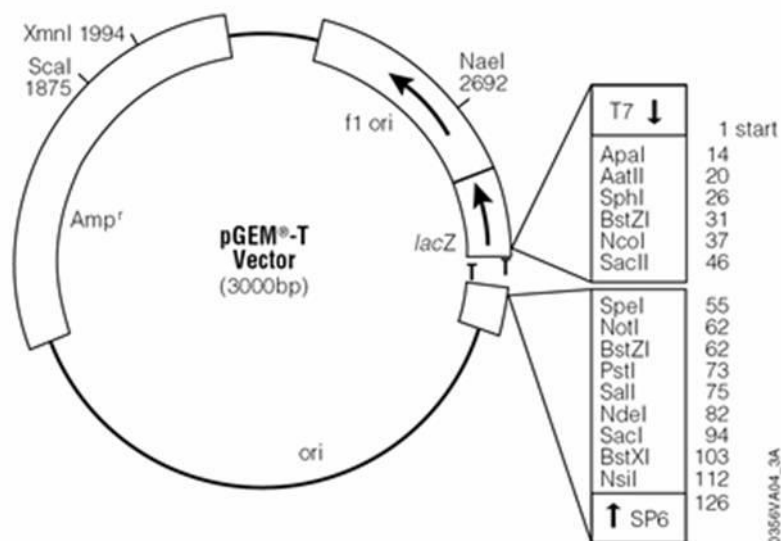


Figure 1 pGEM[®] - T easy vector map

Figure 2 Crinkly leaf disease symptoms on pummelo and lime orchards (A-B) symptoms on lime form Chainat and Nakhon Si Thammarat provinces, (C-D)

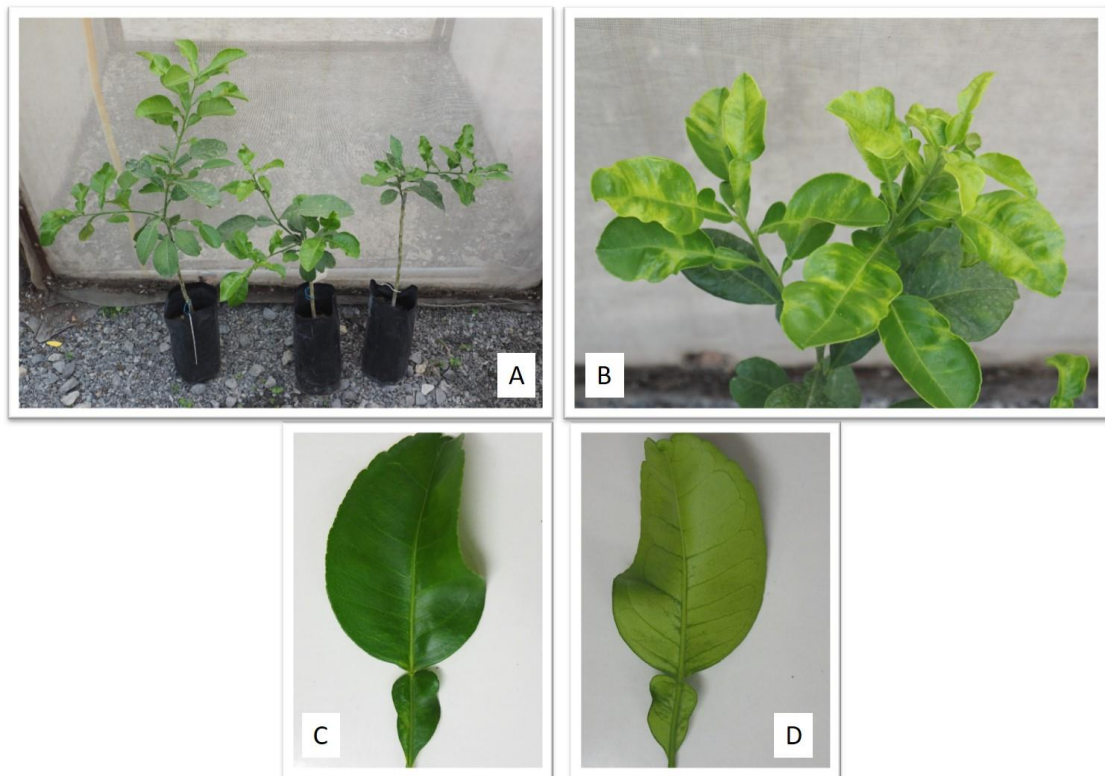


Figure 3 Pummelo seedlings show crinkly disease symptoms (A), Symptoms on young leaves is noticeable (B), Concave into one side of the leaf (C), Blotchy symptoms along midrib on lower surface of the leaf

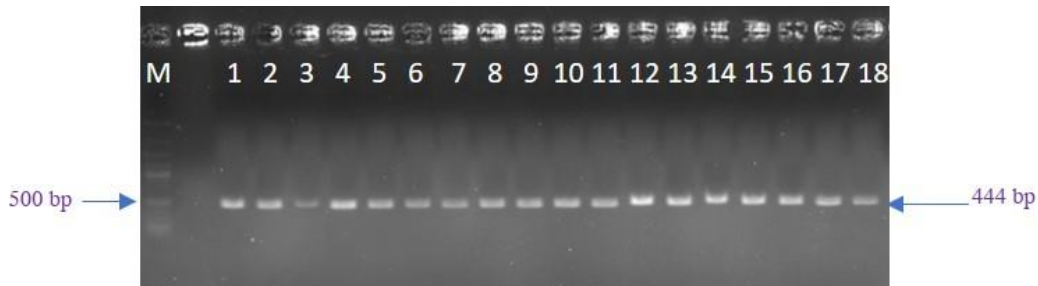


Figure 4 Gel electrophoresis of crinkly leaf samples show PCR product about 444 bp. Electrophoresis is on 1.5% agarose gel of DNA amplified using 3202fw/6rev primers

```

GTGCTGTGTTTCGACCCGTTTCTTGCACTGGATCATGGCATGAAGGTGTGGGTCTCCGGATTCGTG
GAGTTCCTCACACACGCACATGTAAGTGATTGTGAATCGTGCGAGTGTTAGTCGAAGGAAAGCTT
GGAGGTGTTCCCTTGGTGCATGGGCACTTGGGGTATGTAAGGAAAATATTTTTGGCTGAGAATCGG
AAGCTAGAGGAAGTGAAGCCATGTTGTACGGATTGGTGGAGGAAAGATTAGCCCCCTTATGGTA
GTGGGAGTGGGAGTGCCAATTTTATATAATATTACAGGCACTCCCACTGTGACACGTGGCAGTTTA
GCAGCCACAAACAGAGATATGATGGAGAGATGCTCTACGTGGAATAACCTGAGGCCGTTAGATTT
GTGTTTCTCACTTTAAATAATAACCATTGGATGAGCTATCCATGCGAATCCC

```

Figure 5 Nucleotide sequence (444 bp) of crinkly leaf pummelo from Chinat province is most similar to *Citrus chlorotic dwarf associated virus* from China



Figure 6 The incision wound on the seedlings to transmit the crinkly leaf disease (A) Seedlings keep in the greenhouse to observe symptoms and transmission.



Figure 7 Pummelo (Thong Dee cultivar) seeds and seedlings from infected tree (A) Vigor seeds (left), abortion seed (right); (B) Pummelo seedlings



Figure 8 Pummelo seedlings (Thong Dee cultivar) from infected trees uninfected with crinkly leaf disease

การพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซ่าของพืชตระกูลส้ม
Development of Chromatographic Paper Strip for Detection of Citrus
Tristeza Virus in Citrus

แสนชัย คำหาล้า กาญจนา วาระวิชนะนี้
สิทธิศักดิ์ แสไพศาล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากการวิเคราะห์สารละลาย Cp-CTV recombinant protein ด้วยเทคนิค ELISA ไม่สามารถตรวจพบโปรตีนเป้าหมายดังกล่าว จึงอยู่ระหว่างการปรับความเข้มข้นของสารละลาย 20% L (+) arabinose ให้เหมาะสมเพื่อกระตุ้นให้แบคทีเรียสามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนเป้าหมายได้มากที่สุด และให้ได้ความเข้มข้นที่เพียงพอสำหรับใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้ผลิตโพลีโคบอลแอนติบอดีเพื่อนำไปผลิตเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปได้

คำหลัก : โรคทริสเทซ่า, แอนติบอดี, Citrus Tristeza virus , expression protein, recombinant protein

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-10-61

คำนำ

โรคทริสเทซ่า (Tristeza disease) เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มเกิดจากเชื้อ *Citrus tristeza virus* พบมีการระบาดทั่วโลกและเป็นโรคหนึ่งที่ทำให้ความเสียหายอย่างมากทั้งต่อเกษตรกรรายย่อยจนถึงระดับอุตสาหกรรมปลูกส้มขนาดใหญ่ สำหรับประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกในปี พ.ศ. 2515 โดยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร (ไมตรี, 2534) เชื้อไวรัสสาเหตุโรคจัดอยู่ในสกุล *Closterovirus* วงศ์ *Closteroviridae* จัดเป็นไวรัสขนาดใหญ่ที่สุดที่เข้าทำลายพืชมีลักษณะอนุภาคยาวคล้ายเส้นด้าย (thread-like particle) ขนาดอนุภาค 11 x 2,000 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวเส้นบวม (plus single strand RNA, อยู่หนาแน่นภายในระบบลำเลียงของพืชโดยเฉพาะท่ออาหารของพืช (phloem))

ลักษณะอาการของโรค พืชตระกูลส้มสามารถติดเชื้อ *Citrus tristeza virus* ได้ทุกชนิด แต่มีระดับความรุนแรงของโรคไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์พืช สายพันธุ์เชื้อไวรัส รวมถึงภาวะแวดล้อมอื่นๆ ที่พืชได้รับในขณะที่พืชถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย ในมะนาวจะแสดงอาการชัดเจนที่สุด โดยมีอาการใบเหลืองซีดคล้ายกับอาการขาดธาตุอาหาร ใบมีขนาดเล็ก หนาผิดปกติ ขอบใบม้วนเข้า ในใบอ่อนเส้นใบจะแสดงอาการเป็นขีดโปร่งแสง (vein clearing) ส่วนใบแก่เส้นใบจะนูนแข็งและแตก ต้นพืชที่ได้รับเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรงจะแสดงอาการแคระแกร็น ให้ผลผลิตต่ำและตายไปในที่สุด ในพืชตระกูลส้มอื่นๆ ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มตรา และส้มโอ อาการของโรคไม่รุนแรงหรือแสดงอาการชัดเจนเท่ากับมะนาว ในระยะแรกของการติดเชื้ออาการไม่ปรากฏชัดเจน แต่เมื่อต้นส้มให้ผลผลิตแล้ว 1-2 ปี และต้นส้มเริ่มอ่อนแอลงจะแสดงอาการใบกลับ ไม่เขียวสดขึ้น คล้ายอาการขาดน้ำ หากต้นส้มติดลูกดกมากเกินไปจะสลัดใบและลูกทิ้งแล้วแสดงอาการทรุดโทรม การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสทริสเทซ่าสามารถเกิดขึ้นได้ 3 วิธี คือ การติดไปกับกิ่งพันธุ์ซึ่งได้มาจากต้นแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อไวรัส การติดตาทาบกิ่งจากการใช้ตาหรือกิ่งพันธุ์ที่ไม่ปลอดโรค และการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน มีเพลี้ยอ่อนหลายชนิดที่สามารถถ่ายทอดเชื้อ *Citrus tristeza virus* ได้แก่ เพลี้ยอ่อนส้ม (*Toxoptera citricida*), เพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*), เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Toxoptera aurantii*) และเพลี้ยอ่อนผัก (*Apis spiraeicola*)

วิธีการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุในส้มโดยการใช้พืชทดสอบ การติดตาม ทาบกิ่ง อาการบนพืชทดสอบเริ่มปรากฏหลังการถ่ายทอดโรคแล้วอย่างน้อย 1-2 เดือน หรือใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค RT-PCR ซึ่งให้ผลที่แม่นยำ และรวดเร็ว แต่ต้องอาศัยความชำนาญเฉพาะด้านรวมทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการตรวจสอบตาหรือกิ่งพันธุ์ส้มเป็นจำนวนมาก สำหรับเทคนิคทางซีรัมวิทยา เช่น เทคนิค ELISA เป็นวิธีการที่ง่ายและค่าใช้จ่ายน้อยกว่าเทคนิค PCR แต่เนื่องจากปริมาณของเชื้อ *Citrus tristeza virus* ในพืชตระกูลส้มแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ทำให้ประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ยังมีข้อจำกัดเมื่อนำมาตรวจเชื้อ *Citrus tristeza virus* จากพืชตระกูลส้มต่างชนิดกัน ในปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพทำให้สามารถสังเคราะห์ coat protein (Cеровska et. al., 2003) ของเชื้อไวรัส CTV ในเซลล์แบคทีเรีย (รัตนนา 2555, ยุพา, 2556) ได้ในปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งสามารถนำไปผลิตแอนติซีรัมที่มีความบริสุทธิ์และคุณภาพสูงเพิ่มขึ้นได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- สิ่งที่ใช้ในการทดลอง
- 1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคและตัวอย่างพืชปกติ
- 2. โปรตีนลูกผสมของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ *Citrus tristeza virus*
- 3. สัตว์ทดลอง
- 4. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
 - โกร่งบดตัวอย่าง
 - เพลทเลี้ยงเชื้อ
- วัสดุที่ใช้ประยุกต์ตรวจสอบ Immuno Strip เช่น nitrocellulose membrane AE99, sample pad, conjugate pad, absorption pad, backing pad
 - แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane ; NCM)
 - ปากกาทึบหมึกซึม (ขนาดปาก 0.5-0.7 มิลลิเมตร) พู่กันเบอร์ 0, ไม้บรรทัด
 - หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
 - ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
 - เครื่องซั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง
 - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
 - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ
- 5. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่
 - อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป
 - Tryptone
 - Yeast Extract Powder
 - ชุดสกัด Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany)
 - Goat anti-rabbit IgG
 - สารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (Colloidal Gold)
 - competent cell (E. coli สายพันธุ์ Top 10) (Invitrogen, USA)
 - ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.)

วิธีการ

1. การเตรียม starter gene

การเตรียม starter gene โดยนำโคลนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 จำนวน 1 โคลนี ตรวจสอบแล้วว่ามิพลาสมิดสายผสมขึ้นของยีน CTV-CP-adapter gene/6xHisTag ใน pBAD/His A expression vector มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง หรือ ข้ามคืน

2. กระบวนการแสดงออกของโปรตีนลูกผสม Cp-CTV recombinant protein

นำสารแขวนลอย (starter gene) ปริมาตร 1 มิลลิิตร มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ 2XYT ปริมาตร 200 มิลลิิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิิตร) เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.5 – 0.7 จากนั้นทำการเหนี่ยวนำการ

สังเคราะห์โปรตีนด้วยการเติมสารละลาย 2 เท่าของ 20% L-(+)-Arabinose ลงในสารละลายเซลล์แขวนลอย แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเซลล์เมื่อเวลาตามกำหนดเวลาที่ 4, 6, 8 และ 10 ชั่วโมง ตามลำดับ

3. วิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำมาแยกวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่ได้ด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 4-20% Novex® Tris-Glycine Mini Gels, 1.0 mm, 10 well (Invitrogen, USA) ด้วยเครื่อง XCell SureLock® Mini-Cell (Novex®) (Invitrogen, USA) และนำแผ่นเจลมาย้อมด้วยสารละลาย SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, USA) เพื่อตรวจดูขนาดและปริมาณของ fusion protein (Cp-CTV recombinant protein) โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Novex sharp Ph protein standard, Invitrogen, USA)

4. การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสม CTV-CP-adapted gene/6xHisTag ใน pBAD/His A expression vector จำนวน 1 โคโลนี มาเลี้ยงอาหารในเหลว 2XYT ที่เติมแอมพิซิลลิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนโดยการเติมสารละลาย 2 เท่าของ 20% L-(+)-Arabinose เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ ทำการเก็บตะกอนเซลล์ในช่วงเวลาที่มีการผลิตโปรตีนมากที่สุด นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใสทิ้งและสกัดโปรตีนดังกล่าวด้วยวิธี denature condition และวิธี native condition โดยการเติม buffer A, pH 8.0 (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0.5 mM EDTA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มี lysozyme ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรีย และ Freeze/Thaw เซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสหรือใช้ในโตรเจนเหลว จำนวน 3-4 ครั้ง เพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ทำการเก็บส่วนใส (supernatant) ไว้เพื่อนำไปใช้ในการสกัด fusion protein ให้บริสุทธิ์ ส่วนตะกอนเก็บมาสกัดโปรตีนเป็นแบบ denature condition โดยเติม buffer C, (8 M Urea, 1 M NaCl, 500 mM Tris-HCl) และทำการเก็บส่วนใส (supernatant) ไว้เพื่อตรวจหาปริมาณ fusion protein ที่เหลืออยู่ วิธีการสกัด fusion protein ให้บริสุทธิ์ทำโดยเตรียมคอลัมน์ขนาด 10 ml ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA) ปริมาตร 2 ml จากนั้นนำส่วนน้ำใส (supernatant) นำมาเติมลงใน column ทำการล้าง column ด้วย washing buffer C (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl 8 M Urea ; pH 6.3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นล้าง column ด้วย buffer D ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง และทำการแยกเอาส่วน fusion protein ออกจาก column โดยการเติม elution buffer E (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea ; pH 4.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 6 ครั้ง ตรวจวิเคราะห์ขนาด ปริมาณ และความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (ตามกรรมวิธีในข้อ 3)

5. ทำการบันทึกข้อมูลและจัดทำรายงาน

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2560-กันยายน 2563

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรียนทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดสอบสกัดโปรตีนลูกผสมของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ *Citrus tristeza virus* (Cp-CTV recombinant protein) ด้วยชุด ProBond™ Nickel-Chelating Purification System และตรวจสอบสารละลาย Cp-CTV recombinant protein ด้วยเทคนิค ELISA ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสทริสเทซ่า (บริษัท Agdia) ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 พบว่า ตัวอย่างที่นำมาทดสอบให้ค่าเป็นลบ ทั้งนี้อาจเนื่องจากยังไม่สามารถแยกโปรตีนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนออกจาก โปรตีนเป้าหมายได้จึงส่งผลให้ตรวจไม่พบ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ได้ทดสอบสกัด Cp-CTV recombinant protein ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด ProBond™ Nickel-Chelating Purification System เพื่อให้ได้โปรตีนลูกผสมของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส *Citrus tristeza virus* (cp-CTV) สำหรับใช้เป็นแอนติเจนและทำการตรวจสอบโปรตีนที่ได้ด้วยเทคนิค ELISA กับแอนติบอดี As-CTV (Agdia®) ได้ผลเป็นลบ ดังนั้นจึงอยู่ระหว่างการปรับความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย 20% L (+) Arabinose ที่เหมาะสมกระตุ้นให้ยีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ *Citrus tristeza virus* (cp-CTV) สามารถผลิต Cp-CTV recombinant protein ได้ เพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบต่อขั้นตอนการแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ใช้เป็นแอนติเจน ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

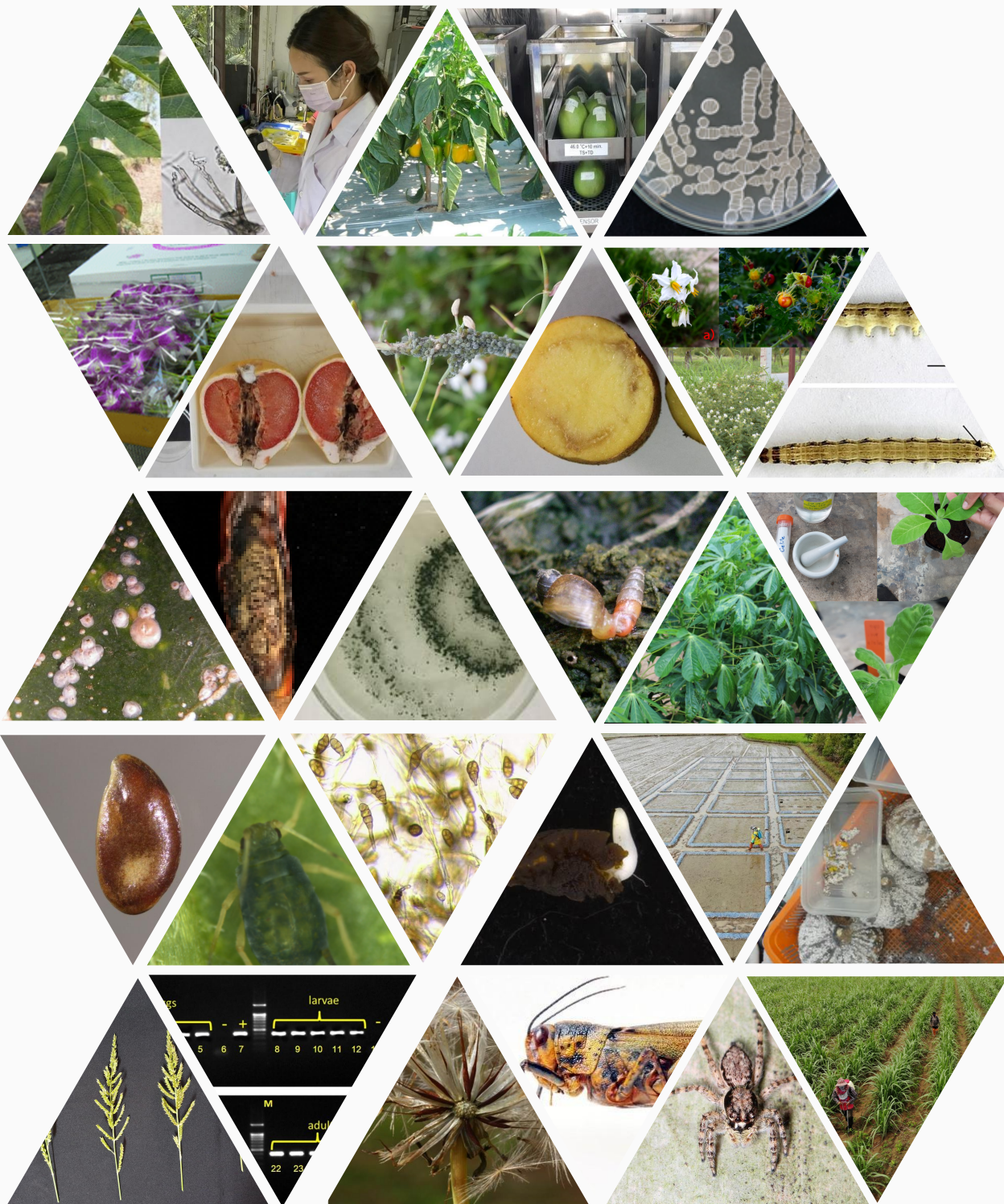
- ไมตรี พรหมมินทร์. 2534. โรคทริสเทซ่าและโรคใบเหลืองต้นโทรมหรือโรคกรีนนิ่ง. เอกสารวิชาการ เทคโนโลยีป้องกันและกำจัดโรคส้ม กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืชกรมส่งเสริมการเกษตร. หน้า 41 – 47.
- ยุพา โพธิ์แก้ว. 2556. การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในพืชตระกูลส้ม. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัตนา สดุดี. 2555. การพัฒนาการตรวจโรคทริสเทซ่าของส้มโดยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีคลาเทอรัลโพลี. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- Cerovska, N., T. Moravec, P. Rosecka, P. Dedic and M. Filigarova. 2003. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of Potato mop-top virus. *Journal of Phytopathology* 151 (4) : 195-200.

ผู้รวบรวมและแก้ไข

นางสาวภัทรพร	สรรพนุเคราะห์
นางสาวดารารพร	รินทะรักษ์
นางสาวอมรรักษ์	คิดใจเดียว
นางสาวกาญจนา	วาระวิชะนี
นางสาวธัญชนก	จงรักไทย
นางสาวภัทรพิชชา	รุจิระพงศ์ชัย
นางสาวชลธิชา	รักใคร่
นางวรัญญา	มาลี
นางศรีจันทร์	ศรีจันทร์
นางสาววิภาดา	ปลอดครบุรี

ผู้สอบทาน

นางสาวจิราภรณ์	สินทร
นางสาวสมฤทัย	ทองคมขำ



Annual Report 2019



กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์